(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116209755 A
(43)申请公布日 2023.06.02

(21)申请号 202180056722.7

(22)申请日 2021.06.03

(30)优先权数据
63/034,346 2020.06.03 US
63/037,535 2020.06.10 US
63/040,998 2020.06.18 US
63/092,481 2020.10.15 US
63/116,083 2020.11.19 US
63/124,676 2020.12.11 US
63/156,883 2021.03.04 US
63/178,472 2021.04.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.03

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/035781 2021.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/247924 EN 2021.12.09

(71)申请人 猛犸生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 卢卡斯·本杰明·哈林顿
威廉·道格拉斯·赖特 刘佩琪
本杰明·朱利叶斯·劳奇
维普特拉·贾亚·哈托诺
布里奇特·安·潘恩·麦凯
达努塔·萨斯特雷·菲普斯
郑宇轩 尼雷亚·桑维森斯
肖恩·陈 大卫·佩兹-埃斯皮诺

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 9/22(2006.01)

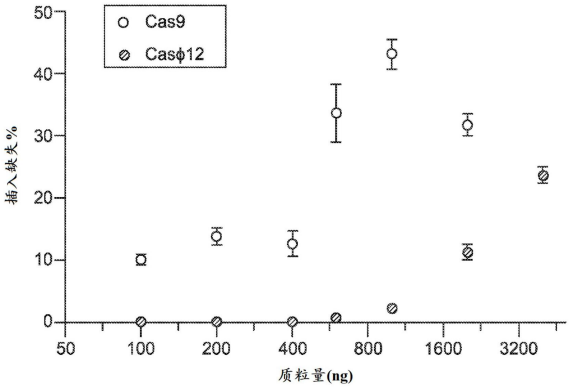
权利要求书21页 说明书244页
序列表（电子公布） 附图120页

(54)发明名称

可编程核酸酶和使用方法

(57)摘要

在某些实施方案中，本文提供了可编程核酸酶、指导核酸及其复合物。本文提供的某些可编程核酸酶包含RuvC结构域。本文还提供了编码所述可编程核酸酶和指导核酸的核酸。本文还提供了基因组编辑的方法、调节基因表达的方法以及用所述可编程核酸酶和指导核酸检测核酸的方法。



CN 116209755 A

1.一种组合物,其包含:

a)可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ IDNO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,和

b)指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其中所述指导核酸包含含有与靶核酸序列互补的核苷酸序列的区域和附加区域,其中所述区域和所述附加区域彼此异源。

2.如权利要求1所述的组合物,其中所述指导核酸的附加区域与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85%的序列同一性。

3.如权利要求1所述的组合物,其中所述指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95%的序列同一性的序列。

4.如权利要求1所述的组合物,其中所述指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

5.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶具有切口酶活性。

6.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶具有双链切割活性。

7.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90%的序列同一性。

8.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。

9.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少98%的序列同一性。

10.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。

11.如权利要求1所述的组合物,其中所述指导核酸不包含tracrRNA。

12.如权利要求1所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶在约20℃至约25℃的温度下与所述指导核酸复合时与在约37℃的温度下形成复合物相比具有更强的切口酶活性。

13.如权利要求1所述的组合物,其中所述附加区域与SEQ IDNO:57具有至少98%的序列同一性。

14.如权利要求13所述的组合物,其中与和包含SEQ ID NO:49的指导核酸复合时相比,所述可编程CasΦ核酸酶和与包含与SEQ IDNO:57具有至少98%的序列同一性的序列的指导核酸复合时具有更强的切口酶活性。

15.如权利要求1所述的组合物,其中与双链切割活性相比,所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的切口活性。

16.如权利要求1所述的组合物,其中与切口活性相比,所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的双链切割活性。

17.如权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域中的单个活性位点,所述活性位点能够催化pre-crRNA加工和核酸的切口或切割。

18.如权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶识别5'-TBN-3'的原型间隔区相邻基序(PAM),其中B是C、G或T中的一种或多种。

19.如权利要求18所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶识别5'-TTTN-3'的原型

间隔区相邻基序(PAM)。

20.一种修饰靶核酸序列的方法,所述方法包括:

使靶核酸序列与可编程CasΦ核酸酶和指导核酸接触,所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,

其中所述可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列,从而修饰所述靶核酸序列。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶在所述靶核酸序列中引入双链断裂。

22.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶具有双链切割活性。

23.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列的单链。

24.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶具有切口酶活性。

25.如权利要求20所述的方法,其中与双链切割活性相比,所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的切口活性。

26.如权利要求20所述的方法,其中与切口活性相比,所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的双链切割活性。

27.如权利要求20所述的方法,其中所述靶核酸是DNA。

28.如权利要求20所述的方法,其中所述靶核酸是双链DNA。

29.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶切割所述双链DNA的非靶链,其中所述非靶链与所述指导核酸不互补。

30.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶不切割所述双链DNA的靶链,其中所述靶链与所述指导核酸互补。

31.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90%的序列同一性。

32.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。

33.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少98%的序列同一性。

34.如权利要求20所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。

35.如权利要求20所述的方法,其中所述指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85%的序列同一性的序列。

36.如权利要求20所述的方法,其中所述指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95%的序列同一性的序列。

37.如权利要求20所述的方法,其中所述指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

38.如权利要求20所述的方法,其中所述指导核酸不包含tracrRNA。

39.如权利要求20所述的方法,其中所述靶核酸序列包含突变序列或与疾病相关的序列。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述突变序列在所述可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列后被去除。

41.如权利要求20所述的方法,其中所述靶核酸序列在人类细胞中。

42.如权利要求20所述的方法,其中所述方法在体内进行。

43.如权利要求20所述的方法,其中所述方法在体外进行。

44.如权利要求20所述的方法,所述方法还包括将供体多核苷酸插入所述靶核酸序列的切割位点处。

45.一种在靶核酸中引入断裂的方法,所述方法包括:使所述靶核酸与以下接触:

(a)第一指导核酸,其包含结合于与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性的第一可编程切口酶的区域;和

(b)第二指导核酸,其包含结合于与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性的第二可编程切口酶的区域,

其中所述第一指导核酸包含与所述靶核酸结合的第一附加区域,并且其中所述第二指导核酸包含与所述靶核酸结合的第二附加区域,并且其中所述第一指导核酸的第一附加区域和所述第二指导核酸的附加区域结合所述靶核酸的相反链。

46.如权利要求45所述的方法,其中所述第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ IDNO.105、SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90%的序列同一性。

47.如权利要求45所述的方法,其中所述第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ IDNO.105、SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。

48.如权利要求45所述的方法,其中所述第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105、SEQ ID NO.107和组成的组的序列。

49.如权利要求45所述的方法,其中所述第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85%的序列同一性的序列。

50.如权利要求45所述的方法,其中所述第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95%的序列同一性的序列。

51.如权利要求45所述的方法,其中所述第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

52.如权利要求45所述的方法,其中与双链切割活性相比,所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶表现出更强的切口活性。

53.如权利要求45所述的方法,其中所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶在两个不同位点对所述靶核酸进行切口。

54.如权利要求45所述的方法,其中所述靶核酸包含双链DNA。

55.如权利要求53所述的方法,其中所述两个不同位点位于所述双链DNA的相反链上。

56.如权利要求45所述的方法,其中所述靶核酸包含突变序列或与疾病相关的序列。

57.如权利要求56所述的方法,其中所述突变序列在所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶对所述靶核酸进行切口之后被去除。

58.如权利要求45所述的方法,其中所述靶核酸在细胞中。

59.如权利要求45所述的方法,其中所述方法在体内进行。

60.如权利要求45所述的方法,其中所述方法在体外进行。

61.如权利要求45-60中任一项所述的方法,其中所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶是相同的。

62.如权利要求45-60中任一项所述的方法,其中所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶是不同的。

63.一种检测样品中靶核酸的方法,所述方法包括

使包含靶核酸的样品与以下接触

(a)可编程CasΦ核酸酶,其与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85%的序列同一性;

(b)指导RNA,其包含与所述可编程CasΦ核酸酶结合的区域和与所述靶核酸结合的附加区域;和

(c)标记的单链DNA报告基因,其不与指导RNA结合;

通过所述可编程CasΦ核酸酶切割所述标记的单链DNA报告基因以释放出可检测标记;和

通过测量来自所述可检测标记的信号来检测所述靶核酸。

64.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸是单链DNA。

65.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸是双链DNA。

66.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸是病毒核酸。

67.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸是细菌核酸。

68.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸来自人类细胞。

69.如权利要求63所述的方法,其中所述靶核酸是胎儿核酸。

70.如权利要求63所述的方法,其中所述样品来源于受试者的唾液、血液、血清、血浆、尿液、吸出物或活检样品。

71.如权利要求63所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105、SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。

72.如权利要求63所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。

73.如权利要求63所述的方法,其中所述指导RNA与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少约95%的序列同一性。

74.如权利要求63所述的方法,其中所述指导RNA包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

75.如权利要求63所述的方法,其中所述样品包含磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液或HEPES缓冲液。

76.如权利要求63所述的方法,其中所述样品具有7至9的pH。

77.如权利要求63所述的方法,其中所述样品具有7.5至8的pH。

78.如权利要求63所述的方法,其中所述样品具有25nM至200mM的盐浓度。

79.如权利要求63所述的方法,其中所述单链DNA报告基因包含ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因。

80.如权利要求63所述的方法,其中所述ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因是通用的ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因。

81.如权利要求63所述的方法,其中所述可编程CasΦ核酸酶表现出PAM非依赖性切割。

82.一种调控细胞中基因转录的方法,所述方法包括:向包含靶核酸序列的细胞中引入以下:

(i)融合多肽或编码所述融合多肽的核酸,其中所述融合多肽包含:

(a)dCasΦ核酸酶,其与选自SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,其中所述dCasΦ多肽是酶促失活的;和

(b)具有转录调节活性的多肽;和

(ii)指导核酸,或包含编码所述指导核酸的核苷酸序列的核酸,其中所述指导核酸包含与所述dCasΦ多肽结合的区域和与所述靶核酸结合的附加区域;

其中通过作用于所述靶核酸序列的融合多肽来调控所述基因转录。

83.如权利要求82所述的方法,其中所述dCasΦ多肽与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。

84.如权利要求82所述的方法,其中所述指导核酸与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少约95%的序列同一性。

85.如权利要求82所述的方法,其中所述指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

86.如权利要求82所述的方法,其中所述指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

87.如权利要求82所述的方法,其中所述包含转录调节活性多肽的多肽具有转录激活活性。

88.如权利要求82所述的方法,其中所述包含转录调节活性多肽的多肽具有转录抑制活性。

89.如权利要求82所述的方法,其中所述包含转录调节活性多肽的多肽具有选自由以下组成的组的活性:转录激活活性、转录抑制活性、核酸酶活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、组蛋白乙酰转移酶活性、核酸结合活性、DNA甲基化酶活性、直接或间接DNA脱甲基酶活性、甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷化活性、去腺苷化活性、脱氨酶活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆蔻酰化活性和去豆蔻酰化活性。

90.一种组合物,其包含:

a)Cas核酸酶或编码所述Cas核酸酶的核酸,和

b)指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其中所述指导核酸包含含有与靶核酸序列互补的核苷酸序列的区域和附加区域,其中所述区域和所述附加区域彼此异源;

其中所述Cas核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸。

91.如权利要求90所述的组合物,其中所述RuvC结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。

92.如权利要求90或91所述的组合物,其中所述Cas核酸酶是如权利要求1-18中任一项

所述的可编程CasΦ核酸酶。

93.如权利要求90-92中任一项所述的组合物,其中所述Cas核酸酶识别5'-TBN-3'的原型间隔区相邻基序(PAM),其中B是C、G或T中的一种或多种。

94.如权利要求93所述的组合物,其中所述Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTTN-3',任选地其中所述PAM是5'-TTTN-3'。

95.如权利要求93所述的组合物,其中所述PAM是5'-GTTK-3'、5'-VTTK-3'、5'-VTTS-3'、5'-TTTS-3'或5'-VTTN-3',其中K是G或T,V是A、C或G,并且S是C或G。

96.如权利要求90-94中任一项所述的组合物,其中所述组合物用于如权利要求20-89中任一项所述的方法。

97.可编程CasΦ核酸酶根据权利要求20至44所述的方法修饰靶核酸序列的用途。

98.第一可编程切口酶和第二可编程切口酶根据权利要求45至62所述的方法在靶核酸中引入断裂的用途。

99.可编程CasΦ核酸酶根据权利要求63至81所述的方法检测样品中靶核酸的用途。

100.dCasΦ多肽根据权利要求82至89所述的方法调控细胞中基因转录的用途。

101.如权利要求1-19或45-100中任一项所述的组合物,其中所述区域是间隔区域并且所述附加区域是重复区域。

102.如权利要求1-19或45-100中任一项所述的方法、组合物或用途,其中所述区域是重复区域并且所述附加区域是间隔区域。

103.如权利要求101或102所述的方法、组合物或用途,其中所述重复区域包含GAC序列,任选地其中所述GAC序列位于所述重复区域的3'端。

104.如权利要求101-103所述的方法、组合物或用途,其中所述重复区域包含发夹,任选地其中所述发夹位于所述重复区域的3'部分。

105.如权利要求104所述的方法、组合物或用途,其中所述发夹包含双链茎部分和单链环部分。

106.如权利要求105所述的方法、组合物或用途,其中所述茎部分的一条链包含CYC序列并且所述茎部分的另一条链包含GRG序列,其中Y和R是互补的。

107.如权利要求106所述的方法、组合物或用途,其中所述GAC序列的G在所述发夹的茎部分中。

108.如权利要求105-107中任一项所述的方法、组合物或用途,其中所述茎部分的每条链包含3、4或5个核苷酸。

109.如权利要求105-108中任一项所述的方法、组合物或用途,其中所述环部分包含2和8个之间的核苷酸,任选地其中所述环部分包含4个核苷酸。

110.如权利要求1所述的组合物,其中所述指导核酸与SEQ IDNO:54具有至少98%的序列同一性。

111.根据权利要求101-110中任一项所述的方法、组合物或用途,其中所述重复区域的长度在15和50个核苷酸之间,优选地,其中所述重复区域的长度在19和37个核苷酸之间。

112.根据权利要求101-111中任一项所述的方法、组合物或用途,其中所述间隔区域的长度在15和50个核苷酸之间、15和40个核苷酸之间或15和35个核苷酸之间,优选地,其中所述间隔区域长度在16和30个核苷酸之间。

113.根据权利要求112所述的方法、组合物或用途，其中所述间隔区域的长度在16和20个核苷酸之间。

114.根据权利要求1-19、90-95、101-113中任一项所述的组合物，其中所述可编程CasΦ核酸酶与二价金属离子形成复合物，优选地，其中所述二价金属离子是Mg^{2+}。

115.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且

d)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

116.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且

d)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

117.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105或SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域；

b)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；

c)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；

d)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

118.如权利要求115-117所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸，其中所述RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。

119.如权利要求115-118所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。

120.如权利要求115-119所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸，其中：

a)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端融合或连接；

b)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的C端融合或连接；或

c)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端和C端融合或连接。

121.一种组合物,其包含如权利要求115-120所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的gRNA。

122.一种组合物,其包含如权利要求115-120所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

123.一种组合物,其包含如权利要求115-120所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,和包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的gRNA,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

124.一种真核细胞,其包含如权利要求115-120所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸。

125.如权利要求124所述的真核细胞,其中所述细胞还包含含有与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的gRNA,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

126.一种载体,其包含如权利要求115-120所述的核酸。

127.如权利要求126所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

128.如权利要求18所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTN-3'。

129.如权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中所述可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTB-3',其中B是C、G或T。

130.如权利要求93所述的组合物,其中所述Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTN-3',任选地其中所述PAM是5'-TTN-3'。

131.如权利要求90-94中任一项的组合物,其中所述Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTK-3'、5'-VTTK-3'、5'-VTTS-3'、5'-TTTS-3'或5'-VTTN-3',其中K是G或T,V是A、C或G,并且S是C或G。

132.如权利要求90-94中任一项所述的组合物,其中所述Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTB-3',其中B是C、G或T。

133.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

134.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

135.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

136.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

137.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

138.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的

靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

139.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

140.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

141.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

142.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程

CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;并且

d)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

143.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;并且

d)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

144.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;并且

d)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

145.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

146.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程

CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

147.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

148.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

149.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

150.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

151.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

152.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

153.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的

靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

154.如权利要求133-153中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。

155.如权利要求133-154中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。

156.如权利要求133-155中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中:

a)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端融合或连接;

b)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的C端融合或连接;或

c)所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端和C端融合或连接。

157.一种组合物,其包含如权利要求133-156中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的gRNA。

158.如权利要求157所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

159.如权利要求158所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

160.一种组合物,其包含如权利要求133-156所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

161.一种组合物,其包含如权利要求133-156中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,和包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的gRNA,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

162.如权利要求161所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

163.如权利要求162所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

164.一种真核细胞,其包含如权利要求133-156中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸。

165.如权利要求164所述的真核细胞,其中所述细胞还包含gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。

166.如权利要求165所述的真核细胞,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

167.如权利要求166所述的真核细胞,其中所述种子区域包含16个核苷。

168.一种载体,其包含如权利要求133-156中任一项所述的核酸。

169.如权利要求168所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

170.一种指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其包含与以下相同或相差不超过5、4、3、2或1个核苷酸的序列:

a)从表A至AH的序列;或

b)包含来自表2的重复区序列和来自表A至H的间隔区序列的序列。

171.如权利要求170所述的指导核酸,其包含:

a)从表A至AH的序列;或

b)包含来自表2的重复区序列和来自表A至H的间隔区序列的序列。

172.如权利要求170或权利要求171所述的指导核酸,其中所述指导核酸包含RNA和/或DNA。

173.如权利要求172所述的指导核酸,其中所述指导核酸是指导RNA。

174.一种复合物,其包含如权利要求171至173中任一项所述的指导核酸和可编程CasΦ核酸酶。

175.一种真核细胞,其包含如权利要求165至167中任一项所述的指导核酸。

176.如权利要求175所述的真核细胞,其还包含可编程CasΦ核酸酶。

177.一种载体,其编码如权利要求170至173中任一项所述的指导核酸。

178.如权利要求177所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

179.一种在第一基因中引入第一修饰和在第二基因中引入第二修饰的方法,所述方法包括使细胞与CasΦ核酸酶;与所述第一基因的等长部分至少部分互补的第一指导RNA;和与所述第二基因的等长部分至少部分互补的第二指导RNA接触。

180.如权利要求179所述的方法,其中所述CasΦ核酸酶是CasΦ12核酸酶。

181.如权利要求180所述的方法,其中所述CasΦ12核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或由其组成。

182.如权利要求179-181中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二修饰包括核苷酸的插入、核苷酸的缺失或其组合。

183.如权利要求179-181中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二修饰包括表观遗传修饰。

184.如权利要求179-183中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二突变分别导致所述第一基因和/或第二基因表达减少。

185.如权利要求179-184中任一项所述的方法,其中所述表达减少是至少约10%的减少、至少约20%的减少、至少约30%的减少、至少约40%的减少、至少约50%的减少、至少约60%的减少、至少约70%的减少、至少约80%的减少或至少约90%的减少。

186.如权利要求179-185中任一项所述的方法,其包括使所述细胞与靶向三种不同基因的三种不同指导RNA接触。

187.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少85%的序列同一性。

188.如权利要求187所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少90%的序列同一性。

189.如权利要求187所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少95%的序列同一性。

190.如权利要求187所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少98%的序列同一性。

191.如权利要求187所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或由其组成。

192.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少85%的序列同一性。

193.如权利要求192所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少90%的序列同一性。

194.如权利要求192所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少95%的序列同一性。

195.如权利要求192所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少98%的序列同一性。

196.如权利要求192所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或由其组成。

197.一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少85%的序列同一性。

198.如权利要求197所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少85%的序列同一性。

199.如权利要求197所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少90%的序列同一性。

200.如权利要求197所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少95%的序列同一性。

201.如权利要求197所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少98%的序列同一性。

202.如权利要求197所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:32或由其组成。

203.如权利要求187至202中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。

204.如权利要求203所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合。

205.如权利要求187至204中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割靶核酸。

206.如权利要求187至205中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割靶核酸。

207.一种组合物,其包含如权利要求187-206中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的指导核酸。

208.如权利要求207所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷

的种子区域。

209.如权利要求209所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

210.一种组合物,其包含如权利要求187-206所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

211.一种组合物,其包含如权利要求187-206中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸,和包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域的指导核酸,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

212.如权利要求211所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

213.如权利要求212所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

214.一种真核细胞,其包含如权利要求187-206中任一项所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸。

215.如权利要求214所述的真核细胞,其中所述细胞还包含指导核酸,所述指导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。

216.如权利要求215所述的真核细胞,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

217.如权利要求217所述的真核细胞,其中所述种子区域包含16个核苷。

218.一种载体,其包含如权利要求187-206中任一项所述的核酸。

219.如权利要求218所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

220.如权利要求168或权利要求218所述的载体,其中所述载体还包含编码指导核酸的核酸,其中所述指导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。

221.如权利要求220所述的载体,其中所述指导核酸是指导RNA。

222.如权利要求168、219-221中任一项所述的载体,其中所述还包含供体多核苷酸。

223.如权利要求207或权利要求211所述的组合物或如权利要求215所述的真核细胞,其中所述指导核酸是指导RNA。

224.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述可编程核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

225.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

226.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

227.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;并且

d)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

228.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的所述靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;并且

e)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

229.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

e)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

230.一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中

a)所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;

b)包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;

c)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;

d)所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是具有5'悬突的交错切割;

e)所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中指导RNA的第二区域;并且

f)所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

231.如权利要求224-230中任一项所述的可编程核酸酶或核酸,其中所述RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。

232.如权利要求224-231中任一项所述的可编程核酸酶或核酸,其中所述可编程核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。

233.如权利要求232所述的可编程核酸酶或核酸,其中:

a)所述一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的N端融合或连接;

b)所述一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的C端融合或连接;或

c)所述一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的N端和C端融合或连接。

234.一种组合物,其包含如权利要求224-233中任一项所述的可编程核酸酶或核酸,以及包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域的gRNA。

235.如权利要求234所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

236.如权利要求235所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

237.一种组合物,其包含如权利要求224-233所述的可编程核酸酶或核酸,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

238.一种组合物,其包含如权利要求224-233中任一项所述的可编程核酸酶或核酸,和包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域的gRNA,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

239.如权利要求238所述的组合物,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

240.如权利要求239所述的组合物,其中所述种子区域包含16个核苷。

241.一种真核细胞,其包含如权利要求224-233中任一项所述的可编程核酸酶或核酸。

242.如权利要求241所述的真核细胞,其中所述细胞还包含gRNA,所述gRNA包含与真核

基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域。

243.如权利要求242所述的真核细胞,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。

244.如权利要求243所述的真核细胞,其中所述种子区域包含16个核苷。

245.一种载体,其包含如权利要求224-233中任一项所述的核酸。

246.如权利要求245所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

247.一种复合物,其包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。

248.如权利要求224所述的复合物,其中所述第一可编程CasΦ核酸酶和所述第二可编程CasΦ核酸酶是相同的可编程CasΦ核酸酶。

249.一种二聚体,其包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。

250.一种同源二聚体,其包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。

251.一种修饰包含靶核酸的细胞的方法,所述方法包括将如权利要求1-19、90-95、157-159、207-209、234-236中任一项所述的组合物引入所述细胞,其中所述可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或所述cas核酸酶切割所述靶核酸,从而修饰所述细胞。

252.一种修饰包含靶核酸的细胞的方法,所述方法包括向所述细胞引入:(i)所述可编程CasΦ核酸酶或如权利要求115-120、133-156、187-206或224-233中任一项所述的可编程核酸酶,和(ii)指导核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶或可编程Cas核酸酶切割所述靶核酸,从而修饰所述细胞。

253.如权利要求252所述的方法,其中所述指导核酸是指导RNA。

254.如权利要求251-253中任一项所述的方法,其中所述方法还包括将供体多核苷酸引入所述细胞。

255.如权利要求254所述的方法,其中所述方法包括将所述供体多核苷酸插入所述靶核酸的切割位点处。

256.如权利要求251-255中任一项所述的方法,其中所述细胞是真核细胞,优选地是人类细胞。

257.如权利要求256所述的方法,其中所述细胞是T细胞。

258.如权利要求257所述的方法,其中所述T细胞是CAR-T细胞。

259.如权利要求256所述的方法,其中所述细胞是干细胞。

260.如权利要求259所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞。

261.如权利要求259所述的方法,其中所述干细胞是多能干细胞,优选地是诱导多能干细胞。

262.一种经修饰的细胞,其通过如权利要求251-261中任一项所述的方法获得或可获得。

263.一种经修饰的人类细胞,其通过如权利要求41所述的方法获得或可获得。

264.一种经修饰的细胞,其通过如权利要求58所述的方法获得或可获得。

265.如权利要求264所述的经修饰的细胞,其中所述细胞是真核细胞,优选地是人类细胞。

266.如权利要求263-265中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述细胞是T细胞。

267.如权利要求266所述的经修饰的细胞,其中所述T细胞是CAR-T细胞。

268.如权利要求263-265中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述细胞是干细胞。

269.如权利要求268所述的经修饰的细胞,其中所述细胞是造血干细胞。

270.如权利要求268所述的经修饰的细胞,其中所述细胞是多能干细胞,优选地是诱导多能干细胞。

271.CasΦ核酸酶根据权利要求179至186中任一项所述的方法在第一基因中引入第一修饰和在基因中引入第二修饰的用途。

272.可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或cas核酸酶根据权利要求251至261中任一项所述的方法修饰细胞的用途。

273.如权利要求251或权利要求252所述的方法,其中所述引入包括脂质纳米颗粒递送编码所述可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或cas核酸酶和所述指导核酸的核酸。

274.如权利要求273所述的方法,其中所述核酸还包含供体多核苷酸。

275.如权利要求273或权利要求274所述的方法,其中所述核酸是病毒载体。

276.如权利要求275所述的方法,其中所述病毒载体是AAV载体。

可编程核酸酶和使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年6月3日提交的美国临时申请号:63/034,346、于2020年6月10日提交的美国临时申请号:63/037,535、于2020年6月18日提交的美国临时申请号:63/040,998、于2020年10月15日提交的美国临时申请号:63/092,481、于2020年11月19日提交的美国临时申请号:63/116,083、于2020年12月11日提交的美国临时申请号:63/124,676、于2021年3月4日提交的美国临时申请号:63/156,883和于2021年4月22日提交的美国临时申请号:63/178,472的优先权和权益,每篇的全部内容均通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 某些可编程核酸酶可用于核酸序列的基因组编辑或核酸序列的检测。需要能够在各种样品条件下工作并可用于基因组编辑和诊断的高效、可编程核酸酶。

发明内容

[0004] 在各个方面,本公开提供了一种组合物,其包含:a)可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,和b)指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其中所述指导核酸包含含有与靶核酸序列互补的核苷酸序列的区域和额外区域,其中所述区域和所述额外区域彼此异源。

[0005] 在一些方面,指导核酸的额外区域与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85%的序列同一性。在一些方面,指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95%的序列同一性的序列。在一些方面,指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶具有切口酶活性。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶具有双链切割活性。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90%的序列同一性。

[0006] 在一些方面,可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95%的序列同一性。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少98%的序列同一性。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。在一些方面,指导核酸不包含tracrRNA。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶在约20℃至约25℃的温度下与所述指导核酸复合时与在约37℃的温度下形成复合物相比具有更强的切口酶活性。在一些方面,指导核酸与SEQ ID NO:54具有至少98%的序列同一性。在一些方面,指导核酸与SEQ ID NO:57具有至少98%的序列同一性。在一些方面,与和包含SEQ ID NO:49的指导核酸复合时相比,所述可编程CasΦ核酸酶和与包含与SEQ ID NO:57具有至少98%的序列同一性的序列的指导核酸复合时具有更强的切口酶活性。

[0007] 在一些方面，与双链切割活性相比，所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的切口活性。在一些方面，与切口活性相比，所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的双链切割活性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域中的单个活性位点，所述活性位点能够催化pre-crRNA加工和核酸的切口或切割。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TBN-3'，其中B是C、G或T中的一种或多种。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTTN-3'。

[0008] 在各个方面，本公开提供了一种修饰靶核酸序列的方法，所述方法包括：使靶核酸序列和与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性的可编程CasΦ核酸酶和指导核酸接触，其中所述可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列，从而修饰所述靶核酸序列。

[0009] 在一些方面，可编程CasΦ核酸酶在所述靶核酸序列中引入双链断裂。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶具有双链切割活性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列的单链。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶具有切口酶活性。在一些方面，与双链切割活性相比，所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的切口活性。在一些方面，与切口活性相比，所述可编程CasΦ核酸酶表现出更强的双链切割活性。在一些方面，靶核酸是DNA。在一些方面，靶核酸是双链DNA。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶切割所述双链DNA的非靶链，其中所述非靶链与所述指导核酸不互补。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶不切割所述双链DNA的靶链，其中所述靶链与所述指导核酸互补。

[0010] 在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少98％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。在一些方面，指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85％的序列同一性的序列。在一些方面，指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95％的序列同一性的序列。在一些方面，指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

[0011] 在一些方面，指导核酸不包含tracrRNA。在一些方面，靶核酸序列包含突变序列或与疾病相关的序列。在一些方面，突变序列在所述可编程CasΦ核酸酶切割所述靶核酸序列后被去除。在一些方面，靶核酸序列在人类细胞中。在一些方面，方法在体内进行。在一些方面，方法在体外进行。在一些方面，方法还包括将供体多核苷酸插入所述靶核酸序列的切割位点处。

[0012] 在各个方面，本公开提供了一种在靶核酸中引入断裂的方法，所述方法包括：使所述靶核酸与以下接触：(a)包含与第一可编程切口酶结合的区域的第一指导核酸，所述第一可编程切口酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性；和(b)包含与第二可编程切口酶结合的区域的第二指导核酸，所述第二可编程切口酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，其中所述第一指导核酸包含与所述靶核酸结合

的第一附加区域并且其中第二指导核酸包含与所述靶核酸结合的第二附加区域，并且其中所述第一指导核酸的第一附加区域和所述第二指导核酸的第二附加区域与所述靶核酸的相反链结合。在一些方面，第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少90％的序列同一性。

[0013] 在一些方面，第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95％的序列同一性。在一些方面，第一可编程切口酶、所述第二可编程切口酶或两者包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。在一些方面，第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少85％的序列同一性的序列。在一些方面，第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少95％的序列同一性的序列。在一些方面，第一指导核酸、所述第二指导核酸或两者包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。

[0014] 在一些方面，与双链切割活性相比，所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶表现出更强的切口活性。在一些方面，第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶在两个不同位点对所述靶核酸进行切口。在一些方面，靶核酸包含双链DNA。在一些方面，两个不同位点位于所述双链DNA的相反链上。在一些方面，靶核酸包含突变序列或与疾病相关的序列。在一些方面，突变序列在所述第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶对所述靶核酸进行切口之后被去除。在一些方面，靶核酸在细胞中。在一些方面，方法在体内进行。在一些方面，方法在体外进行。在一些方面，第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶是相同的。在一些方面，第一可编程切口酶和所述第二可编程切口酶是不同的。

[0015] 在各个方面，本公开提供了一种检测样品中靶核酸的方法，所述方法包括使包含靶核酸的样品与以下接触：(a)可编程CasΦ核酸酶，所述核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105，和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性；(b)指导RNA，所述指导RNA包含与所述可编程CasΦ核酸酶结合的区域和与所述靶核酸结合的附加区域；(c)不结合所述指导RNA的标记单链DNA报告基因；通过所述可编程CasΦ核酸酶切割所述标记单链DNA报告基因以释放出可检测的标记；以及通过测量来自所述可检测的标记的信号来检测所述靶核酸。

[0016] 在一些方面，靶核酸是单链DNA。在一些方面，靶核酸是双链DNA。在一些方面，靶核酸是病毒核酸。在一些方面，靶核酸是细菌核酸。在一些方面，靶核酸来自人类细胞。在一些方面，靶核酸是胎儿核酸。在一些方面，样品来源于受试者的唾液、血液、血清、血浆、尿液、吸出物或活检样品。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列。

[0017] 在一些方面，指导RNA与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少约95％的序列同一性。在一些方面，指导RNA包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。在一些方面，样品包含磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液或HEPES缓冲液。在一些方面，样品具有7至9的pH。在一些方面，样品具有7.5至8的pH。在一些方面，样品具有25nM至200mM的盐浓度。

在一些方面，单链DNA报告基因包含ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因。在一些方面，ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因是通用的ssDNA-荧光淬灭DNA报告基因。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶表现出不依赖于PAM的切割。

[0018] 在各个方面，本公开提供了一种调控细胞中基因转录的方法，所述方法包括：将以下引入包含靶核酸序列的细胞：(i)融合多肽或编码所述融合多肽的核酸，其中所述融合多肽包含：(a)dCasΦ多肽，所述dCasΦ多肽与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，其中所述dCasΦ多肽酶促失活；和(b)具有转录调节活性的多肽；和(ii)指导核酸，或包含编码所述指导核酸的核苷酸序列的核酸，其中所述指导核酸包含与所述dCasΦ多肽结合的区域和与所述靶核酸结合的附加区域；其中通过作用于所述靶核酸序列的融合多肽来调控所述基因的转录。

[0019] 在一些方面，dCasΦ多肽与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少95％的序列同一性。在一些方面，指导核酸与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少约95％的序列同一性。在一些方面，指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。在一些方面，指导核酸包含选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列。在一些方面，包含转录调节活性多肽的多肽具有转录激活活性。

[0020] 在一些方面，包含转录调节活性多肽的多肽具有转录抑制活性。在一些方面，包含转录调节活性多肽的多肽具有选自由以下组成的组的活性：转录激活活性、转录抑制活性、核酸酶活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、组蛋白乙酰转移酶活性、核酸结合活性、DNA甲基化酶活性、直接或间接DNA脱甲基酶活性、甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷化活性、去腺苷化活性、脱氨酶活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆蔻酰化活性和去豆蔻酰化活性。

[0021] 在各个方面，本公开提供了一种组合物，其包含：a)Cas核酸酶或编码所述Cas核酸酶的核酸，和b)指导核酸或编码所述指导核酸的核酸，其中所述指导核酸包含含有与靶核酸序列互补的核苷酸序列的区域和附加区域，其中所述区域和所述附加区域彼此异源；其中所述Cas核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割靶核酸。在一些方面，RuvC结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。在一些方面，Cas核酸酶是如本文所公开的所述可编程CasΦ核酸酶。在一些方面，Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TBN-3'，其中B是C、G或T中的一种或多种。在一些方面，Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTTN-3'。在一些方面，Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTN-3'。在一些方面，Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTB-3'，其中B是C、G或T。在一些方面，Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTK-3'、5'-VTTK-3'、5'-VTTS-3'、5'-TTTS-3'或5'-VTTN-3'，其中K是G或T，V是A、C或G，并且S是C或G。在一些方面，组合物用于上述方法中的任一种。

[0022] 在各个方面，本公开提供了可编程CasΦ核酸酶根据上述方法中的任一种来修饰靶核酸序列的用途。在各个方面，本公开提供了第一可编程切口酶和第二可编程切口酶根据上述方法中的任一种在靶核酸中引入断裂的用途。在各个方面，本公开提供了可编程CasΦ核酸酶根据上述方法中的任一种来检测样品中的靶核酸的用途。在各个方面，本公开提供了dCasΦ多肽根据上述方法中的任一种来调控细胞中的基因转录的用途。在一些方面，

区域是间隔区域并且所述附加区域是重复区域。在一些方面，区域是重复区域并且所述附加区域是间隔区域。在一些方面，重复区域包含GAC序列，任选地其中所述GAC序列位于所述重复区域的3'端。在一些方面，重复区域包含发夹，任选地其中所述发夹位于所述重复区域的3'部分。在一些方面，发夹包含双链茎部分和单链环部分。在一些方面，茎部分的一条链包含CYC序列并且所述茎部分的另一条链包含GRG序列，其中Y和R是互补的。在一些方面，GAC序列的G位于所述发夹的茎部分。在一些方面，茎部分的每条链包含3、4或5个核苷酸。在一些方面，环部分包含2和8个之间的核苷酸，任选地其中所述环部分包含4个核苷酸。在一些方面，指导核酸与SEQ ID NO:54具有至少98％的序列同一性。

[0023] 在一些方面，重复区域的长度在15和50个核苷酸之间，优选地，其中所述重复区域的长度在19和37个核苷酸之间。在一些方面，间隔区域的长度在15和50个核苷酸之间、15和40个核苷酸之间或15和35个核苷酸之间，优选地，其中所述间隔区域长度在16和30个核苷酸之间。在一些方面，间隔区域的长度在16和20个核苷酸之间。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与二价金属离子形成复合物，优选地，其中所述二价金属离子是Mg2+。

[0024] 在各个方面，本公开提供了可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0025] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0026] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105或SEQ ID NO.107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中a)所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，b)所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；c)包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；d)所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且e)所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0027] 在一些方面，RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。在一些方面，一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端融合或连接；所述一个或

多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的C端融合或连接;或者所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端和C端融合或连接。在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。

[0028] 在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些情况下,一个方面包括真核细胞,所述真核细胞包含本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸。

[0029] 在一些方面,细胞还包含gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

[0030] 在一些情况下,一个方面包括包含本文所述的核酸的载体。在一些方面,载体是病毒载体。

[0031] 在一些方面,可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTN-3'。在一些方面,可编程CasΦ核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTB-3',其中B是C、G或T。在一些方面,Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-TTN-3',任选地,其中所述PAM是5'-TTN-3'。在一些方面,Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTK-3'、5'-VTTK-3'、5'-VTTS-3'、5'-TTTS-3'或5'-VTTN-3',其中K是G或T,V是A、C或G,并且S是C或G。在一些方面,Cas核酸酶识别原型间隔区相邻基序(PAM)5'-GTTB-3',其中B是C、G或T。

[0032] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0033] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0034] 在各个方面,本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且

其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割,并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0035] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中的所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0036] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中的所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0037] 在各个方面,本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0038] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0039] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5'悬突的交错切割；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0040] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5'悬突的交错切割；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0041] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0042] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0043] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指

导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0044] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0045] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0046] 在各个方面,本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0047] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85%的序列同一性,并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA,所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域,其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中的所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0048] 在各个方面,本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族

PF18516的RuvC样结构域，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中的所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0049] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0050] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47、SEQ ID NO.105和107组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5’悬突的交错切割；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0051] 在各个方面，本公开提供了一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶包含匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516的RuvC样结构域，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5’悬突的交错切割；所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0052] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程CasΦ核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指

导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程CasΦ核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;所述可编程CasΦ核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。在一些方面,RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。

[0053] 在一些方面,可编程CasΦ核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。在一些方面,一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端融合或连接;所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的C端融合或连接;或者所述一个或多个NLS与所述可编程CasΦ核酸酶的N端和C端融合或连接。

[0054] 在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

[0055] 在一些情况下,一个方面包括本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸和gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。

[0056] 在一些方面,真核细胞包含本文所述的可编程CasΦ核酸酶或核酸。在一些方面,细胞还包含gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。在一些方面,载体包含本文所述的核酸。在一些方面,载体是病毒载体。

[0057] 在各个方面,本公开提供指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其包含与以下序列相同或相差不超过5、4、3、2或1个核苷酸的序列:从表A至AH的序列;或包含来自表2的重复序列和来自表A至H的间隔序列的序列。在一些方面,指导核酸包含来自表A至AH的序列;或包含来自表2的重复序列和来自表A至H的间隔序列的序列。在一些方面,指导核酸包含RNA和/或DNA。在一些方面,指导核酸是指导RNA。一些方面还包括包含所述指导核酸和可编程CasΦ核酸酶的复合物。一些方面包括包含所述指导核酸的真核细胞。在一些方面,真核细胞还包含可编程CasΦ核酸酶。一些方面还包括编码所述指导核酸的载体。在一些方面,载体是病毒载体。

[0058] 在各个方面,本公开提供了在第一基因中引入第一修饰和在第二基因中引入第二修饰的方法,所述方法包括使细胞与CasΦ核酸酶;与所述第一基因的等长部分至少部分互补的第一指导RNA;和与所述第二基因的等长部分至少部分互补的第二指导RNA接触。在一些方面,CasΦ核酸酶是CasΦ12核酸酶。在一些方面,CasΦ12核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或由其组成。在一些方面,第一和/或第二修饰包括核苷酸的插入、核苷酸的缺失或其组合。在一些方面,第一和/或第二修饰包括表观遗传修饰。在一些方面,第一和/或第二突变分别导致所述第一基因和/或第二基因的表达减少。在一些方面,表达减少是至少约10%的减少、至少约20%的减少、至少约30%的减少、至少约40%的减少、至少约50%的减

少、至少约60％的减少、至少约70％的减少、至少约80％的减少或至少约90％的减少。在一些方面，方法包括使细胞与靶向三种不同基因的三种不同指导RNA接触。

[0059] 在各个方面，本公开提供了可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少85％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少90％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少95％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:12具有至少98％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或由其组成。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少85％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少90％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少95％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:18具有至少98％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或由其组成。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少85％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少85％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少90％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少95％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶与SEQ ID NO:32具有至少98％的序列同一性。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:32或由其组成。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶能够结合指导RNA，所述指导RNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面，包含所述可编程CasΦ核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来切割靶核酸。在一些方面，可编程CasΦ核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割靶核酸。

[0060] 在各个方面，本公开提供了一种组合物，其包含本文公开的可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，以及指导核酸，所述指导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面，第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面，种子区域包含16个核苷。在一些方面，组合物包含所述可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，以及细胞，优选地，其中所述细胞是真核细胞。在各个方面，本公开提供了一种本文公开的可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸和指导核酸，所述指导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域，以及细胞，优选地，其中所述细胞是真核细胞。在一些方面，第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面，种子区域包含16个核苷。

[0061] 在各个方面，本公开提供了包含本文公开的可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸的真核细胞。在一些方面，细胞还包含指导核酸，所述指导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面，第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面，种子区域包含16个核苷。

[0062] 在各个方面，本公开提供了包含编码如本文公开的可编程核酸酶的核酸的载体。在一些方面，载体是病毒载体。在一些方面，载体还包含编码指导核酸的核酸，其中所述指

导核酸包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程CasΦ核酸酶结合的第二区域。在一些方面，指导核酸是指导RNA。在一些方面，载体还包含供体多核苷酸。在一些方面，指导核酸是指导RNA。

[0063] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述可编程核酸酶包含RuvC结构域，其中所述RuvC结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5'悬突的交错切割，并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0064] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0065] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域；包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链，其中所述链断裂是5'悬突的交错切割；所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域；并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0066] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0067] 在各个方面，本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸，其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸，并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合，所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域，其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域；包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合；所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸；所述可编程核酸

酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0068] 在各个方面,本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。

[0069] 在各个方面,本公开提供了一种可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸,其中所述可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas核酸酶并且包含400和900个之间的氨基酸,并且其中所述可编程核酸酶能够与指导RNA结合,所述指导RNA包含与真核生物基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,其中所述第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域;包含所述可编程核酸酶和所述指导RNA的复合物与所述靶序列结合;所述RuvC样结构域能够加工pre-crRNA并切割所述靶核酸;所述可编程核酸酶切割包含所述靶序列的靶核酸的两条链,其中所述链断裂是5'悬突的交错切割;所述可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中所述指导RNA的第二区域;并且所述可编程核酸酶不需要tracrRNA来切割所述靶核酸。在一些方面,RuvC结构域或RuvC样结构域中的相同活性位点催化所述pre-crRNA的加工和所述靶核酸的切割。在一些方面,可编程核酸酶与一个或多个NLS融合或连接。

[0070] 在各个方面,本文公开的可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸与一个或多个NLS融合。在一些方面,一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的N端融合或连接。在一些方面,一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的C端融合或连接;或者所述一个或多个NLS与所述可编程核酸酶的N端和C端融合或连接。

[0071] 在各个方面,本公开提供了一种组合物,其包含本文公开的可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸;以及gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。在一些方面,本文公开的所述可编程核酸酶或核酸包含在细胞中,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些方面,包含本文公开的所述可编程核酸酶或核酸的所述组合物还包含gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域,以及细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。

[0072] 在各个方面,本公开提供了包含本文公开的可编程核酸酶或编码所述可编程核酸酶的核酸分子的真核细胞。在一些方面,细胞还包含gRNA,所述gRNA包含与真核基因组中的靶核酸序列互补的第一区域和与所述可编程核酸酶结合的第二区域。在一些方面,第一区域包含含有10和16个之间的核苷的种子区域。在一些方面,种子区域包含16个核苷。在一些方面,本文公开的核酸包含在载体中。在一些方面,载体是病毒载体。

[0073] 在一些方面，本公开提供了一种复合物，其包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。在一些方面，第一可编程CasΦ核酸酶和所述第二可编程CasΦ核酸酶是相同的可编程CasΦ核酸酶。在一些方面，二聚体包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。在一些方面，组合物包含第一可编程CasΦ核酸酶和第二可编程CasΦ核酸酶。

[0074] 在各个方面，本公开提供了一种修饰包含靶核酸的细胞的方法，所述方法包括将包含可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或cas核酸酶的组合物引入细胞，其中所述可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或cas核酸酶切割所述靶核酸，从而修饰所述细胞。

[0075] 在各个方面，本公开提供了一种修饰包含靶核酸的细胞的方法，所述方法包括向所述细胞引入(i)本文公开的所述可编程CasΦ核酸酶或可编程核酸酶和(ii)指导核酸，其中所述可编程CasΦ核酸酶或可编程Cas核酸酶切割所述靶核酸，从而修饰所述细胞。在一些方面，指导核酸是指导RNA。在一些方面，方法还包括将供体多核苷酸引入所述细胞。在一些方面，方法包括将所述供体多核苷酸插入所述靶核酸的切割位点处。在一些方面，细胞是真核细胞，优选地是人类细胞。在一些方面，细胞是T细胞。在一些方面，细胞是CAR-T细胞。在一些方面，细胞是干细胞。在一些方面，细胞是造血干细胞。在一些方面，干细胞是多能干细胞，优选地是诱导多能干细胞。在一些方面，通过本文公开的方法获得或可获得所述经修饰的细胞。在一些方面，本公开提供了通过本文的方法获得或可获得的经修饰的人类细胞。在一些方面，经修饰的细胞是真核细胞，优选地是人类细胞。在一些方面，细胞是T细胞。在一些方面，T细胞是CAR-T细胞。在一些方面，细胞是干细胞。在一些方面，细胞是造血干细胞。在一些方面，细胞是多能干细胞，优选地是诱导多能干细胞。

[0076] 在一些方面，方法包括根据本文公开的方法，使用CasΦ核酸酶在第一基因中引入第一修饰和在基因中引入第二修饰。在一些方面，方法包括根据本文公开的方法，使用可编程CasΦ核酸酶、可编程的核酸酶或cas核酸酶修饰细胞。在一些方面，方法包括脂质纳米颗粒递送编码所述可编程CasΦ核酸酶、可编程核酸酶或cas核酸酶的核酸和所述指导核酸。在一些方面，核酸还包含供体多核苷酸。在一些方面，核酸是病毒载体。在一些方面，病毒载体是AAV载体。

[0077] 通过引用并入

[0078] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在此通过引用并入本文，就如每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出通过引用并入的程度一样。

[0079] 42256-779_601_SL专利或申请文件含有至少一幅彩色绘图。专利局将根据请求和必要费用的支付提供有彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本。

[0080] 本发明的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下阐述使用本发明原理的说明性实施方案的详细描述和附图将获得对本发明的特征和优点的更好理解，在附图中：

[0081] 图1说明了对CasΦ多肽进行顺式切割测定以评估可编程切口酶活性的结果。结果示出了CasΦ直系同源物具有可编程切口酶活性。对五种CasΦ多肽进行了测定，所述多肽在图1中被命名为CasΦ.2、CasΦ.11、CasΦ.17、CasΦ.18和CasΦ.12。对于所述测定，每种CasΦ多肽在室温下与指导核酸复合20分钟以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。将每种CasΦ多肽的RNP复合物分别与指导核酸靶向的质粒DNA在37℃温育60分钟。此图示出了通过凝胶

电泳测量的在60分钟温育期间出现切口(单链断裂)或线性化(双链断裂)的质粒的百分比。数据示出了CasΦ.2、CasΦ.11、CasΦ.17和CasΦ.18充当可编程切口酶。CasΦ.17和CasΦ.18仅产生切口产物。CasΦ.2和CasΦ.11生成了一些线性化产物,但主要是切口中间体。CasΦ.12生成几乎完全线性化的产物。

[0082] 图2A和图2B说明了对CasΦ多肽进行顺式切割测定以评估crRNA重复序列和RNP复合温度对CasΦ多肽的可编程切口酶活性的影响的结果。测试了三种蛋白质中的每一种(在图2A和图2B中命名为CasΦ.11、CasΦ.17和CasΦ.18)在与包含重复序列CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.10和CasΦ.18的四种crRNA(在图2A和图2B中分别缩写为j2、j7、j10和j18)之一复合时对质粒DNA进行切口的能力。图2C说明了CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.10和CasΦ.18重复序列的比对,示出保守(以黑色突出显示)和分歧的核苷酸。对于所述测定,每个CasΦ多肽与指导核酸的RNP复合物形成在室温或37℃下进行。在37℃下,将RNP复合物与包含指导核酸的靶序列的输入质粒DNA一起温育60分钟。图2A示出了被在室温下组装的RNP复合物切口的输入质粒DNA的百分比。数据示出了包含来自所有测试的CasΦ多肽的重复序列的crRNA支持CasΦ.11、CasΦ.17和CasΦ.18的切口酶活性;唯一的例外是CasΦ.17/CasΦ.2-重复配对。图2B示出了被在37℃下组装的RNP复合物切口的输入质粒DNA的百分比。数据示出了当与包含来自CasΦ.2或CasΦ.10的重复序列的crRNA复合时,每种蛋白质的活性都被完全消除。图2D示出了图2A和图2B所示实验的CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.6、CasΦ.9、CasΦ.10、CasΦ.12和CasΦ.13的相应数据。图2D还示出了被如上所述与四种crRNAJ2、j7、j10和j18之一复合时的CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.6、CasΦ.9、CasΦ.10、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、CasΦ.17和CasΦ.18线性化的输入质粒DNA的百分比。

[0083] 图3说明了顺式切割测定和测序运行的结果,证明了CasΦ切口酶切割双链DNA靶标的非靶链。顺式切割测定是用四种CasΦ多肽CasΦ.12、CasΦ.2、CasΦ.11和CasΦ.18以及不含CasΦ多肽的对照在超螺旋质粒DNA上进行的,所述超螺旋质粒DNA包含紧接在TTTN PAM序列下游的原型间隔区。使用正向和反向引物对测定所得DNA进行Sanger测序。正向引物包含DNA序列的靶链(TS)序列,而反向引物包含非靶链(NTS)序列。如果链已被所测定的CasΦ多肽切割,则测序信号将从切割位点减少。图3A说明了不含CasΦ多肽的对照的切割模式。在不存在CasΦ多肽的情况下,靶DNA保持未切割,并导致靶和非靶链的完整测序。图3B说明了CasΦ.12蛋白的切割模式,所述CasΦ.12蛋白具有双链DNA切割活性。如图所示,测序信号在靶链和非靶链上均减少(如箭头所示),表明两条链均已切割。图3C说明了CasΦ.2的切割模式,如图1所示,CasΦ.2主要对DNA进行切口。测序信号仅在非靶链上(底部箭头)减少,表明非靶链存在切口。图3D说明了CasΦ.11的切割模式。如图1所示,CasΦ.11仅在与质粒DNA温育60分钟后才对DNA进行切口。测序信号在非靶链上(底部箭头)减少,从而表明CasΦ.11对非靶链进行切口。图3E说明了CasΦ.18的切割模式。如图1所示,CasΦ.18仅在与质粒DNA温育60分钟后才对DNA进行切口。测序信号在非靶链上(底部箭头)减少,从而表明CasΦ.18对非靶链进行切口。

[0084] 图4说明了对CasΦ多肽进行顺式切割测定以评估crRNA重复序列和靶序列、可编程切口酶和CasΦ多肽的双链DNA切割活性的影响的结果。图4A中的热图示出了与10种crRNA重复序列配对的12种CasΦ直系同源物的60分钟体外质粒切割反应的切割产物。除0外,所有Repeat和CasΦ轴标签均指Cas12Φ系统编号。Repeat 0是阴性对照,包括CasΦ

.18crRNA重复序列和非靶向间隔序列。除了极少数例外,对切口或线性化靶DNA的偏好不受crRNA重复序列或靶DNA序列的影响。CasΦ.12和CasΦ.18靶向间隔区1(方框)的原始数据示于B中。图4B示出了用于生成来自图4A的热图子集的原始凝胶数据。CasΦ.12主要使质粒DNA线性化(即切割双链DNA靶标的两条链),而CasΦ.18主要不会超出第一条链切口。

[0085] 图5说明了CasΦcrRNA重复的结构保守性。图5A示出了CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、CasΦ.18和CasΦ.32的crRNA重复结构。这些结构是使用在线RNA预测工具(https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html)在37℃下使用默认参数计算的。表2中提供了这些重复的序列。图5B示出了crRNA的共有结构,由LocaRNA工具使用来自CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.7、CasΦ.10、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、Cas12Φ.17、CasΦ.18、CasΦ.19、CasΦ.21、CasΦ.22、CasΦ.23、CasΦ.24、CasΦ.25、CasΦ.26、CasΦ.27、CasΦ.28、CasΦ.29、CasΦ.30、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.33、CasΦ.35和CasΦ.41的crRNA重复确定。图5C示出了由LocaRNA工具确定的crRNA的进一步细化的共有结构。LocaRNA工具比对RNA序列,同时考虑RNA序列的共有二级结构。

[0086] 图6说明了CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11、CasΦ.12和CasΦ.18的最佳PAM偏好。使用线性DNA靶标进行体外切割测定。从TTTAPAM开始,除了亲本TTTA以外,每个位置一个接一个地变化为其他3个核苷酸,总共12个变体。图6A示出了说明了双链切割(或CasΦ.18的切口)的绝对水平的热图。图6B示出了在归一化为100%的亲本TTTAPAM之后的来自图6A的数据。图6C示出了这些CasΦ多肽的最佳PAM偏好,数据汇总示于图6A和图6B中。

[0087] 图7说明CasΦ多肽对超螺旋DNA进行快速切口。将CasΦ多肽与它们靶向紧邻GTTG或TTTG PAM下游的两个靶标(S1,TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108),或S2,CACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCATATG(SEQ ID NO:109))之一的天然重复crRNA组装在一起。加入超螺旋靶DNA开始反应,并在1、3、6、15、30和60min后停止。通过琼脂糖凝胶分析将切割量化为切口(左列)或线性(右列)。误差线为重复时程的+/-SEM。

[0088] 图8说明CasΦ多肽偏好全长重复和16至20个核苷酸的间隔区。测试了重复和间隔区长度不同的crRNA组支持CasΦ多肽间隔区切割的能力。使用了跨CasΦ直系同源物起作用的两种不同的CasΦ重复。图8A示出了受crRNA重复长度影响的切口(顶部)或线性化(底部)的测定结果。19个核苷酸是仍然支持切割活性的最短重复。图8B示出了受crRNA间隔区长度影响的切口(顶部)或线性化(底部)结果。最佳间隔区长度因靶标而异,但通常为16至20个核苷酸。

[0089] 图9说明了HEK293T细胞中的CasΦ.12切割以及改变间隔区长度对这种切割的影响。图9A提供了在HEK293T细胞中如何评估CasΦ.12切割活性的示意图。Ac-GFP表达HEK293T细胞系用表达CasΦ.12的质粒及其靶向Ac-GFP基因的crRNA进行转染。通过由流式细胞术评估的Ac-GFP表达细胞的减少来评估CasΦ.12切割。如图9B所示,改变间隔区长度改变了CasΦ.12切割的程度。CasΦ.12在HEK293T细胞中偏好17到22个核苷酸的间隔区长度,但更长的间隔区(测试了多达30个核苷酸)也支持CasΦ.12切割。

[0090] 图10说明本文公开的CasΦ是新的Cas核酸酶家族。如图10A所示,InterPro数据库并未将CasΦ.2识别为蛋白家族成员。作为阳性对照,InterPro数据库鉴定了氨基酸球菌属(Acidaminococcus)物种(菌株BV3L6)为Cas12a蛋白家族成员,如图10B所示。

[0091] 图11说明了PF07282的原始HMM。

[0092] 图12说明了PF18516的原始HMM。

[0093] 图13说明了CasΦ.19-CasΦ.48的切割活性。

[0094] 图14说明了CasΦ多肽的PAM要求。图14A示出了CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11和CasΦ.12的PAM要求。图14B示出了CasΦ.20、CasΦ.26、CasΦ.32、CasΦ.38和CasΦ.45的PAM要求。图14C示出了来自CasΦ.20、CasΦ.24和CasΦ.25的PAM要求评估的切割产物。图14D示出了图14C中所示的原始数据的量化。

[0095] 图15说明了HEK293T细胞中的内源性基因编辑。

[0096] 图16说明了CHO细胞中的内源性基因编辑。图16A示出了在内源性Bak1、Bax和Fut8基因中CasΦ.12介导的插入或缺失突变(插入缺失(indel))的生成。图16B示出了用于评估经由同源定向修复途径的CasΦ.12介导的基因编辑的DNA供体寡核苷酸。图16C示出了递送CasΦ.12后插入缺失的检测。图16D示出了图15C中数据的序列分析。图16E示出了在递送CasΦ.12和供体寡核苷酸后检测到的并入供体模板。Bak1、Bax和Fut8基因的CasΦ.12介导的插入缺失突变生成的其他实例分别示于图16F、图16G和图16H。图16I示出了用于评估经由同源定向修复途径的CasΦ.12介导的基因编辑的DNA供体寡核苷酸。图16J示出了在递送Cas9和靶向Bax的gRNA、CasΦ.12和靶向Bax的gRNA或CasΦ.12和靶向Fut8的gRNA后,CHO细胞中的HDR频率。图16K和图16L分别示出了在每个细胞指定的病毒基因组数量(1x10^5、3x10^5,或1x10^6)下递送CasΦ.12和AAV6 DNA供体后,在CHO细胞中检测到的插入缺失突变和HDR的频率。

[0097] 图17说明了K562细胞中的内源性基因编辑。

[0098] 图18说明原代细胞中的内源性基因编辑。图18A示出了在有或没有靶向β-2微球蛋白基因的gRNA的情况下,已接受CasΦ.12的T细胞的流式细胞术分析。图18B示出了在递送CasΦ.12和靶向β-2微球蛋白基因的gRNA后,在K562细胞和T细胞中检测到的修饰。图18C示出了接受CasΦ.12和靶向β-2微球蛋白基因的gRNA的T细胞群体的序列分析。图18D示出了T细胞的流式细胞术分析,所述T细胞已接受CasΦ.12和靶向T细胞受体α恒定基因的gRNA。图18E示出了接受了CasΦ.12和靶向T细胞受体α恒定基因的gRNA的的细胞群体的序列分析。图18F示出了通过序列分析检测到的插入缺失的量化。

[0099] 图19说明了在与第一DNA链的切割可分开的反应步骤中,CasΦ核酸酶对第二DNA链的切割。

[0100] 图20说明了CasΦ核酸酶在检测分析中对ssDNA的反式切割。

[0101] 图21说明CasΦ.12介导的效率与Cas9介导的效率相当。图21A示出了来自图21B中的流式细胞术图的插入缺失突变的频率和B2M敲除细胞的量化。

[0102] 图22说明了鉴定在CHO细胞中用CasΦ.12进行基因组编辑的优化gRNA。图22A示出了由与2'氟修饰的gRNA复合的CasΦ.12多肽诱导的插入缺失突变的频率。图22B示出了进一步的CasΦ.12RNP复合物,其可以在CHO细胞中介导基因组编辑。

[0103] 图23说明了CHO和HEK293细胞中最小的脱靶CasΦ.12介导的基因组编辑。图23A至F是基于计算机计算预测的潜在脱靶位点列表的脱靶分析插入缺失验证。图23A示出了靶向Fut8的CasΦ.12,图23B示出了靶向BAX的CasΦ.12,图23C示出了靶向BAX的Cas9,图23D示出了靶向Fut8的Cas9,图23E示出了靶向Bak1的Cas9并且图23F示出了靶向Bak1的CasΦ

.12。图23G示出了使用无偏引导序列程序的脱靶分析，使用CasΦ.12和靶向HEK293细胞中的人类Fut8的引导。图23H示出了使用无偏引导序列程序的脱靶分析，使用Cas9和靶向HEK293细胞中的人类Fut8的引导。

[0104] 图24说明了经由同源定向修复(HDR)进行的CasΦ.12介导的基因组编辑。图24A示出了经由HDR途径进行的CasΦ.12介导的基因编辑。图24B示出了供体寡核苷酸的示意图

[0105] 图25说明了CasΦ.12靶向多个基因的能力。图25A示出了在用重复长度为20个核苷酸和间隔区长度为20个核苷酸的gRNA进行CasΦ.12介导的基因组编辑后B2M和TRAC敲除的百分比。图25B示出了在用重复长度为20个核苷酸和间隔区长度为17个核苷酸的gRNA进行CasΦ.12介导的基因组编辑后B2M和TRAC敲除的百分比。图25C示出了针对用不同gRNA的B2M和TRAC敲除的对应流式细胞术图。图25D示出了在用不同间隔区长度的经修饰的gRNA(重复长度为20个核苷酸和间隔区长度为17或20个核苷酸)进行CasΦ.12介导的基因组编辑后TRAC敲除的百分比。图25E示出了CasΦ.12介导的基因组编辑后TRAC敲除的相应流式细胞术图。

[0106] 图26说明了CasΦ.12的扩展种子区域。图26A和图26B示出了当间隔区5'端的前1-16个核苷酸中存在单错配或双错配时，不发生插入缺失突变或CD3敲除。图26C和图26D提供了具有错配的gRNA的示意图。

[0107] 图27说明了CasΦ.12在具有经修饰的gRNA的CHO细胞中介导基因组编辑的能力。

[0108] 图28说明了使用重复和间隔区长度变化的gRNA的CasΦ.12介导基因组编辑的能力。图28A示出了使用不同重复长度的gRNA的CasΦ.12介导的插入缺失突变的频率。图28B示出了使用不同间隔区长度的gRNA的CasΦ.12介导的插入缺失突变的频率。

[0109] 图29A-E说明了在人类原代T细胞中用CasΦ.12靶向CD3、B2M和PD1的示例性gRNA。图29F示出了靶向TRAC的gRNA的筛选。图29H示出了靶向B2M的gRNA的筛选。图29G和图29I分别示出了靶向TRAC和B2M的示例性gRNA的流式细胞术图。

[0110] 图30说明了递送CasΦ.12RNP或CasΦ.12mRNA均导致有效的基因组编辑。图30A和图30B示出了靶向T细胞中的B2M和TRAC的CasΦ.12RNP复合物的流式细胞术图，并定量于图30C和图30D中。图30E和图30F示出了通过在递送CasΦ.12RNP的情况下进行序列分析检测到的插入缺失的量化。图30G和图30I示出了递送CasΦ.12mRNA后插入缺失突变的频率，并且图30H中所示的B2M敲除细胞的量化是图30G中两个数据点的示例性FACS图。图30J示出了CasΦ.12或Cas9诱导的插入缺失突变的尺寸分布。

[0111] 图31说明了CasΦ.12在哺乳动物细胞中可以加工其自身的指导RNA。

[0112] 图32说明了CasΦ多肽诱导的切割模式。图32A示出了生成了切口和线性化质粒DNA的CasΦ多肽。图32B示出了靶链和非靶链上的切割位点的示意图。图32C示出了非靶链和靶链的序列分析并表示在图32D中。图32E示出了不同CasΦ多肽的切割位点和悬突的表格。

[0113] 图33说明了CasΦRNP复合物同时敲除多个基因的能力。T细胞用CasΦ.12的RNP复合物和靶向B2M、TRAC或PDCD1的gRNA进行核转染，并使用流式细胞术测量敲除百分比。

[0114] 图34说明了CasΦ.12RNP复合物在小鼠Hepa1-6细胞中介导PCKS9高效基因组编辑的能力。95个CasΦgRNA与Cas9一起用作对照。CasΦ.12RNP复合物诱导的最大插入缺失频率为48％，而Cas9RNP复合物诱导的最大插入缺失频率为22％。

[0115] 图35说明了CasΦ.12一体化载体在Hepa1-6小鼠肝癌细胞中介导基因组编辑的能力。图35A示出了编码CasΦ多肽序列和gRNA序列的AAV的质粒图谱。图35B说明了重复截短。图35C示出了用AAV的有效转染。图35D示出了CasΦ.12诱导的插入缺失突变的频率。图35E和图35F示出了CasΦ.12诱导的插入缺失突变的频率,不同gRNA含有不同长度的重复序列和间隔区序列。

[0116] 图36说明了编码CasΦ和gRNA的mRNA的LNP递送的优化。测试一系列的N/P比率并确定插入缺失突变的频率。

[0117] 图37说明了CasΦ介导的$CD34^+$造血干细胞的基因组编辑。用含有CasΦ.12多肽和B2M靶向指导的RNP复合物或CasΦ.12mRNA和B2M靶向指导的混合物对细胞进行核转染,并确定插入缺失突变的频率。

[0118] 图38说明了诱导多能干细胞的CasΦ介导的基因组编辑。用RNP复合物(CasΦ.12多肽和靶向B2M基因座或靶向CIITA基因座的gRNA)对细胞进行核转染,并确定插入缺失突变的频率。

[0119] 图39说明了K562细胞中CIITA基因座的CasΦ介导的基因组编辑。用RNP复合物(CasΦ多肽和靶向CIITA的gRNA)对细胞进行核转染,并通过NGS确定插入缺失突变的频率。

具体实施方式

[0120] 本公开提供了包含可编程CasΦ核酸酶的方法、组合物、系统和试剂盒。示例性组合物包含一种可编程CasΦ核酸酶或编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸,其中所述可编程CasΦ核酸酶与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85%的序列同一性。在一些实施方案中,组合物还包含指导核酸或编码所述指导核酸的核酸,其中所述指导核酸包含含有与靶核酸序列互补的核苷酸序列的区域和附加区域,其中所述区域和所述附加区域彼此异源。如本文所用,术语“异源”可用于描述或指示第一序列不同于第二序列并且不是天然存在在一起的。如本文所用,术语“异源”可用于描述第一部分(例如,第一序列)不同于第二部分(例如,第二序列),因此,这两个部分不是天然存在在一起的,而是被工程化改造为一个实体的一部分。例如,包含彼此异源的区域和附加区域的指导核酸序列可以指示指导核酸序列被工程化改造以包含所述区域和附加区域。可编程CasΦ核酸酶和指导核酸可以在核糖核蛋白复合物中复合在一起。或者,符合本公开的组合物包含编码可编程CasΦ核酸酶和指导核酸的核酸。在一些实施方案中,指导核酸包含与选自由SEQ ID NO:48至86组成的组的序列具有至少约85%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶是SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:105。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶具有切口酶活性。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶具有双链切割活性。如本文所用,CasΦ可以被称为Cas12j或Cas14u。

[0121] 本文还公开了用于修饰靶核酸序列的组合物、方法和系统。用于修饰靶核酸序列的示例性方法包括使靶核酸序列和与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85%的序列同一性的可编程CasΦ核酸酶和指导核酸接触,其中可编程CasΦ核酸酶切割靶核酸序列,从而修饰靶核酸序列。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶向靶核酸中引入双链断裂。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶引入了单链断裂。

[0122] 本文还公开了用于包括使用两种或更多种可编程CasΦ切口酶的修饰靶核酸序列

的组合物、方法和系统。用于在靶核酸中引入断裂的示例性方法包括使靶核酸与以下接触：(a)第一指导核酸，其包含和与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85％的序列同一性的第一可编程切口酶结合的区域；和(b)第二指导核酸，其包含和与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85％的序列同一性的第二可编程切口酶结合的区域，其中第一指导核酸包含与靶核酸结合的附加区域，并且其中第二指导核酸包含与靶核酸结合的附加区域，并且其中第一指导核酸的附加区域和第二指导核酸的附加区域结合靶核酸的相反链。

[0123] 本文还公开了用于检测样品中的靶核酸的组合物、方法和系统。用于检测样品中的靶核酸的示例性方法包括使包含靶核酸的样品与以下接触：(a)可编程CasΦ核酸酶，其与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85％的序列同一性；(b)指导RNA，其包含与可编程CasΦ核酸酶结合的区域和与靶核酸结合的附加区域；和(c)标记的单链DNA报告基因，其不与指导RNA结合；通过可编程CasΦ核酸酶切割标记的单链DNA报告基因以释放可检测标记；并通过测量来自可检测标记的信号检测靶核酸。

[0124] 本文还公开了用于调控细胞中基因转录的组合物、方法和系统。调控细胞中基因转录的示例性方法包括向包含靶核酸序列的细胞中引入以下：(i)融合多肽或编码融合多肽的核酸，其中融合多肽包含：(a)dCasΦ多肽，其与选自由SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105组成的组的序列具有至少85％的序列同一性，其中dCasΦ多肽酶促失活；和(b)具有转录调节活性的多肽；和(ii)指导核酸，或包含编码指导核酸的核苷酸序列的核酸，其中指导核酸包含与dCasΦ多肽结合的区域和与靶核酸结合的附加区域；其中通过作用于靶核酸序列的融合多肽来调控基因转录。

[0125] 还公开了可编程CasΦ核酸酶根据本文所述的任何方法修饰靶核酸序列的用途。还公开了第一可编程切口酶和第二可编程切口酶根据本文所述的任何方法在靶核酸中引入断裂的用途。还公开了可编程CasΦ核酸酶根据本文所述的任何方法检测样品中的靶核酸的用途。还公开了dCasΦ多肽根据本文所述的任何方法调控细胞中的基因转录的用途。

[0126] 可编程核酸酶

[0127] 本公开提供了包含可编程核酸酶的方法和组合物。可编程核酸酶可以与本公开的指导核酸复合以靶向靶核酸用于检测、编辑、修饰或调节靶核酸。

[0128] 可编程核酸酶可用于检测靶核酸。例如，在某些实施方案中，当可编程核酸酶与指导核酸复合并且靶核酸与指导核酸杂交时，单链DNA (ssDNA)(诸如ssDNA报告基因)通过可编程核酸酶的反式切割被激活。ssDNA的反式切割的检测可用于确定样品中的靶核酸。

[0129] 可编程核酸酶可用于编辑或修饰靶核酸，例如，通过靶序列的位点特异性切割、供体核酸插入或其组合。

[0130] 可编程核酸酶可用于靶核酸的基因调节，例如，使用与具有基因调节活性的多肽组合的无催化活性的可编程核酸酶。

[0131] 在一些实施方案中，可编程核酸酶是具有位点特异性核酸切割活性的可编程核酸酶。在一些实施方案中，可编程核酸酶是具有双链DNA切割活性的可编程核酸酶。在一些实施方案中，可编程核酸酶是可编程切口酶。在一些实施方案中，可编程核酸酶是可编程DNA切口酶。在一些实施方案中，可编程核酸酶是包含无催化活性核酸酶结构域的可编程核酸酶。在一些实施方案中，包含无催化活性核酸酶结构域的可编程核酸酶相对于野生型核酸

酶结构域可以包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个突变。所述突变可以存在于核酸酶的切割位点或活性位点内。

[0132] 在一些实施方案中，可编程核酸酶是可编程DNA核酸酶。在一些实施方案中，可编程核酸酶是V型CRISPR/Cas酶，其中V型CRISPR/Cas酶在单个RuvC结构域中包含单个活性位点或催化结构域。RuvC结构域通常靠近酶的C端。单个RuvC结构域可以包含RuvC子结构域，例如RuvCI、RuvCII和RuvCIII。如本文所用，“V型CRISPR/Cas酶”或“V型cas核酸酶”或“V型cas效应子”可用于描述酶家族或其成员，所述酶家族或其成员具有不同N端结构并且通常包含保守的单一催化RuvC样核酸内切酶结构域，即N端结构的C端，来源于由自主或非自主转座子编码的TnpB蛋白。术语“RuvC结构域”和“RuvC样结构域”可互换用于V型CRISPR/Cas酶、V型cas核酸酶和V型cas效应子。在一些实施方案中，V型CRISPR/Cas酶是CasΦ核酸酶。CasΦ多肽可以作为催化靶核酸中特定序列的切割的核酸内切酶发挥作用。本公开的可编程CasΦ核酸酶可以在RuvC结构域中具有单个活性位点，其能够催化pre-crRNA加工和核酸的切口或切割。这个紧凑的催化位点可以使可编程CasΦ核酸酶特别有利于基因组工程化和基因组操纵的新功能。

[0133] 在一些实施方案中，RuvC结构域是RuvC样结构域。各种RuvC样结构域在本领域中是已知的并且使用在线工具诸如InterPro可以轻松鉴定(https://www.ebi.ac.uk/interpro/)。例如，RuvC样结构域可以是与IS605和其他相关转座子家族的TnpB蛋白区域共享同源性的结构域，如描述于评论文章诸如Shmakov等人(Nature Reviews Microbiology第15卷，第169-182页(2017))以及Koonin E.V.和Makarova K.S.(2019,Phil.Trans.R.Soc.,B 374:20180087)。在一些实施方案中，RuvC样结构域与转座酶IS605、OrfB、C端共享同源性。转座酶IS605、OrfB、C端很容易被技术人员使用生物信息学工具诸如PFAM鉴定(Finn等人(Nucleic Acids Res.2014年1月1日;42((Database issue):D222-D230);El-Gebali等人(2019)Nucleic Acids Res.doi:10.1093/nar/gky995)。PFAM是蛋白质家族数据库，其中每个条目都由种子比对组成，所述种子比对使用HMMER软件(hmmer.org)形成构建序型隐马尔科夫模型(HMM)的基础。PFAM很容易经由pfam.xfam.org访问，由EMBL-EBI维护，很容易允许根据当前发布的PFAM(例如2020年5月的33.1版本)分析氨基酸序列，但本地构建也可以使用公开和免费可得的数据库文件和工具来实现。技术人员使用HMM PF07282很容易鉴定转座酶IS605、OrfB、C端。PF07282在图11(登录号PF07282.12)中复制以供参考。技术人员还能够使用PFAM工具，例如用HMM PF18516来鉴定RuvC结构域。PF18516在图12(登录号PF18516.2)中复制以供参考。在一些实施方案中，如使用PFAM工具(例如使用PFAM版本33.1，以及HMM登录号PF07282.12和PF18516.2)评估，可编程CasΦ核酸酶包含RuvC样结构域，其匹配PFAM家族PF07282但不匹配PFAM家族PF18516。理想情况下，PFAM搜索应使用设置为1.0的E值截止值进行。

[0134] 在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少

42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少20%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少25%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少30%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少35%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少40%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少45%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少50%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少55%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少60%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少65%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少70%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少75%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少80%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少85%的编辑效率。在一些中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少90%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少95%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有至少100%的编辑效率。在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶-或本文所述的可编程核酸酶和指导RNA组合-具有42%的编辑效率。在一些实施方案中，编辑效率通过分析核酸或基因敲除中插入缺失突变的频率来确定。

[0135] 在一些实施方案中，本文所述的可编程核酸酶具有少于1500个氨基酸、少于1450个氨基酸、少于1400个氨基酸、少于1350个氨基酸、少于1300个氨基酸、少于1250个氨基酸、少于1200个氨基酸、少于1150个氨基酸、少于1100个氨基酸、少于1050个氨基酸、少于1000个氨基酸、少于950个氨基酸、少于900个氨基酸、少于850个氨基酸或少于800个氨基酸的一级氨基酸序列长度。

[0136] 在一些实例中，本文所述的可编程核酸酶是V型cas核酸酶。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少20%的编辑效率。在一些实例中，V型cas核

酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少25％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少30％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少35％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少40％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少45％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少50％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少55％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少60％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少65％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少70％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少75％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少80％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少85％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少90％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有至少95％的编辑效率。在一些实例中，V型cas核酸酶或包含V型cas核酸酶的组合物具有100％的编辑效率。

[0137] 在一些实例中，本文所述的可编程核酸酶具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少20％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少25％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少30％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少35％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少40％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少45％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少50％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少55％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少60％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少65％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少70％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少75％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少80％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少85％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少90％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有至少95％的编辑效率。在一些实例中，具有少于850个氨基酸的一级氨基酸序列长度的可编程核酸酶具有100％的编辑效率。

[0138] 表1提供了可以用在本公开的组合物和方法中的示例性CasΦ多肽的氨基酸序列。

[0139] 表1-CasΦ氨基酸序列

[0140]

名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
CasΦ.1	1	MADTPTLFTQFLRHHLPGQRFRKDILKQAGRILANK GEDATIAFLRGKSEESPPDFQPPVKCPIIACSRPLTEW PIYQASVAIQGYVYGQSLAEFEASDPGCSKDGLLGW FDKTGVCTDYFSVQGLNLIFQNARKRYIGVQTKVTN RNEKRHKKLKRINAKRIAEGLPELTSDEPESALDETG HLIDPPGLNTNIYCYQQVSPKPLALSEVNQLPTAYAG YSTSGDDPIQPMVTKDRLSISKGQPGYIPEHQRALLS QKKHRRMRGYGLKARALLVIVRIQDDWAVIDLRSL LRNAYWRRIVQTKEPSTITKLLKLVTGDPVLDATRM VATFTYKPGIVQVRSAKCLKNKQGSKLFSERYLNET VSVTSIDLGSNNLVAVATYRLVNGNTPELLQRFTLPS HLVKDFERYKQAHDTLEDSIQKTAVASLPQGQQTEIR MWSMYGFREAQERVCQELGLADGSIPWNVMTATST ILTDLFLARGGDPKKCMFTSEPKKKKNSKQVLYKIR DRAWAKMYRTLLSKETREAWNKALWGLKRGSPDY ARLSKRKEELARRCVNYTISTAEKRAQCGRTIVALE DLNIGFFHGRGKQEPGWVGLFTRKKENRWLMQAL HKAFLELAHHRGYHVIEVNPAYTSQTCPVCRHCDPD NRDQHNREAFHCIGCGFRGNADLDVATHNIAMVAIT GESLKRARGSVASKTPQPLAAE
CasΦ.2	2	MPKPAVESEFSKVLKKHFPGERFRSSYMKRGGKILA AQGEEAVVAYLQGKSEEEPPNFQPPAKCHVVTKSRD FAEWPIMKASEAIQRYIYALSTTERAACKPGKSSESH AAWFAATGVSNHGYSHVQGLNLIFDHTLGRYDGVL KKVQLRNEKARARLESINASRADEGLPEIKAEEEEV ATNETGHLLQPPGINPSFYVYQTISPQAYRPRDEIVLP PEYAGYVRDPNAPIPLGVVRNRCDIQKGCPGYIPEW QREAGTAISPKTGKAVTVPGLSPKKNKRMRRYWRS EKEKAQDALLVTVRIGTDWVVIDVRGLLRNARWRT IAPKDISLNALLDLFTGDPVIDVRRNIVTFTYTLDAC GTYARKWTLKGKQTKATLDKLTATQTVALVAIDLGQ TNPISAGISRVTQENGALQCEPLDRFTLPDDLLKDISA YRIAWDRNEEELRARSVEALPEAQQAEVRALDGVS KETARTQLCADFGLDPKRLPWDKMSSNTTFISEALL SNSVSRDQVFFTPAPKKGAKKKAPVEVMRKDRTWA RAYKPRLSVEAQKLKNEALWALKRTSPEYLKLSRRK EELCRRSINYVIEKTRRRTQCQIVIPVIEDLNVRFFHG SGKRLPGWDNFFTAKKENRWFIQGLHKAFSDLRTH RSFYVFEVRPERTSITCPKCGHCEVGNRDGEAFQCL SCGKTCNADLDVATHNLTQVALTGKTMPKREEPRD AQGTAPARKTKKASKSKAPPAEREDQTPAQEPSQTS
CasΦ.3	3	MYILEMADLKSEPSLLAKLLRDRFPGKYWLPKYWK LAEKKRLTGGEEAACEYMADKQLDSPPPNFRPPARC VILAKSRPFEDWPVHRVASKAQSFVIGLSEQGFAALR AAPPSTADARRDWLRSHGASEDDLMALEAQLLETI

[0141]

		MGNAISLHGGVLKKIDNANVKAAKRLSGRNEARLN KGLQELPPEQEGSAYGADGLLVNPPGLNLNIYCRKS CCPKPVKNTARFVGHYPGYLRDSDSILISGTMDRLTI IEGMPGHIPAWQREQGLVKPGGRRRRLSGSESNMRQ KVDPSTGPRRSTRSGTVNRSNQRTGRNGDPLLVEIR MKEDWVLLDARGLLRNLRWRESKRGLSCDHEDLS LSGLLALFSGDPVIDPVRNEVVFLYGEGIIPVRSTKPV GTRQSKKLLERQASMGPLTLISCDLGQTNLIAGRAS AISLTHGSLGVRSSVRIELDPEIIKSFERLRKDADRLE TEILTAAKETLSDEQRGEVNSHEKDSPQTAKASLCRE LGLHPPSLPWGQMGPSTTFIADMLISHGRDDDAFLS HGEFPTLEKRKKFDKRFCLESRPLLSSETRKALNESL WEVKRTSSEYARLSQRKKEMARRAVNFVVEISRRKT GLSNVIVNIEDLNVRIFHGGGKQAPGWDGFFRPKSE NRWFIQAIHKAFSDLAAHHGIPVIESDPQRTSMTCPE CGHCDSKNRNGVRFLCKGCGASMDADFDAACRNL ERVALTGKPMPKPSTSCERLLSATTGKVCSDHSLSHD AIEKAS
CasΦ.4	4	MEKEITELTKIRREFPNKKFSSTDMKKAGKLLKAEG PDAVRDFLNSCQEIIGDFKPPVKTNIVSISRPFEEWPV SMVGRAIQEYYFSLTKEELESVHPGTSSEDHKSFFNI TGLSNYNYTSVQGLNLIFKNAKAIYDGTLVKANNK NKKLEKKFNEINHKRSLEGLPIITPDFEEPFDENGHL NNPPGINRNIYGYQGCAAKVFVPSKHKMVSLPKEY EGYNRDPNLSLAGFRNRLEIPEGEPGHVPWFQRMDI PEGQIGHVNKIQRFNFVHGKNSGKVKFSDKTGRVKR YHHSKYKDATKPYKFLEESKKVSALDSILAIITIGDD WVVFDIRGLYRNVFYRELAQKGLTAVQLLDLFTGDP VIDPKKGVVTFSYKEGVVPVFSQKIVPRFKSRDTLE KLTSQGPVALLSVDLGQNEPVAARVCSLKNINDKITL DNSCRISFLDDYKKQIKDYRDSLDELEIKIRLEAINSL ETNQQVEIRDLDVFSADRAKANTVDMFDIDPNLISW DSMSDARVSTQISDLYLKNGGDESRVYFEINNKRIKR SDYNISQLVRPKLSDSTRKNLNDSIWKLKRTSEEYLK LSKRKLELSRAVVNYTIRQSKLLSGINDIVIILEDLDV KKKFNGRGIRDIGWDNFFSSRKENRWFIPAFHKAFS ELSSNRGLCVIEVNPAWTSATCPDCGFCSKENRDGIN FTCRKCGVSYHADIDVATLNIARVAVLGKPMSGPAD RERLGDTKKPRVARSRKTMKRKDISNSTVEAMVTA
CasΦ.5	5	MDMLDTETNYATETPAQQQDYSPKPPKKAQRAPKG FSKKARPEKKPPKPITLFTQKHFSGVRFLKRVIRDAS KILKLSESRTITFLEQAIERDGSAPPDVTPPVHNTIMA VTRPFEEWPEVILSKALQKHCYALTKKIKIKTWPKK GPGKKCLAAWSARTKIPLIPGQVQATNGLFDRIGSIY DGVEKKVTNRNANKKLEYDEAIKEGRNPAVPEYET AYNIDGTLINKPGYNPNLYITQSRTPRLITEADRPLVE KILWQMVEKKTQSRNQARRARLEKAAHLQGLPVPK FVPEKVDRSQKIEIRIIDPLDKIEPYMPQDRMAIKASQ DGHVPYWQRPFLSKRRNRRVRAGWGKQVSSIQAW LTGALLVIVRLGNEAFLADIRGALRNAQWRKLLKPD

[0142]

		ATYQSLFNLFTGDPVVNTRTNHLTMAYREGVVNIVK SRSFKGRQTREHLLTLLGQGKTVAGVSFDLGQKHA AGLLAAHFGLGEDGNPVFTPIQACFLPQRYLDSLTN YRNRYDALTLDMRRQSLLALTPAQQQEFADAQRDP GGQAKRACCLKLNLNPDEIRWDLVSGISTMISDLYIE RGGDPRDVHQQVETKPKGKRKSEIRILKIRDGKWAY DFRPKIADETRKAQREQLWKLQKASSEFERLSRYKI NIARAIANWALQWGRELSGCDIVIPVLEDLNVGSKF FDGKGKWLLGWDNRFTPKKENRWFIKVLHKAVAEL APHRGVPVYEVMPHRTSMTCPACHYCHPTNREGDR FECQSCHVVKNTDRDVAPYNILRVAVEGKTLDRWQ AEKKPQAEPDRPMILIDNQES
CasΦ.6	6	MDMLDTETNYATETPAQQQDYSPKPPKKAQRAPKG FSKKARPEKKPPKPITLFTQKHFSGVRFLKRVIRDAS KILKLSESRTITFLEQAIERDGSAPPDVTPPVHNTIMA VTRPFEEWPEVILSKALQKHCYALTKKIKIKTWPKK GPGKKCLAAWSARTKIPLIPGQVQATNGLFDRIGSIY DGVEKKVTNRNANKKLEYDEAIKEGRNPAVPEYET AYNIDGTLINKPGYNPNLYITQSRTPRLITEADRPLVE KILWQMVEKKTQSRNQARRARLEKAAHLQGLPVPK FVPEKVDRSQKIEIRIIDPLDKIEPYMPQDRMAIKASQ DGHVPYWQRPFLSKRRNRRVRAGWGKQVSSIQAW LTGALLVIVRLGNEAFLADIRGALRNAQWRKLLKPD ATYQSLFNLFTGDPVVNTRTNHLTMAYREGVVDIVK SRSFKGRQTREHLLTLLGQGKTVAGVSFDLGQKHA AGLLAAHFGLGEDGNPVFTPIQACFLPQRYLDSLTN YRNRYDALTLDMRRQSLLALTPAQQQEFADAQRDP GGQAKRACCLKLNLNPDEIRWDLVSGISTMISDLYIE RGGDPRDVHQQVETKPKGKRKSEIRILKIRDGKWAY DFRPKIADETRKAQREQLWKLQKASSEFERLSRYKI NIARAIANWALQWGRELSGCDIVIPVLEDLNVGSKF FDGKGKWLLGWDNRFTPKKENRWFIKVLHKAVAEL APHKGVPVYEVMPHRTSMTCPACHYCHPTNREGDR FECQSCHVVKNTDRDVAPYNILRVAVEGKTLDRWQ AEKKPQAEPDRPMILIDNQES
CasΦ.7	7	MSSLPTPLELLKQKHADLFKGLQFSSKDNKMAGKV LKKDGEEAALAFLSERGVSRGELPNFRPPAKTLVVA QSRPFEEFPIYRVSEAIQLYVYSLSVKELETVPSGSST KKEHQRFFQDSSVPDFGYTSVQGLNKIFGLARGIYL GVITRGENQLQKAKSKHEALNKKRRASGEAETEFD PTPYEYMTPERKLAKPPGVNHSIMCYVDISVDEFDF RNPDGIVLPSEYAGYCREINTAIEKGTVDRLGHLKG GPGYIPGHQRKESTTEGPKINFRKGRIRRSYTALYAK RDSRRVRQGKLALPSYRHHMMRLNSNAESAILAVIF FGKDWVVFDLRGLLRNVRWRNLFVDGSTPSTLLG MFGDPVIDPKRGVVAFCYKEQIVPVVSKSITKMVKA PELLNKLYLKSEDPLVLVAIDLGQTNPVGVGVYRVM NASLDYEVVTRFALESELLREIESYRQRTNAFEAQIR AETFDAMTSEEQEEITRVRAFSASKAKENVCHRFGM PVDAVDWATMGSNTIHIAKWVMRHGDPSLVEVLEY

		RKDNEIKLDKNGVPKKVKLTDKRIANLTSIRLRFSQE TSKHYNDTMWELRRKHPVYQKLSKSKADFSRRVV NSIIRRVNHLVPRARIVFIIEDLKNLGKVFHGSGKREL GWDSYFEPKSENRWFIQVLHKAFSETGKHKGYYIIE CWPNWTSCTCPKCSCCDSENRHGEVFRCLACGYTC NTDFGTAPDNLVKIATTGKGLPGPKKRCKGSSKGKN PKIARSSETGVSVTESGAPKVKKSSPTQTSQSSSQSA P
CasΦ.8	8	MNKIEKEKTPLAKLMNENFAGLRFPFAIIKQAGKKL LKEGELKTIEYMTGKGSIEPLPNFKPPVKCLIVAKRR DLKYFPICKASCEIQSYVYSLNYKDFMDYFSTPMTS QKQHEEFFKKSGLNIEYQNVAGLNLIFNNVKNTYNG VILKVKNRNEKLKKKAIKNNYEFEEIKTFNDDGCLI NKPGINNVIYCFQSISPKILKNITHLPKEYNDYDCSV DRNIIQKYVSRLDIPESQPGHVPEWQRKLPEFNNTN NPRRRRKWYSNGRNISKGYSVDQVNQAKIEDSLLA QIKIGEDWIILDIRGLLRDLNRRELISYKNKLTIKDVL GFFSDYPIIDIKKNLVTFCYKEGVIQVVSQKSIGNKKS KQLLEKLIENKPIALVSIDLGQTNPVSVKISKLNKINN KISIESFTYRFLNEEILKEIEKYRKDYDKLELKLINEA
CasΦ.9	9	MDMLDTETNYATETPSQQQDYSPKPPKKDRRAPKG FSKKARPEKKPPKPITLFTQKHFSGVRFLKRVIRDAS KILKLSESRTITFLEQAIERDGSAPPDVTPPVHNTIMA VTRPFEEWPEVILSKALQKHCYALTKKIKIKTWPKK GPGKKCLAAWSARTKIPLIPGQVQATNGLFDRIGSIY DGVEKKVTNRNANKKLEYDEAIKEGRNPAVPEYET AYNIDGTLINKPGYNPNLYITQSRTPRLITEADRPLVE KILWQMVEKKTQSRNQARRARLEKAAHLQGLPVPK FVPEKVDRSQKIEIRIIDPLDKIEPYMPQDRMAIKASQ DGHVPYWQRPFLSKRRNRRVRAGWGKQVSSIQAW LTGALLVIVRLGNEAFLADIRGALRNAQWRKLLKPD ATYQSLFNLFTGDPVVNTRTNHLTMAYREGVVDIVK SRSFKGRQTREHLLTLLGQGKTVAGVSFDLGQKHA AGLLAAHFGLGEDGNPVFTPIQACFLPQRYLDSLTN YRNRYDALTLDMRRQSLLALTPAQQQEFADAQRDP GGQAKRACCLKLNLNPDEIRWDLVSGISTMISDLYIE RGGDPRDVHQQVETKPKGKRKSEIRILKIRDGKWAY DFRPKIADETRKAQREQLWKLQKASSEFERLSRYKI NIARAIANWALQWGRELSGCDIVIPVLEDLNVGSKF FDGKGKWLLGWDNRFTPKKENRWFIKVLHKAVAEL APHRGVPVYEVMPHRTSMTCPACHYCHPTNREGDR FECQSCHVVKNTDRDVAPYNILRVAVEGKTLDRWQ AEKKPQAEPDRPMILIDNQES
CasΦ.10	10	MDMLDTETNYATETPSQQQDYSPKPPKKDRRAPKG FSKKARPEKKPPKPITLFTQKHFSGVRFLKRVIRDAS KILKLSESRTITFLEQAIERDGSAPPDVTPPVHNTIMA VTRPFEEWPEVILSKALQKHCYALTKKIKIKTWPKK GPGKKCLAAWSARTKIPLIPGQVQATNGLFDRIGSIY DGVEKKVTNRNANKKLEYDEAIKEGRNPAVPEYET

[0143]

[0144]

		AYNIDGTLINKPGYNPNLYITQSRTPRLITEADRPLVE KILWQMVEKKTQSRNQARRARLEKAAHLQGLPVPK FVPEKVDRSQKIEIRIIDPLDKIEPYMPQDRMAIKASQ DGHVPYWQRPFLSKRRNRRVRAGWGKQVSSIQAW LTGALLVIVRLGNEAFLADIRGALRNAQWRKLLKPD ATYQSLFNLFTGDPVVNTRTNHLTMAYREGVVNIVK SRSFKGRQTREHLLTLLGQGKTVAGVSFDLGQKHA AGLLAAHFGLGEDGNPVFTPIQACFLPQRYLDSLTN YRNRYDALTLDMRRQSLLALTPAQQQEFADAQRDP GGQAKRACCLKLNLNPDEIRWDLVSGISTMISDLYIE RGGDPRDVHQQVETKPKGKRKSEIRILKIRDGKWAY DFRPKIADETRKAQREQLWKLQKASSEFERLSRYKI NIARAIANWALQWGRELSGCDIVIPVLEDLNVGSKF FDGKGKWLLGWDNRFTPKKENRWFIKVLHKAVAEL APHRGVPVYEVMPHRTSMTCPACHYCHPTNREGDR FECQSCHVVKNTDRDVAPYNILRVAVEGKTLDRWQ AEKKPQAEPDRPMILIDNQES
CasΦ.11	11	MSNKTTPPSPLSLLLRAHFPGLKFESQDYKIAGKKL RDGGPEAVISYLTGKGQAKLKDVKPPAKAFVIAQSR PFIEWDLVRVSRQIQEKIFGIPATKGRPKQDGLSETAF NEAVASLEVDGKSKLNEETRAAFYEVLGLDAPSLHA QAQNALIKSAISIREGVLKKVENRNEKNLSKTKRRK EAGEEATFVEEKAHDERGYLIHPPGVNQTIPGYQAV VIKSCPSDFIGLPSGCLAKESAEALTDYLPHDRMTIP KGQPGYVPEWQHPLLNRRKNRRRRDWYSASLNKP KATCSKRSGTPNRKNSRTDQIQSGRFKGAIPVLMRF QDEWVIIDIRGLLRNARYRKLLKEKSTIPDLLSLFTG DPSIDMRQGVCTFIYKAGQACSAKMVKTKNAPEILS ELTKSGPVVLVSIDLGQTNPIAAKVSRVTQLSDGQLS HETLLRELLSNDSSDGKEIARYRVASDRLRDKLANL AVERLSPEHKSEILRAKNDTPALCKARVCAALGLNP EMIAWDKMTPYTEFLATAYLEKGGDRKVATLKPKN RPEMLRRDIKFKGTEGVRIEVSPEAAEAYREAQWDL QRTSPEYLRLSTWKQELTKRILNQLRHKAAKSSQCE VVVMAFEDLNIKMMHGNGKWADGGWDAFFIKKR ENRWFMQAFHKSLTELGAHKGVPTIEVTPHRTSITC TKCGHCDKANRDGERFACQKCGFVAHADLEIATDNI ERVALTGKPMPKPESERSGDAKKSVGARKAAFKPEE DAEAAE
CasΦ.12	12	MIKPTVSQFLTPGFKLIRNHSRTAGLKLKNEGEEACK KFVRENEIPKDECPNFQGGPAIANIIAKSREFTEWEIY QSSLAIQEVIFTLPKDKLPEPILKEEWRAQWLSEHGL DTVPYKEAAGLNLIIKNAVNTYKGVQVKVDNKNKN NLAKINRKNEIAKLNGEQEISFEEIKAFDDKGYLLQK PSPNKSIYCYQSVSPKPFITSKYHNVNLPEEYIGYYR KSNEPIVSPYQFDRLRIPIGEPGYVPKWQYTFLSKKE NKRRKLSKRIKNVSPILGIICIKKDWCVFDMRGLLRT NHWKKYHKPTDSINDLFDYFTGDPVIDTKANVVRF RYKMENGIVNYKPVREKKGKELLENICDQNGSCKL ATVDVGQNNPVAIGLFELKKVNGELTKTLISRHPTPI

[0145]

		DFCNKITAYRERYDKLESSIKLDAIKQLTSEQKIEVD NYNNNFTPQNTKQIVCSKLNINPNDLPWDKMISGTH FISEKAQVSNKSEIYFTSTDKGKTKDVMKSDYKWF QDYKPKLSKEVRDALSDIEWRLRRESLEFNKLSKSR EQDARQLANWISSMCDVIGIENLVKKNNFFGGSGKR EPGWDNFYKPKKENRWWINAIHKALTELSQNKGKR VILLPAMRTSITCPKCKYCDSKNRNGEKFNCLKCGIE LNADIDVATENLATVAITAQSMPKPTCERSGDAKKP VRARKAKAPEFHDKLAPSYTVVLREAV
CasΦ.13	13	MRQPAEKTAFQVFRQEVIGTQKLSGGDAKTAGRLY KQGKMEAAREWLLKGARDDVPPNFQPPAKCLVVAV SHPFEEWDISKTNHDVQAYIYAQPLQAEGHLNGLSE KWEDTSADQHKLWFEKTGVPDRGLPVQAINKIAKA AVNRAFGVVRKVENRNEKRRSRDNRIAEHNRENGL TEVVREAPEVATNADGFLLHPPGIDPSILSYASVSPVP YNSSKHSFVRLPEEYQAYNVEPDAPIPQFVVEDRFAI PPGQPGYVPEWQRLKCSTNKHRRMRQWSNQDYKP KAGRRAKPLEFQAHLTRERAKGALLVVMRIKEDWV VFDVRGLLRNVEWRKVLSEEAREKLTLKGLLDLFT GDPVIDTKRGIVTFLYKAEITKILSKRTVKTKNARDL LLRLTEPGEDGLRREVGLVAVDLGQTHPIAAAIYRIG RTSAGALESTVLHRQGLREDQKEKLKEYRKRHTAL DSRLRKEAFETLSVEQQKEIVTVSGSGAQITKDKVC NYLGVDPSTLPWEKMGSYTHFISDDFLRRGGDPNIV HFDRQPKKGKVSKKSQRIKRSDSQWVGRMRPRLSQ ETAKARMEADWAAQNENEEYKRLARSKQELARWC VNTLLQNTRCITQCDEIVVVIEDLNVKSLHGKGARE PGWDNFFTPKTENRWFIQILHKTFSELPKHRGEHVIE GCPLRTSITCPACSYCDKNSRNGEKFVCVACGATFH ADFEVATYNLVRLATTGMPMPKSLERQGGGEKAGG ARKARKKAKQVEKIVVQANANVTMNGASLHSP
CasΦ.14	14	MSSLPTPLELLKQKHADLFKGLQFSSKDNKMAGKV LKKDGEEAALAFLSERGVSRGELPNFRPPAKTLVVA QSRPFEEFPIYRVSEAIQLYVYSLSVKELETVPSGSST KKEHQRFFQDSSVPDFGYTSVQGLNKIFGLARGIYL GVITRGENQLQKAKSKHEALNKKRRASGEAETEFD PTPYEYMTPERKLAKPPGVNHSIMCYVDISVDEFDF RNPDGIVLPSEYAGYCREINTAIEKGTVDRLGHLKG GPGYIPGHQRKESTTEGPKINFRKGRIRRSYTALYAK RDSRRVRQGKLALPSYRHHMMRLNSNAESAILAVIF FGKDWVVFDLRGLLRNVRWRNLFVDGSTPSTLLG MFGDPVIDPKRGVVAFCYKEQIVPVVSKSITKMVKA PELLNKLYLKSEDPLVLVAIDLGQTNPVGVGVYRVM NASLDYEVVTRFALESELLREIESYRQRTNAFEAQIR AETFDAMTSEEQEEITRVRAFSASKAKENVCHRFGM PVDAVDWATMGSNTIHIAKWVMRHGDPSLVEVLEY RKDNEIKLDKNGVPKKVKLTDKRIANLTSIRLRFSQE TSKHYNDTMWELRRKHPVYQKLSKSKADFSRRVV NSIIRRVNHLVPRARIVFIIEDLKNLGKVFHGSGKREL GWDSYFEPKSENRWFIQVLHKAFSETGKHKGYYIIE

		CWPNWTSCTCPKCSCCDSENRHGEVFRCLACGYTC NTDFGTAPDNLVKIATTGKGLPGPKKRCKGSSKGKN PKIARSSETGVSVTESGAPKVKKSSPTQTSQSSSQSA P
CasΦ.15	15	MIKPTVSQFLTPGFKLIRNHSRTAGLKLKNEGEEACK KFVRENEIPKDECPNFQGGPAIANIIAKSREFTEWEIY QSSLAIQEVIFTLPKDKLPEPILKEEWRAQWLSEHGL DTVPYKEAAGLNLIIKNAVNTYKGVQVKVDNKNKN NLAKINRKNEIAKLNGEQEISFEEIKAFDDKGYLLQK PSPNKSIYCYQSVSPKPFITSKYHNVNLPEEYIGYYR KSNEPIVSPYQFDRLRIPIGEPGYVPKWQYTFLSKKE NKRRKLSKRIKNVSPILGIICIKKDWCVFDMRGLLRT NHWKKYHKPTDSINDLFDYFTGDPVIDTKANVVRF RYKMENGIVNYKPVREKKGKELLENICDQNGSCKL ATVDVGQNNPVAIGLFELKKVNGELTKTLISRHPTPI DFCNKITAYRERYDKLESSIKLDAIKQLTSEQKIEVD NYNNNFTPQNTKQIVCSKLNINPNDLPWDKMISGTH FISEKAQVSNKSEIYFTSTDKGKTKDVMKSDYKWF QDYKPKLSKEVRDALSDIEWRLRRESLEFNKLSKSR EQDARQLANWISSMCDVIGIENLVKKNNFFGGSGKR EPGWDNFYKPKKENRWWINAIHKALTELSQNKGKR VILLPAMRTSITCPKCKYCDSKNRNGEKFNCLKCGIE LNADIDVATENLATVAITAQSMPKPTCERSGDAKKP VRARKAKAPEFHDKLAPSYTVVLREAV
CasΦ.16	16	MSNKTTPPSPLSLLLRAHFPGLKFESQDYKIAGKKL RDGGPEAVISYLTGKGQAKLKDVKPPAKAFVIAQSR PFIEWDLVRVSRQIQEKIFGIPATKGRPKQDGLSETAF NEAVASLEVDGKSKLNEETRAAFYEVLGLDAPSLHA QAQNALIKSAISIREGVLKKVENRNEKNLSKTKRRK EAGEEATFVEEKAHDERGYLIHPPGVNQTIPGYQAV VIKSCPSDFIGLPSGCLAKESAEALTDYLPHDRMTIP KGQPGYVPEWQHPLLNRRKNRRRRDWYSASLNKP KATCSKRSGTPNRKNSRTDQIQSGRFKGAIPVLMRF QDEWVIIDIRGLLRNARYRKLLKEKSTIPDLLSLFTG DPSIDMRQGVCTFIYKAGQACSAKMVKTKNAPEILS ELTKSGPVVLVSIDLGQTNPIAAKVSRVTQLSDGQLS HETLLRELLSNDSSDGKEIARYRVASDRLRDKLANL AVERLSPEHKSEILRAKNDTPALCKARVCAALGLNP EMIAWDKMTPYTEFLATAYLEKGGDRKVATLKPKN RPEMLRRDIKFKGTEGVRIEVSPEAAEAYREAQWDL QRTSPEYLRLSTWKQELTKRILNQLRHKAAKSSQCE VVVMAFEDLNIKMMHGNGKWADGGWDAFFIKKR ENRWFMQAFHKSLTELGAHKGVPTIEVTPHRTSITC TKCGHCDKANRDGERFACQKCGFVAHADLEIATDNI ERVALTGKPMPKPESERSGDAKKSVGARKAAFKPEE DAEAAE
CasΦ.17	17	MYSLEMADLKSEPSLLAKLLRDRFPGKYWLPKYW KLAEKKRLTGGEEAACEYMADKQLDSPPPNFRPPAR CVILAKSRPFEDWPVHRVASKAQSFVIGLSEQGFAAL

[0146]

[0147]

		RAAPPSTADARRDWLRSHGASEDDLMALEAQLLET IMGNAISLHGGVLKKIDNANVKAAKRLSGRNEARL NKGLQELPPEQEGSAYGADGLLVNPPGLNLNIYCRK SCCPKPVKNTARFVGHYPGYLRDSDSILISGTMDRLT IIEGMPGHIPAWQREQGLVKPGGRRRRLSGSESNMR QKVDPSTGPRRSTRSGTVNRSNQRTGRNGDPLLVEI RMKEDWVLLDARGLLRNLRWRESKRGLSCDHEDL SLSGLLALFSGDPVIDPVRNEVVFLYGEGIIPVRSTKP VGTRQSKKLLERQASMGPLTLISCDLGQTNLIAGRA SAISLTHGSLGVRSSVRIELDPEIIKSFERLRKDADRL ETEILTAAKETLSDEQRGEVNSHEKDSPQTAKASLCR ELGLHPPSLPWGQMGPSTTFIADMLISHGRDDDAFL SHGEFPTLEKRKKFDKRFCLESRPLLSSETRKALNES LWEVKRTSSEYARLSQRKKEMARRAVNFVVEISRRK TGLSNVIVNIEDLNVRIFHGGGKQAPGWDGFFRPKS ENRWFIQAIHKAFSDLAAHHGIPVIESDPQRTSMTCP ECGHCDSKNRNGVRFLCKGCGASMDADFDAACRN LERVALTGKPMPKPSTSCERLLSATTGKVCSDHSLSH DAIEKAS
CasΦ.18	18	MEKEITELTKIRREFPNKKFSSTDMKKAGKLLKAEG PDAVRDFLNSCQEIIGDFKPPVKTNIVSISRPFEEWPV SMVGRAIQEYYFSLTKEELESVHPGTSSEDHKSFFNI TGLSNYNYTSVQGLNLIFKNAKAIYDGTLVKANNK NKKLEKKFNEINHKRSLEGLPIITPDFEEPFDENGHL NNPPGINRNIYGYQGCAAKVFVPSKHKMVSLPKEY EGYNRDPNLSLAGFRNRLEIPEGEPGHVPWFQRMDI PEGQIGHVNKIQRFNFVHGKNSGKVKFSDKTGRVKR YHHSKYKDATKPYKFLEESKKVSALDSILAIITIGDD WVVFDIRGLYRNVFYRELAQKGLTAVQLLDLFTGDP VIDPKKGVVTFSYKEGVVPVFSQKIVPRFKSRDTLE KLTSQGPVALLSVDLGQNEPVAARVCSLKNINDKITL DNSCRISFLDDYKKQIKDYRDSLDELEIKIRLEAINSL ETNQQVEIRDLDVFSADRAKANTVDMFDIDPNLISW DSMSDARVSTQISDLYLKNGGDESRVYFEINNKRIKR SDYNISQLVRPKLSDSTRKNLNDSIWKLKRTSEEYLK LSKRKLELSRAVVNYTIRQSKLLSGINDIVIILEDLDV KKKFNGRGIRDIGWDNFFSSRKENRWFIPAFHKTFSE LSSNRGLCVIEVNPAWTSATCPDCGFCSKENRDGINF TCRKCGVSYHADIDVATLNIARVAVLGKPMSGPADR ERLGDTKKPRVARSRKTMKRKDISNSTVEAMVTA
CasΦ.19	19	MLVRTSTLVQDNKNSRSASRAFLKKPKMPKNKHIKE PTELAKLIRELFPGQRFTRAINTQAGKILKHKGRDEV VEFLKNKGIDKEQFMDFRPPTKARIVATSGAIEEFSY LRVSMAIQECCFGKYKFPKEKVNGKLVLETVGLTKE ELDDFLPKKYYENKKSRDRFFLKTGICDYGYTYAQ GLNEIFRNTRAIYEGVFTKVNNRNEKRREKKDKYN EERRSKGLSEEPYDEDESATDESGHLINPPGVNLNIW TCEGFCKGPYVTKLSGTPGYEVILPKVFDGYNRDPN EIISCGITDRFAIPEGEPGHIPWHQRLEIPEGQPGYVPG HQRFADTGQNNSGKANPNKKGRMRKYYGHGTKYT

[0148]

		QPGEYQEVFRKGHREGNKRRYWEEDFRSEAHDCIL YVIHIGDDWVVCDLRGPLRDAYRRGLVPKEGITTQE LCNLFSGDPVIDPKHGVVTFCYKNGLVRAQKTISAG KKSRELLGALTSQGPIALIGVDLGQTEPVGARAFIVN QARGSLSLPTLKGSFLLTAENSSSWNVFKGEIKAYRE AIDDLAIRLKKEAVATLSVEQQTEIESYEAFSAEDAK QLACEKFGVDSSFILWEDMTPYHTGPATYYFAKQFL KKNGGNKSLIEYIPYQKKKSKKTPKAVLRSDYNIAC CVRPKLLPETRKALNEAIRIVQKNSDEYQRLSKRKL EFCRRVVNYLVRKAKKLTGLERVIIAIEDLKSLEKFF TGSGKRDNGWSNFFRPKKENRWFIPAFHKAFSELAP NRGFYVIECNPARTSITDPDCGYCDGDNRDGIKFEC KKCGAKHHTDLDVAPLNIAIVAVTGRPMPKTVSNKS KRERSGGEKSVGASRKRNHRKSKANQEMLDATSSA AE
CasΦ.20	20	MPKIKKPTEISLLRKEVFPDLHFAKDRMRAASLVLK NEGREAAIEYLRVNHEDKPPNFMPPAKTPYVALSRP LEQWPIAQASIAIQKYIFGLTKDEFSATKKLLYGDKS TPNTESRKRWFEVTGVPNFGYMSAQGLNAIFSGAL ARYEGVVQKVENRNKKRFEKLSEKNQLLIEEGQPV KDYVPDTAYHTPETLQKLAENNHVRVEDLGDMIDR LVHPPGIHRSIYGYQQVPPFAYDPDNPKGIILPKAYAG YTRKPHDIIEAMPNRLNIPEGQAGYIPEHQRDKLKK GGRVKRLRTTRVRVDATETVRAKAEALNAEKARLR GKEAILAVFQIEEDWALIDMRGLLRNVYMRKLIAAG ELTPTTLLGYFTETLTLDPRRTEATFCYHLRSEGALH AEYVRHGKNTRELLLDLTKDNEKIALVTIDLGQRNP LAAAIFRVGRDASGDLTENSLEPVSRMLLPQAYLDQI KAYRDAYDSFRQNIWDTALASLTPEQQRQILAYEAY TPDDSKENVLRLLLGGNVMPDDLPWEDMTKNTHYI SDRYLADGGDPSKVWFVPGPRKRKKNAPPLKKPPK PRELVKRSDHNISHLSEFRPQLLKETRDAFEKAKIDT ERGHVGYQKLSTRKDQLCKEILNWLEAEAVRLTRC KTMVLGLEDLNGPFFNQGKGKVRGWVSFFRQKQE NRWIVNGFRKNALARAHDKGKYILELWPSWTSQTC PKCKHVHADNRHGDDFVCLQCGARLHADAEVATW NLAVVAIQGHSLPGPVREKSNDRKKSGSARKSKKAN ESGKVVGAWAAQATPKRATSKKETGTARNPVYNPL ETQASCPAP
CasΦ.21	21	MTPSPQIARLVETPLAAALKAHHPGKKFRSDYLKKA GKILKDQGVEAAMAHLDGKDQAEPPNFKPPAKCRI VARSREFSEWPIVKASVEIQKYIYGLTLEERKACDPG KSSASHKAWFAKTGVNTFGYSSVQGFNLIFGHTLGR YDGVLVKTENLNKKRAEKNERFRAKALAEGRAEPV CPPLVTATNDTGQDVTLEDGRVVRPGQLLQPPGINP NIYAYQQVSPKAYVPGIIELPEEFQGYSRDPNAVILPL VPRDRLSIPKGQPGYVPEPHREGLTGRKDRRMRRYY ETERGTKLKRPPLTAKGRADKANEALLVVVRIDSD WVVMDVRGLLRNARWRRLVSKEGITLNGLLDLFTG DPVLNPKDCSVSRDTGDPVNDPRHGVVTFCYKLGV

[0149]

		VDVCSKDRPIKGFRTKEVLERLTSSGTVGMVSIDLG QTNPVAAAVSRVTKGLQAETLETFTLPDDLLGKVRA YRAKTDRMEEGFRRNALRKLTAEQQAEITRYNDAT EQQAKALVCSTYGIGPEEVPWERMTSNTTYISDHIL DHGGDPDTVFFMATKRGQNKPTLHKRKDKAWGQK FRPAISVETRLARQAAEWELRRASLEFQKLSVWKTE LCRQAVNYVMERTKKRTQCDVIIPVIEDLPVPLFHGS GKRDPGWANFFVHKRENRWFIDGLHKAFSELGKHR GIYVFEVCPQRTSITCPKCGHCDPDNRDGEKFVCLS CQATLNADLDVATTNLVRVALTGKVMPRSERSGDAQ TPGPARKARTGKIKGSKPTSAPQGATQTDAKAHLSQ TGV
CasΦ.22	22	MTPSPQIARLVETPLAAALKAHHPGKKFRSDYLKKA GKILKDQGVEAAMAHLDGKDQAEPPNFKPPAKCRI VARSREFSEWPIVKASVEIQKYIYGLTLEERKACDPG KSSASHKAWFAKTGVNTFGYSSVQGFNLIFGHTLGR YDGVLVKTENLNKKRAEKNERFRAKALAEGRAEPV CPPLVTATNDTGQDVTLEDGRVVRPGQLLQPPGINP NIYAYQQVSPKAYVPGIIELPEEFQGYSRDPNAVILPL VPRDRLSIPKGQPGYVPEPHREGLTGRKDRRMRRYY ETERGTKLKRPPLTAKGRADKANEALLVVVRIDSD WVVMDVRGLLRNARWRRLVSKEGITLNGLLDLFTG DPVLNPKDCSVSRDTGDPVNDPRHGVVTFCYKLGV VDVCSKDRPIKGFRTKEVLERLTSSGTVGMVSIDLG QTNPVAAAVSRVTKGLQAETLETFTLPDDLLGKVRA YRAKTDRMEEGFRRNALRKLTAEQQAEITRYNDAT EQQAKALVCSTYGIGPEEVPWERMTSNTTYISDHIL DHGGDPDTVFFMATKRGQNKPTLHKRKDKAWGQK FRPAISVETRLARQAAEWELRRASLEFQKLSVWKTE LCRQAVNYVMERTKKRTQCDVIIPVIEDLPVPLFHGS GKRDPGWANFFVHKRENRWFIDGLHKAFSELGKHR GIYVFEVCPQRTSITCPKCGHCDPDNRDGEKFVCLS CQATLHADLDVATTNLVRVALTGKVMPRSERSGDAQ TPGPARKARTGKIKGSKPTSAPQGATQTDAKAHLSQ TGV
CasΦ.23	23	MKTEKPKTALTLLREEVFPGKKYRLDVLKEAGKKL STKGREATIEFLTGKDEERPQNFQPPAKTSIVAQSRPF DQWPIVQVSLAVQKYIYGLTQSEFEANKKALYGETG KAISTESRRAWFEATGVDNFGFTAAQGINPIFSQAVA RYEGVIKKVENRNEKKLKKLTKKNLLRLESGEEIED FEPEATFNEEGRLLQPPGANPNIYCYQQISPRIYDPSD PKGVILPQIYAGYDRKPEDIISAGVPNRLAIPEGQPGY IPEHQRAGLKTQGRIRCRASVEAKARAAILAVVHLG EDWVVLDLRGLLRNVYWRKLASPGTLTLKGLLDFF TGGPVLDARRGIATFSYTLKSAAAVHAENTYKGKGT REVLLKLTENNSVALVTVDLGQRNPLAAMIARVSRT SQGDLTYPESVEPLTRLFLPDPFLEEVRKYRSSYDAL RLSIREAAIASLTPEQQAEIRYIEKFSAGDAKKNVAE VFGIDPTQLPWDAMTPRTTYISDLFLRMGGDRSRVF FEVPPKKAKKAPKKPPKKPAGPRIVKRTDGMIARLR

[0150]

		EIRPRLSAETNKAFQEARWEGERSNVAFQKLSVRRK QFARTVVNHLVQTAQKMSRCDTVVLGIEDLNVPFFH GRGKYQPGWEGFFRQKKENRWLINDMHKALSERG PHRGGYVLELTPFWTSLRCPKCGHTDSANRDGDDF VCVKCGAKLHSDLEVATANLALVAITGQSIPRPPREQ SSGKKSTGTARMKKTSGETQGKGSKACVSEALNKIE QGTARDPVYNPLNSQVSCPAP
CasΦ.24	24	VYNPDMKKPNNIRRIREEHFEGLCFGKDVLTKAGKI YEKDGEEAAIDFLMGKDEEDPPNFKPPAKTTIVAQS RPFDQWPIYQVSQAVQERVFAYTEEEFNASKEALFS GDISSKSRDFWFKTNNISDQGIGAQGLNTILSHAFSR YSGVIKKVENRNKKRLKKLSKKNQLKIEEGLEILEF KPDSAFNENGLLAQPPGINPNIYGYQAVTPFVFDPDN PGDVILPKQYEGYSRKPDDIIEKGPSRLDIPKGQPGY VPEHQRKNLKKKGRVRLYRRTPPKTKALASILAVLQ IGKDWVLFDMRGLLRSVYMREAATPGQISAKDLLD TFTGCPVLNTRTGEFTFCYKLRSEGALHARKIYTKG ETRTLLTSLTSENNTIALVTVDLGQRNPAAIMISRLSR KEELSEKDIQPVSRRLLPDRYLNELKRYRDAYDAFR QEVRDEAFTSLCPEHQEQVQQYEALTPEKAKNLVLK HFFGTHDPDLPWDDMTSNTHYIANLYLERGGDPSK VFFTRPLKKDSKSKKPRKPTKRTDASISRLPEIRPKM PEDARKAFEKAKWEIYTGHEKFPKLAKRVNQLCREI ANWIEKEAKRLTLCDTVVVGIEDLSLPPKRGKGKFQ ETWQGFFRQKFENRWVIDTLKKAIQNRAHDKGKYV LGLAPYWTSQRCPACGFIHKSNRNGDHFKCLKCEA LFHADSEVATWNLALVAVLGKGITNPDSKKPSGQKK TGTTRKKQIKGKNKGKETVNVPPTTQEVEDIIAFFE KDDETVRNPVYKPTGT
CasΦ.25	25	MKKPNNIRRIREEHFEGLCFGKDVLTKAGKIYEKDG EEAAIDFLMGKDEEDPPNFKPPAKTTIVAQSRPFDQ WPIYQVSQAVQERVFAYTEEEFNASKEALFSGDISSK SRDFWFKTNNISDQGIGAQGLNTILSHAFSRYSGVIK KVENRNKKRLKKLSKKNQLKIEEGLEILEFKPDSAF NENGLLAQPPGINPNIYGYQAVTPFVFDPDNPGDVIL PKQYEGYSRKPDDIIEKGPSRLDIPKGQPGYVPEHQR KNLKKKGRVRLYRRTPPKTKALASILAVLQIGKDWV LFDMRGLLRSVYMREAATPGQISAKDLLDTFTGCPV LNTRTGEFTFCYKLRSEGALHARKIYTKGETRTLLTS LTSENNTIALVTVDLGQRNPAAIMISRLSRKEELSEK DIQPVSRRLLPDRYLNELKRYRDAYDAFRQEVRDEA FTSLCPEHQEQVQQYEALTPEKAKNLVLKHFFGTHD PDLPWDDMTSNTHYIANLYLERGGDPSKVFFTRPLK KDSKSKKPRKPTKRTDASISRLPEIRPKMPEDARKAF EKAKWEIYTGHEKFPKLAKRVNQLCREIANWIEKEA KRLTLCDTVVVGIEDLSLPPKRGKGKFQETWQGFFR QKFENRWVIDTLKKAIQNRAHDKGKYVLGLAPYW TSQRCPACGFIHKSNRNGDHFKCLKCEALFHADSEV ATWNLALVAVLGKGITNPDSKKPSGQKKTGTTRKK QIKGKNKGKETVNVPPTTQEVEDIIAFFEKDDETVR

		NPVYKPTGT
CasΦ.26	26	VIKTHFPAGRFRKDHQKTAGKKLKHEGEEACVEYL RNKVSDYPPNFKPPAKGTIVAQSRPFSEWPIVRASEA IQKYVYGLTVAELDVFSPGTSKPSHAEWFAKTGVEN YGYRQVQGLNTIFQNTVNRFKGVLKKVENRNKKSL KRQEGANRRRVEEGLPEVPVTVESATDDEGRLLQPP GVNPSIYGYQGVAPRVCTDLQGFSGMSVDFAGYRR DPDAVLVESLPEGRLSIPKGERGYVPEWQRDPERNK FPLREGSRRQRKWYSNACHKPKPGRTSKYDPEALK KASAKDALLVSISIGEDWAIIDVRGLLRDARRRGFTP EEGLSLNSLLGLFTEYPVFDVQRGLITFTYKLGQVD VHSRKTVPTFRSRALLESLVAKEEIALVSVDLGQTNP ASMKVSRVRAQEGALVAEPVHRMFLSDVLLGELSS YRKRMDAFEDAIRAQAFETMTPEQQAEITRVCDVS VEVARRRVCEKYSISPQDVPWGEMTGHSTFIVDAVL RKGGDESLVYFKNKEGETLKFRDLRISRMEGVRPRL TKDTRDALNKAVLDLKRAHPTFAKLAKQKLELARR CVNFIEREAKRYTQCERVVFVIEDLNVGFFHGKGKR DRGWDAFFTAKKENRWVIQALHKAFSDLGLHRGSY VIEVTPQRTSMTCPRCGHCDKGNRNGEKFVCLQCG ATLHADLEVATDNIERVALTGKAMPKPPVRERSGDV QKAGTARKARKPLKPKQKTEPSVQEGSSDDGVDKS PGDASRNPVYNPSDTLSI
CasΦ.27	27	MAKAKTLAALLRELLPGQHLAPHHRWVANKLLMT SGDAAAFVIGKSVSDPVRGSFRKDVITKAGRIFKKD GPDAAAAFLDGKWEDRPPNFQPPAKAAIVAISRSFD EWPIVKVSCAIQQYLYALPVQEFESSVPEARAQAHA AWFQDTGVDDCNFKSTQGLNAIFNHGKRTYEGVLK KAQNRNDKKNLRLERINAKRAEAGQAPLVAGPDES PTDDAGCLLHPPGINANIYCYQQVSPRPYEQSCGIQL PPEYAGYNRLSNVAIPPMPNRLDIPQGQPGYVPEHH RHGIKKFGRVRKRYGVVPGRNRDADGKRTRQVLTE AGAAAKARDSVLAVIRIGDDWTVVDLRGLLRNAQ WRKLVPDGGITVQGLLDLFTGDPVIDPRRGVVTFIY KADSVGIHSEKVCRGKQSKNLLERLCAMPEKSSTRL DCARQAVALVSVDLGQRNPVAARFSRVSLAEGQLQ AQLVSAQFLDDAMVAMIRSYREEYDRFESLVREQA KAALSPEQLSEIVRHEADSAESVKSCVCAKFGIDPAG LSWDKMTSGTWRIADHVQAAGGDVEWFFFKTCGK GKEIKTVRRSDFNVAKQFRLRLSPETRKDWNDAIWE LKRGNPAYVSFSKRKSEFARRVVNDLVHRARRAVRC DEVVFAIEDLNISFFHGKGQRQMGWDAFFEVKQEN RWFIQALHKAFVERATHKGGYVLEVAPARTSTTCPE CRHCDPESRRGEQFCCIKCRHTCHADLEVATFNIEQV ALTGVSLPKRLSSTLL
CasΦ.28	28	MSKEKTPPSAYAILKAKHFPDLDFEKKHKMMAGRM FKNGASEQEVVQYLQGKGSESLMDVKPPAKSPILAQ SRPFDEWEMVRTSRLIQETIFGIPKRGSIPKRDGLSET QFNELVASLEVGGKPMLNKQTRAIFYGLLGIKPPTFH

[0151]

[0152]

		AMAQNILIDLAINIRKGVLKKVDNLNEKNRKKVKRI RDAGEQDVMVPAEVTAHDDRGYLNHPPGVNPTIPG YQGVVIPFPEGFEGLPSGMTPVDWSHVLVDYLPHDR LSIPKGSPGYIPEWQRPLLNRHKGRRHRSWYANSLN KPRKSRTEEAKDRQNAGKRTALIEAERLKGVLPVLM RFKEDWLIIDARGLLRNARYRGVLPEGSTLGNLIDLF SDSPRVDTRRGICTFLYRKGRAYSTKPVKRKESKETL LKLTEKSTIALVSIDLGQTNPLTAKLSKVRQVDGCLV AEPVLRKLIDNASEDGKEIARYRVAHDLLRARILEDA IDLLGIYKDEVVRARSDTPDLCKERVCRFLGLDSQAI DWDRMTPYTDFIAQAFVAKGGDPKVVTIKPNGKPK MFRKDRSIKNMKGIRLDISKEASSAYREAQWAIQRE SPDFQRLAVWQSQLTKRIVNQLVAWAKKCTQCDTV VLAFEDLNIGMMHGSGKWANGGWNALFLHKQENR WFMQAFHKALTELSAHKGIPTIEVLPHRTSITCTQCG HCHPGNRDGERFKCLKCEFLANTDLEIATDNIERVAL TGLPMPKGERSSAKRKPGGTRKTKKSKHSGNSPLA AE
CasΦ.29	29	MEKAGPTSPLSVLIHKNFEGCRFQIDHLKIAGRKLA REGEAAAIEYLLDKKCEGLPPNFQPPAKGNVIAQSR PFTEWAPYRASVAIQKYIYSLSVDERKVCDPGSSSDS HEKWFKQTGVQNYGYTHVQGLNLIFKHALARYDG VLKKVDNRNEKNRKKAERVNSFRREEGLPEEVFEE EKATDETGHLLQPPGVNHSIYCYQSVRPKPFNPRKP GGISLPEAYSGYSLKPQDELPIGSLDRLSIPPGQPGYV PEWQRSQLTTQKHRRKRSWYSAQKWKPRTGRTSTF DPDRLNCARAQGAILAVVRIHEDWVVFDVRGLLRN ALWRELAGKGLTVRDLLDFFTGDPVVDTKRGVVTF TYKLGKVDVHSLRTVRGKRSKKVLEDLTLSSDVGL VTIDLGQTNVLAADYSKVTRSENGELLAVPLSKSFL PKHLLHEVTAYRTSYDQMEEGFRRKALLTLTEDQQV EVTLVRDFSVESSKTKLLQLGVDVTSLPWEKMSSNT TYISDQLLQQGADPASLFFDGERDGKPCRHKKKDRT WAYLVRPKVSPETRKALNEALWALKNTSPEFESLSK RKIQFSRRCMNYLLNEAKRISGCGQVVFVIEDLNVR VHHGRGKRAIGWDNFFKPKRENRWFMQALHKAAS ELAIHRGMHIIEACPARSSITCPKCGHCDPENRCSSD REKFLCVKCGAAFHADLEVATFNLRKVALTGTALPK SIDHSRDGLIPKGARNRKLKEPQANDEKACA
CasΦ.30	30	MKEQSPLSSVLKSNFPGKKFLSADIRVAGRKLAQLG EAAAVEYLSPRQRDSVPNFRPPAFCTVVAKSRPFEE WPIYKASVLLQEQIYGMTGQEFEERCGSIPTSLSGLR QWASSVGLGAAMEGLHVQGMNLMVKNAINRYKG VLVKVENRNKKLVEANEAKNSSREERGLPPLRPPEL GSAFGPDGRLVNPPGIDKSIRLYQGVSPVPVVKTTGR PTVHRLDIPAGEKGHVPLWQREAGLVKEGPRRRRM WYSNSNLKRSRKDRSAEASEARKADSVVVRVSVKE DWVDIDVRGLLRNVAWRGIERAGESTEDLLSLFSGD PVVDPSRDSVVFLYKEGVVDVLSKKVVGAGKSRKQ LEKMVSEGPVALVSCDLGQTNYVAARVSVLDESLSP

[0153]

		VRSFRVDPREFPSADGSQGVVGSLDRIRADSDRLEA KLLSEAEASLPEPVRAEIEFLRSERPSAVAGRLCLKL GIDPRSIPWEKMGSTTSFISEALSAKGSPLALHDGAPI KDSRFAHAARGRLSPESRKALNEALWERKSSSREYG VISRRKSEASRRMANAVLSESRRLTGLAVVAVNLED LNMVSKFFHGRGKRAPGWAGFFTPKMENRWFIRSI HKAMCDLSKHRGITVIESRPERTSISCPECGHCDPEN RSGERFSCKSCGVSLHADFEVATRNLERVALTGKPM PRRENLHSPEGATASRKTRKKPREATASTFLDLRSVL SSAENEGSGPAARAG
CasΦ.31	31	MLPPSNKIGKSMSLKEFINKRNFKSSIIKQAGKILKK EGEEAVKKYLDDNYVEGYKKRDFPITAKCNIVASNR KIEDFDISKFSSFIQNYVFNLNKDNFEEFSKIKYNRKS FDELYKKIANEIGLEKPNYENIQGEIAVIRNAINIYNG VLKKVENRNKKIQEKNQSKDPPKLLSAFDDNGFLA ERPGINETIYGYQSVRLRHLDVEKDKDIIVQLPDIYQ KYNKKSTDKISVKKRLNKYNVDEYGKLISKRRKERI NKDDAILCVSNFGDDWIIFDARGLLRQTYRYKLKK KGLCIKDLLNLFTGDPIINPTKTDLKEALSLSFKDGII NNRTLKVKNYKKCPELISELIRDKGKVAMISIDLGQT NPISYRLSKFTANNVAYIENGVISEDDIVKMKKWRE KSDKLENLIKEEAIASLSDDEQREVRLYENDIADNTK KKILEKFNIREEDLDFSKMSNNTYFIRDCLKNKNIDE SEFTFEKNGKKLDPTDACFAREYKNKLSELTRKKIN EKIWEIKKNSKEYHKISIYKKETIRYIVNKLIKQSKEK SECDDIIVNIEKLQIGGNFFGGRGKRDPGWNNFFLPK EENRWFINACHKAFSELAPHKGIIVIESDPAYTSQTCP KCENCDKENRNGEKFKCKKCNYEANADIDVATENL EKIAKNGRRLIKNFDQLGERLPGAEMPGGARKRKPS KSLPKNGRGAGVGSEPELINQSPSQVIA
CasΦ.32	32	VPDKKETPLVALCKKSFPGLRFKKHDSRQAGRILKS KGEGAAVAFLEGKGGTTQPNFKPPVKCNIVAMSRPL EEWPIYKASVVIQKYVYAQSYEEFKATDPGKSEAGL RAWLKATRVDTDGYFNVQGLNLIFQNARATYEGVL KKVENRNSKKVAKIEQRNEHRAERGLPLLTLDEPET ALDETGHLRHRPGINCSVFGYQHMKLKPYVPGSIPG VTGYSRDPSTPIAACGVDRLEIPEGQPGYVPPWDRE NLSVKKHRRKRASWARSRGGAIDDNMLLAVVRVAD DWALLDLRGLLRNTQYRKLLDRSVPVTIESLLNLVT NDPTLSVVKKPGKPVRYTATLIYKQGVVPVVKAKV VKGSYVSKMLDDTTETFSLVGVDLGVNNLIAANAL RIRPGKCVERLQAFTLPEQTVEDFFRFRKAYDKHQE NLRLAAVRSLTAEQQAEVLALDTFGPEQAKMQVCG HLGLSVDEVPWDKVNSRSSILSDLAKERGVDDTLY MFPFFKGKGKKRKTEIRKRWDVNWAQHFRPQLTSE TRKALNEAKWEAERNSSKYHQLSIRKKELSRHCVN YVIRTAEKRAQCGKVIVAVEDLHHSFRRGGKGSRKS GWGGFFAAKQEGRWLMDALFGAFCDLAVHRGYRV IKVDPYNTSRTCPECGHCDKANRDRVNREAFICVCC GYRGNADIDVAAYNIAMVAITGVSLRKAARASVAST

[0154]

		PLESLAAE
CasΦ.33	33	MSKTKELNDYQEALARRLPGVRHQKSVRRAARLV YDRQGEDAMVAFLDGKEVDEPYTLQPPAKCHILAVS RPIEEWPIARVTMAVQEHVYALPVHEVEKSRPETTE GSRSAWFKNSGVSNHGVTHAQTLNAILKNAYNVYN GVIKKVENRNAKKRDSLAAKNKSRERKGLPHFKAD PPELATDEQGYLLQPPSPNSSVYLVQQHLRTPQIDLP SGYTGPVVDPRSPIPSLIPIDRLAIPPGQPGYVPLHDR EKLTSNKHRRMKLPKSLRAQGALPVCFRVFDDWAV VDGRGLLRHAQYRRLAPKNVSIAELLELYTGDPVID IKRNLMTFRFAEAVVEVTARKIVEKYHNKYLLKLTE PKGKPVREIGLVSIDLNVQRLIALAIYRVHQTGESQL ALSPCLHREILPAKGLGDFDKYKSKFNQLTEEILTAA VQTLTSAQQEEYQRYVEESSHEAKADLCLKYSITPH ELAWDKMTSSTQYISRWLRDHGWNASDFTQITKGR KKVERLWSDSRWAQELKPKLSNETRRKLEDAKHDL QRANPEWQRLAKRKQEYSRHLANTVLSMAREYTA CETVVIAIENLPMKGGFVDGNGSRESGWDNFFTHK KENRWMIKDIHKALSDLAPNRGVHVLEVNPQYTSQ TCPECGHRDKANRDPIQRERFCCTHCGAQRHADLE VATHNIAMVATTGKSLTGKSLAPQRLQEAAE
CasΦ.41	34	VLLSDRIQYTDPSAPIPAMTVVDRRKIKKGEPGYVPP FMRKNLSTNKHRRMRLSRGQKEACALPVGLRLPDG KDGWDFIIFDGRALLRACRRLRLEVTSMDDVLDKF TGDPRIQLSPAGETIVTCMLKPQHTGVIQQKLITGKM KDRLVQLTAEAPIAMLTVDLGEHNLVACGAYTVGQR RGKLQSERLEAFLLPEKVLADFEGYRRDSDEHSETL RHEALKALSKRQQREVLDMLRTGADQARESLCYK YGLDLQALPWDKMSSNSTFIAQHLMSLGFGESATH VRYRPKRKASERTILKYDSRFAAEEKIKLTDETRRA WNEAIWECQRASQEFRCLSVRKLQLARAAVNWTLT QAKQRSRCPRVVVVVEDLNVRFMHGGGKRQEGWA GFFKARSEKRWFIQALHKAYTELPTNRGIHVMEVNP ARTSITCTKCGYCDPENRYGEDFHCRNPKCKVRGG HVANADLDIATENLARVALSGPMPKAPKLK
CasΦ.34	35	MTPSFGYQMIIVTPIHHASGAWATLRLLFLNPKTSGV MLGMTKTKSAFALMREEVFPGLLFKSADLKMAGR KFAKEGREAAIEYLRGKDEERPANFKPPAKGDIIAQS RPFDQWPIVQVSQAIQKYIFGLTKAEFDATKTLLYGE GNHPTTESRRRWFEATGVPDFGFTSAQGLNAIFSSAL ARYEGVIQKVENRNEKRLKKLSEKNQRLVEEGHAV EAYVPETAFHTLESLKALSEKSLVPLDDLMDKIDRL AQPPGINPCLYGYQQVAPYIYDPENPRGVVLPDLYL GYCRKPDDPITACPNRLDIPKGQPGYIPEHQRGQLK KHGRVRRFRYTNPQAKARAKAQTAILAVLRIDEDW VVMDLRGLLRNVYFREVAAPGELTARTLLDTFTGCP VLNLRSNVVTFCYDIESKGALHAEYVRKGWATRNK LLDLTKDGQSVALLSVDLGQRHPVAVMISRLKRDDK GDLSEKSIQVVSRTFADQYVDKLKRYRVQYDALRK

[0155]

		EIYDAALVSLPPEQQAEIRAYEAFAPGDAKANVLSV MFQGEVSPDELPWDKMNTNTHYISDLYLRRGGDPS RVFFVPQPSTPKKNAKKPPAPRKPVKRTDENVSHMP EFRPHLSNETREAFQKAKWTMERGNVRYAQLSRFL NQIVREANNWLVSEAKKLTQCQTVVWAIEDLHVPFF HGKGKYHETWDGFFRQKKEDRWFVNVFHKAISER APNKGEYVMEVAPYRTSQRCPVCGFVDADNRHGD HFKCLRCGVELHADLEVATWNIALVAVQGHGIAGPP REQSCGGETAGTARKGKNIKKNKGLADAVTVEAQD SEGGSKKDAGTARNPVYIPSESQVNCPAP
CasΦ.35	36	MKPKTPKPPKTPVAALIDKHFPGKRFRASYLKSVGK KLKNQGEDVAVRFLTGKDEERPPNFQPPAKSNIVAQS RPIEEWPIHKVSVAVQEYVYGLTVAEKEACSDAGESS SSHAAWFAKTGVENFGYTSVQGLNKIFPPTFNRFDG VIKKVENRNEKKRQKATRINEAKRNKGQSEDPPEAE VKATDDAGYLLQPPGINHSVYGYQSITLCPYTAEKF PTIKLPEEYAGYHSNPDAPIPAGVPDRLAIPEGQPGH VPEEHRAGLSTKKHRRVRQWYAMANWKPKPKRTS KPDYDRLAKARAQGALLIVIRIDEDWVVVDARGLL RNVRWRSLGKREITPNELLDLFTGDPVLDLKRGVVT FTYAEGVVNVCSRSTTKGKQTKVLLDAMTAPRDGK KRQIGMVAVDLGQTNPIAAEYSRVGKNAAGTLEATP LSRSTLPDELLREIALYRKAHDRLEAQLREEAVLKLT AEQQAENARYVETSEEGAKLALANLGVDTSTLPWD AMTGWSTCISDHLINHGGDTSAVFFQTIRKGTKKLE TIKRKDSSWADIVRPRLTKETREALNDFLWELKRSH EGYEKLSKRLEELARRAVNHVVQEVKWLTQCQDIV IVIEDLNVRNFHGGGKRGGGWSNFFTVKKENRWFM QALHKAFSDLAAHRGIPVLEVYPARTSITCLGCGHC DPENRDGEAFVCQQCGATFHADLEVATRNIARVALT GEAMPKAPAREQPGGAKKRGTSRRRKLTEVAVKSA EPTIHQAKNQQLNGTSRDPVYKGSELPAL
CasΦ.43	37	MSEITDLLKANFKGKTFKSADMRMAGRILKKSGAQ AVIKYLSDKGAVDPPDFRPPAKCNIIAQSRPFDEWPIC KASMAIQQHIYGLTKNEFDESSPGTSSASHEQWFAK TGVDTHGFTHVQGLNLIFQHAKKRYEGVIKKVENY NEKERKKFEGINERRSKEGMPLLEPRLRTAFGDDGK FAEKPGVNPSIYLYQQTSPRPYDKTKHPYVHAPFEL KEITTIPTQDDRLKIPFGAPGHVPEKHRSQLSMAKHK RRRAWYALSQNKPRPPKDGSKGRRSVRDLADLKAA SLADAIPLVSRVGFDWVVIDGRGLLRNLRWRKLAH EGMTVEEMLGFFSGDPVIDPRRNVATFIYKAEHATV KSRKPIGGAKRAREELLKATASSDGVIRQVGLISVDL GQTNPVAYEISRMHQANGELVAEHLEYGLLNDEQV NSIQRYRAAWDSMNESFRQKAIESLSMEAQDEIMQA STGAAKRTREAVLTMFGPNATLPWSRMSSNTTCISD ALIEVGKEEETNFVTSNGPRKRTDAQWAAYLRPRVN PETRALLNQAVWDLMKRSDEYERLSKRKLEMARQ CVNFVVARAEKLTQCNNIGIVLENLVVRNFHGSGRR ESGWEGFFEPKRENRWFMQVLHKAFSDLAQHRGV

[0156]

		MVFEVHPAYSSQTCPACRYVDPKNRSSEDRERFKCL KCGRSFNADREVATFNIREIARTGVGLPKPDCERSRG VQTTGTARNPGRSLKSNKNPSEPKRVLQSKTRKKIT STETQNEPLATDLKT
CasΦ.44	38	MTPKTESPLSALCKKHFPGKRFRTNYLKDAGKILKK HGEDAVVAFLSDKQEDEPANFCPPAKVHILAQSRPFE DWPINLASKAIQTYVYGLTADERKTCEPGTSKESHD RWFKETGVDHHGFTSVQGLNLIFKHTLNRYDGVIK KVETRNEKRRSSVVRINEKKAAEGLPLIAAEAEETA FGEDGRLLQPPGVNHSIYCFQQVSPQPYSSKKHPQV VLPHAVQGVDPDAPIPVGRPNRLDIPKGQPGYVPEW QRPHLSMKCKRVRMWYARANWRRKPGRRSVLNEA RLKEASAKGALPIVLVIGDDWLVMDARGLLRSVFW RRVAKPGLSLSELLNVTPTGLFSGDPVIDPKRGLVTF TSKLGVVAVHSRKPTRGKKSKDLLLKMTKPTDDGM PRHVGMVAIDLGQTNPVAAEYSRVVQSDAGTLKQE PVSRGVLPDDLLKDVARYRRAYDLTEESIRQEAIALL SEGHRAEVTKLDQTTANETKRLLVDRGVSESLPWE KMSSNTTYISDCLVALGKTDDVFFVPKAKKGKKET GIAVKRKDHGWSKLLRPRTSPEARKALNENQWAVK RASPEYERLSRRKLELGRRCVNHIIQETKRWTQCEDI VVVLEDLNVGFFHGSGKRPDGWDNFFVSKRENRW FIQVLHKAFGDLATHRGTHVIEVHPARTSITCIKCGH CDAGNRDGESFVCLASACGDRRHADLEVATRNVAR VAITGERMPPSEQARDVQKAGGARKRKPSARNVKS SYPAVEPAPASP
CasΦ.36	39	MSDNKMKKLSKEEKPLTPLQILIRKYIDKSQYPSGFK TTIIKQAGVRIKSVKSEQDEINLANWIISKYDPTYIKR DFNPSAKCQIIATSRSVADFDIVKMSNKVQEIFFASSH LDKNVFDIGKSKSDHDSWFERNNVDRGIYTYSNVQ GMNLIFSNTKNTYLGVAVKAQNKFSSKMKRIQDINN FRITNHQSPLPIPDEIKIYDDAGFLLNPPGVNPNIFGY QSCLLKPLENKEIISKTSFPEYSRLPADMIEVNYKISN RLKFSNDQKGFIQFKDKLNLFKINSQELFSKRRRLSG QPILLVASFGDDWVVLDGRGLLRQVYYRGIAKPGSI TISELLGFFTGDPIVDPIRGVVSLGFKPGVLSQETLKT TSARIFAEKLPNLVLNNNVGLMSIDLGQTNPVSYRLS EITSNMSVEHICSDFLSQDQISSIEKAKTSLDNLEEEI AIKAVDHLSDEDKINFANFSKLNLPEDTRQSLFEKYP ELIGSKLDFGSMGSGTSYIADELIKFENKDAFYPSGK KKFDLSFSRDLRKKLSDETRKSYNDALFLEKRTNDK YLKNAKRRKQIVRTVANSLVSKIEELGLTPVINIENL AMSGGFFDGRGKREKGWDNFFKVKKENRWVMKD FHKAFSELSPHHGVIVIESPPYCTSVTCTKCNFCDKK NRNGHKFTCQRCGLDANADLDIATENLEKVAISGKR MPGSERSSDERKVAVARKAKSPKGKAIKGVKCTITD EPALLSANSQDCSQSTS
CasΦ.37	40	MALSLAEVRERHFKGLRFRSSYLKRAGKILKKEGEA ACVAYLTGKDEESPPNFKPPAKCDVVAQSRPFEEWPI

[0157]

		VQASVAVQSYVYGLTKEAFEAFNPGTTKQSHEACLA ATGIDTCGYSNVQGLNLIFRQAKNRYEGVITKVENR NKKAKKKLTRKNEWRQKNGHSELPEAPEELTFNDE GRLLQPPGINPSLYTYQQISPTPWSPKDSSILPPQYAG YERDPNAPIPFGVAKDRLTIASGCPGYIPEWMRTAGE KTNPRTQKKFMHPGLSTRKNKRMRLPRSVRSAPLG ALLVTIHLGEDWLVLDVRGLLRNARWRGVAPKDIST QGLLNLFTGDPVIDTRRGVVTFTYKPETVGIHSRTW LYKGKQTKEVLEKLTQDQTVALVAIDLGQTNPVSAA ASRVSRSGENLSIETVDRFFLPDELIKELRLYRMAHD RLEERIREESTLALTEAQQAEVRALEHVVRDDAKNK VCAAFNLDAASLPWDQMTSNTTYLSEAILAQGVSR DQVFFTPNPKKGSKEPVEVMRKDRAWVYAFKAKLS EETRKAKNEALWALKRASPDYARLSKRREELCRRSV NMVINRAKKRTQCQVVIPVLEDLNIGFFHGSGKRLP GWDNFFVAKKENRWLMNGLHKSFSDLAVHRGFYV FEVMPHRTSITCPACGHCDSENRDGEAFVCLSCKRT YHADLDVATHNLTQVAGTGLPMPEREHPGGTKKPG GSRKPESPQTHAPILHRTDYSESADRLGS
	CasΦ.45	41	QAVIKYLSDKGAVDPPDFRPPAKCNIIAQSRPFDEWPI CKASMAIQQHIYGLTKNEFDESSPGTSSASHEQWFA KTGVDTHGFTHVQGLNLIFQHAKKRYEGVIKKVEN YNEKERKKFEGINERRSKEGMPLLEPRLRTAFGDDG KFAEKPGVNPSIYLYQQTSPRPYDKTKHPYVHAPFE LKEITTIPTQDDRLKIPFGAPGHVPEKHRSQLSMAKH KRRRAWYALSQNKPRPPKDGSKGRRSVRDLADLKA ASLADAIPLVSRVGFDWVVIDGRGLLRNLRWRKLA HEGMTVEEMLGFFSGDPVIDPRRNVATFIYKAEHAT VKSRKPIGGAKRAREELLKATASSDGVIRQVGLISVD LGQTNPVAYEISRMHQANGELVAEHLEYGLLNDEQ VNSIQRYRAAWDSMNESFRQKAIESLSMEAQDEIMQ ASTGAAKRTREAVLTMFGPNATLPWSRMSSNTTCIS DALIEVGKEEETNFVTSNGPRKRTDAQWAAYLRPRV NPETRALLNQAVWDLMKRSDEYERLSKRKLEMAR QCVNFVVARAEKLTQCNNIGIVLENLVVRNFHGSGR RESGWEGFFEPKRENRWFMQVLHKAFSDLAQHRG VMVFEVHPAYSSQTCPACRYVDPKNRSSEDRERFKC LKCGRSFNADREVATFNIREIARTGVGLPKPDCERSR DVQTPGTARKSGRSLKSQDNLSEPKRVLQSKTRKKI TSTETQNEPLATDLKT
	CasΦ.38	42	MIKEQSELSKLIEKYYPGKKFYSNDLKQAGKHLKKS EHLTAKESEELTVEFLKSCKEKLYDFRPPAKALIISTS RPFEEWPIYKASESIQKYIYSLTKEELEKYNISTDKTS QENFFKESLIDNYGFANVSGLNLIFQHTKAIYDGVLK KVNNRNNKILKKYKRKIEEGIEIDSPELEKAIDESGH FINPPGINKNIYCYQQVSPTIFNSFKETKIICPFNYKRN PNDIIQKGVIDRLAIPFGEPGYIPDHQRDKVNKHKKR IRKYYKNNENKNKDAILAKINIGEDWVLFDLRGLLR NAYWRKLIPKQGITPQQLLDMFSGDPVIDPIKNNITFI YKESIIPIHSESIIKTKKSKELLEKLTKDEQIALVSIDLG

[0158]

		QTNPVAARFSRLSSDLKPEHVSSSFLPDELKNEICRY REKSDLLEIEIKNKAIKMLSQEQQDEIKLVNDISSEEL KNSVCKKYNIDNSKIPWDKMNGFTTFIADEFINNGG DKSLVYFTAKDKKSKKEKLVKLSDKKIANSFKPKIS KETREILNKITWDEKISSNEYKKLSKRKLEFARRATN YLINQAKKATRLNNVVLVVEDLNSKFFHGSGKRED GWDNFFIPKKENRWFIQALHKSLTDVSIHRGINVIEV RPERTSITCPKCGCCDKENRKGEDFKCIKCDSVYHA DLEVATFNIEKVAITGESMPKPDCERLGGEESIG
CasΦ.39	43	VAFLDGKEVDEPYTLQPPAKCHILAVSRPIEEWPIAR VTMAVQEHVYALPVHEVEKSRPETTEGSRSAWFKN SGVSNHGVTHAQTLNAILKNAYNVYNGVIKKVENR NAKKRDSLAAKNKSRERKGLPHFKADPPELATDEQ GYLLQPPSPNSSVYLVQQHLRTPQIDLPSGYTGPVVD PRSPIPSLIPIDRLAIPPGQPGYVPLHDREKLTSNKHR RMKLPKSLRAQGALPVCFRVFDDWAVVDGRGLLRH AQYRRLAPKNVSIAELLELYTGDPVIDIKRNLMTFRF AEAVVEVTARKIVEKYHNKYLLKLTEPKGKPVREIG LVSIDLNVQRLIALAIYRVHQTGESQLALSPCLHREIL PAKGLGDFDKYKSKFNQLTEEILTAAVQTLTSAQQEE YQRYVEESSHEAKADLCLKYSITPHELAWDKMTSST QYISRWLRDHGWNASDFTQITKGRKKVERLWSDSR WAQELKPKLSNETRRKLEDAKHDLQRANPEWQRL AKRKQEYSRHLANTVLSMAREYTACETVVIAIENLP MKGGFVDGNGSRESGWDNFFTHKKENRWMIKDIH KALSDLAPNRGVHVLEVNPQYTSQTCPECGHRDKA NRDPIQRERFCCTHCGAQRHADLEVATHNIAMVATT GKSLTGKSLAPQRLQ
CasΦ.42	44	LEIPEGEPGHVPWFQRMDIPEGQIGHVNKIQRFNFV HGKNSGKVKFSDKTGRVKRYHHSKYKDATKPYKFL EESKKVSALDSILAIITIGDDWVVFDIRGLYRNVFYR ELAQKGLTAVQLLDLFTGDPVIDPKKGIITFSYKEGV VPVFSQKIVSRFKSRDTLEKLTSQGPVALLSVDLGQN EPVAARVCSLKNINDKIALDNSCRIPFLDDYKKQIKD YRDSLDELEIKIRLEAINSLDVNQQVEIRDLDVFSAD RAKASTVDMFDIDPNLISWDSMSDARFSTQISDLYL KNGGDESRVYFEINNKRIKRSDYNISQLVRPKLSDST RKNLNDSIWKLKRTSEEYLKLSKRKLELSRAVVNYT IRQSKLLSGINDIVIILEDLDVKKKFNGRGIRDIGWD NFFSSRKENRWFIPAFHKSFSELSSNRGLCVIEVNPA WTSATCPDCGFCSKENRDGINFTCRKCGVSYHADID VATLNIARVAVLGKPMSGPADRERLGGTKKPRVARS RKDMKRKDISNGTVEVMVTA
CasΦ.46	45	IPSFGYLDRLKIAKGQPGYIPEWQRETINPSKKVRRY WATNHEKIRNAIPLVVFIGDDWVIIDGRGLLRDARRR KLADKNTTIEQLLEMVSNDPVIDSTRGIATLSYVEGV VPVRSFIPIGEKKGREYLEKSTQKESVTLLSVDIGQIN PVSCGVYKVSNGCSKIDFLDKFFLDKKHLDAIQKYR TLQDSLEASIVNEALDEIDPSFKKEYQNINSQTSNDV

[0159]

		KKSLCTEYNIDPEAISWQDITAHSTLISDYLIDNNITN DVYRTVNKAKYKTNDFGWYKKFSAKLSKEAREAL NEKIWELKIASSKYKKLSVRKKEIARTIANDCVKRA ETYGDNVVVAMESLTKNNKVMSGRGKRDPGWHNL GQAKVENRWFIQAISSAFEDKATHHGTPVLKVNPAY TSQTCPSCGHCSKDNRSSKDRTIFVCKSCGEKFNAD LDVATYNIAHVAFSGKKLSPPSEKSSATKKPRSARKS KKSRKS
CasΦ.47	46	SPIEKLLNGLLVKITFGNDWIICDARGLLDNVQKGII HKSYFTNKSSLVDLIDLFTCNPIVNYKNNVVTFCYK EGVVDVKSFTPIKSGPKTQENLIKKLKYSRFQNEKD ACVLGVGVDVGVTNPFAINGFKMPVDESSEWVML NEPLFTIETSQAFREEIMAYQQRTDEMNDQFNQQSID LLPPEYKVEFDNLPEDINEVAKYNLLHTLNIPNNFLW DKMSNTTQFISDYLIQIGRGTETEKTITTKKGKEKILT IRDVNWFNTFKPKISEETGKARTEIKRDLQKNSDQF QKLAKSREQSCRTWVNNVTEEAKIKSGCPLIIFVIEA LVKDNRVFSGKGHRAIGWHNFGKQKNERRWWVQA IHKAFQEQGVNHGYPVILCPPQYTSQTCPKCNHVDR DNRSGEKFKCLKYGWIGNADLDVGAYNIARVAITG KALSKPLEQKKIKKAKNKT
CasΦ.48	47	LLDNVQKGIIHKSYFTNKSSLVDLIDLFTCNPIVNYK NNVVTFCYKEGVVDVKSFTPIKSGPKTQENLIKKLK YSRFQNEKDACVLGVGVDVGVTNPFAINGFKMPVD ESSEWVMLNEPLFTIETSQAFREEIMAYQQRTDEMN DQFNQQSIDLLPPEYKVEFDNLPEDINEVAKYNLLHT LNIPNNFLWDKMSNTTQFISDYLIQIGRGTETEKTITT KKGKEKILTIRDVNWFNTFKPKISEETGKARTEIKRD LQKNSDQFQKLAKSREQSCRTWVNNVTEEAKIKSG CPLIIFVIEALVKDNRVFSGKGHRAIGWHNFGKQKN ERRWWVQAIHKAFQEQGVNHGYPVILCPPQYTSQT CPKCNHVDRDNRSGEKFKCLKYGWIGNADLDVGA YNIARVAITGKALSKPLEQKKIKKAKNKT
CasΦ.49	105	MIKPTVSQFLTPGFKLIRNHSRTAGLKLKNEGEEACK KFVRENEIPKDECPNFQGGPAIANIIAKSREFTEWEIY QSSLAIQEVIFTLPKDKLPEPILKEEWRAQWLSEHGL DTVPYKEAAGLNLIIKNAVNTYKGVQVKVDNKNKN NLAKINRKNEIAKLNGEQEISFEEIKAFDDKGYLLQK PSPNKSIYCYQSVSPKPFITSKYHNVNLPEEYIGYYR KSNEPIVSPYQFDRLRIPIGEPGYVPKWQYTFLSKKE NKRRKLSKRIKNVSPILGIICIKKDWCVFDMRGLLRT NHWKKYHKPTDSINDLFDYFTGDPVIDTKANVVRF RYKMENGIVNYKPVREKKGKELLENICDQNGSCKL ATVDVGQNNPVAIGLFELKKVNGELTKTLISRHPTPI DFCNKITAYRERYDKLESSIKLDAIKQLTSEQKIEVD NYNNNFTPQNTKQIVCSKLNINPNDLPWDKMISGTH FISEKAQVSNKSEIYFTSTDKGKTKDVMKSDYKWF QDYKPKLSKEVRDALSDIEWRLRRESLEFNKLSKSR EQDARQLANWISSMCDVIGIENLVKKNNFFGGSGKR

[0160]

		EPGWDNFYKPKKENRWWINAIHKALTELSQNKGKR VILLPAMRTSITCPKCKYCDSKNRNGEKFNCLKCGIE LNADIDVATENLATVAITAQSMPKPTCERSGDAKKP VRARKAKAPEFHDKLAPSYTVVLREAV**KRPAATKK AGQAKKKKEF** **(有下划线的序列是核定位信号; SEQ ID NO: 106)**
具有NLS信号的CasΦ.12	107	SNA**PKKKRKVGIHGVPAA**MIKPTVSQFLTPGFKLIR NHSRTAGLKLKNEGEEACKKFVRENEIPKDECPNFQ GGPAIANIIAKSREFTEWEIYQSSLAIQEVIFTLPKDK LPEPILKEEWRAQWLSEHGLDTVPYKEAAGLNLIIK NAVNTYKGVQVKVDNKNKNNLAKINRKNEIAKLN GEQEISFEEIKAFDDKGYLLQKPSPNKSIYCYQSVSP KPFITSKYHNVNLPEEYIGYYRKSNEPIVSPYQFDRL RIPIGEPGYVPKWQYTFLSKKENKRRKLSKRIKNVSP ILGIICIKKDWCVFDMRGLLRTNHWKKYHKPTDSIN DLFDYFTGDPVIDTKANVVRFRYKMENGIVNYKPV REKKGKELLENICDQNGSCKLATVDVGQNNPVAIGL FELKKVNGELTKTLISRHPTPIDFCNKITAYRERYDKL ESSIKLDAIKQLTSEQKIEVDNYNNNFTPQNTKQIVC SKLNINPNDLPWDKMISGTHFISEKAQVSNKSEIYFT STDKGKTKDVMKSDYKWFQDYKPKLSKEVRDALS DIEWRLRRESLEFNKLSKSREQDARQLANWISSMCD VIGIENLVKKNNFFGGSGKREPGWDNFYKPKKENR WWINAIHKALTELSQNKGKRVILLPAMRTSITCPKCK YCDSKNRNGEKFNCLKCGIELNADIDVATENLATVAI TAQSMPKPTCERSGDAKKPVRARKAKAPEFHDKLA PSYTVVLREAV**KRPAATKKAGQAKKKKEF** **(有下划线的序列是核定位信号; SEQ ID NO: 112 和 106)**

[0161] 在一些实施方案中,本公开的任何可编程CasΦ核酸酶(例如,SEQ ID NO:1至47、105或107中的任何一个,或其片段或变体)可以包含核定位信号(NLS)。在一些情况下,一个或多个NLS与可编程CasΦ核酸酶的N端融合或连接。在一些实施方案中,一个或多个NLS与可编程CasΦ核酸酶的C端融合或连接。在一些实施方案中,一个或多个NLS与可编程CasΦ核酸酶的N端和C端融合或连接。在一些实施方案中,NLS和可编程CasΦ核酸酶之间的连接包含标签。在一些情况下,NLS可以具有序列KRPAATKKAGQAKKKKEF(SEQ ID NO:106)。可以选择NLS以匹配目标细胞类型,例如已知几种NLS在不同类型的真核细胞例如哺乳动物细胞中具有功能。合适的NLS包括SV40大T抗原NLS(PKKKRKV,SEQ ID NO:110)和c-Myc NLS(PAAKRVKLD,SEQ ID NO:111)。在一些实施方案中,NLS可以是SV40大T抗原NLS或c-Myc NLS。在植物细胞中起作用的NLS描述于Chang等人,(Plant Signal Behav.2013年10月;8(10):e25976)。在一些实施方案中,NLS序列可选自以下共有序列:KR(K/R)R、K(K/R)RK;(P/R)XXKR(^DE)(K/R);KRX(W/F/Y)XXAF(SEQ ID NO:2489);(R/P)XXKR(K/R)(^DE);LGKR(K/R)(W/F/Y)(SEQ ID NO:2490);KRX10-12K(KR)(KR)或KRX10-12K(KR)X(K/R)。

[0162] 在一些实施方案中,核质蛋白NLS(KRPAATKKAGQAKKKKEF(SEQ ID NO:106))与可编程CasΦ核酸酶的C端连接或融合。在一些实施方案中,SV40 NLS(PKKKRKVGIHGVPAA)(SEQ

ID NO:112)与可编程CasΦ核酸酶的N端连接或融合。在优选的实施方案中,核质蛋白NLS(SEQ ID NO:106)与可编程CasΦ核酸酶的C端连接或融合,并且SV40 NLS(SEQ ID NO:112)与可编程CasΦ核酸酶的N端连接或融合。

[0163] 在一些实施方案中,CasΦ核酸酶包含多于200个氨基酸、多于300个氨基酸、多于400个氨基酸。在一些实施方案中,CasΦ核酸酶包含少于1500个氨基酸、少于1000个氨基酸或少于900个氨基酸。在一些实施方案中,CasΦ核酸酶包含200和1500个之间的氨基酸、300和1000个之间的氨基酸或400和900个之间的氨基酸。在优选的实施方案中,CasΦ核酸酶包含400和900个之间的氨基酸。

[0164] “百分比同一性”和“%同一性”可以指两个序列(核苷酸或氨基酸)在比对中在相同位置处具有相同残基的程度。例如,“氨基酸序列与SEQ ID NO:Y X%相同”可以指氨基酸序列与SEQ ID NO:Y的%同一性,并详述为氨基酸序列中X%的残基与SEQ ID NO:Y中公开的序列的残基相同。通常,可以采用计算机程序进行此类计算。比较和比对序列对的示例性程序包括ALIGN(Myers和Miller,Comput Appl Biosci.1988年3月;4(1):11-7)、FASTA(Pearson和Lipman,Proc Natl Acad Sci U S A.1988年4月;85(8):2444-8;Pearson,Methods Enzymol.1990;183:63-98)和缺口BLAST(Altschul等人,Nucleic Acids Res.1997年9月1日;25(17):3389-40)、BLASTP、BLASTN或GCG(Devereux等人,Nucleic Acids Res.1984年1月11日;12(1Pt 1):387-95)。

[0165] CasΦ多肽或其变体可以与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107中的任一个具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0166] 本公开的可编程核酸酶或切口酶可以与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107中的任一个具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0167] 本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶,其与SEQ ID NO:2具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0168] 本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶,其与SEQ ID NO:4具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0169] 本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶,其与SEQ ID NO:11具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0170] 本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶,其与SEQ ID NO:17具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0171] 本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶,其与SEQ ID NO:18具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0172] 本公开的组合物和方法可以包含可编程多肽或核酸酶,其与SEQ ID NO:12具有至

少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性。

[0173] 本公开的组合物和方法可以包含可编程多肽或核酸酶，其与SEQ ID NO:105具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性。

[0174] 本公开的组合物和方法可以包含可编程多肽或核酸酶，其与SEQ ID NO:107具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性。

[0175] 在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少70％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少75％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少85％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少92％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少95％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少97％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少98％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:2具有至少99％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:2。

[0176] 在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少70％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少75％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少85％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少92％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少95％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少97％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少98％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:4具有至少99％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:4。

[0177] 在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少70％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少75％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少80％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少85％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少90％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少92％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少95％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少97％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:11具有至少98％同一性的序列。在一些实施方案中，可编程核酸酶包

含与SEQ ID NO:11具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:11。

[0178] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少92%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:12具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:12。

[0179] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少92%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:17具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:17。

[0180] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少92%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:18具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:18。

[0181] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少85%同一性的序列。在一

些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少92%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少97%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:105。

[0182] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含SEQ ID NO:105的N端717个氨基酸残基的序列。

[0183] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:105具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:106具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:106。

[0184] 在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少70%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少75%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少80%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少85%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少95%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少98%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含与SEQ ID NO:107具有至少99%同一性的序列。在一些实施方案中,可编程核酸酶包含序列SEQ ID NO:107。

[0185] 本文公开的可编程核酸酶可以针对在特定细胞例如细菌细胞、植物细胞、真核细胞、动物细胞、哺乳动物细胞或人类细胞中表达进行密码子优化。在一些实施方案中,可编程核酸酶针对人类细胞进行了密码子优化。

[0186] 表1中呈现的与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO:107中的任一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性的可编程核酸酶或其变体或片段可以具有切口活性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:2具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:4具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:11具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:17具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶，其与SEQ ID NO:18具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。

[0187] 表1中呈现的与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107中的任一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性的可编程核酸酶或其变体可以具有双链DNA切割活性。本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶，其能够在靶DNA序列中引入双链断裂并与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107中的任何一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶，其具有双链DNA切割活性并与SEQ ID NO:12具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶，其具有双链DNA切割活性并与SEQ ID NO:2具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程切口酶，其与SEQ ID NO:4具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。本公开的组合物和方法可以包含可编程核酸酶，其具有双链DNA切割活性并与SEQ ID NO:11具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。

[0188] 表1中呈现的与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47和SEQ ID NO.105中的任一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性的可编程核酸酶或其变体可以具有切口酶活性和双链DNA切割活性。切口酶活性和双链DNA切割活性的比率可以根据反应条件(包括例如RNP复合温度、指导核酸中的crRNA重复序列)进行调控。在一些实施方案中，与RNP复合温度为37℃时相比，RNP复合温度为室温例如20至22℃时，切口酶活性降低。在一些实施方案中，与室温相比，在37

℃下双链DNA切割活性对RNP复合不敏感，或者与在37℃下复合时相比，在室温下与指导RNA复合时，双链DNA切割活性降低10％、20％或30％。在优选的实施方案中，当RNP复合温度为室温和37℃时，双链切割活性类似。

[0189] 表1中呈现的与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO:107中的任一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性的可编程核酸酶或其变体可以具有降低的核酸切割活性或基本没有核酸切割活性。

[0190] 在一些实施方案中，可编程核酸酶的N端氨基酸序列不是MISKMIKPTV(SEQ ID NO:113)。在一些实施方案中，可编程核酸酶不包括氨基酸序列MISKMIKPTV(SEQ ID NO:114)。

[0191] 在一些实施方案中，可编程核酸酶的N端氨基酸序列不是MISK(SEQ ID NO:115)。在一些实施方案中，可编程核酸酶不包括氨基酸序列MISK(SEQ ID NO:115)。

[0192] 在一些实施方案中，组合物包含本文所述的第一可编程核酸酶和本文所述的第二可编程核酸酶。在一些实施方案中，复合物包含本文所述的第一可编程核酸酶和本文所述的第二可编程核酸酶。在优选的实施方案中，复合物包含本文所述的第一可编程核酸酶和本文所述的第二可编程核酸酶，其中第一和第二可编程核酸酶是相同的可编程核酸酶。在一些实施方案中，第一和第二可编程核酸酶形成二聚体。在一些优选的实施方案中，第一和第二可编程核酸酶形成同源二聚体。

[0193] 在一些实施方案中，二聚体包含本文所述的第一可编程核酸酶和本文所述的第二可编程核酸酶。在优选的实施方案中，二聚体是同源二聚体，其中第一和第二可编程核酸酶是相同的。

[0194] 在一些实施方案中，可编程核酸酶可以是可编程切口酶。本公开提供了可编程切口酶的组合物，其能够在双链DNA(dsDNA)的单链中引入断裂(“切口”)。在一些实施方案中，可编程切口酶是可编程DNA切口酶。所述可编程切口酶可以与指导核酸偶联，所述指导核酸靶向dsDNA中的特定目标区域。在一些实施方案中，将两种可编程切口酶组合并一起递送以生成两个链断裂。例如，第一可编程切口酶可以靶向dsDNA的第一区域并对其进行切口，并且第二可编程切口酶可以靶向相同dsDNA的相反链上的第二区域并对其进行切口。当组合并一起递送以在dsDNA的相反链上生成切口时，可以在dsDNA中生成两个链断裂。链断裂可以通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)进行修复和重新连接。因此，可以组合本文公开的两种可编程切口酶以选择性编辑核酸序列。这可用于任何基因组编辑方法，例如，用于治疗疾病或病症的治疗应用，或用于农业应用。

[0195] 在一些实施方案中，如本文公开的可编程核酸酶可用于基因组编辑目的以生成链断裂以切除DNA区域或随后引入DNA区域(例如，供体DNA)。

[0196] 在一些实施方案中，本文公开的可编程核酸酶(例如，切口酶)可用于DNA内切核酸酶靶向CRISPR TransReporter(DETECTR)测定。在一些实施方案中，可编程核酸酶是可编程切口酶。DETECTR测定可以利用一些可编程核酸酶的反式切割能力来实现对样品中靶核酸的快速和高保真检测。靶核酸可以是DNA或RNA。例如，在从生物样品中提取靶DNA后，包含与目标靶DNA互补的部分的crRNA可以结合靶DNA序列，从而通过可编程核酸酶启动无差别的ssDNA酶活性。在一些实施方案中，提取的DNA在使DNA接触与指导RNA复合的可编程核酸酶之前通过PCR或等温扩增反应进行扩增。在与靶DNA杂交后，可编程核酸酶的反式切割活性

被激活，然后可以切割ssDNA荧光淬灭(FQ)报告分子。切割报告分子可以提供荧光读数，指示样品中存在靶DNA。在一些实施方案中，本文公开的可编程核酸酶可以与DETECTR测定中的其他可编程核酸酶组合或多重化。DETECTR测定的原理描述于Chen等人(Science 2018年4月27日;360(6387):436-439)，并且可以被修改以有利于本文所述的可编程核酸酶的使用。在一些实施方案中，本文公开的可编程核酸酶可用于特定的高灵敏度酶促报告基因解锁(SHERLOCK)测定。SHERLOCK测定的原理描述于Kellner等人(Nat Protoc.2019年10月;14(10):2986-3012)，并且可以被修改以有利于本文所述的可编程核酸酶的使用。因此，一些实施方案提供了一种检测样品中靶核酸的方法，所述方法包括：使包含靶核酸的样品与以下接触：(a)本文公开的可编程CasΦ核酸酶，(b)指导RNA，其包含与可编程CasΦ核酸酶结合的区域和与靶核酸结合的附加区域，以及(c)不与向导RNA结合的检测核酸；通过可编程CasΦ核酸酶切割检测核酸；以及通过测量由切割检测核酸产生的信号来检测靶核酸。在优选的实施方案中，检测核酸是单链DNA报告基因。

[0197] 如在靶DNA存在的特定条件下通过增强的ssDNA-FQ报告基因的切割所测量的，本公开的可编程核酸酶可以显示出增强的活性。例如，本公开的可编程核酸酶可以具有基于缓冲液制剂、pH水平、温度或盐的可变水平的活性。符合本公开的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液和HEPES缓冲液。本公开的可编程核酸酶可以在磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液和HEPES缓冲液中表现出最佳活性。

[0198] 可编程核酸酶还可以在不同的pH水平下表现出不同水平的切口酶或双链切割活性。例如，可在pH 7和pH 9之间观察到增强的切割。在一些实施方案中，本公开的可编程核酸酶在约pH 7、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3、约pH 7.4、约pH 7.5、约pH 7.6、约pH 7.7、约pH 7.8、约pH 7.9、约pH 8、约pH 8.1、约pH 8.2、约pH 8.3、约pH 8.4、约pH 8.5、约pH 8.6、约pH 8.7、约pH 8.8、约pH 8.9、约pH 9、pH 7至7.5、pH 7.5至8、pH 8至8.5、pH 8.5至9或pH 7至8.5显示出增强的活性。

[0199] 在一些实施方案中，本公开的可编程核酸酶在靶DNA存在的情况下在25℃至50℃的温度下表现出增强的ssDNA-FQ报告基因DNA的切割。例如，本公开的可编程核酸酶可以在约25℃、约26℃、约27℃、约28℃、约29℃、约30℃、约31℃、约32℃、约33℃、约34℃、约35℃、约36℃、约37℃、约38℃、约39℃、约40℃、约41℃、约42℃、约43℃、约44℃、约45℃、约46℃、约47℃、约48℃、约49℃、约50℃、30℃至40℃、35℃至45℃或35℃至40℃表现出增强的ssDNA-FQ报告基因的切割。

[0200] 在靶DNA存在的情况下，本公开的可编程核酸酶可能对样品中的盐浓度不敏感。有利地，所述可编程核酸酶可以是有活性的并且能够在25nM盐至200mM盐的不同盐浓度下切割ssDNA-FQ-报告基因序列。各种盐均符合本文公开的可编程核酸酶的这种特性，包括NaCl或KCl。本公开的可编程核酸酶可以在25nM至500nM盐、500nM至1000nM盐、1000nM至2000nM盐、2000nM至3000nM盐、3000nM至4000nM盐、4000nM至5000nM盐、5000nM至6000nM盐、6000nM至7000nM盐、7000nM至8000nM盐、8000nM至9000nM盐、9000nM至0.01mM盐、0.01mM至0.05mM盐、0.05mM至0.1mM盐、0.1mM至10mM盐、10mM至100mM盐或100mM至500mM盐的盐浓度下有活性。因此，本公开的可编程核酸酶可以表现出不依赖于样品中盐浓度的切割活性。

[0201] 本公开的可编程核酸酶能够切割任何ssDNA-FQ报告基因，无论其是何序列。因此，本文提供的可编程核酸酶能够切割通用ssDNAFQ报告基因。在一些实施方案中，本文提供的

可编程核酸酶切割包含5至20个腺嘌呤、5至20个胸腺嘧啶、5至20个胞嘧啶或5至20个鸟嘌呤的均聚物ssDNA-FQ报告基因。因此，本公开的可编程核酸酶能够切割如本文其他地方所公开的也被可编程核酸酶切割的ssDNA-FQ报告基因，允许在具有单个ssDNA-FQ报告基因的单个测定中容易地多重化多个可编程切口酶和可编程核酸酶。

[0202] 本公开的可编程核酸酶可以结合靶DNA中的野生型原型间隔区相邻基序(PAM)或突变体PAM。在一些实施方案中，本公开的可编程CasΦ核酸酶识别并结合5'-TBN-3'的原型间隔区相邻基序(PAM)，其中B是C、G或T中的一种或多种。例如，本公开的可编程CasΦ核酸酶可以识别并结合5'-TTTN-3'的原型间隔区相邻基序(PAM)。作为另一个实例，本公开的可编程CasΦ核酸酶可以识别并结合5'-TTN-3的原型间隔区相邻基序(PAM)。在一些实施方案中，PAM是5'-TTTA-3'、5'-GTTK-3'、5'-VTTK-3'、5'-VTTS-3'、5'-TTTS-3'或5'-VTTN-3'，其中K是G或T，V是A、C或G，并且S是C或G。在一些实施方案中，PAM是5'-GTTB-3'，其中B是C、G或T。

[0203] 在本公开的一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶识别并结合5'-NTTN-3'的PAM。

[0204] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:2具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-GTTK-3'PAM。在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:2具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTN-3'PAM。

[0205] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:4具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-VTTK-3'PAM。在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:4具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTN-3'PAM。

[0206] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:11具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-VTTS-3'PAM。在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:11具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTN-3'PAM。

[0207] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:12具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-TTTS-3'PAM。在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:12具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTN-3'PAM。

[0208] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:18具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％

或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-VTTN-3'PAM。

[0209] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:20具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTNN-3'PAM。

[0210] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:20具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-TTN-3'PAM。

[0211] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:26具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTG-3'PAM。

[0212] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:32具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-GTTB-3'PAM，其中B是C、G或N。

[0213] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:42具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-GTTN-3'PAM。

[0214] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:41具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTTN-3'PAM。

[0215] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:24具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTNN-3'PAM。

[0216] 在一些实施方案中，当可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:25具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性时，可编程CasΦ核酸酶或变体识别5'-NTNN-3'PAM。

[0217] 可以在本文公开的缓冲液中配制可编程核酸酶和其他试剂(例如，指导核酸)。多种缓冲溶液与本文公开的方法、组合物、试剂、酶和试剂盒相容。缓冲液与本文所述的不同可编程核酸酶相容。本文公开的任何方法、组合物、试剂、酶或试剂盒可以包含缓冲液。这些缓冲液可以与本文所述的其他试剂、样品和支持介质相容，用于检测病害(诸如疾病、癌症或遗传病症)或遗传信息(诸如用于表型分析、基因分型或确定祖先)。如本文所述，缓冲液可以提高本文所述的任何可编程核酸酶的顺式或反式切割率。缓冲液可以增加可编程核酸酶对靶核酸的辨别能力。如本文所述的方法可以在缓冲液中进行。

[0218] 在一些实施方案中，缓冲液可以包含一种或多种缓冲剂、盐、拥挤剂或去垢剂，或其任何组合。缓冲液可以包含还原剂。缓冲液可以包含竞争剂。示例性缓冲剂包括HEPES、TRIS、MES、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BIS-TRIS丙烷、BES、MOPS、TES、DISO、Trizma、TRICINE、GLY-GLY、HEPPS、BICINE、TAPS、MPD、MPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、咪唑或其任何组合。缓冲剂可以与可编程核酸酶相容。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为1mM至200mM的缓冲剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为10mM至30mM的缓冲剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为约20mM的缓冲剂。组合物(例

如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有2.5至3.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有3至4的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有3.5至4.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有4至5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有4.5至5.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有5至6的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有5.5至6.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有6至7的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有6.5至7.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有7至8的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有7.5至8.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有8至9的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有8.5至9.5的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有9至10的pH。组合物(例如,包含可编程核酸酶的组合物)可以具有9.5至10.5的pH。

[0219] 缓冲液可以包含盐。示例性盐包括NaCl、KCl、乙酸镁、乙酸钾、$CaCl_2$和$MgCl_2$。缓冲液可以包含乙酸钾、乙酸镁、氯化钠、氯化镁或其任何组合。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为5mM至100mM的盐。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为5mM至10mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含1mM至60mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含1mM至10mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含约105mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含约55mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含约7mM的盐。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含盐,其中所述盐包括乙酸钾和乙酸镁。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含盐,其中所述盐包括氯化钠和氯化镁。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含盐,其中所述盐包括氯化钾和氯化镁。

[0220] 缓冲剂可以包含拥挤剂。示例性拥挤剂包括甘油和牛血清白蛋白。缓冲液可以包含甘油。拥挤剂可以减少溶液中其他分子可用的溶剂体积,从而增加所述分子的有效浓度。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.01%(体积/体积)至10%(体积/体积)的拥挤剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.5%(体积/体积)至10%(体积/体积)的拥挤剂。

[0221] 缓冲液可以包含去垢剂。示例性去垢剂包括Tween、Triton-X和IGEPAL。缓冲液可以包含Tween、Triton-X或其任何组合。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含Triton-X。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含IGEPAL CA-630。在一些实施方案中,与可编程核酸酶相容的缓冲液包含浓度为2%(体积/体积)或更低的去垢剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为2%(体积/体积)或更低的去垢剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.00001%(体积/体积)至0.01%(体积/体积)的去垢剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为约0.01%(体积/体积)的去垢剂。

[0222] 缓冲液可以包含还原剂。示例性还原剂包括二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇(BME)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含DTT。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.01mM至100mM的还原剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.1mM至10mM的还原剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.5mM至2mM的还原剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.01mM至100mM的还原剂。与

可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为0.1mM至10mM的还原剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为约1mM的还原剂。

[0223] 与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含竞争剂。示例性竞争剂与靶核酸或报告基因核酸竞争被可编程核酸酶切割。示例性竞争剂包括肝素、咪唑和鲑鱼精DNA。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为1μg/mL至100μg/mL的竞争剂。与可编程核酸酶相容的缓冲液可以包含浓度为40μg/mL至60μg/mL的竞争剂。

[0224] 在一些实施方案中，如果当靶核酸是双链核酸时主要切割产物是切口核酸，则可编程CasΦ核酸酶被描述为“切口酶”。在一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶切割双链靶核酸的两条链。在一些实施方案中，靶核酸为DNA。在一些实施方案中，靶核酸为双链DNA。

[0225] 在本文公开的可编程CasΦ核酸酶切割双链靶核酸的两条链的情况下，链断裂可以是5’悬突的交错切割。在一些实施方案中，5’悬突是5和10个之间的核苷酸的悬突。在一些实施方案中，5’悬突是5或6个核苷酸的悬突。在一些实施方案中，5’悬突是9或10个核苷酸的悬突。

[0226] 在一些实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:20具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下，5’悬突是9或10个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:20具有至少90％的序列同一性的情况下，5’悬突是9或10个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的情况下，5’悬突是9或10个核苷酸的悬突。

[0227] 在一些实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:22具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下，5’悬突是9或10个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:22具有至少90％的序列同一性的情况下，5’悬突是10个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的情况下，5’悬突是10个核苷酸的悬突。

[0228] 在一些实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:28具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下，5’悬突是9个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:28具有至少90％的序列同一性的情况下，5’悬突是9个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的情况下，5’悬突是9个核苷酸的悬突。

[0229] 在一些实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:40具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下，5’悬突是10个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:40具有至少90％的序列同一性的情况下，5’悬突是10个核苷酸的悬突。在进一步的实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的情况下，5’悬突是10个核苷酸的悬突。

[0230] 在一些实施方案中，在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:37具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％

或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:37具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。

[0231] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:41具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:41具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的情况下,5'悬突是9或10个核苷酸的悬突。

[0232] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:12具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是5个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:12具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是5个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的情况下,5'悬突是5个核苷酸的悬突。

[0233] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:24具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:24具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。

[0234] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:25具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:25具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。

[0235] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:32具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:32具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。

[0236] 在一些实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:33具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体与SEQ ID NO:33具有至少90％的序列同一性的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。在进一步优选的实施方案中,在可编程CasΦ核酸酶或其变体包含氨基酸

序列SEQ ID NO:33的情况下,5'悬突是6个核苷酸的悬突。

[0237] 在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶快速切割双链靶核酸的一条链。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶在它已经切割靶核酸的第一条链之后切割靶核酸的第二条链。可以在体外顺式切割测定中评估靶核酸链的切割。为进行此类测定,可编程CasΦ核酸酶在包含50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BS A的缓冲液中与其天然crRNA(例如具有CasΦ.2重复的CasΦ.2核酸酶)复合,并且所述缓冲液在25℃,pH为7.9。复合在室温(例如20-22℃)下进行20分钟。RNP的浓度为200nM。靶质粒是2.2kb的超螺旋质粒,其含有靶序列5'-TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGA TTAT-3'(SEQ ID NO:116)或5'-CACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT GCCATATG-3'(SEQ ID NO:117),紧接在5'-GTTG-3'或5'-TTTG-3'PAM的下游。在时间"0"时,将30份等体积的20nM靶质粒与复合RNP混合,使得靶质粒的浓度为10nM,并且复合RNP的浓度为100nM。温育温度为37℃。反应在所需的时间点(例如1、3、6、15、30和60分钟)淬灭,反应淬灭包括1mg/ml蛋白酶K、0.08% SDS和15mM EDTA。样品在37℃下温育30分钟以去除蛋白质。通过琼脂糖凝胶分析对切割进行定量。

[0238] 在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶在1分钟内产生最大切口产物量的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90或至少95%,其中最大切口产物量是从靶质粒与可编程CasΦ核酸酶混合后60分钟内检测到的最大量。在优选的实施方案中,在1分钟内产生了最大切口产物量的至少80%。在更优选的实施方案中,在1分钟内产生了最大切口产物量的至少90%。

[0239] 在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶在1分钟内产生最大线性产物量的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90或至少95%,其中最大线性产物量是从靶质粒与可编程CasΦ核酸酶混合后60分钟内检测到的最大量。在优选的实施方案中,在1分钟内产生了最大线性产物量的至少80%。在更优选的实施方案中,在1分钟内产生了最大线性产物量的至少90%。

[0240] 在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶使用辅因子。在一些实施方案中,辅因子允许可编程CasΦ核酸酶执行功能。在一些实施方案中,功能是pre-crRNA加工和/或靶核酸切割。如Jiang F.和Doudna J.A.(Annu.Rev.Biophys.2017.46:505-29)中所讨论的,Cas9使用二价金属离子作为辅因子。可以很容易地评估二价金属离子作为辅因子的适用性,诸如通过基于Sundaresan等人(Cell Rep.2017年12月26日;21(13):3728-3739)所描述的方法。在一些实施方案中,辅因子是二价金属离子。在一些实施方案中,二价金属离子选自Mg^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}。在优选的实施方案中,二价金属离子是Mg^{2+}。在一些实施方案中,可编程CasΦ核酸酶与二价金属离子形成复合物。在优选的实施方案中,可编程CasΦ核酸酶与Mg^{2+}形成复合物。

[0241] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含本文公开的可编程CasΦ核酸酶和细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些实施方案中,本文公开的可编程CasΦ核酸酶在细胞中,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

[0242] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含本文公开的编码可编程CasΦ核酸酶的核酸和细胞,优选地,其中所述细胞是真核细胞。在一些实施方案中,本文所述的编码可编程CasΦ核酸酶的核酸在细胞中,优选地,其中所述细胞是真核细胞。

[0243] 指导核酸

[0244] 本公开的方法和组合物可以包含指导核酸。指导核酸可以结合靶核酸(例如,靶核酸的单链)或其部分。例如,如本文所述,指导核酸可以结合靶核酸,诸如来自病毒或细菌或其他导致疾病的因子的核酸或其扩增子。如本文所述,指导核酸可以结合靶核酸,诸如来自细菌、病毒、寄生生物、原生动物、真菌或其他导致疾病的因子的核酸或其扩增子。靶核酸可以包含突变,诸如单核苷酸多态性(SNP)。突变可以导致例如对治疗诸如抗生素治疗的抗性。突变可以导致基因功能障碍或基因敲除。突变可以导致疾病、有助于疾病或疾病(诸如肝脏疾病或病症、眼部病或病症、囊性纤维化或肌肉疾病或病症)风险的发展。如本文所述,指导核酸可以结合靶核酸,诸如来自癌症基因或与遗传病症相关的基因的核酸,优选DNA,或其扩增子。指导核酸包含与靶核酸反向互补的一段核酸。指导核酸通常与靶核酸特异性结合。靶核酸可以是逆转录的RNA、DNA、DNA扩增子或合成核酸。靶核酸可以是目标核酸的单链DNA或DNA扩增子。指导核酸可以是非天然存在的指导核酸。非天然存在的指导核酸可以包含工程化序列,所述序列具有与目标靶核酸序列杂交的重复和间隔区。非天然存在的指导核酸可以重组表达或化学合成。

[0245] 指导核酸(例如gRNA)可以与靶核酸的靶序列杂交。指导核酸可以与可编程核酸酶结合。

[0246] 在一些实施方案中,gRNA包含crRNA。在一些实施方案中,CasΦ多肽或其变体的gRNA不包含tracrRNA。如Jiang F.和Doudna J.A.(Annu.Rev.Biophys.2017.46:505-29)所述,Cas9切割活性需要tracrRNA。tracrRNA是多核苷酸,其与crRNA杂交以允许crRNA成熟,使得crRNA可以与Cas核酸酶结合并将Cas核酸酶定位到靶序列。在一些实施方案中,本文公开的可编程CasΦ核酸酶不需要tracrRNA来定位和/或切割靶核酸。crRNA可以包含重复区域。具体地,指导核酸的crRNA可以包含重复区域和间隔区域。重复区域是指与可编程核酸酶结合的crRNA序列。间隔区域是指与靶核酸序列杂交的crRNA序列。在一些实施方案中,重复区域可以包含相对于pre-crRNA中的重复序列的突变或截短。crRNA的重复序列可以与可编程核酸酶相互作用,从而允许指导核酸和可编程核酸酶形成复合物。此复合物可以称为核糖核蛋白(RNP)复合物。crRNA可以包含间隔区序列。间隔区序列可以与靶核酸的靶序列杂交,其中靶序列是靶核酸的片段。间隔区序列可以与靶序列反向互补。在一些情况下,间隔区序列可以与靶序列充分反向互补以允许杂交,然而,可能不一定是100%反向互补。

[0247] 在一些实施方案中,可编程核酸酶可以切割前体RNA(“pre-crRNA”)以产生(或“加工”)指导RNA(gRNA),也称为“成熟指导RNA”。切割pre-crRNA以产生成熟指导RNA的可编程核酸酶据说具有pre-crRNA加工活性。

[0248] 本文公开的可编程核酸酶可以加工crRNA的重复序列,其中重复序列是crRNA中与可编程核酸酶结合的区域。例如,可以将crRNA递送至哺乳动物细胞,例如HEK293T细胞,其中crRNA包含长度为36个核苷酸的全长重复区域以及可编程核酸酶。然后可编程核酸酶切割crRNA的重复区域,使得成熟crRNA包含更短的重复区域(例如长度为24个核苷酸)。因此,在一些实施方案中,本文公开的可编程核酸酶能够切割crRNA的重复区域。在优选的实施方案中,本文公开的可编程核酸酶能够切割哺乳动物细胞中crRNA的重复区域。

[0249] 指导核酸可以与靶核酸特异性结合。指导核酸可以包含至少部分与靶核酸序列反向互补的序列。

[0250] 指导核酸可以是非天然存在的指导核酸。非天然存在的指导核酸可以包含工程化

序列,所述序列具有与目标靶核酸序列杂交的重复和间隔区。非天然存在的指导核酸可以重组表达或化学合成。

[0251] 指导核酸可以包含RNA、DNA或其组合。术语“gRNA”是指包含RNA的指导核酸。gRNA可能包含不是核糖核酸的核苷。在一些实施方案中,gRNA中的所有核苷都是核糖核酸。在一些实施方案中,gRNA中的一些核苷不是核糖核酸。在gRNA中的核苷不是核糖核酸的实施方案中,非核糖核酸核苷可以是天然存在的或非天然存在的核苷。在一些实施方案中,核苷间连接是磷酸二酯键。在一些实施方案中,指导核酸中至少两个核苷之间的核苷间连接不是磷酸二酯键。在一些实施方案中,至少两个核苷之间的核苷间连接是非天然核苷间键联。非天然核苷间键联包括磷和非磷核苷间键联。磷核苷间键联包括硫代磷酸酯键联和硫代磷酸盐键联。核苷间键联可以包含“C3间隔区”。C3间隔区是技术人员已知的三个碳原子组成的链。

[0252] 可以修饰指导核酸以提高基因组编辑效率、增加稳定性、减少脱靶效应,和/或增加指导核酸对本文公开的CasΦ多肽的亲和力。修饰可包括非天然核苷酸和/或非天然键联。此外或另选地,可以修饰指导核酸的一个或多个糖部分。此类糖部分修饰可包括2'-O-甲基(2'OMe)、2'-O-甲氧基-乙基和2'氟。在一些实施方案中,通过分析核酸或基因敲除中插入缺失突变的频率来确定编辑效率或基因组编辑效率。在一些实施方案中,使用流式细胞仪或下一代测序可用于分析细胞的插入缺失突变或基因敲除。在其他实施方案中,可以使用流式细胞仪、下一代测序或CIRCLE-seq检测脱靶效应。

[0253] 在一些优选的实施方案中,来自重复区域5'端的前3个核苷(或前3个核苷之一,或前3个核苷的组合)包含2'-O-甲基修饰,并且间隔区域3'端的3个核苷之间的键联包含硫代磷酸酯键联。

[0254] 在一些实施方案中,重复区域5'端的第一个核苷包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,重复区域5'端的前两个核苷包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,重复区域5'端的前三个核苷包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后一个核苷包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后两个核苷包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后三个核苷包含2'-O-甲基修饰。

[0255] 在一些实施方案中,来自重复区域5'端的前3个核苷(或前3个核苷之一,或前3个核苷的组合)和间隔区域3'端的3个核苷包含2'-O-甲基修饰,并且间隔区域3'端的3个核苷之间的键联包含硫代磷酸酯键联。

[0256] 在一些实施方案中,来自重复区域5'端的前3个核苷(或前3个核苷之一,或前3个核苷的组合)和间隔区3'端的3个核苷包含2'氟修饰。

[0257] 在一些实施方案中,重复区域5'端的第一个核苷包含2'氟修饰。在一些实施方案中,重复区域5'端的前两个核苷包含2'氟修饰。在一些实施方案中,重复区域5'端的前三个核苷包含2'氟修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后一个核苷包含2'氟修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后两个核苷包含2'氟修饰。在一些实施方案中,间隔区域3'端的最后三个核苷包含2'氟修饰。在优选的实施方案中,间隔区域3'端的最后三个核苷包含2'氟修饰。

[0258] 在优选的实施方案中,重复区域5'端的前两个核苷包含2'-O-甲基修饰,重复5'端的前两个核苷通过硫代磷酸酯键联连接,并且最后间隔区域3'端的三个核苷包含2'氟修

饰。

[0259] 在一些实施方案中，重复区域5'端的两个核苷之间的键联包含3C间隔区，并且间隔区域3'端的两个核苷之间的键联包含3C间隔区。

[0260] 在一些实施方案中，指导核酸包含核糖核苷和脱氧核糖核苷。在一些实施方案中，指导核酸是指导RNA，其中来自间隔区域5'端的第一个、第八个和第九个核苷和间隔区域3'端的四个核苷是脱氧核糖核苷。

[0261] 在一些实施方案中，指导核酸包含多聚A尾。在一些优选的实施方案中，指导核酸在间隔区域3'端包含多聚A尾。

[0262] 在一些实施方案中，多个经修饰的指导物(例如，本文公开的修饰指导物的组合)与一种或多种可编程核酸酶(例如，本文公开的一种或多种可编程核酸酶)复合。在一些实例中，多个经修饰的指导物中的一个或多个包含本文所述的任何核苷修饰。在一些实例中，多个经修饰的指导物中的一个或多个包含本文所述的重复或间隔区域的任何长度。在一些实例中，多个经修饰的指导物中的一个或多个包含本文所述的重复间隔区长度和本文所述的核苷修饰。在一些实施方案中，多个经修饰的指导物中的一个或多个包含长度为约15至约20个核苷酸的重复序列。在一些实施方案中，多个经修饰的指导物中的一个或多个包含长度为约15至约20个核苷酸的间隔序列或区域。

[0263] 表2提供了与本公开的组合物和方法一起使用的示例性crRNA序列。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:48-SEQ ID NO:86或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％，或至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:49或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:51或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:52或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:54或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:57或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。

[0264] 表2.示例性crRNA序列

[0265]

CasΦ 直系同源物	crRNA 重复序列(示为 DNA)，5'至 3'	SEQ ID. NO.
CasΦ.01	GGAGAGATCTCAAACGATTGCTCGATTAGTCGAGAC	48
CasΦ.02	GTCGGAACGCTCAACGATTGCCCCTCACGAGGGGAC	49
CasΦ.04	ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTACGCTGGGAC	50
CasΦ.07	GGATCCAATCCTTTTTGATTGCCCAATTCGTTGGGAC	51
CasΦ.10	GGATCTGAGGATCATTATTGCTCGTTACGACGAGAC	52
CasΦ.11	CCTGCGAAACCTTTTGATTGCTCAGTACGCTGAGAC	53
CasΦ.12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGAC	54
CasΦ.13	GTAGAAGACCTCGCTGATTGCTCGGTGCGCCGAGAC	55
CasΦ.17	ATGGCAACAGACTCTCATTGCGCGGTACGCCGCGAC	56
CasΦ.18	ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTACGCTGGGAC	57
CasΦ.19	GTCGCTCTCTAACGCTTGCCCAGTACGCTGGGAC	58
CasΦ.20	GCTGGAAGACTCAATGATGGCTCCTTACGAGGAGAC	59
CasΦ.21	GGTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	60
CasΦ.22	GGTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	61
CasΦ.23	CTTGAAATCCTGTCAGATTGCTCCCTTCGGGGAGAC	62
CasΦ.24	GCTGGAAGACTCAATGATGGCTCCTTACGAGGAGAC	63
CasΦ.25	GCTGGAAGACTCAATGATGGCTCCTTACGAGGAGAC	64
CasΦ.26	CTAGGAACGCACGCAGATTGCTCGGTACGCCGAGAC	65
CasΦ.27	ATTGCAACGCCTAAAGATTGCTCGATACGTCGAGAC	66
CasΦ.28	GTTCGGCRAYCCTTTGATTGCTCAGTACGCTGAGAC	67
CasΦ.29	GTTGAACCTAGATCAGATGGCTCAGTACGCTGAGAC	68
CasΦ.30	CCCTCAACACGTCAGAAATGCCCGGCACGCCGGGAC	69
CasΦ.31	GTCGCAAGACTCGAATAATTGCCCCTCTATGGGGAC	70
CasΦ.32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGAC	71
CasΦ.33	CTCTCAATGGATAACGATTGCTCTCTACGGAGAGAC	72
CasΦ.34	GCTGGAAGACTCAATGATGGCTCCTTACGAGGAGAC	73
CasΦ.35	GTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	74
CasΦ.36	GTCGCAAGACTCGAATAATTGCCCCTCTATGGGGAC	75
CasΦ.37	GTCGGAACGCTCAACGATTGCCCCTCACGAGGGGAC	76
CasΦ.38	GTTGAACCTAGATCAGATGGCTCAGTACGCTGAGAC	77

[0266]

CasΦ.39	CTCTCAATGGATAACGATTGCTCTCTACGGAGAGAC	78
CasΦ.41	ACTGAAACCACCAACGATTGCGCTCCTCGGAGCGAC	79
CasΦ.42	ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTACGCTGGGAC	80
CasΦ.43	GTTGAACCTAGATCAGATGGCTCAGTACGCTGAGAC	81
CasΦ.44	GTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	82
CasΦ.45	GTTGAACCTAGATCAGATGGCTCAGTACGCTGAGAC	83
CasΦ.46	GTCGGAACGCTCAACGATTGCCCCTCACGAGGGGAC	84
CasΦ.47	GGTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	85
CasΦ.48	GGTTGAACCCTCAACAGATTGCTCGGTAAGCCGAGAC	86

[0267] 在一些实施方案中，本文公开的可编程核酸酶与特定crRNA序列结合使用。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:48-SEQ ID NO:86或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:49或其反向互补序列中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:51或其反向互补序列中的任何一个具

有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:52或其反向互补序列中的任何一个具有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:54或其反向互补序列中的任何一个具有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中，crRNA序列与SEQ ID NO:57或其反向互补序列中的任何一个具有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。

[0268] 在一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶的活性可以由包含表2中列举的任何crRNA重复序列的crRNA支持。在一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶的活性可以由包含crRNA重复序列的crRNA支持，所述crRNA重复序列与SEQ ID NO:48-SEQ ID NO:86中的任何一个具有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。

[0269] 在一些实施方案中，crRNA重复序列包含发夹。在一些实施方案中，发夹位于crRNA重复序列的3'部分。发夹包含双链茎部分和单链环部分。在优选的实施方案中，茎部分的一条链包含CYC序列并且另一条链包含GRG序列，其中Y和R是互补的。在优选的实施方案中，crRNA重复在3'端包含GAC序列。在更优选的实施方案中，GAC序列的G位于发夹的茎部分。在一些实施方案中，茎部分的每条链包含3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在优选的实施方案中，茎部分的每条链包含3、4或5个核苷酸。在一些实施方案中，环部分包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个核苷酸。在优选的实施方案中，环部分包含2、3、4、5或6个核苷酸。在最优选的实施方案中，环部分包含4个核苷酸。在一些实施方案中，核苷酸是天然存在的核苷酸。在一些实施方案中，核苷酸是合成核苷酸。

[0270] 在一些情况下，指导核酸不是天然存在的，而是通过人工组合另外分开的序列片段制成的。人工组合通常通过化学合成、通过基因工程技术或通过人工操纵核酸的分离区段来进行。在一些情况下，包含与靶核酸反向互补的序列的指导核酸片段的长度为20个核苷酸。指导核酸可以具有至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个与靶核酸反向互补的核苷酸。在一些情况下，指导核酸的长度可以是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。例如，指导核酸可以是至少10个碱基。在一些实施方案中，指导核酸可以是10至50个碱基。在一些实施方案中，指导核酸可以是至少25个碱基。在一些情况下，指导核酸具有与靶核酸反向互补的精确的或约12个核苷酸(nt)至约80nt、约12nt至约50nt、约12nt至约45nt、约12nt至约40nt、约12nt至约35nt、约12nt至约30nt、约12nt至约25nt、约12nt至约20nt、约12nt至约19nt、约19nt至约20nt、约19nt至约25nt、约19nt至约30nt、约19nt至约35nt、约19nt至约40nt、约19nt至约45nt、约19nt至约50nt、约19nt至约60nt、约20nt至约25nt、约20nt至约30nt、约20nt至约35nt、约20nt至约40nt、约20nt至约45nt、约20nt至约50nt或约20nt至约60nt。在一些情况下，指导核酸具有与靶核酸反向互补的约10nt至约60nt、约20nt至约50nt或约30nt至约40nt。应当理解，指导核酸的序列不需要与其可特异性杂交、可杂交或特异性结合的靶核酸的序列100%反向互补。指导核酸可以具有包含至少一个位于核酸残基5至20的区域中的尿嘧啶的序列，所述序列与靶核酸中的修饰可变区域反向互补。在一些情况下，

指导核酸具有包含至少一个位于核酸残基5至9、10至14或15至20的区域中的尿嘧啶的序列，所述序列与靶核酸中的修饰可变区域反向互补。指导核酸可以具有包含至少一个位于核酸残基5至20的区域中的尿嘧啶的序列，所述序列与靶核酸中的甲基化可变区域反向互补。在一些情况下，指导核酸具有包含至少一个位于核酸残基5至9、10至14或15至20的区域中的尿嘧啶的序列，所述序列与靶核酸中的甲基化可变区域反向互补。指导核酸可以与靶核酸杂交。

[0271] 在一些情况下，组合物包含本文公开的指导核酸的较短版本。例如，指导核酸序列可以由本文公开的指导核酸的一部分组成。在一些情况下，较短的版本可以提供相对于其较长版本增强的活性。针对CasΦ.12的指导RNA的较长版本和较短版本的实例分别示于表I、K、M、O、Q、S、U和W以及表AB至AF中，其中较短版本由从长版的5'端移除16个核苷酸和从长版的3'端去除三个核苷酸而产生。在一些情况下，长版是表J、L、N、P、R、T、V、X中描述的CasΦ.32指导核酸，并且短版是长版的5'端没有16个核苷酸并且在长版的3'端没有三个核苷酸的指导核酸。

[0272] 指导核酸(例如，非天然存在的指导核酸)可选自已经针对目标感染株或基因组基因座的核酸序列平铺的一组指导核酸。指导核酸可选自已针对靶核酸例如HPV16或HPV18毒株的核酸序列平铺的一组指导核酸。通常，可以汇集针对目标感染株或基因组基因座的核酸平铺的指导核酸以用于本文所述的方法。通常，汇集这些指导核酸用于在单一测定中检测靶核酸。使用本文所述的方法汇集针对单一靶核酸平铺的指导核酸可以增强靶核酸的检测。使用本文所述的方法汇集针对单一靶核酸平铺的指导核酸可以确保在单一反应内广泛覆盖靶核酸。例如，平铺沿着靶核酸是连续的。有时，平铺沿着靶核酸重叠。在一些情况下，平铺包括沿着靶核酸平铺的指导核酸之间的间隙。在一些情况下，指导核酸的平铺是非连续的。通常，用于检测靶核酸的方法包括使靶核酸与如本文公开的指导核酸库和可编程核酸酶或切口酶接触，其中指导核酸库的指导核酸序列具有选自对应于靶核酸的核酸序列的一组平铺的指导核酸；和测定由报告基因核酸群体中至少一些报告基因核酸的切割产生的信号。指导核酸的汇集可以确保在单个反应中对靶物种的广谱鉴定或广泛覆盖。这对可能由多种生物体引起的疾病或适应症(如脓毒症)特别有帮助。

[0273] 在一些实施方案中，间隔区序列的长度在10和35个核苷酸之间、长度在10和30个核苷酸之间、长度在15和30个核苷酸之间、长度在10和25个核苷酸之间、长度在15和25个核苷酸之间、长度在17和30个核苷酸之间、长度在17和25个核苷酸之间、长度在17和22个核苷酸之间或长度在17和20个核苷酸之间。在优选的实施方案中，间隔区序列的长度在17和25个核苷酸之间。在更优选的实施方案中，间隔区序列的长度在17和20个核苷酸之间。在最优选的实施方案中，间隔区序列长度为17个核苷酸。

[0274] 在一些实施方案中，重复序列的长度在15和40个核苷酸之间、长度在15和36个核苷酸之间、长度在18和36个核苷酸之间、长度在18和30个核苷酸之间、长度在18和25个核苷酸之间、长度在18和22个核苷酸之间、长度在18和20个核苷酸之间。在优选的实施方案中，重复序列的长度在20和22个核苷酸之间。在更优选的实施方案中，重复序列的长度为20个核苷酸。

[0275] 本文公开的CasΦ多肽的指导核酸的间隔区域包含种子区域。在一些实施方案中，种子区域不能容忍距间隔区序列5'端约1至约20个核苷酸内的间隔区和靶序列的互补性错

配。种子区域从间隔区序列的5'端开始，并且是指导核酸与CasΦ多肽结合时不能容忍间隔区序列和靶序列之间互补性错配的区域，使得指导核酸不与靶序列杂交，以允许CasΦ多肽切割靶核酸。在一些实施方案中，种子区域包含10和20个之间的核苷、12和20个之间的核苷、14和20个之间的核苷、14和18个之间的核苷、10和16个之间的核苷、12和16个之间的核苷或14和16个之间的核苷。在优选的实施方案中，种子区域包含16个核苷酸。

[0276] 本公开的可编程核酸酶可以被激活以在核糖核蛋白(RNP)复合物与靶核酸结合后表现出切割活性(例如，靶核酸的顺式切割或侧链核酸的反式切割)，其中gRNA的crRNA的间隔区与靶核酸杂交。

[0277] 表A:靶向人类T细胞中的TRAC的gRNA间隔区序列

[0278]

名称	间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA	靶标	SEQ ID NO
R3040	TGGATATCTGTGGGACAAGA	TRAC	118
R3041	TCCCACAGATATCCAGAACC	TRAC	119
R3042	GAGTCTCTCAGCTGGTACAC	TRAC	120
R3043	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA	TRAC	121
R3044	TCACTGGATTTAGAGTCTCT	TRAC	122
R3045	AGAATCAAAATCGGTGAATA	TRAC	123
R3046	GAGAATCAAAATCGGTGAAT	TRAC	124
R3047	ACCGATTTTGATTCTCAAAC	TRAC	125
R3048	TTTGAGAATCAAAATCGGTG	TRAC	126
R3049	GTTTGAGAATCAAAATCGGT	TRAC	127
R3050	TGATTCTCAAACAAATGTGT	TRAC	128
R3051	GATTCTCAAACAAATGTGTC	TRAC	129
R3052	ATTCTCAAACAAATGTGTCA	TRAC	130
R3053	TGACACATTTGTTTGAGAAT	TRAC	131
R3054	TCAAACAAATGTGTCACAAA	TRAC	132
R3055	GTGACACATTTGTTTGAGAA	TRAC	133
R3056	CTTTGTGACACATTTGTTTG	TRAC	134
R3057	TGATGTGTATATCACAGACA	TRAC	135
R3058	TCTGTGATATACACATCAGA	TRAC	136
R3059	GTCTGTGATATACACATCAG	TRAC	137
R3060	TGTCTGTGATATACACATCA	TRAC	138

[0279]

R3061	AAGTCCATAGACCTCATGTC	TRAC	139
R3062	CTCTTGAAGTCCATAGACCT	TRAC	140
R3063	AAGAGCAACAGTGCTGTGGC	TRAC	141
R3064	CTCCAGGCCACAGCACTGTT	TRAC	142
R3065	TTGCTCCAGGCCACAGCACT	TRAC	143
R3066	GTTGCTCCAGGCCACAGCAC	TRAC	144
R3067	CACATGCAAAGTCAGATTTG	TRAC	145
R3068	GCACATGCAAAGTCAGATTT	TRAC	146
R3069	GCATGTGCAAACGCCTTCAA	TRAC	147
R3070	AAGGCGTTTGCACATGCAAA	TRAC	148
R3071	CATGTGCAAACGCCTTCAAC	TRAC	149
R3072	TTGAAGGCGTTTGCACATGC	TRAC	150
R3073	AACAACAGCATTATTCCAGA	TRAC	151
R3074	TGGAATAATGCTGTTGTTGA	TRAC	152
R3075	TTCCAGAAGACACCTTCTTC	TRAC	153
R3076	CAGAAGACACCTTCTTCCCC	TRAC	154
R3077	CCTGGGCTGGGGAAGAAGGT	TRAC	155
R3078	TTCCCCAGCCCAGGTAAGGG	TRAC	156
R3079	CCCAGCCCAGGTAAGGGCAG	TRAC	157
R3080	TAAAAGGAAAAACAGACATT	TRAC	158
R3081	CTAAAAGGAAAAACAGACAT	TRAC	159
R3082	TTCCTTTTAGAAAGTTCCTG	TRAC	160
R3083	TCCTTTTAGAAAGTTCCTGT	TRAC	161
R3084	CCTTTTAGAAAGTTCCTGTG	TRAC	162
R3085	CTTTTAGAAAGTTCCTGTGA	TRAC	163
R3086	TAGAAAGTTCCTGTGATGTC	TRAC	164
R3136	AGAAAGTTCCTGTGATGTCA	TRAC	165
R3137	GAAAGTTCCTGTGATGTCAA	TRAC	166
R3138	ACATCACAGGAACTTTCTAA	TRAC	167
R3139	CTGTGATGTCAAGCTGGTCG	TRAC	168
R3140	TCGACCAGCTTGACATCACA	TRAC	169
R3141	CTCGACCAGCTTGACATCAC	TRAC	170
R3142	TCTCGACCAGCTTGACATCA	TRAC	171
R3143	AAAGCTTTTCTCGACCAGCT	TRAC	172
R3144	CAAAGCTTTTCTCGACCAGC	TRAC	173
R3145	CCTGTTTCAAAGCTTTTCTC	TRAC	174
R3146	GAAACAGGTAAGACAGGGGT	TRAC	175
R3147	AAACAGGTAAGACAGGGGTC	TRAC	176

[0280] 表B:靶向人类T细胞中的B2M的gRNA间隔区序列

[0281]

名称	间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA	靶标	SEQ ID NO
R3087	AATATAAGTGGAGGCGTCGC	B2M	177
R3088	ATATAAGTGGAGGCGTCGCG	B2M	178
R3089	AGGAATGCCCGCCAGCGCGA	B2M	179
R3090	CTGAAGCTGACAGCATTCGG	B2M	180
R3091	GGGCCGAGATGTCTCGCTCC	B2M	181
R3092	GCTGTGCTCGCGCTACTCTC	B2M	182
R3093	CTGGCCTGGAGGCTATCCAG	B2M	183
R3094	TGGCCTGGAGGCTATCCAGC	B2M	184
R3095	ATGTGTCTTTTCCCGATATT	B2M	185
R3096	TCCCGATATTCCTCAGGTAC	B2M	186
R3097	CCCGATATTCCTCAGGTACT	B2M	187
R3098	CCGATATTCCTCAGGTACTC	B2M	188
R3099	GAGTACCTGAGGAATATCGG	B2M	189
R3100	GGAGTACCTGAGGAATATCG	B2M	190
R3101	CTCAGGTACTCCAAAGATTC	B2M	191
R3102	AGGTTTACTCACGTCATCCA	B2M	192
R3103	ACTCACGTCATCCAGCAGAG	B2M	193
R3104	CTCACGTCATCCAGCAGAGA	B2M	194
R3105	TCTGCTGGATGACGTGAGTA	B2M	195
R3106	CATTCTCTGCTGGATGACGT	B2M	196
R3107	CCATTCTCTGCTGGATGACG	B2M	197
R3108	ACTTTCCATTCTCTGCTGGA	B2M	198
R3109	GACTTTCCATTCTCTGCTGG	B2M	199
R3110	AGGAAATTTGACTTTCCATT	B2M	200
R3111	CCTGAATTGCTATGTGTCTG	B2M	201
R3112	CTGAATTGCTATGTGTCTGG	B2M	202
R3113	CTATGTGTCTGGGTTTCATC	B2M	203
R3114	AATGTCGGATGGATGAAACC	B2M	204
R3115	CATCCATCCGACATTGAAGT	B2M	205
R3116	ATCCATCCGACATTGAAGTT	B2M	206
R3117	AGTAAGTCAACTTCAATGTC	B2M	207
R3118	TTCAGTAAGTCAACTTCAAT	B2M	208
R3119	AAGTTGACTTACTGAAGAAT	B2M	209
R3120	ACTTACTGAAGAATGGAGAG	B2M	210
R3121	TCTCTCCATTCTTCAGTAAG	B2M	211
R3122	CTGAAGAATGGAGAGAGAAT	B2M	212
R3123	AATTCTCTCTCCATTCTTCA	B2M	213
R3124	CAATTCTCTCTCCATTCTTC	B2M	214

R3125	TCAATTCTCTCTCCATTCTT	B2M	215
R3126	TTCAATTCTCTCTCCATTCT	B2M	216
R3127	AAAAAGTGGAGCATTCAGAC	B2M	217
R3128	CTGAAAGACAAGTCTGAATG	B2M	218
R3129	AGACTTGTCTTTCAGCAAGG	B2M	219
R3130	TCTTTCAGCAAGGACTGGTC	B2M	220
R3131	CAGCAAGGACTGGTCTTTCT	B2M	221
R3132	AGCAAGGACTGGTCTTTCTA	B2M	222
R3133	CTATCTCTTGTACTACACTG	B2M	223
R3134	TATCTCTTGTACTACACTGA	B2M	224
R3135	AGTGTAGTACAAGAGATAGA	B2M	225
R3148	TACTACACTGAATTCACCCC	B2M	226
R3149	AGTGGGGGTGAATTCAGTGT	B2M	227
R3150	CAGTGGGGGTGAATTCAGTG	B2M	228
R3151	TCAGTGGGGGTGAATTCAGT	B2M	229
R3152	TTCAGTGGGGGTGAATTCAG	B2M	230
R3153	ACCCCCACTGAAAAAGATGA	B2M	231
R3154	ACACGGCAGGCATACTCATC	B2M	232
R3155	GGCTGTGACAAAGTCACATG	B2M	233
R3156	GTCACAGCCCAAGATAGTTA	B2M	234
R3157	TCACAGCCCAAGATAGTTAA	B2M	235
R3158	ACTATCTTGGGCTGTGACAA	B2M	236
R3159	CCCCACTTAACTATCTTGGG	B2M	237

[0282]

[0283] 表C:靶向人类T细胞中的PD1的gRNA间隔区序列

名称	**间隔区序列(5'-->3')**	**靶标**	**SEQ ID NO**
R2921	CCUUCCGCUCACCUCCGCCU	PD1	238
R2922	CCUUCCGCUCACCUCCGCCU	PD1	239
R2923	CGCUCACCUCCGCCUGAGCA	PD1	240
R2924	UCCACUGCUCAGGCGGAGGU	PD1	241
R2925	UAGCACCGCCCAGACGACUG	PD1	242
R2926	AGGCAUGCAGAUCCCACAGG	PD1	243
R2927	CACAGGCGCCCUGGCCAGUC	PD1	244
R2928	UCUGGGCGGUGCUACAACUG	PD1	245
R2929	GCAUGCCUGGAGCAGCCCCA	PD1	246
R2930	UAGCACCGCCCAGACGACUG	PD1	247
R2931	UGGCCGCCAGCCCAGUUGUA	PD1	248
R2932	CUUCCGCUCACCUCCGCCUG	PD1	249
R2933	CAGGGCCUGUCUGGGGAGUC	PD1	250
R2934	UCCCCAGCCCUGCUCGUGGU	PD1	251
R2935	GGUCACCACGAGCAGGGCUG	PD1	252

[0284]

[0285]

R2936	UCCCCUUCGGUCACCACGAG	PD1	253
R2937	GAGAAGCUGCAGGUGAAGGU	PD1	254
R2938	ACCUGCAGCUUCUCCAACAC	PD1	255
R2939	UCCAACACAUCGGAGAGCUU	PD1	256
R2940	GCACGAAGCUCUCCGAUGUG	PD1	257
R2941	AGCACGAAGCUCUCCGAUGU	PD1	258
R2942	GUGCUAAACUGGUACCGCAU	PD1	259
R2943	CUGGGGCUCAUGCGGUACCA	PD1	260
R2944	UCCGUCUGGUUGCUGGGGCU	PD1	261
R2945	CCCGAGGACCGCAGCCAGCC	PD1	262
R2946	UGUGACACGGAAGCGGCAGU	PD1	263
R2947	CGUGUCACACAACUGCCCAA	PD1	264
R2948	GGCAGUUGUGUGACACGGAA	PD1	265
R2949	CACAUGAGCGUGGUCAGGGC	PD1	266
R2950	CGCCGGGCCCUGACCACGCU	PD1	267
R2951	GGGGCCAGGGAGAUGGCCCC	PD1	268
R2952	AUCUGCGCCUUGGGGGCCAG	PD1	269
R2953	GAUCUGCGCCUUGGGGGCCA	PD1	270
R2954	CCAGACAGGCCCUGGAACCC	PD1	271
R2955	CCAGCCCUGCUCGUGGUGAC	PD1	272
R2956	UCUCUGGAAGGGCACAAAGG	PD1	273
R2957	GUGCCCUUCCAGAGAGAAGG	PD1	274
R2958	UGCCCUUCCAGAGAGAAGGG	PD1	275
R2959	UGCCCUUCUCUCUGGAAGGG	PD1	276
R2960	CAGAGAGAAGGGCAGAAGUG	PD1	277
R2961	GAACUGGCCGGCUGGCCUGG	PD1	278
R2962	GGAACUGGCCGGCUGGCCUG	PD1	279
R2963	CAAACCCUGGUGGUUGGUGU	PD1	280
R2964	GUGUCGUGGGCGGCCUGCUG	PD1	281
R2965	CCUCGUGCGGCCCGGGAGCA	PD1	282
R2966	UCCCUGCAGAGAAACACACU	PD1	283
R2967	CUCUGCAGGGACAAUAGGAG	PD1	284
R2968	UCUGCAGGGACAAUAGGAGC	PD1	285
R2969	CUCCUCAAAGAAGGAGGACC	PD1	286
R2970	UCCUCAAAGAAGGAGGACCC	PD1	287
R2971	UCUGUGGACUAUGGGGAGCU	PD1	288
R2972	UCUCGCCACUGGAAAUCCAG	PD1	289
R2973	CCAGUGGCGAGAGAAGACCC	PD1	290
R2974	CAGUGGCGAGAGAAGACCCC	PD1	291
R2975	CGCUAGGAAAGACAAUGGUG	PD1	292
R2976	UCUUUCCUAGCGGAAUGGGC	PD1	293
R2977	CCUAGCGGAAUGGGCACCUC	PD1	294

R2978	CUAGCGGAAUGGGCACCUCA	PD1	295
R2979	GCCCCUCUGACCGGCUUCCU	PD1	296
R2980	CUUGGCCACCAGUGUUCUGC	PD1	297
R2981	GCCACCAGUGUUCUGCAGAC	PD1	298
R2982	UGCAGACCCUCCACCAUGAG	PD1	299
R2983	UCCUGAGGAAAUGCGCUGAC	PD1	300
R2984	CCUCAGGAGAAGCAGGCAGG	PD1	301
R2985	CUCAGGAGAAGCAGGCAGGG	PD1	302
R2986	CAGGCCGUCCAGGGGCUGAG	PD1	303
R2987	AGACAUGAGUCCUGUGGUGG	PD1	304
R2988	AGGUCCUGCCAGCACAGAGC	PD1	305
R2989	AGGGAGCUGGACGCAGGCAG	PD1	306
R2990	AGCCCCGGGCCGCAGGCAGC	PD1	307
R2991	AGGCAGGAGGCUCCGGGGCG	PD1	308
R2992	GGGGCUGGUUGGAGAUGGCC	PD1	309
R2993	GAGAUGGCCUUGGAGCAGCC	PD1	310
R2994	GCUGCUCCAAGGCCAUCUCC	PD1	311
R2995	GAGCAGCCAAGGUGCCCCUG	PD1	312
R2996	GGGAUGCCACUGCCAGGGGC	PD1	313
[0286] R2997	CGGGAUGCCACUGCCAGGGG	PD1	314
R2998	GGCCCUGCGUCCAGGGCGUU	PD1	315
R2999	UCUGCUCCCUGCAGGCCUAG	PD1	316
R3000	UCUAGGCCUGCAGGGAGCAG	PD1	317
R3001	CCUGAAACUUCUCUAGGCCU	PD1	318
R3002	UGACCUUCCCUGAAACUUCU	PD1	319
R3003	CAGGGAAGGUCAGAAGAGCU	PD1	320
R3004	AGGGAAGGUCAGAAGAGCUC	PD1	321
R3005	CUGCCCUGCCCACCACAGCC	PD1	322
R3006	CCUGCCCUGCCCACCACAGC	PD1	323
R3007	ACACAUGCCCAGGCAGCACC	PD1	324
R3008	CACAUGCCCAGGCAGCACCU	PD1	325
R3009	CCUGCCCCACAAAGGGCCUG	PD1	326
R3010	GUGGGGCAGGGAAGCUGAGG	PD1	327
R3011	UGGGGCAGGGAAGCUGAGGC	PD1	328
R3012	CUGCCUCAGCUUCCCUGCCC	PD1	329
R3013	CAGGCCCAGCCAGCACUCUG	PD1	330
R3014	AGGCCCAGCCAGCACUCUGG	PD1	331
R3015	CACCCCAGCCCCUCACACCA	PD1	332
R3016	GGACCGUAGGAUGUCCCUCU	PD1	333

[0287] 表D:靶向人类CIITA的gRNA间隔区序列

[0288]

名称	间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA	靶标	SEQ ID NO
R4503 C2TA_T1.1	CTACACAATGCGTTGCCTGG	CIITA	334
R4504 C2TA_T1.2	GGGCTCTGACAGGTAGGACC	CIITA	335
R4505 C2TA_T1.3	TGTAGGAATCCCAGCCAGGC	CIITA	336
R4506 C2TA_T1.8	CCTGGCTCCACGCCCTGCTG	CIITA	337
R4507 C2TA_T1.9	GGGAAGCTGAGGGCACGAGG	CIITA	338
R4508 C2TA_T2.1	ACAGCGATGCTGACCCCCTG	CIITA	339
R4509 C2TA_T2.2	TTAACAGCGATGCTGACCCC	CIITA	340
R4510 C2TA_T2.3	TATGACCAGATGGACCTGGC	CIITA	341
R4511 C2TA_T2.4	GGGCCCCTAGAAGGTGGCTA	CIITA	342
R4512 C2TA_T2.5	TAGGGGCCCCAACTCCATGG	CIITA	343
R4513 C2TA_T2.6	AGAAGCTCCAGGTAGCCACC	CIITA	344
R4514 C2TA_T2.7	TCCAGCCAGGTCCATCTGGT	CIITA	345
R4515 C2TA_T2.8	TTCTCCAGCCAGGTCCATCT	CIITA	346
R5200	AGCAGGCTGTTGTGTGACAT	CIITA	1934
R5201	CATGTCACACAACAGCCTGC	CIITA	1935
R5202	TGTGACATGGAAGGTGATGA	CIITA	1936
R5203	ATCACCTTCCATGTCACACA	CIITA	1937
R5204	GCATAAGCCTCCCTGGTCTC	CIITA	1938
R5205	CAGGACTCCCAGCTGGAGGG	CIITA	1939
R5206	CTCAGGCCCTCCAGCTGGGA	CIITA	1940
R5207	TGCTGGCATCTCCATACTCT	CIITA	1941
R5208	TGCCCAACTTCTGCTGGCAT	CIITA	1942
R5209	CTGCCCAACTTCTGCTGGCA	CIITA	1943
R5210	TCTGCCCAACTTCTGCTGGC	CIITA	1944
R5211	TGACTTTTCTGCCCAACTTC	CIITA	1945
R5212	CTGACTTTTCTGCCCAACTT	CIITA	1946
R5213	TCTGACTTTTCTGCCCAACT	CIITA	1947
R5214	CCAGAGGAGCTTCCGGCAGA	CIITA	1948
R5215	AGGTCTGCCGGAAGCTCCTC	CIITA	1949
R5216	CGGCAGACCTGAAGCACTGG	CIITA	1950
R5217	CAGTGCTTCAGGTCTGCCGG	CIITA	1951

[0289]

R5218	AACAGCGCAGGCAGTGGCAG	CIITA	1952
R5219	AACCAGGAGCCAGCCTCCGG	CIITA	1953
R5220	TCCAGGCGCATCTGGCCGGA	CIITA	1954
R5221	CTCCAGGCGCATCTGGCCGG	CIITA	1955
R5222	TCTCCAGGCGCATCTGGCCG	CIITA	1956
R5223	CTCCAGTTCCTCGTTGAGCT	CIITA	1957
R5224	TCCAGTTCCTCGTTGAGCTG	CIITA	1958
R5225	AGGCAGCTCAACGAGGAACT	CIITA	1959
R5226	CTCGTTGAGCTGCCTGAATC	CIITA	1960
R5227	AGCTGCCTGAATCTCCCTGA	CIITA	1961
R5228	GTCCCCACCATCTCCACTCT	CIITA	1962
R5229	TCCCCACCATCTCCACTCTG	CIITA	1963
R5230	CCAGAGCCCATGGGGCAGAG	CIITA	1964
R5231	GCCAGAGCCCATGGGGCAGA	CIITA	1965
R5232	CAGCCTCAGAGATTTGCCAG	CIITA	1966
R5233	GGAGGCCGTGGACAGTGAAT	CIITA	1967
R5234	ACTGTCCACGGCCTCCCAAC	CIITA	1968
R5235	GCTCCATCAGCCACTGACCT	CIITA	1969
R5236	AGGCATGCTGGGCAGGTCAG	CIITA	1970
R5237	CTCGGGAGGTCAGGGCAGGT	CIITA	1971
R5238	GCTCGGGAGGTCAGGGCAGG	CIITA	1972
R5239	GAGACCTCTCCAGCTGCCGG	CIITA	1973
R5240	TTGGAGACCTCTCCAGCTGC	CIITA	1974
R5241	GAAGCTTGTTGGAGACCTCT	CIITA	1975
R5242	GGAAGCTTGTTGGAGACCTC	CIITA	1976
R5243	TGGAAGCTTGTTGGAGACCT	CIITA	1977
R5244	TACCGCTCACTGCAGGACAC	CIITA	1978
R5245	CTGCTGCTCCTCTCCAGCCT	CIITA	1979
R5246	CCGCTCCAGGCTCTTGCTGC	CIITA	1980
R5247	TGCCCAGTCCGGGGTGGCCA	CIITA	1981
R5248	GGCCAGCTGCCGTTCTGCCC	CIITA	1982
R5249	GCAGCCAACAGCACCTCAGC	CIITA	1983
R5250	GCTGCCAAGGAGCACCGGCG	CIITA	1984
R5251	CCCAGCACAGCAATCACTCG	CIITA	1985
R5252	GCCCAGCACAGCAATCACTC	CIITA	1986
R5253	CTGTGCTGGGCAAAGCTGGT	CIITA	1987
R5254	CCCTGACCAGCTTTGCCCAG	CIITA	1988
R5255	GGCTGGGGCAGTGAGCCGGG	CIITA	1989
R5256	TGGCCGGCTTCCCCAGTACG	CIITA	1990
R5257	CCCAGTACGACTTTGTCTTC	CIITA	1991
R5258	GTCTTCTCTGTCCCCTGCCA	CIITA	1992
R5259	TCTTCTCTGTCCCCTGCCAT	CIITA	1993

[0290]

R5260	TCTGTCCCCTGCCATTGCTT	CIITA	1994
R5261	AAGCAATGGCAGGGGACAGA	CIITA	1995
R5262	CTTGAACCGTCCGGGGGATG	CIITA	1996
R5263	AACCGTCCGGGGGATGCCTA	CIITA	1997
R5264	TCCCTGGGCCCACAGCCACT	CIITA	1998
R5265	AAGATGTGGCTGAAAACCTC	CIITA	1999
R5266	TCAGCCACATCTTGAAGAGA	CIITA	2000
R5267	CAGCCACATCTTGAAGAGAC	CIITA	2001
R5268	AGCCACATCTTGAAGAGACC	CIITA	2002
R5269	AAGAGACCTGACCGCGTTCT	CIITA	2003
R5270	TGCTCATCCTAGACGGCTTC	CIITA	2004
R5271	CAGCTCCTCGAAGCCGTCTA	CIITA	2005
R5272	CGCTTCCAGCTCCTCGAAGC	CIITA	2006
R5273	GAGGAGCTGGAAGCGCAAGA	CIITA	2007
R5274	CTGCACAGCACGTGCGGACC	CIITA	2008
R5275	TGGAAAAGGCCGGCCAGCAG	CIITA	2009
R5276	TTCTGGAAAAGGCCGGCCAG	CIITA	2010
R5277	TCCAGAAGAAGCTGCTCCGA	CIITA	2011
R5278	CCAGAAGAAGCTGCTCCGAG	CIITA	2012
R5279	CAGAAGAAGCTGCTCCGAGG	CIITA	2013
R5280	CACCCTCCTCCTCACAGCCC	CIITA	2014
R5281	CTCAGGCTCTGGACCAGGCG	CIITA	2015
R5282	GAGCTGTCCGGCTTCTCCAT	CIITA	2016
R5283	AGCTGTCCGGCTTCTCCATG	CIITA	2017
R5284	TCCATGGAGCAGGCCCAGGC	CIITA	2018
R5285	GAGAGCTCAGGGATGACAGA	CIITA	2019
R5286	AGAGCTCAGGGATGACAGAG	CIITA	2020
R5287	GTGCTCTGTCATCCCTGAGC	CIITA	2021
R5288	TTCTCAGTCACAGCCACAGC	CIITA	2022
R5289	TCAGTCACAGCCACAGCCCT	CIITA	2023
R5290	GTGCCGGGCAGTGTGCCAGC	CIITA	2024
R5291	TGCCGGGCAGTGTGCCAGCT	CIITA	2025
R5292	GCGTCCTCCCCAAGCTCCAG	CIITA	2026
R5293	GGGAGGACGCCAAGCTGCCC	CIITA	2027
R5294	GCCAGCTCTGCCAGGGCCCC	CIITA	2028
R5295	ATGTCTGCGGCCCAGCTCCC	CIITA	2029
R5392	GATGTCTGCGGCCCAGCTCC	CIITA	2030
R5393	CCATCCGCAGACGTGAGGAC	CIITA	2031
R5394	GCCATCGCCCAGGTCCTCAC	CIITA	2032
R5395	GGCCATCGCCCAGGTCCTCA	CIITA	2033
R5396	GACTAAGCCTTTGGCCATCG	CIITA	2034
R5397	GTCCAACACCCACCGCGGGC	CIITA	2035

[0291]

R5398	CAGGAGGAAGCTGGGGAAGG	CIITA	2036
R5399	CCCAGCTTCCTCCTGCAATG	CIITA	2037
R5400	CTCCTGCAATGCTTCCTGGG	CIITA	2038
R5401	CTGGGGGCCCTGTGGCTGGC	CIITA	2039
R5402	GCCACTCAGAGCCAGCCACA	CIITA	2040
R5403	CGCCACTCAGAGCCAGCCAC	CIITA	2041
R5404	ATTTCGCCACTCAGAGCCAG	CIITA	2042
R5405	TCCTTGATTTCGCCACTCAG	CIITA	2043
R5406	GGGTCAATGCTAGGTACTGC	CIITA	2044
R5407	CTTGGGGTCAATGCTAGGTA	CIITA	2045
R5408	TTCCTTGGGGTCAATGCTAG	CIITA	2046
R5409	ACCCCAAGGAAGAAGAGGCC	CIITA	2047
R5410	TCATAGGGCCTCTTCTTCCT	CIITA	2048
R5411	CTGGCTGGGCTGATCTTCCA	CIITA	2049
R5412	TGGCTGGGCTGATCTTCCAG	CIITA	2050
R5413	CAGCCTCCCGCCCGCTGCCT	CIITA	2051
R5414	CTGTCCACCGAGGCAGCCGC	CIITA	2052
R5415	TGCTTCCTGTCCACCGAGGC	CIITA	2053
R5416	AGGTACCTCGCAAGCACCTT	CIITA	2054
R5417	CGAGGTACCTGAAGCGGCTG	CIITA	2055
R5418	CAGCCTCCTCGGCCTCGTGG	CIITA	2056
R5419	GGCAGCACGTGGTACAGGAG	CIITA	2057
R5420	GCAGCACGTGGTACAGGAGC	CIITA	2058
R5421	TCTGGGCACCCGCCTCACGC	CIITA	2059
R5422	CTGGGCACCCGCCTCACGCC	CIITA	2060
R5423	TGGGCACCCGCCTCACGCCT	CIITA	2061
R5424	CCCAGTACATGTGCATCAGG	CIITA	2062
R5425	GCCCGCCGCCTCCAAGGCCT	CIITA	2063
R5426	GAGGCGGCGGGCCAAGACTT	CIITA	2064
R5427	TCCCTGGACCTCCGCAGCAC	CIITA	2065
R5428	GCCCCTCTGGATTGGGGAGC	CIITA	2066
R5429	CCCCTCTGGATTGGGGAGCC	CIITA	2067
R5430	GGGAGCCTCGTGGGACTCAG	CIITA	2068
R5431	GTCTCCCCATGCTGCTGCAG	CIITA	2069
R5432	TCCTCTGCTGCCTGAAGTAG	CIITA	2070
R5433	AGGCAGCAGAGGAGAAGTTC	CIITA	2071
R5434	AAAGGCTCGATGGTGAACTT	CIITA	2072
R5435	GAAAGGCTCGATGGTGAACT	CIITA	2073
R5436	ACCATCGAGCCTTTCAAAGC	CIITA	2074
R5437	GCTTTGAAAGGCTCGATGGT	CIITA	2075
R5438	AGGGACTTGGCTTTGAAAGG	CIITA	2076
R5439	CAAAGCCAAGTCCCTGAAGG	CIITA	2077

R5440	AAAGCCAAGTCCCTGAAGGA	CIITA	2078
R5441	CACATCCTTCAGGGACTTGG	CIITA	2079
R5442	CCAGGTCTTCCACATCCTTC	CIITA	2080
R5443	CCCAGGTCTTCCACATCCTT	CIITA	2081
R5444	CTCGGAAGACACAGCTGGGG	CIITA	2082
R5445	GGTCCCGAACAGCAGGGAGC	CIITA	2083
R5446	AGGTCCCGAACAGCAGGGAG	CIITA	2084
R5447	TTTAGGTCCCGAACAGCAGG	CIITA	2085
R5448	CTTTAGGTCCCGAACAGCAG	CIITA	2086
R5449	GGGACCTAAAGAAACTGGAG	CIITA	2087
R5450	GGGAAAGCCTGGGGGCCTGA	CIITA	2088
R5451	GGGGAAAGCCTGGGGGCCTG	CIITA	2089
R5452	CCCCAAACTGGTGCGGATCC	CIITA	2090
R5453	CCCAAACTGGTGCGGATCCT	CIITA	2091
R5454	TTCTCACTCAGCGCATCCAG	CIITA	2092
R5455	AGCTGGGGGAAGGTGGCTGA	CIITA	2093
R5456	CCCCAGCTGAAGTCCTTGGA	CIITA	2094
R5457	CAAGGACTTCAGCTGGGGGA	CIITA	2095
R5458	CCAAGGACTTCAGCTGGGGG	CIITA	2096
R5459	AGGGTTTCCAAGGACTTCAG	CIITA	2097
R5460	TAGGCACCCAGGTCAGTGAT	CIITA	2098
R5461	GTAGGCACCCAGGTCAGTGA	CIITA	2099
R5462	GCTCGCTGCATCCCTGCTCA	CIITA	2100
R5463	GCCTGAGCAGGGATGCAGCG	CIITA	2101
R5464	TACAATAACTGCATCTGCGA	CIITA	2102
R5465	GCTCGTGTGCTTCCGGACAT	CIITA	2103
R5466	CGGACATGGTGTCCCTCCGG	CIITA	2104
R5467	ACGGCTGCCGGGGCCCAGCA	CIITA	2105
R5468	GGAGGTGTCCTCATGTGGAG	CIITA	2106
R5469	CTGGACACTGAATGGGATGG	CIITA	2107
R5470	AGTGTCCAGGAACACCTGCA	CIITA	2108
R5471	CAGGTGTTCCTGGACACTGA	CIITA	2109
R5472	TTGCAGGTGTTCCTGGACAC	CIITA	2110
R5473	ACGGATCAGCCTGAGATGAT	CIITA	2111

[0292]

[0293] 表E:靶向小鼠PCSK9的gRNA间隔区序列

名称	间隔区序列(5'-->3')	靶标	SEQ ID NO
R4238	CCGCUGUUGCCGCCGCUGCU	PCSK9	347
R4239	CCGCCGCUGCUGCUGCUGUU	PCSK9	348
R4240	CUGCUACUGUGCCCCACCGG	PCSK9	349
R4241	AUAAUCUCCAUCCUCGUCCU	PCSK9	350

[0294]

[0295]

R4242	UGAAGAGCUGAUGCUCGCCC	PCSK9	351
R4243	GAGCAACGGCGGAAGGUGGC	PCSK9	352
R4244	CUGGCAGCCUCCAGGCCUCC	PCSK9	353
R4245	UGGUGCUGAUGGAGGAGACC	PCSK9	354
R4246	AAUCUGUAGCCUCUGGGUCU	PCSK9	355
R4247	UUCAAUCUGUAGCCUCUGGG	PCSK9	356
R4248	GUUCAAUCUGUAGCCUCUGG	PCSK9	357
R4249	AACAAACUGCCCACCGCCUG	PCSK9	358
R4250	AUGACAUAGCCCCGGCGGGC	PCSK9	359
R4251	UACAUAUCUUUUAUGACCUC	PCSK9	360
R4252	UAUGACCUCUUCCCUGGCUU	PCSK9	361
R4253	AUGACCUCUUCCCUGGCUUC	PCSK9	362
R4254	UGACCUCUUCCCUGGCUUCU	PCSK9	363
R4255	ACCAAGAAGCCAGGGAAGAG	PCSK9	364
R4256	CCUGGCUUCUUGGUGAAGAU	PCSK9	365
R4257	UUGGUGAAGAUGAGCAGUGA	PCSK9	366
R4258	GUGAAGAUGAGCAGUGACCU	PCSK9	367
R4259	CCCCAUGUGGAGUACAUUGA	PCSK9	368
R4260	CUCAAUGUACUCCACAUGGG	PCSK9	369
R4261	AGGAAGACUCCUUUGUCUUC	PCSK9	370
R4262	GUCUUCGCCCAGAGCAUCCC	PCSK9	371
R4263	UCUUCGCCCAGAGCAUCCCA	PCSK9	372
R4264	GCCCAGAGCAUCCCAUGGAA	PCSK9	373
R4265	CAUGGGAUGCUCUGGGCGAA	PCSK9	374
R4266	GCUCCAGGUUCCAUGGGAUG	PCSK9	375
R4267	UCCCAGCAUGGCACCAGACA	PCSK9	376
R4268	CUCUGUCUGGUGCCAUGCUG	PCSK9	377
R4269	GAUACCAGCAUCCAGGGUGC	PCSK9	378
R4270	AGGGCAGGGUCACCAUCACC	PCSK9	379
R4271	AAGUCGGUGAUGGUGACCCU	PCSK9	380
R4272	AACAGCGUGCCGGAGGAGGA	PCSK9	381
R4273	GCCACACCAGCAUCCCGGCC	PCSK9	382
R4274	AGCACACGCAGGCUGUGCAG	PCSK9	383
R4275	ACAGUUGAGCACACGCAGGC	PCSK9	384
R4276	CCUUGACAGUUGAGCACACG	PCSK9	385
R4277	GCUGACUCUUCCGAAUAAAC	PCSK9	386
R4278	AUUCGGAAGAGUCAGCUAAU	PCSK9	387
R4279	UUCGGAAGAGUCAGCUAAUC	PCSK9	388
R4280	GGAAGAGUCAGCUAAUCCAG	PCSK9	389
R4281	UGCUGCCCCUGGCCGGUGGG	PCSK9	390
R4282	AGGAUGCGGCUAUACCCACC	PCSK9	391
R4283	CCAGCUGCUGCAACCAGCAC	PCSK9	392

[0296]

R4284	CAGCAGCUGGGAACUUCCGG	PCSK9	393
R4285	CGGGACGACGCCUGCCUCUA	PCSK9	394
R4286	GUGGCCCCGACUGUGAUGAC	PCSK9	395
R4287	CCUUGGGGACUUUGGGGACU	PCSK9	396
R4288	GUCCCCAAAGUCCCCAAGGU	PCSK9	397
R4289	GGGACUUUGGGGACUAAUUU	PCSK9	398
R4290	GGGGACUAAUUUUGGACGCU	PCSK9	399
R4291	GGGACUAAUUUUGGACGCUG	PCSK9	400
R4292	UGGACGCUGUGUGGAUCUCU	PCSK9	401
R4293	GGACGCUGUGUGGAUCUCUU	PCSK9	402
R4294	GACGCUGUGUGGAUCUCUUU	PCSK9	403
R4295	CCGGGGGCAAAGAGAUCCAC	PCSK9	404
R4296	GCCCCCGGGAAGGACAUCAU	PCSK9	405
R4297	CCCCCGGGAAGGACAUCAUC	PCSK9	406
R4298	AUGUCACAGAGUGGGACCUC	PCSK9	407
R4299	UGGCUCGGAUGCUGAGCCGG	PCSK9	408
R4300	CCCUGGCCGAGCUGCGGCAG	PCSK9	409
R4301	GUAGAGAAGUGGAUCAGCCU	PCSK9	410
R4302	GGUAGAGAAGUGGAUCAGCC	PCSK9	411
R4303	UCUACCAAAGACGUCAUCAA	PCSK9	412
R4304	AUGACGUCUUUGGUAGAGAA	PCSK9	413
R4305	CCUGAGGACCAGCAGGUGCU	PCSK9	414
R4306	GGGGUCAGCACCUGCUGGUC	PCSK9	415
R4307	GAGUGGGCCCCGAGUGUGCC	PCSK9	416
R4308	UGGGGCACAGCGGGCUGUAG	PCSK9	417
R4309	UCCAGGAGCGGGAGGCGUCG	PCSK9	418
R4310	CAGACCUGCUGGCCUCCUAU	PCSK9	419
R4311	AGGGCCUUGCAGACCUGCUG	PCSK9	420
R4312	GGGGGUGAGGGUGUCUAUGC	PCSK9	421
R4313	GGGGUGAGGGUGUCUAUGCC	PCSK9	422
R4314	GCACGGGGAACCAGGCAGCA	PCSK9	423
R4315	CCCGUGCCAACUGCAGCAUC	PCSK9	424
R4316	UGGAUGCUGCAGUUGGCACG	PCSK9	425
R4317	UGGUGGCAGUGGACAUGGGU	PCSK9	426
R4318	CACUUCCCAAUGGAAGCUGC	PCSK9	427
R4319	CAUUGGGAAGUGGAAGACCU	PCSK9	428
R4320	GGAAGUGGAAGACCUUAGUG	PCSK9	429
R4321	GUGUCCGGAGGCAGCCUGCG	PCSK9	430
R4322	GCCACCAGGCGGCCAGUGUC	PCSK9	431
R4323	CUGCUGCCAUGCCCCAGGGC	PCSK9	432
R4324	CAGCCCUGGGGCAUGGCAGC	PCSK9	433
R4325	CAUUCCAGCCCUGGGGCAUG	PCSK9	434

[0297]

R4326	GCAUUCCAGCCCUGGGGCAU	PCSK9	435
R4327	UGCAUUCCAGCCCUGGGGCA	PCSK9	436
R4328	AUUUUGCAUUCCAGCCCUGG	PCSK9	437
R4329	CAUCCAGUCAGGGUCCAUCC	PCSK9	438
R4330	UCCACGCUGUAGGCUCCCAG	PCSK9	439
R4331	CCACACACAGGUUGUCCACG	PCSK9	440
R4332	UCCACUGGUCCUGUCUGCUC	PCSK9	441
R4333	CUGAAGGCCGGCUCCGGCAG	PCSK9	442

[0298] 表F:CHO细胞中靶向Bak1的gRNA间隔区序列

[0299]

名称	**间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2452 Bak1_CasPhi_1	GAAGCTATGTTTTCCATCTC	443
R2453 Bak1_CasPhi_2	GCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	444
R2454 Bak1_CasPhi_3	CTCCTAGAACCCAACAGGTA	445
R2455 Bak1_CasPhi_4	GAAAGACCTCCTCTGTGTCC	446
R2456 Bak1_CasPhi_5	TCCATCTCGGGGTTGGCAGG	447
R2457 Bak1_CasPhi_6	TTCCTGATGGTGGAGATGGA	448
R2849_Bak1_nsd_sg1	CTGACTCCCAGCTCTGACCC	449
R2850_Bak1_nsd_sg2	TGGGGTCAGAGCTGGGAGTC	450
R2851_Bak1_nsd_sg3	GAAAGACCTCCTCTGTGTCC	451
R2852_Bak1_nsd_sg4	CGAAGCTATGTTTTCCATCT	452
R2853_Bak1_nsd_sg5	GAAGCTATGTTTTCCATCTC	453
R2854_Bak1_nsd_sg6	TCCATCTCCACCATCAGGAA	454
R2855_Bak1_nsd_sg7	CCATCTCCACCATCAGGAAC	455
R2856_Bak1_nsd_sg8	CTGATGGTGGAGATGGAAAA	456
R2857_Bak1_nsd_sg9	CATCTCCACCATCAGGAACA	457
R2858_Bak1_nsd_sg10	TTCCTGATGGTGGAGATGGA	458
R2859_Bak1_nsd_sg11	GCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	459
R2860_Bak1_nsd_sg12	TCCATCTCGGGGTTGGCAGG	460
R2861_Bak1_nsd_sg13	TAGGAGCAAATTGTCCATCT	461
R2862_Bak1_nsd_sg14	GGTTCTAGGAGCAAATTGTC	462
R2863_Bak1_nsd_sg15	GCTCCTAGAACCCAACAGGT	463
R2864_Bak1_nsd_sg16	CTCCTAGAACCCAACAGGTA	464
R3977 Bak1_外显子1_sg1	TCCAGACGCCATCTTTCAGG	465
R3978 Bak1_外显子1_sg2	TGGTAAGAGTCCTCCTGCCC	466
R3979 Bak1_外显子3_sg1	TTACAGCATCTTGGGTCAGG	467
R3980 Bak1_外显子3_sg2	GGTCAGGTGGGCCGGCAGCT	468

[0300]

R3981 Bak1_外显子3_sg3	CTATCATTGGAGATGACATT	469
R3982 Bak1_外显子3_sg4	GAGATGACATTAACCGGAGA	470
R3983 Bak1_外显子3_sg5	TGGAACTCTGTGTCGTATCT	471
R3984 Bak1_外显子3_sg6	CAGAATTTACTGGAGCAGCT	472
R3985 Bak1_外显子3_sg7	ACTGGAGCAGCTGCAGCCCA	473
R3986 Bak1_外显子3_sg8	CCAGCTGTGGGCTGCAGCTG	474
R3987 Bak1_外显子3_sg9	GTAGGCATTCCCAGCTGTGG	475
R3988 Bak1_外显子3_sg10	GTGAAGAGTTCGTAGGCATT	476
R3989 Bak1_外显子3_sg11	ACCAAGATTGCCTCCAGGTA	477
R3990 Bak1_外显子3_sg12	CCTCCAGGTACCCACCACCA	478

[0301] 表G:CHO细胞中靶向Bax的gRNA间隔区序列

[0302]

名称	间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA	SEQ ID NO
R2458 Bax_CasPhi_1	CTAATGTGGATACTAACTCC	479
R2459 Bax_CasPhi_2	TTCCGTGTGGCAGCTGACAT	480
R2460 Bax_CasPhi_3	CTGATGGCAACTTCAACTGG	481
R2461 Bax_CasPhi_4	TACTTTGCTAGCAAACTGGT	482
R2462 Bax_CasPhi_5	AGCACCAGTTTGCTAGCAAA	483
R2463 Bax_CasPhi_6	AACTGGGGCCGGGTTGTTGC	484
R2865_Bax_nsd_sg1	TTCTCTTTCCTGTAGGATGA	485
R2866_Bax_nsd_sg2	TCTTTCCTGTAGGATGATTG	486
R2867_Bax_nsd_sg3	CCTGTAGGATGATTGCTAAT	487
R2868_Bax_nsd_sg4	CTGTAGGATGATTGCTAATG	488
R2869_Bax_nsd_sg5	CTAATGTGGATACTAACTCC	489
R2870_Bax_nsd_sg6	TTCCGTGTGGCAGCTGACAT	490
R2871_Bax_nsd_sg7	CGTGTGGCAGCTGACATGTT	491
R2872_Bax_nsd_sg8	CCATCAGCAAACATGTCAGC	492
R2873_Bax_nsd_sg9	AAGTTGCCATCAGCAAACAT	493
R2874_Bax_nsd_sg10	GCTGATGGCAACTTCAACTG	494
R2875_Bax_nsd_sg11	CTGATGGCAACTTCAACTGG	495
R2876_Bax_nsd_sg12	AACTGGGGCCGGGTTGTTGC	496
R2877_Bax_nsd_sg13	TTGCCCTTTTCTACTTTGCT	497

[0303]

R2878_Bax_nsd_sg14	CCCTTTTCTACTTTGCTAGC	498
R2879_Bax_nsd_sg15	CTAGCAAAGTAGAAAAGGGC	499
R2880_Bax_nsd_sg16	GCTAGCAAAGTAGAAAAGGG	500
R2881_Bax_nsd_sg17	TCTACTTTGCTAGCAAACTG	501
R2882_Bax_nsd_sg18	CTACTTTGCTAGCAAACTGG	502
R2883_Bax_nsd_sg19	TACTTTGCTAGCAAACTGGT	503
R2884_Bax_nsd_sg20	GCTAGCAAACTGGTGCTCAA	504
R2885_Bax_nsd_sg21	CTAGCAAACTGGTGCTCAAG	505
R2886_Bax_nsd_sg22	AGCACCAGTTTGCTAGCAAA	506

[0304] 表H:CHO细胞中靶向Fut8的gRNA间隔区序列

[0305]

名称	**间隔区序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2464 Fut8_CasPhi_1	CCACTTTGTCAGTGCGTCTG	507
R2465 Fut8_casPhi_2	CTCAATGGGATGGAAGGCTG	508
R2466 Fut8_CasPhi_3	AGGAATACATGGTACACGTT	509
R2467 Fut8_CasPhi_4	AAGAACATTTTCAGCTTCTC	510
R2468 Fut8_CasPhi_5	ATCCACTTTCATTCTGCGTT	511
R2469 Fut8_CasPhi_6	TTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	512
R2887_Fut8_nsd_sg1	TCCCCAGAGTCCATGTCAGA	513
R2888_Fut8_nsd_sg2	TCAGTGCGTCTGACATGGAC	514
R2889_Fut8_nsd_sg3	GTCAGTGCGTCTGACATGGA	515
R2890_Fut8_nsd_sg4	CCACTTTGTCAGTGCGTCTG	516
R2891_Fut8_nsd_sg5	TGTTCCCACTTTGTCAGTGC	517
R2892_Fut8_nsd_sg6	CTCAATGGGATGGAAGGCTG	518
R2893_Fut8_nsd_sg7	CATCCCATTGAGGAATACAT	519
R2894_Fut8_nsd_sg8	AGGAATACATGGTACACGTT	520
R2895_Fut8_nsd_sg9	AACGTGTACCATGTATTCCT	521
R2896_Fut8_nsd_sg10	TTCAACGTGTACCATGTATT	522
R2897_Fut8_nsd_sg11	AAGAACATTTTCAGCTTCTC	523
R2898_Fut8_nsd_sg12	GAGAAGCTGAAAATGTTCTT	524
R2899_Fut8_nsd_sg13	TCAGCTTCTCGAACGCAGAA	525
R2900_Fut8_nsd_sg14	CAGCTTCTCGAACGCAGAAT	526
R2901_Fut8_nsd_sg15	TGCGTTCGAGAAGCTGAAAA	527
R2902_Fut8_nsd_sg16	AGCTTCTCGAACGCAGAATG	528
R2903_Fut8_nsd_sg17	ATTCTGCGTTCGAGAAGCTG	529
R2904_Fut8_nsd_sg18	CATTCTGCGTTCGAGAAGCT	530
R2905_Fut8_nsd_sg19	TCGAACGCAGAATGAAAGTG	531
R2906_Fut8_nsd_sg20	ATCCACTTTCATTCTGCGTT	532
R2907_Fut8_nsd_sg21	TATCCACTTTCATTCTGCGT	533
R2908_Fut8_nsd_sg22	TTATCCACTTTCATTCTGCG	534
R2909_Fut8_nsd_sg23	TTTATCCACTTTCATTCTGC	535

R2910_Fut8_nsd_sg24	TTTTATCCACTTTCATTCTG	536
R2911_Fut8_nsd_sg25	AACAAAGAAGGGTCATCAGT	537
R2912_Fut8_nsd_sg26	CCTCCTTTAACAAAGAAGGG	538
R2913_Fut8_nsd_sg27	GCCTCCTTTAACAAAGAAGG	539
R2914_Fut8_nsd_sg28	TTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	540
R2915_Fut8_nsd_sg29	GTTAAAGGAGGCAAAGACAA	541
R2916_Fut8_nsd_sg30	TTAAAGGAGGCAAAGACAAA	542
R2917_Fut8_nsd_sg31	TCTTTGCCTCCTTTAACAAA	543
R2918_Fut8_nsd_sg32	GTCTTTGCCTCCTTTAACAA	544
R2919_Fut8_nsd_sg33	GTCTAACTTACTTTGTCTTT	545
R2920_Fut8_nsd_sg34	TTGGTCTAACTTACTTTGTC	546

[0306]

[0307] 表I:靶向人类T细胞中的TRAC的CasΦ.12gRNA

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA	SEQ ID NO
R3040_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGATATCTGTGGGACAAGA	547
R3041_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCCACAGATATCCAGAACC	548
R3042_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGTCTCTCAGCTGGTACAC	549
R3043_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAGAGTCTCTCAGCTGGTACA	550
R3044_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCACTGGATTTAGAGTCTCT	551
R3045_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAGAATCAAAATCGGTGAATA	552
R3046_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGAATCAAAATCGGTGAAT	553
R3047_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACACCGATTTTGATTCTCAAAC	554
R3048_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTGAGAATCAAAATCGGTG	555
R3049_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGTTTGAGAATCAAAATCGGT	556
R3050_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGATTCTCAAACAAATGTGT	557
R3051_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGATTCTCAAACAAATGTGTC	558
R3052_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACATTCTCAAACAAATGTGTCA	559
R3053_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGACACATTTGTTTGAGAAT	560
R3054_CasPhi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAAACAAATGTGTCACAAA	561
R3055_Cas	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG	562

[0308]

[0309]

Phi12	ACGTGACACATTTGTTTGAGAA	
R3056_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTTTGTGACACATTTGTTTG	563
R3057_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTGATGTGTATATCACAGACA	564
R3058_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTCTGTGATATACACATCAGA	565
R3059_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGTCTGTGATATACACATCAG	566
R3060_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTGTCTGTGATATACACATCA	567
R3061_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAAGTCCATAGACCTCATGTC	568
R3062_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTCTTGAAGTCCATAGACCT	569
R3063_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAAGAGCAACAGTGCTGTGGC	570
R3064_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTCCAGGCCACAGCACTGTT	571
R3065_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTTGCTCCAGGCCACAGCACT	572
R3066_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGTTGCTCCAGGCCACAGCAC	573
R3067_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCACATGCAAAGTCAGATTTG	574
R3068_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGCACATGCAAAGTCAGATTT	575
R3069_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGCATGTGCAAACGCCTTCAA	576
R3070_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAAGGCGTTTGCACATGCAAA	577
R3071_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCATGTGCAAACGCCTTCAAC	578
R3072_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTTGAAGGCGTTTGCACATGC	579
R3073_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAACAACAGCATTATTCCAGA	580
R3074_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTGGAATAATGCTGTTGTTGA	581
R3075_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTTCCAGAAGACACCTTCTTC	582
R3076_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCAGAAGACACCTTCTTCCCC	583
R3077_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCCTGGGCTGGGGAAGAAGGT	584
R3078_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG	585
R3079_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCCCAGCCCAGGTAAGGGCAG	586

[0310]

R3080_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTAAAAGGAAAAACAGACATT	587
R3081_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTAAAAGGAAAAACAGACAT	588
R3082_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTTCCTTTTAGAAAGTTCCTG	589
R3083_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTCCTTTTAGAAAGTTCCTGT	590
R3084_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCCTTTTAGAAAGTTCCTGTG	591
R3085_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTTTTAGAAAGTTCCTGTGA	592
R3086_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTAGAAAGTTCCTGTGATGTC	593
R3136_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAGAAAGTTCCTGTGATGTCA	594
R3137_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGAAAGTTCCTGTGATGTCAA	595
R3138_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACACATCACAGGAACTTTCTAA	596
R3139_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTGTGATGTCAAGCTGGTCG	597
R3140_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTCGACCAGCTTGACATCACA	598
R3141_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCTCGACCAGCTTGACATCAC	599
R3142_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACTCTCGACCAGCTTGACATCA	600
R3143_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAAAGCTTTTCTCGACCAGCT	601
R3144_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCAAAGCTTTTCTCGACCAGC	602
R3145_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACCCTGTTTCAAAGCTTTTCTC	603
R3146_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACGAAACAGGTAAGACAGGGGT	604
R3147_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAG ACAAACAGGTAAGACAGGGGTC	605

[0311] 表J:靶向人类T细胞中的TRAC的CasΦ.32gRNA

[0312]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R3040_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGGATATCTGTGGGACAAGA	606
R3041_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCCCACAGATATCCAGAACC	607
R3042_Cas	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA	608

Phi32	GACGAGTCTCTCAGCTGGTACAC	
R3043_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAGAGTCTCTCAGCTGGTACA	609
R3044_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCACTGGATTTAGAGTCTCT	610
R3045_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAGAATCAAAATCGGTGAATA	611
R3046_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGAGAATCAAAATCGGTGAAT	612
R3047_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACACCGATTTTGATTCTCAAAC	613
R3048_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTTGAGAATCAAAATCGGTG	614
R3049_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGTTTGAGAATCAAAATCGGT	615
R3050_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGATTCTCAAACAAATGTGT	616
R3051_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGATTCTCAAACAAATGTGTC	617
R3052_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACATTCTCAAACAAATGTGTCA	618
R3053_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGACACATTTGTTTGAGAAT	619
R3054_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCAAACAAATGTGTCACAAA	620
R3055_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGTGACACATTTGTTTGAGAA	621
R3056_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTTTGTGACACATTTGTTTG	622
R3057_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGATGTGTATATCACAGACA	623
R3058_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCTGTGATATACACATCAGA	624
R3059_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGTCTGTGATATACACATCAG	625
R3060_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGTCTGTGATATACACATCA	626
R3061_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAAGTCCATAGACCTCATGTC	627
R3062_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTCTTGAAGTCCATAGACCT	628
R3063_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAAGAGCAACAGTGCTGTGGC	629
R3064_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTCCAGGCCACAGCACTGTT	630
R3065_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTGCTCCAGGCCACAGCACT	631
R3066_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGTTGCTCCAGGCCACAGCAC	632

[0313]

[0314]

R3067_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCACATGCAAAGTCAGATTTG	633
R3068_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGCACATGCAAAGTCAGATTT	634
R3069_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGCATGTGCAAACGCCTTCAA	635
R3070_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAAGGCGTTTGCACATGCAAA	636
R3071_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCATGTGCAAACGCCTTCAAC	637
R3072_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTGAAGGCGTTTGCACATGC	638
R3073_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAACAACAGCATTATTCCAGA	639
R3074_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTGGAATAATGCTGTTGTTGA	640
R3075_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTCCAGAAGACACCTTCTTC	641
R3076_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCAGAAGACACCTTCTTCCCC	642
R3077_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCCTGGGCTGGGGAAGAAGGT	643
R3078_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG	644
R3079_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCCCAGCCCAGGTAAGGGCAG	645
R3080_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTAAAAGGAAAAACAGACATT	646
R3081_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTAAAAGGAAAAACAGACAT	647
R3082_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTTCCTTTTAGAAAGTTCCTG	648
R3083_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCCTTTTAGAAAGTTCCTGT	649
R3084_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCCTTTTAGAAAGTTCCTGTG	650
R3085_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTTTTAGAAAGTTCCTGTGA	651
R3086_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTAGAAAGTTCCTGTGATGTC	652
R3136_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAGAAAGTTCCTGTGATGTCA	653
R3137_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGAAAGTTCCTGTGATGTCAA	654
R3138_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACACATCACAGGAACTTTCTAA	655
R3139_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTGTGATGTCAAGCTGGTCG	656
R3140_Cas	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA	657

[0315]

Phi32	GACTCGACCAGCTTGACATCACA	
R3141_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCTCGACCAGCTTGACATCAC	658
R3142_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACTCTCGACCAGCTTGACATCA	659
R3143_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAAAGCTTTTCTCGACCAGCT	660
R3144_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCAAAGCTTTTCTCGACCAGC	661
R3145_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACCCTGTTTCAAAGCTTTTCTC	662
R3146_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACGAAACAGGTAAGACAGGGGT	663
R3147_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGA GACAAACAGGTAAGACAGGGGTC	664

[0316] 表K:靶向人类T细胞中的B2M的CasΦ.12gRNA

[0317]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R3087_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAATATAAGTGGAGGCGTCGC	665
R3088_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACATATAAGTGGAGGCGTCGCG	666
R3089_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGGAATGCCCGCCAGCGCGA	667
R3090_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTGAAGCTGACAGCATTCGG	668
R3091_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGGGCCGAGATGTCTCGCTCC	669
R3092_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGCTGTGCTCGCGCTACTCTC	670
R3093_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTGGCCTGGAGGCTATCCAG	671
R3094_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTGGCCTGGAGGCTATCCAGC	672
R3095_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACATGTGTCTTTTCCCGATATT	673
R3096_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCCCGATATTCCTCAGGTAC	674
R3097_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCCCGATATTCCTCAGGTACT	675
R3098_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCCGATATTCCTCAGGTACTC	676
R3099_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGAGTACCTGAGGAATATCGG	677
R3100_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGGAGTACCTGAGGAATATCG	678

[0318]

R3101_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTCAGGTACTCCAAAGATTC	679
R3102_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGGTTTACTCACGTCATCCA	680
R3103_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACTCACGTCATCCAGCAGAG	681
R3104_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTCACGTCATCCAGCAGAGA	682
R3105_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCTGCTGGATGACGTGAGTA	683
R3106_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCATTCTCTGCTGGATGACGT	684
R3107_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCCATTCTCTGCTGGATGACG	685
R3108_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACTTTCCATTCTCTGCTGGA	686
R3109_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGACTTTCCATTCTCTGCTGG	687
R3110_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGGAAATTTGACTTTCCATT	688
R3111_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCCTGAATTGCTATGTGTCTG	689
R3112_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTGAATTGCTATGTGTCTGG	690
R3113_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTATGTGTCTGGGTTTCATC	691
R3114_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAATGTCGGATGGATGAAACC	692
R3115_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCATCCATCCGACATTGAAGT	693
R3116_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACATCCATCCGACATTGAAGTT	694
R3117_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGTAAGTCAACTTCAATGTC	695
R3118_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTTCAGTAAGTCAACTTCAAT	696
R3119_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAAGTTGACTTACTGAAGAAT	697
R3120_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACTTACTGAAGAATGGAGAG	698
R3121_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCTCTCCATTCTTCAGTAAG	699
R3122_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTGAAGAATGGAGAGAGAAT	700
R3123_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAATTCTCTCTCCATTCTTCA	701
R3124_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCAATTCTCTCTCCATTCTTC	702
R3125_Cas	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA	703

Phi12	GACTCAATTCTCTCTCCATTCTT	
R3126_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTTCAATTCTCTCTCCATTCT	704
R3127_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAAAAAGTGGAGCATTCAGAC	705
R3128_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTGAAAGACAAGTCTGAATG	706
R3129_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGACTTGTCTTTCAGCAAGG	707
R3130_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCTTTCAGCAAGGACTGGTC	708
R3131_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCAGCAAGGACTGGTCTTTCT	709
R3132_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGCAAGGACTGGTCTTTCTA	710
R3133_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCTATCTCTTGTACTACACTG	711
R3134_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTATCTCTTGTACTACACTGA	712
R3135_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGTGTAGTACAAGAGATAGA	713
R3148_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTACTACACTGAATTCACCCC	714
R3149_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACAGTGGGGGTGAATTCAGTGT	715
R3150_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCAGTGGGGGTGAATTCAGTG	716
R3151_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCAGTGGGGGTGAATTCAGT	717
R3152_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTTCAGTGGGGGTGAATTCAG	718
R3153_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACCCCCACTGAAAAAGATGA	719
R3154_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACACGGCAGGCATACTCATC	720
R3155_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGGCTGTGACAAAGTCACATG	721
R3156_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACGTCACAGCCCAAGATAGTTA	722
R3157_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACTCACAGCCCAAGATAGTTAA	723
R3158_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACACTATCTTGGGCTGTGACAA	724
R3159_Cas Phi12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGA GACCCCCACTTAACTATCTTGGG	725

[0319]

[0320] 表L:靶向人类T细胞中的B2M的CasΦ.32gRNA

[0321]

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA	SEQ ID NO
R3087_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAATATAAGTGGAGGCGTCGC	726
R3088_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACATATAAGTGGAGGCGTCGCG	727
R3089_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAGGAATGCCCGCCAGCGCGA	728
R3090_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTGAAGCTGACAGCATTCGG	729
R3091_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACGGGCCGAGATGTCTCGCTCC	730
R3092_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACGCTGTGCTCGCGCTACTCTC	731
R3093_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTGGCCTGGAGGCTATCCAG	732
R3094_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTGGCCTGGAGGCTATCCAGC	733
R3095_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACATGTGTCTTTTCCCGATATT	734
R3096_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTCCCGATATTCCTCAGGTAC	735
R3097_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCCCGATATTCCTCAGGTACT	736
R3098_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCCGATATTCCTCAGGTACTC	737
R3099_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACGAGTACCTGAGGAATATCGG	738
R3100_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACGGAGTACCTGAGGAATATCG	739
R3101_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTCAGGTACTCCAAAGATTC	740
R3102_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAGGTTTACTCACGTCATCCA	741
R3103_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACACTCACGTCATCCAGCAGAG	742
R3104_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTCACGTCATCCAGCAGAGA	743
R3105_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTCTGCTGGATGACGTGAGTA	744
R3106_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCATTCTCTGCTGGATGACGT	745
R3107_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCCATTCTCTGCTGGATGACG	746
R3108_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACACTTTCCATTCTCTGCTGGA	747
R3109_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACGACTTTCCATTCTCTGCTGG	748
R3110_Cas	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG	749

Phi32	AGACAGGAAATTTGACTTTCCATT	
R3111_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCCTGAATTGCTATGTGTCTG	750
R3112_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTGAATTGCTATGTGTCTGG	751
R3113_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTATGTGTCTGGGTTTCATC	752
R3114_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAATGTCGGATGGATGAAACC	753
R3115_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCATCCATCCGACATTGAAGT	754
R3116_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACATCCATCCGACATTGAAGTT	755
R3117_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAGTAAGTCAACTTCAATGTC	756
R3118_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTTCAGTAAGTCAACTTCAAT	757
R3119_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAAGTTGACTTACTGAAGAAT	758
R3120_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACACTTACTGAAGAATGGAGAG	759
R3121_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTCTCTCCATTCTTCAGTAAG	760
R3122_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTGAAGAATGGAGAGAGAAT	761
R3123_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAATTCTCTCTCCATTCTTCA	762
R3124_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCAATTCTCTCTCCATTCTTC	763
R3125_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTCAATTCTCTCTCCATTCTT	764
R3126_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTTCAATTCTCTCTCCATTCT	765
R3127_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAAAAAGTGGAGCATTCAGAC	766
R3128_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTGAAAGACAAGTCTGAATG	767
R3129_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAGACTTGTCTTTCAGCAAGG	768
R3130_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTCTTTCAGCAAGGACTGGTC	769
R3131_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCAGCAAGGACTGGTCTTTCT	770
R3132_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACAGCAAGGACTGGTCTTTCTA	771
R3133_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACCTATCTCTTGTACTACACTG	772
R3134_Cas Phi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCG AGACTATCTCTTGTACTACACTGA	773

[0322]

[0323]

R3135_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAGTGTAGTACAAGAGATAGA	774
R3148_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTACTACACTGAATTCACCCC	775
R3149_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAGTGGGGGTGAATTCAGTGT	776
R3150_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCAGTGGGGGTGAATTCAGTG	777
R3151_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCAGTGGGGGTGAATTCAGT	778
R3152_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTCAGTGGGGGTGAATTCAG	779
R3153_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACACCCCCACTGAAAAAGATGA	780
R3154_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACACACGGCAGGCATACTCATC	781
R3155_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGGCTGTGACAAAGTCACATG	782
R3156_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTCACAGCCCAAGATAGTTA	783
R3157_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCACAGCCCAAGATAGTTAA	784
R3158_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACACTATCTTGGGCTGTGACAA	785
R3159_CasPhi32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCCCCACTTAACTATCTTGGG	786

[0324] 表M:靶向人类T细胞中的PD1的CasΦ.12gRNA

[0325]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R2921_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUCCGCUCACCUCCGCCU	787
R2922_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUCCGCUCACCUCCGCCU	788
R2923_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCUCACCUCCGCCUGAGCA	789
R2924_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACUGCUCAGGCGGAGGU	790
R2925_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGCACCGCCCAGACGACUG	791
R2926_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAUGCAGAUCCCACAGG	792
R2927_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAGGCGCCCUGGCCAGUC	793
R2928_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGGGCGGUGCUACAACUG	794
R2929_Cas	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG	795

[0326]

Phi12	AGACGCAUGCCUGGAGCAGCCCCA	
R2930_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUAGCACCGCCCAGACGACUG	796
R2931_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGGCCGCCAGCCCAGUUGUA	797
R2932_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUUCCGCUCACCUCCGCCUG	798
R2933_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCAGGGCCUGUCUGGGGAGUC	799
R2934_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCCCAGCCCUGCUCGUGGU	800
R2935_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGUCACCACGAGCAGGGCUG	801
R2936_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCCCUUCGGUCACCACGAG	802
R2937_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGAGAAGCUGCAGGUGAAGGU	803
R2938_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACACCUGCAGCUUCUCCAACAC	804
R2939_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCAACACAUCGGAGAGCUU	805
R2940_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGCACGAAGCUCUCCGAUGUG	806
R2941_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGCACGAAGCUCUCCGAUGU	807
R2942_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGUGCUAAACUGGUACCGCAU	808
R2943_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUGGGGCUCAUGCGGUACCA	809
R2944_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCGUCUGGUUGCUGGGGCU	810
R2945_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCCGAGGACCGCAGCCAGCC	811
R2946_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGUGACACGGAAGCGGCAGU	812
R2947_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCGUGUCACACAACUGCCCAA	813
R2948_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGCAGUUGUGUGACACGGAA	814
R2949_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCACAUGAGCGUGGUCAGGGC	815
R2950_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCGCCGGGCCCUGACCACGCU	816
R2951_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGGGCCAGGGAGAUGGCCCC	817
R2952_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAUCUGCGCCUUGGGGGCCAG	818
R2953_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGAUCUGCGCCUUGGGGGCCA	819

[0327]

R2954_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCAGACAGGCCCUGGAACCC	820
R2955_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCAGCCCUGCUCGUGGUGAC	821
R2956_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUCUGGAAGGGCACAAAGG	822
R2957_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGUGCCCUUCCAGAGAGAAGG	823
R2958_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGCCCUUCCAGAGAGAAGGG	824
R2959_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGCCCUUCUCUCUGGAAGGG	825
R2960_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCAGAGAGAAGGGCAGAAGUG	826
R2961_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGAACUGGCCGGCUGGCCUGG	827
R2962_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGAACUGGCCGGCUGGCCUG	828
R2963_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCAAACCCUGGUGGUUGGUGU	829
R2964_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGUGUCGUGGGCGGCCUGCUG	830
R2965_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCUCGUGCGGCCCGGGAGCA	831
R2966_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCCUGCAGAGAAACACACU	832
R2967_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUCUGCAGGGACAAUAGGAG	833
R2968_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUGCAGGGACAAUAGGAGC	834
R2969_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUCCUCAAAGAAGGAGGACC	835
R2970_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCUCAAAGAAGGAGGACCC	836
R2971_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUGUGGACUAUGGGGAGCU	837
R2972_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUCGCCACUGGAAAUCCAG	838
R2973_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCAGUGGCGAGAGAAGACCC	839
R2974_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCAGUGGCGAGAGAAGACCCC	840
R2975_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCGCUAGGAAAGACAAUGGUG	841
R2976_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUUUCCUAGCGGAAUGGGC	842
R2977_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCUAGCGGAAUGGGCACCUC	843
R2978_Cas	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG	844

[0328]

Phi12	AGACCUAGCGGAAUGGGCACCUCA	
R2979_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGCCCCUCUGACCGGCUUCCU	845
R2980_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUUGGCCACCAGUGUUCUGC	846
R2981_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGCCACCAGUGUUCUGCAGAC	847
R2982_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGCAGACCCUCCACCAUGAG	848
R2983_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCCUGAGGAAAUGCGCUGAC	849
R2984_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCUCAGGAGAAGCAGGCAGG	850
R2985_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCUCAGGAGAAGCAGGCAGGG	851
R2986_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCAGGCCGUCCAGGGGCUGAG	852
R2987_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGACAUGAGUCCUGUGGUGG	853
R2988_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGGUCCUGCCAGCACAGAGC	854
R2989_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGGGAGCUGGACGCAGGCAG	855
R2990_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGCCCCGGGCCGCAGGCAGC	856
R2991_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACAGGCAGGAGGCUCCGGGGCG	857
R2992_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGGGCUGGUUGGAGAUGGCC	858
R2993_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGAGAUGGCCUUGGAGCAGCC	859
R2994_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGCUGCUCCAAGGCCAUCUCC	860
R2995_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGAGCAGCCAAGGUGCCCCUG	861
R2996_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGGAUGCCACUGCCAGGGGC	862
R2997_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCGGGAUGCCACUGCCAGGGG	863
R2998_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACGGCCCUGCGUCCAGGGCGUU	864
R2999_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUGCUCCCUGCAGGCCUAG	865
R3000_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUCUAGGCCUGCAGGGAGCAG	866
R3001_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACCCUGAAACUUCUCUAGGCCU	867
R3002_Cas Phi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGG AGACUGACCUUCCCUGAAACUUCU	868

[0329]

R3003_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGGAAGGUCAGAAGAGCU	869
R3004_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGAAGGUCAGAAGAGCUC	870
R3005_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCCCUGCCCACCACAGCC	871
R3006_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGCCCUGCCCACCACAGC	872
R3007_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACACACAUGCCCAGGCAGCACC	873
R3008_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAUGCCCAGGCAGCACCU	874
R3009_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGCCCCACAAAGGGCCUG	875
R3010_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGGGGCAGGGAAGCUGAGG	876
R3011_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGGGCAGGGAAGCUGAGGC	877
R3012_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCCUCAGCUUCCCUGCCC	878
R3013_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGCCCAGCCAGCACUCUG	879
R3014_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCCCAGCCAGCACUCUGG	880
R3015_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCACCCCAGCCCCUCACACCA	881
R3016_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGACCGUAGGAUGUCCCUCU	882

[0330] 表N:靶向人类T细胞中的PD1的CasΦ.32gRNA

[0331]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R2921_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUUCCGCUCACCUCCGCCU	883
R2922_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUUCCGCUCACCUCCGCCU	884
R2923_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCGCUCACCUCCGCCUGAGCA	885
R2924_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCACUGCUCAGGCGGAGGU	886
R2925_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUAGCACCGCCCAGACGACUG	887
R2926_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGCAUGCAGAUCCCACAGG	888
R2927_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCACAGGCGCCCUGGCCAGUC	889
R2928_CasP	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGG	890

[0332]

hi32	CGAGACUCUGGGCGGUGCUACAACUG	
R2929_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGCAUGCCUGGAGCAGCCCCA	891
R2930_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUAGCACCGCCCAGACGACUG	892
R2931_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGGCCGCCAGCCCAGUUGUA	893
R2932_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUUCCGCUCACCUCCGCCUG	894
R2933_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGGGCCUGUCUGGGGAGUC	895
R2934_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCCCAGCCCUGCUCGUGGU	896
R2935_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGUCACCACGAGCAGGGCUG	897
R2936_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCCCUUCGGUCACCACGAG	898
R2937_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAGAAGCUGCAGGUGAAGGU	899
R2938_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACACCUGCAGCUUCUCCAACAC	900
R2939_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCAACACAUCGGAGAGCUU	901
R2940_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGCACGAAGCUCUCCGAUGUG	902
R2941_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGCACGAAGCUCUCCGAUGU	903
R2942_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGUGCUAAACUGGUACCGCAU	904
R2943_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGGGGCUCAUGCGGUACCA	905
R2944_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCGUCUGGUUGCUGGGGCU	906
R2945_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCCGAGGACCGCAGCCAGCC	907
R2946_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGUGACACGGAAGCGGCAGU	908
R2947_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCGUGUCACACAACUGCCCAA	909
R2948_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGCAGUUGUGUGACACGGAA	910
R2949_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCACAUGAGCGUGGUCAGGGC	911
R2950_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCGCCGGGCCCUGACCACGCU	912
R2951_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGGGCCAGGGAGAUGGCCCC	913
R2952_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAUCUGCGCCUUGGGGGCCAG	914

[0333]

R2953_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAUCUGCGCCUUGGGGGCCA	915
R2954_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCAGACAGGCCCUGGAACCC	916
R2955_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCAGCCCUGCUCGUGGUGAC	917
R2956_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUCUGGAAGGGCACAAAGG	918
R2957_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGUGCCCUUCCAGAGAGAAGG	919
R2958_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGCCCUUCCAGAGAGAAGGG	920
R2959_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGCCCUUCUCUCUGGAAGGG	921
R2960_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGAGAGAAGGGCAGAAGUG	922
R2961_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAACUGGCCGGCUGGCCUGG	923
R2962_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGAACUGGCCGGCUGGCCUG	924
R2963_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAAACCCUGGUGGUUGGUGU	925
R2964_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGUGUCGUGGGCGGCCUGCUG	926
R2965_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUCGUGCGGCCCGGGAGCA	927
R2966_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCCUGCAGAGAAACACACU	928
R2967_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUCUGCAGGGACAAUAGGAG	929
R2968_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUGCAGGGACAAUAGGAGC	930
R2969_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUCCUCAAAGAAGGAGGACC	931
R2970_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCUCAAAGAAGGAGGACCC	932
R2971_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUGUGGACUAUGGGGAGCU	933
R2972_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUCGCCACUGGAAAUCCAG	934
R2973_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCAGUGGCGAGAGAAGACCC	935
R2974_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGUGGCGAGAGAAGACCCC	936
R2975_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCGCUAGGAAAGACAAUGGUG	937
R2976_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUUUCCUAGCGGAAUGGGC	938
R2977_CasP	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGG	939

	hi32	CGAGACCCUAGCGGAAUGGGCACCUC	
	R2978_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUAGCGGAAUGGGCACCUCA	940
	R2979_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGCCCCUCUGACCGGCUUCCU	941
	R2980_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUUGGCCACCAGUGUUCUGC	942
	R2981_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGCCACCAGUGUUCUGCAGAC	943
	R2982_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGCAGACCCUCCACCAUGAG	944
	R2983_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCUGAGGAAAUGCGCUGAC	945
	R2984_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUCAGGAGAAGCAGGCAGG	946
	R2985_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUCAGGAGAAGCAGGCAGGG	947
	R2986_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGGCCGUCCAGGGGCUGAG	948
	R2987_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGACAUGAGUCCUGUGGUGG	949
	R2988_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGUCCUGCCAGCACAGAGC	950
[0334]	R2989_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGGAGCUGGACGCAGGCAG	951
	R2990_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGCCCCGGGCCGCAGGCAGC	952
	R2991_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGCAGGAGGCUCCGGGGCG	953
	R2992_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGGGCUGGUUGGAGAUGGCC	954
	R2993_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAGAUGGCCUUGGAGCAGCC	955
	R2994_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGCUGCUCCAAGGCCAUCUCC	956
	R2995_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAGCAGCCAAGGUGCCCCUG	957
	R2996_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGGAUGCCACUGCCAGGGGC	958
	R2997_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCGGGAUGCCACUGCCAGGGG	959
	R2998_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGCCCUGCGUCCAGGGCGUU	960
	R2999_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUGCUCCCUGCAGGCCUAG	961
	R3000_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCUAGGCCUGCAGGGAGCAG	962
	R3001_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUGAAACUUCUCUAGGCCU	963

[0335]

R3002_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGACCUUCCCUGAAACUUCU	964
R3003_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGGGAAGGUCAGAAGAGCU	965
R3004_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGGAAGGUCAGAAGAGCUC	966
R3005_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGCCCUGCCCACCACAGCC	967
R3006_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUGCCCUGCCCACCACAGC	968
R3007_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACACACAUGCCCAGGCAGCACC	969
R3008_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCACAUGCCCAGGCAGCACCU	970
R3009_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCUGCCCCACAAAGGGCCUG	971
R3010_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGUGGGGCAGGGAAGCUGAGG	972
R3011_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGGGGCAGGGAAGCUGAGGC	973
R3012_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGCCUCAGCUUCCCUGCCC	974
R3013_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAGGCCCAGCCAGCACUCUG	975
R3014_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGGCCCAGCCAGCACUCUGG	976
R3015_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCACCCCAGCCCCUCACACCA	977
R3016_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGACCGUAGGAUGUCCCUCU	978

[0336] 表0:靶向人类CIITA的CasΦ.12gRNA

[0337]

名称	**重复区+间隔区序列 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R4503_CasPhi12_C2TA_T1.1	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUACACAAUGCGUUGCCUGG	979
R4504_CasPhi12_C2TA_T1.2	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGCUCUGACAGGUAGGACC	980
R4505_CasPhi12_C2TA_T1.3	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGUAGGAAUCCCAGCCAGGC	981
R4506_CasPhi12_C2TA_T1.8	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGGCUCCACGCCCUGCUG	982
R4507_CasPhi12_C2TA_T1.9	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAAGCUGAGGGCACGAGG	983
R4508_CasPhi12_C2TA_T2.1	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACACAGCGAUGCUGACCCCCUG	984
R4509_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC	985

_C2TA_T2.2	GAGGAGACUUAACAGCGAUGCUGACCCC	
R4510_CasPhi12_C2TA_T2.3	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUAUGACCAGAUGGACCUGGC	986
R4511_CasPhi12_C2TA_T2.4	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGCCCCUAGAAGGUGGCUA	987
R4512_CasPhi12_C2TA_T2.5	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUAGGGGCCCCAACUCCAUGG	988
R4513_CasPhi12_C2TA_T2.6	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGAAGCUCCAGGUAGCCACC	989
R4514_CasPhi12_C2TA_T2.7	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCAGCCAGGUCCAUCUGGU	990
R4515_CasPhi12_C2TA_T2.8	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUCUCCAGCCAGGUCCAUCU	991
R5200_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGCAGGCUGUUGUGUGACAU	2112
R5201_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAUGUCACACAACAGCCUGC	2113
R5202_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGUGACAUGGAAGGUGAUGA	2114
R5203_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAUCACCUUCCAUGUCACACA	2115
R5204_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCAUAAGCCUCCCUGGUCUC	2116
R5205_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGGACUCCCAGCUGGAGGG	2117
R5206_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCAGGCCCUCCAGCUGGGA	2118
R5207_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGCUGGCAUCUCCAUACUCU	2119
R5208_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGCCCAACUUCUGCUGGCAU	2120
R5209_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGCCCAACUUCUGCUGGCA	2121
R5210_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUGCCCAACUUCUGCUGGC	2122
R5211_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGACUUUUCUGCCCAACUUC	2123
R5212_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGACUUUUCUGCCCAACUU	2124
R5213_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUGACUUUUCUGCCCAACU	2125
R5214_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAGAGGAGCUUCCGGCAGA	2126
R5215_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGUCUGCCGGAAGCUCCUC	2127
R5216_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCGGCAGACCUGAAGCACUGG	2128
R5217_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGUGCUUCAGGUCUGCCGG	2129

[0338]

	R5218_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAACAGCGCAGGCAGUGGCAG	2130
	R5219_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAACCAGGAGCCAGCCUCCGG	2131
	R5220_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCAGGCGCAUCUGGCCGGA	2132
	R5221_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCCAGGCGCAUCUGGCCGG	2133
	R5222_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUCCAGGCGCAUCUGGCCG	2134
	R5223_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCCAGUUCCUCGUUGAGCU	2135
	R5224_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCAGUUCCUCGUUGAGCUG	2136
	R5225_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGCAGCUCAACGAGGAACU	2137
	R5226_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCGUUGAGCUGCCUGAAUC	2138
	R5227_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGCUGCCUGAAUCUCCCUGA	2139
	R5228_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUCCCCACCAUCUCCACUCU	2140
	R5229_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCCCACCAUCUCCACUCUG	2141
[0339]	R5230_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAGAGCCCAUGGGGCAGAG	2142
	R5231_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCAGAGCCCAUGGGGCAGA	2143
	R5232_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGCCUCAGAGAUUUGCCAG	2144
	R5233_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGAGGCCGUGGACAGUGAAU	2145
	R5234_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACACUGUCCACGGCCUCCCAAC	2146
	R5235_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUCCAUCAGCCACUGACCU	2147
	R5236_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGCAUGCUGGGCAGGUCAG	2148
	R5237_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCGGGAGGUCAGGGCAGGU	2149
	R5238_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUCGGGAGGUCAGGGCAGG	2150
	R5239_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAGACCUCUCCAGCUGCCGG	2151
	R5240_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUGGAGACCUCUCCAGCUGC	2152
	R5241_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAAGCUUGUUGGAGACCUCU	2153
	R5242_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC	2154

	GAGGAGACGGAAGCUUGUUGGAGACCUC	
R5243_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGGAAGCUUGUUGGAGACCU	2155
R5244_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUACCGCUCACUGCAGGACAC	2156
R5245_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGCUGCUCCUCUCCAGCCU	2157
R5246_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCGCUCCAGGCUCUUGCUGC	2158
R5247_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGCCCAGUCCGGGGUGGCCA	2159
R5248_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGCCAGCUGCCGUUCUGCCC	2160
R5249_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCAGCCAACAGCACCUCAGC	2161
R5250_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUGCCAAGGAGCACCGGCG	2162
R5251_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAGCACAGCAAUCACUCG	2163
R5252_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCCAGCACAGCAAUCACUC	2164
R5253_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGUGCUGGGCAAAGCUGGU	2165
R5254_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCUGACCAGCUUUGCCCAG	2166
R5255_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGCUGGGGCAGUGAGCCGGG	2167
R5256_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGGCCGGCUUCCCCAGUACG	2168
R5257_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAGUACGACUUUGUCUUC	2169
R5258_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUCUUCUCUGUCCCCUGCCA	2170
R5259_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUUCUCUGUCCCCUGCCAU	2171
R5260_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUGUCCCCUGCCAUUGCUU	2172
R5261_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAAGCAAUGGCAGGGGACAGA	2173
R5262_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUUGAACCGUCCGGGGGAUG	2174
R5263_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAACCGUCCGGGGGAUGCCUA	2175
R5264_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCCUGGGCCCACAGCCACU	2176
R5265_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAAGAUGUGGCUGAAAACCUC	2177
R5266_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCAGCCACAUCUUGAAGAGA	2178

[0340]

[0341]

R5267_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGCCACAUCUUGAAGAGAC	2179
R5268_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGCCACAUCUUGAAGAGACC	2180
R5269_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAAGAGACCUGACCGCGUUCU	2181
R5270_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGCUCAUCCUAGACGGCUUC	2182
R5271_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGCUCCUCGAAGCCGUCUA	2183
R5272_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCGCUUCCAGCUCCUCGAAGC	2184
R5273_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAGGAGCUGGAAGCGCAAGA	2185
R5274_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGCACAGCACGUGCGGACC	2186
R5275_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGGAAAAGGCCGGCCAGCAG	2187
R5276_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUCUGGAAAAGGCCGGCCAG	2188
R5277_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCAGAAGAAGCUGCUCCGA	2189
R5278_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAGAAGAAGCUGCUCCGAG	2190
R5279_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGAAGAAGCUGCUCCGAGG	2191
R5280_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCACCCUCCUCCUCACAGCCC	2192
R5281_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCAGGCUCUGGACCAGGCG	2193
R5282_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAGCUGUCCGGCUUCUCCAU	2194
R5283_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGCUGUCCGGCUUCUCCAUG	2195
R5284_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCAUGGAGCAGGCCCAGGC	2196
R5285_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAGAGCUCAGGGAUGACAGA	2197
R5286_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGAGCUCAGGGAUGACAGAG	2198
R5287_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUGCUCUGUCAUCCCUGAGC	2199
R5288_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUCUCAGUCACAGCCACAGC	2200
R5289_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCAGUCACAGCCACAGCCCU	2201
R5290_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUGCCGGGCAGUGUGCCAGC	2202
R5291_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC	2203

[0342]

	GAGGAGACUGCCGGGCAGUGUGCCAGCU	
R5292_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCGUCCUCCCCAAGCUCCAG	2204
R5293_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGAGGACGCCAAGCUGCCC	2205
R5294_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCAGCUCUGCCAGGGCCCC	2206
R5295_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAUGUCUGCGGCCCAGCUCCC	2207
R5392_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAUGUCUGCGGCCCAGCUCC	2208
R5393_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAUCCGCAGACGUGAGGAC	2209
R5394_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCAUCGCCCAGGUCCUCAC	2210
R5395_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGCCAUCGCCCAGGUCCUCA	2211
R5396_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGACUAAGCCUUUGGCCAUCG	2212
R5397_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUCCAACACCCACCGCGGGC	2213
R5398_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGGAGGAAGCUGGGGAAGG	2214
R5399_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAGCUUCCUCCUGCAAUG	2215
R5400_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCCUGCAAUGCUUCCUGGG	2216
R5401_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGGGGGCCCUGUGGCUGGC	2217
R5402_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCACUCAGAGCCAGCCACA	2218
R5403_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCGCCACUCAGAGCCAGCCAC	2219
R5404_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAUUUCGCCACUCAGAGCCAG	2220
R5405_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCUUGAUUUCGCCACUCAG	2221
R5406_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGUCAAUGCUAGGUACUGC	2222
R5407_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUUGGGGUCAAUGCUAGGUA	2223
R5408_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUCCUUGGGGUCAAUGCUAG	2224
R5409_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACACCCCAAGGAAGAAGAGGCC	2225
R5410_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCAUAGGGCCUCUUCUUCCU	2226
R5411_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGGCUGGGCUGAUCUUCCA	2227

[0343]

R5412_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGGCUGGGCUGAUCUUCCAG	2228
R5413_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGCCUCCCGCCCGCUGCCU	2229
R5414_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGUCCACCGAGGCAGCCGC	2230
R5415_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGCUUCCUGUCCACCGAGGC	2231
R5416_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGUACCUCGCAAGCACCUU	2232
R5417_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCGAGGUACCUGAAGCGGCUG	2233
R5418_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGCCUCCUCGGCCUCGUGG	2234
R5419_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGCAGCACGUGGUACAGGAG	2235
R5420_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCAGCACGUGGUACAGGAGC	2236
R5421_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCUGGGCACCCGCCUCACGC	2237
R5422_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGGGCACCCGCCUCACGCC	2238
R5423_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUGGGCACCCGCCUCACGCCU	2239
R5424_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAGUACAUGUGCAUCAGG	2240
R5425_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCCGCCGCCUCCAAGGCCU	2241
R5426_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAGGCGGCGGGCCAAGACUU	2242
R5427_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCCUGGACCUCCGCAGCAC	2243
R5428_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCCCUCUGGAUUGGGGAGC	2244
R5429_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCCUCUGGAUUGGGGAGCC	2245
R5430_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGAGCCUCGUGGGACUCAG	2246
R5431_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUCUCCCCAUGCUGCUGCAG	2247
R5432_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUCCUCUGCUGCCUGAAGUAG	2248
R5433_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGCAGCAGAGGAGAAGUUC	2249
R5434_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAAAGGCUCGAUGGUGAACUU	2250
R5435_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGAAAGGCUCGAUGGUGAACU	2251
R5436_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC	2252

[0344]

	GAGGAGACACCAUCGAGCCUUUCAAAGC	
R5437_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUUUGAAAGGCUCGAUGGU	2253
R5438_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGGACUUGGCUUUGAAAGG	2254
R5439_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAAAGCCAAGUCCCUGAAGG	2255
R5440_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAAAGCCAAGUCCCUGAAGGA	2256
R5441_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCACAUCCUUCAGGGACUUGG	2257
R5442_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAGGUCUUCCACAUCCUUC	2258
R5443_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAGGUCUUCCACAUCCUU	2259
R5444_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUCGGAAGACACAGCUGGGG	2260
R5445_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGUCCCGAACAGCAGGGAGC	2261
R5446_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGUCCCGAACAGCAGGGAG	2262
R5447_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUUAGGUCCCGAACAGCAGG	2263
R5448_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUUUAGGUCCCGAACAGCAG	2264
R5449_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGACCUAAAGAAACUGGAG	2265
R5450_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGAAAGCCUGGGGGCCUGA	2266
R5451_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGGGAAAGCCUGGGGGCCUG	2267
R5452_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCCAAACUGGUGCGGAUCC	2268
R5453_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCAAACUGGUGCGGAUCCU	2269
R5454_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUCUCACUCAGCGCAUCCAG	2270
R5455_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGCUGGGGGAAGGUGGCUGA	2271
R5456_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCCCAGCUGAAGUCCUUGGA	2272
R5457_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAAGGACUUCAGCUGGGGGA	2273
R5458_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCCAAGGACUUCAGCUGGGGG	2274
R5459_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGGGUUUCCAAGGACUUCAG	2275
R5460_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUAGGCACCCAGGUCAGUGAU	2276

[0345]

R5461_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGUAGGCACCCAGGUCAGUGA	2277
R5462_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUCGCUGCAUCCCUGCUCA	2278
R5463_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCCUGAGCAGGGAUGCAGCG	2279
R5464_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUACAAUAACUGCAUCUGCGA	2280
R5465_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGCUCGUGUGCUUCCGGACAU	2281
R5466_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCGGACAUGGUGUCCCUCCGG	2282
R5467_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACACGGCUGCCGGGGCCCAGCA	2283
R5468_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACGGAGGUGUCCUCAUGUGGAG	2284
R5469_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCUGGACACUGAAUGGGAUGG	2285
R5470_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACAGUGUCCAGGAACACCUGCA	2286
R5471_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACCAGGUGUUCCUGGACACUGA	2287
R5472_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACUUGCAGGUGUUCCUGGACAC	2288
R5473_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUAC GAGGAGACACGGAUCAGCCUGAGAUGAU	2289

[0346] 表P:靶向人类CIITA的CasΦ.32gRNA

[0347]

名称	**重复区+间隔区序列 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R4503_CasPhi32_C2TA_T1.1	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACCUACACAAUGCGUUGCCUGG	992
R4504_CasPhi32_C2TA_T1.2	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACGGGCUCUGACAGGUAGGACC	993
R4505_CasPhi32_C2TA_T1.3	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACUGUAGGAAUCCCAGCCAGGC	994
R4506_CasPhi32_C2TA_T1.8	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACCCUGGCUCCACGCCCUGCUG	995
R4507_CasPhi32_C2TA_T1.9	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACGGGAAGCUGAGGGCACGAGG	996
R4508_CasPhi32_C2TA_T2.1	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACACAGCGAUGCUGACCCCCUG	997
R4509_CasPhi32_C2TA_T2.2	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACUUAACAGCGAUGCUGACCCC	998
R4510_CasPhi32_C2TA_T2.3	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCG GCGAGACUAUGACCAGAUGGACCUGGC	999

[0348]

R4511_CasPhi32_C2TA_T2.4	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGGGCCCCUAGAAGGUGGCUA	1000
R4512_CasPhi32_C2TA_T2.5	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUAGGGGCCCCAACUCCAUGG	1001
R4513_CasPhi32_C2TA_T2.6	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAGAAGCUCCAGGUAGCCACC	1002
R4514_CasPhi32_C2TA_T2.7	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCAGCCAGGUCCAUCUGGU	1003
R4515_CasPhi32_C2TA_T2.8	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUUCUCCAGCCAGGUCCAUCU	1004

[0349] 表Q:靶向小鼠PCSK9的CasΦ.12gRNA

[0350]

名称	重复区+间隔区序列 RNA 序列(5'-->3')	SEQ ID NO
R4238_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGCUGUUGCCGCCGCUGCU	1005
R4239_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGCCGCUGCUGCUGCUGUU	1006
R4240_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCUACUGUGCCCCACCGG	1007
R4241_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUAAUCUCCAUCCUCGUCCU	1008
R4242_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGAAGAGCUGAUGCUCGCCC	1009
R4243_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGCAACGGCGGAAGGUGGC	1010
R4244_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGCAGCCUCCAGGCCUCC	1011
R4245_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGUGCUGAUGGAGGAGACC	1012
R4246_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAAUCUGUAGCCUCUGGGUCU	1013
R4247_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCAAUCUGUAGCCUCUGGG	1014
R4248_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUUCAAUCUGUAGCCUCUGG	1015
R4249_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAACAAACUGCCCACCGCCUG	1016
R4250_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACAUAGCCCCGGCGGGC	1017
R4251_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUACAUAUCUUUUAUGACCUC	1018
R4252_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUAUGACCUCUUCCCCUGGCUU	1019
R4253_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACCUCUUCCCCUGGCUUC	1020
R4254_Ca	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGA	1021

[0351]

sPhi12	GACUGACCUCUUCCCUGGCUUCU	
R4255_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACACCAAGAAGCCAGGGAAGAG	1022
R4256_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGGCUUCUUGGUGAAGAU	1023
R4257_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUUGGUGAAGAUGAGCAGUGA	1024
R4258_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGAAGAUGAGCAGUGACCU	1025
R4259_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCAUGUGGAGUACAUUGA	1026
R4260_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCAAUGUACUCCACAUGGG	1027
R4261_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAGACUCCUUUGUCUUC	1028
R4262_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCUUCGCCCAGAGCAUCCC	1029
R4263_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUUCGCCCAGAGCAUCCCA	1030
R4264_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCAGAGCAUCCCAUGGAA	1031
R4265_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUGGGAUGCUCUGGGCGAA	1032
R4266_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCCAGGUUCCAUGGGAUG	1033
R4267_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCAGCAUGGCACCAGACA	1034
R4268_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCUGUCUGGUGCCAUGCUG	1035
R4269_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGAUACCAGCAUCCAGGGUGC	1036
R4270_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGCAGGGUCACCAUCACC	1037
R4271_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAAGUCGGUGAUGGUGACCCU	1038
R4272_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAACAGCGUGCCGGAGGAGGA	1039
R4273_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACACCAGCAUCCCGGCC	1040
R4274_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCACACGCAGGCUGUGCAG	1041
R4275_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACACAGUUGAGCACACGCAGGC	1042
R4276_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUGACAGUUGAGCACACG	1043
R4277_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUGACUCUUCCGAAUAAAC	1044
R4278_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUUCGGAAGAGUCAGCUAAU	1045

[0352]

R4279_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCGGAAGAGUCAGCUAAUC	1046
R4280_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAAGAGUCAGCUAAUCCAG	1047
R4281_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCUGCCCCUGGCCGGUGGG	1048
R4282_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAUGCGGCUAUACCCACC	1049
R4283_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGCUGCUGCAACCAGCAC	1050
R4284_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCAGCUGGGAACUUCCGG	1051
R4285_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCGGGACGACGCCUGCCUCUA	1052
R4286_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGGCCCCGACUGUGAUGAC	1053
R4287_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUGGGGACUUUGGGGACU	1054
R4288_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCCCCAAAGUCCCCAAGGU	1055
R4289_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGACUUUGGGGACUAAUUU	1056
R4290_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGACUAAUUUUGGACGCU	1057
R4291_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGACUAAUUUUGGACGCUG	1058
R4292_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGACGCUGUGUGGAUCUCU	1059
R4293_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGACGCUGUGUGGAUCUCUU	1060
R4294_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGACGCUGUGUGGAUCUCUUU	1061
R4295_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGGGGGCAAAGAGAUCCAC	1062
R4296_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCCCGGGAAGGACAUCAU	1063
R4297_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCCGGGAAGGACAUCAUC	1064
R4298_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGUCACAGAGUGGGACCUC	1065
R4299_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGCUCGGAUGCUGAGCCGG	1066
R4300_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCUGGCCGAGCUGCGGCAG	1067
R4301_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUAGAGAAGUGGAUCAGCCU	1068
R4302_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGUAGAGAAGUGGAUCAGCC	1069
R4303_Ca	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGA	1070

	sPhi12	GACUCUACCAAAGACGUCAUCAA	
	R4304_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACGUCUUUGGUAGAGAA	1071
	R4305_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGAGGACCAGCAGGUGCU	1072
	R4306_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGUCAGCACCUGCUGGUC	1073
	R4307_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUGGGCCCCGAGUGUGCC	1074
	R4308_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGGGCACAGCGGGCUGUAG	1075
	R4309_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGGAGCGGGAGGCGUCG	1076
	R4310_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGACCUGCUGGCCUCCUAU	1077
	R4311_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGCCUUGCAGACCUGCUG	1078
	R4312_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGGUGAGGGUGUCUAUGC	1079
	R4313_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGUGAGGGUGUCUAUGCC	1080
	R4314_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCACGGGGAACCAGGCAGCA	1081
[0353]	R4315_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCGUGCCAACUGCAGCAUC	1082
	R4316_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGAUGCUGCAGUUGGCACG	1083
	R4317_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGUGGCAGUGGACAUGGGU	1084
	R4318_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCACUUCCCAAUGGAAGCUGC	1085
	R4319_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUUGGGAAGUGGAAGACCU	1086
	R4320_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAAGUGGAAGACCUUAGUG	1087
	R4321_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGUCCGGAGGCAGCCUGCG	1088
	R4322_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACCAGGCGGCCAGUGUC	1089
	R4323_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCUGCCAUGCCCCAGGGC	1090
	R4324_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCCUGGGGCAUGGCAGC	1091
	R4325_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUUCCAGCCCUGGGGCAUG	1092
	R4326_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAUUCCAGCCCUGGGGCAU	1093
	R4327_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCAUUCCAGCCCUGGGGCA	1094

[0354]

R4328_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAUUUUGCAUUCCAGCCCUGG	1095
R4329_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUCCAGUCAGGGUCCAUCC	1096
R4330_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACGCUGUAGGCUCCCAG	1097
R4331_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCCACACACAGGUUGUCCACG	1098
R4332_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACUGGUCCUGUCUGCUC	1099
R4333_CasPhi12	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGAAGGCCGGCUCCGGCAG	1100

[0355] 表R:靶向小鼠PCSK9的CasΦ.32gRNA

[0356]

名称	重复区+间隔区序列 RNA 序列(5'-->3')	SEQ ID NO
R4238_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCGCUGUUGCCGCCGCUGCU	1101
R4239_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCGCCGCUGCUGCUGCUGUU	1102
R4240_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGCUACUGUGCCCCACCGG	1103
R4241_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAUAAUCUCCAUCCUCGUCCU	1104
R4242_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGAAGAGCUGAUGCUCGCCC	1105
R4243_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGAGCAACGGCGGAAGGUGGC	1106
R4244_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGGCAGCCUCCAGGCCUCC	1107
R4245_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGGUGCUGAUGGAGGAGACC	1108
R4246_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAAUCUGUAGCCUCUGGGUCU	1109
R4247_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUUCAAUCUGUAGCCUCUGGG	1110
R4248_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACGUUCAAUCUGUAGCCUCUGG	1111
R4249_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAACAAACUGCCCACCGCCUG	1112
R4250_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAUGACAUAGCCCCGGCGGGC	1113
R4251_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUACAUAUCUUUUAUGACCUC	1114
R4252_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUAUGACCUCUUCCCUGGCUU	1115
R4253_Cas	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC	1116

[0357]

Phi32	GAGACAUGACCUCUUCCCUGGCUUC	
R4254_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGACCUCUUCCCUGGCUUCU	1117
R4255_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACACCAAGAAGCCAGGGAAGAG	1118
R4256_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCUGGCUUCUUGGUGAAGAU	1119
R4257_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUUGGUGAAGAUGAGCAGUGA	1120
R4258_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUGAAGAUGAGCAGUGACCU	1121
R4259_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCCCAUGUGGAGUACAUUGA	1122
R4260_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCUCAAUGUACUCCACAUGGG	1123
R4261_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAGGAAGACUCCUUUGUCUUC	1124
R4262_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUCUUCGCCCAGAGCAUCCC	1125
R4263_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUCUUCGCCCAGAGCAUCCCA	1126
R4264_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCCCAGAGCAUCCCAUGGAA	1127
R4265_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAUGGGAUGCUCUGGGCGAA	1128
R4266_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCUCCAGGUUCCAUGGGAUG	1129
R4267_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUCCCAGCAUGGCACCAGACA	1130
R4268_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCUCUGUCUGGUGCCAUGCUG	1131
R4269_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGAUACCAGCAUCCAGGGUGC	1132
R4270_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAGGGCAGGGUCACCAUCACC	1133
R4271_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAAGUCGGUGAUGGUGACCCU	1134
R4272_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAACAGCGUGCCGGAGGAGGA	1135
R4273_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCCACACCAGCAUCCCGGCC	1136
R4274_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAGCACACGCAGGCUGUGCAG	1137
R4275_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACACAGUUGAGCACACGCAGGC	1138
R4276_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCUUGACAGUUGAGCACACG	1139
R4277_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCUGACUCUUCCGAAUAAAC	1140

[0358]

R4278_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAUUCGGAAGAGUCAGCUAAU	1141
R4279_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUUCGGAAGAGUCAGCUAAUC	1142
R4280_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGAAGAGUCAGCUAAUCCAG	1143
R4281_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGCUGCCCCUGGCCGGUGGG	1144
R4282_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAGGAUGCGGCUAUACCCACC	1145
R4283_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCAGCUGCUGCAACCAGCAC	1146
R4284_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAGCAGCUGGGAACUUCCGG	1147
R4285_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCGGGACGACGCCUGCCUCUA	1148
R4286_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUGGCCCCGACUGUGAUGAC	1149
R4287_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCUUGGGGACUUUGGGGACU	1150
R4288_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUCCCCAAAGUCCCCAAGGU	1151
R4289_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGACUUUGGGGACUAAUUU	1152
R4290_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGGACUAAUUUUGGACGCU	1153
R4291_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGACUAAUUUUGGACGCUG	1154
R4292_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGGACGCUGUGUGGAUCUCU	1155
R4293_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGACGCUGUGUGGAUCUCUU	1156
R4294_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGACGCUGUGUGGAUCUCUUU	1157
R4295_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCGGGGGCAAAGAGAUCCAC	1158
R4296_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCCCCCGGGAAGGACAUCAU	1159
R4297_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCCCCGGGAAGGACAUCAUC	1160
R4298_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAUGUCACAGAGUGGGACCUC	1161
R4299_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGGCUCGGAUGCUGAGCCGG	1162
R4300_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCCUGGCCGAGCUGCGGCAG	1163
R4301_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUAGAGAAGUGGAUCAGCCU	1164
R4302_Cas	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC	1165

[0359]

Phi32	GAGACGGUAGAGAAGUGGAUCAGCC	
R4303_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUCUACCAAAGACGUCAUCAA	1166
R4304_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAUGACGUCUUUGGUAGAGAA	1167
R4305_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCUGAGGACCAGCAGGUGCU	1168
R4306_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGGUCAGCACCUGCUGGUC	1169
R4307_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGAGUGGGCCCCGAGUGUGCC	1170
R4308_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGGGGCACAGCGGGCUGUAG	1171
R4309_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUCCAGGAGCGGGAGGCGUCG	1172
R4310_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAGACCUGCUGGCCUCCUAU	1173
R4311_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACAGGGCCUUGCAGACCUGCUG	1174
R4312_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGGGUGAGGGUGUCUAUGC	1175
R4313_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGGGUGAGGGUGUCUAUGCC	1176
R4314_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCACGGGGAACCAGGCAGCA	1177
R4315_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCCCGUGCCAACUGCAGCAUC	1178
R4316_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGGAUGCUGCAGUUGGCACG	1179
R4317_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACUGGUGGCAGUGGACAUGGGU	1180
R4318_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCACUUCCCAAUGGAAGCUGC	1181
R4319_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAUUGGGAAGUGGAAGACCU	1182
R4320_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGGAAGUGGAAGACCUUAGUG	1183
R4321_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGUGUCCGGAGGCAGCCUGCG	1184
R4322_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCCACCAGGCGGCCAGUGUC	1185
R4323_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCUGCUGCCAUGCCCCAGGGC	1186
R4324_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAGCCCUGGGGCAUGGCAGC	1187
R4325_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACCAUUCCAGCCCUGGGGCAUG	1188
R4326_Cas Phi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGC GAGACGCAUUCCAGCCCUGGGGCAU	1189

[0360]

R4327_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUGCAUUCCAGCCCUGGGGCA	1190
R4328_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACAUUUUGCAUUCCAGCCCUGG	1191
R4329_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCAUCCAGUCAGGGUCCAUCC	1192
R4330_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCACGCUGUAGGCUCCCAG	1193
R4331_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCCACACACAGGUUGUCCACG	1194
R4332_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACUCCACUGGUCCUGUCUGCUC	1195
R4333_CasPhi32	GCUGGGGACCGAUCCUGAUUGCUCGCUGCGGCGAGACCUGAAGGCCGGCUCCGGCAG	1196

[0361] 表S:CHO细胞中靶向Bak1的CasΦ.12gRNA

[0362]

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为DNA	SEQ ID NO
R2452 Bak1_CasPhi12_1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAGCTATGTTTTCCATCTC	1197
R2453 Bak1_CasPhi12_2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	1198
R2454 Bak1_CasPhi12_3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCCTAGAACCCAACAGGTA	1199
R2455 Bak1_CasPhi12_4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGACCTCCTCTGTGTCC	1200
R2456 Bak1_CasPhi12_5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCGGGGTTGGCAGG	1201
R2457 Bak1_CasPhi12_6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCTGATGGTGGAGATGGA	1202
R2849_Bak1_CasPhi12_nsd_sg1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGACTCCCAGCTCTGACCC	1203
R2850_Bak1_CasPhi12_nsd_sg2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGGGTCAGAGCTGGGAGTC	1204
R2851_Bak1_CasPhi12_nsd_sg3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGACCTCCTCTGTGTCC	1205
R2852_Bak1_CasPhi12_nsd_sg4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCGAAGCTATGTTTTCCATCT	1206
R2853_Bak1_CasPhi12_nsd_sg5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAGCTATGTTTTCCATCTC	1207
R2854_Bak1_CasPhi12_nsd_sg6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCCACCATCAGGAA	1208
R2855_Bak1_CasPhi12_nsd_sg7	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCATCTCCACCATCAGGAAC	1209
R2856_Bak1_CasPhi12_nsd_sg8	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGTGGAGATGGAAAA	1210
R2857_Bak1_	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG	1211

[0363]

CasPhi12_nsd_sg9	AGGAGACCATCTCCACCATCAGGAACA	
R2858_Bak1_CasPhi12_nsd_sg10	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTCCTGATGGTGGAGATGGA	1212
R2859_Bak1_CasPhi12_nsd_sg11	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	1213
R2860_Bak1_CasPhi12_nsd_sg12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCCATCTCGGGGTTGGCAGG	1214
R2861_Bak1_CasPhi12_nsd_sg13	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTAGGAGCAAATTGTCCATCT	1215
R2862_Bak1_CasPhi12_nsd_sg14	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGGTTCTAGGAGCAAATTGTC	1216
R2863_Bak1_CasPhi12_nsd_sg15	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGCTCCTAGAACCCAACAGGT	1217
R2864_Bak1_CasPhi12_nsd_sg16	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTCCTAGAACCCAACAGGTA	1218
R3977 Bak1_CasPhi12_外显子1_sg1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCCAGACGCCATCTTTCAGG	1219
R3978 Bak1_CasPhi12_外显子1_sg2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTGGTAAGAGTCCTCCTGCCC	1220
R3979 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTACAGCATCTTGGGTCAGG	1221
R3980 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGGTCAGGTGGGCCGGCAGCT	1222
R3981 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTATCATTGGAGATGACATT	1223
R3982 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGAGATGACATTAACCGGAGA	1224
R3983 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTGGAACTCTGTGTCGTATCT	1225
R3984 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCAGAATTTACTGGAGCAGCT	1226
R3985 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg7	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACACTGGAGCAGCTGCAGCCCA	1227
R3986 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg8	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCCAGCTGTGGGCTGCAGCTG	1228
R3987 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg9	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGTAGGCATTCCCAGCTGTGG	1229

[0364]

R3988 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg10	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGTGAAGAGTTCGTAGGCATT	1230
R3989 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg11	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACACCAAGATTGCCTCCAGGTA	1231
R3990 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTCCAGGTACCCACCACCA	1232

[0365] 表T:CHO细胞中靶向Bak1的CasΦ.32gRNA

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2452 Bak1_CasPhi32_1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAAGCTATGTTTTCCATCTC	1233
R2453 Bak1_CasPhi32_2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	1234
R2454 Bak1_CasPhi32_3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTCCTAGAACCCAACAGGTA	1235
R2455 Bak1_CasPhi32_4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAAAGACCTCCTCTGTGTCC	1236
R2456 Bak1_CasPhi32_5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCCATCTCGGGGTTGGCAGG	1237
R2457 Bak1_CasPhi32_6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTCCTGATGGTGGAGATGGA	1238
R2849_Bak1_CasPhi32_nsd_sg1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTGACTCCCAGCTCTGACCC	1239
R2850_Bak1_CasPhi32_nsd_sg2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTGGGGTCAGAGCTGGGAGTC	1240
R2851_Bak1_CasPhi32_nsd_sg3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAAAGACCTCCTCTGTGTCC	1241
R2852_Bak1 CasPhi32__nsd_sg4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCGAAGCTATGTTTTCCATCT	1242
R2853_Bak1_CasPhi32_nsd_sg5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAAGCTATGTTTTCCATCTC	1243
R2854_Bak1_CasPhi32_nsd_sg6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCCATCTCCACCATCAGGAA	1244
R2855_Bak1_CasPhi32_nsd_sg7	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCCATCTCCACCATCAGGAAC	1245
R2856_Bak1_CasPhi32_nsd_sg8	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTGATGGTGGAGATGGAAAA	1246
R2857_Bak1_CasPhi32_nsd_sg9	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCATCTCCACCATCAGGAACA	1247
R2858_Bak1_CasPhi32_nsd_sg10	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTCCTGATGGTGGAGATGGA	1248

[0366]

[0367]

R2859_Bak1_CasPhi32_nsd_sg11	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCCCTG	1249
R2860_Bak1_CasPhi32_nsd_sg12	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCCATCTCGGGGTTGGCAGG	1250
R2861_Bak1_CasPhi32_nsd_sg13	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTAGGAGCAAATTGTCCATCT	1251
R2862_Bak1_CasPhi32_nsd_sg14	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGGTTCTAGGAGCAAATTGTC	1252
R2863_Bak1_CasPhi32_nsd_sg15	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGCTCCTAGAACCCAACAGGT	1253
R2864_Bak1_CasPhi32_nsd_sg16	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTCCTAGAACCCAACAGGTA	1254
R3977 Bak1_CasPhi32_外显子1_sg1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCCAGACGCCATCTTTCAGG	1255
R3978 Bak1_CasPhi32_外显子1_sg2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTGGTAAGAGTCCTCCTGCCC	1256
R3979 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTACAGCATCTTGGGTCAGG	1257
R3980 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGGTCAGGTGGGCCGGCAGCT	1258
R3981 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTATCATTGGAGATGACATT	1259
R3982 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAGATGACATTAACCGGAGA	1260
R3983 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTGGAACTCTGTGTCGTATCT	1261
R3984 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCAGAATTTACTGGAGCAGCT	1262
R3985 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg7	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACACTGGAGCAGCTGCAGCCCA	1263
R3986 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg8	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCCAGCTGTGGGCTGCAGCTG	1264
R3987 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg9	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTAGGCATTCCCAGCTGTGG	1265
R3988 Bak1_CasPhi32_外显子	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTGAAGAGTTCGTAGGCATT	1266

[0368]

3_sg10		
R3989 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg11	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACACCAAGATTGCCTCCAGGTA	1267
R3990 Bak1_CasPhi32_外显子3_sg12	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCCTCCAGGTACCCACCACCA	1268

[0369] 表U:CHO细胞中靶向Bax的CasΦ.12gRNA

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为DNA	SEQ ID NO
R2458 Bax_CasPhi12_1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAATGTGGATACTAACTCC	1269
R2459 Bax_CasPhi12_2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGACAT	1270
R2460 Bax_CasPhi12_3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGCAACTTCAACTGG	1271
R2461 Bax_CasPhi12_4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTACTTTGCTAGCAAACTGGT	1272
R2462 Bax_CasPhi12_5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCACCAGTTTGCTAGCAAA	1273
R2463 Bax_CasPhi12_6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAACTGGGGCCGGGTTGTTGC	1274
R2865_Bax_CasPhi12_nsd_sg1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCTCTTTCCTGTAGGATGA	1275
R2866_Bax_CasPhi12_nsd_sg2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTTTCCTGTAGGATGATTG	1276
R2867_Bax_CasPhi12_nsd_sg3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTGTAGGATGATTGCTAAT	1277
R2868_Bax_CasPhi12_nsd_sg4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGTAGGATGATTGCTAATG	1278
R2869_Bax_CasPhi12_nsd_sg5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAATGTGGATACTAACTCC	1279
R2870_Bax_CasPhi12_nsd_sg6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGACAT	1280
R2871_Bax_CasPhi12_nsd_sg7	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCGTGTGGCAGCTGACATGTT	1281
R2872_Bax_CasPhi12_nsd_sg8	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCATCAGCAAACATGTCAGC	1282
R2873_Bax_CasPhi12_nsd_sg9	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGTTGCCATCAGCAAACAT	1283
R2874_Bax_CasPhi12_nsd_sg10	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGCTGATGGCAACTTCAACTG	1284
R2875_Bax_CasPhi12_nsd_sg11	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGCAACTTCAACTGG	1285
R2876_Bax_CasPhi12_nsd_sg12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAACTGGGGCCGGGTTGTTGC	1286

[0370]

[0371]

R2877_Bax_ CasPhi12_nsd_sg13	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTGCCCTTTTCTACTTTGCT	1287
R2878_Bax_ CasPhi12_nsd_sg14	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCCCTTTTCTACTTTGCTAGC	1288
R2879_Bax_ CasPhi12_nsd_sg15	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTAGCAAAGTAGAAAAGGGC	1289
R2880_Bax_ CasPhi12_nsd_sg16	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGCTAGCAAAGTAGAAAAGGG	1290
R2881_Bax_ CasPhi12_nsd_sg17	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCTACTTTGCTAGCAAACTG	1291
R2882_Bax_ CasPhi12_nsd_sg18	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTACTTTGCTAGCAAACTGG	1292
R2883_Bax_ CasPhi12_nsd_sg19	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTACTTTGCTAGCAAACTGGT	1293
R2884_Bax_ CasPhi12_nsd_sg20	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGCTAGCAAACTGGTGCTCAA	1294
R2885_Bax_ CasPhi12_nsd_sg21	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTAGCAAACTGGTGCTCAAG	1295
R2886_Bax_ CasPhi12_nsd_sg22	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAGCACCAGTTTGCTAGCAAA	1296

[0372] 表V:CHO细胞中靶向Bax的CasΦ.32gRNA

[0373]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2458 Bax_CasPhi32_1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTAATGTGGATACTAACTCC	1297
R2459 Bax_CasPhi32_2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGACAT	1298
R2460 Bax_CasPhi32_3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTGATGGCAACTTCAACTGG	1299
R2461 Bax_CasPhi32_4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTACTTTGCTAGCAAACTGGT	1300
R2462 Bax_CasPhi32_5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAGCACCAGTTTGCTAGCAAA	1301
R2463 Bax_CasPhi32_6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAACTGGGGCCGGGTTGTTGC	1302
R2865_Bax_CasPhi 32_nsd_sg1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTTCTCTTTCCTGTAGGATGA	1303
R2866_Bax_ CasPhi32_nsd_sg2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTCTTTCCTGTAGGATGATTG	1304
R2867_Bax_ CasPhi32_nsd_sg3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCCTGTAGGATGATTGCTAAT	1305
R2868_Bax_ CasPhi32_nsd_sg4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTGTAGGATGATTGCTAATG	1306
R2869_Bax_ CasPhi32_nsd_sg5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTAATGTGGATACTAACTCC	1307
R2870_Bax_	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC	1308

[0374]

CasPhi32_nsd_sg6	GGCGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGACAT	
R2871_Bax_ CasPhi32_nsd_sg7	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCGTGTGGCAGCTGACATGTT	1309
R2872_Bax_ CasPhi32_nsd_sg8	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCCATCAGCAAACATGTCAGC	1310
R2873_Bax_ CasPhi32_nsd_sg9	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAAGTTGCCATCAGCAAACAT	1311
R2874_Bax_ CasPhi32_nsd_sg10	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACGCTGATGGCAACTTCAACTG	1312
R2875_Bax_ CasPhi32_nsd_sg11	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTGATGGCAACTTCAACTGG	1313
R2876_Bax_ CasPhi32_nsd_sg12	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAACTGGGGCCGGGTTGTTGC	1314
R2877_Bax_ CasPhi32_nsd_sg13	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTTGCCCTTTTCTACTTTGCT	1315
R2878_Bax_ CasPhi32_nsd_sg14	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCCCTTTTCTACTTTGCTAGC	1316
R2879_Bax_ CasPhi32_nsd_sg15	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTAGCAAAGTAGAAAAGGGC	1317
R2880_Bax_ CasPhi32_nsd_sg16	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACGCTAGCAAAGTAGAAAAGGG	1318
R2881_Bax_ CasPhi32_nsd_sg17	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTCTACTTTGCTAGCAAACTG	1319
R2882_Bax_ CasPhi32_nsd_sg18	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTACTTTGCTAGCAAACTGG	1320
R2883_Bax_ CasPhi32_nsd_sg19	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTACTTTGCTAGCAAACTGGT	1321
R2884_Bax_ CasPhi32_nsd_sg20	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACGCTAGCAAACTGGTGCTCAA	1322
R2885_Bax_ CasPhi32_nsd_sg21	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTAGCAAACTGGTGCTCAAG	1323
R2886_Bax_ CasPhi32_nsd_sg22	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAGCACCAGTTTGCTAGCAAA	1324

[0375] 表W:CHO细胞中靶向Fut8的CasΦ.12gRNA

[0376]

名称	**重复区+间隔区 DNA 序列(5'-->3'),示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2464 Fut8_CasPhi12_1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCCACTTTGTCAGTGCGTCTG	1325
R2465 Fut8_CasPhi12_2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTCAATGGGATGGAAGGCTG	1326
R2466 Fut8_CasPhi12_3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAGGAATACATGGTACACGTT	1327
R2467 Fut8_CasPhi12_4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAAGAACATTTTCAGCTTCTC	1328
R2468 Fut8_CasPhi12_5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACATCCACTTTCATTCTGCGTT	1329

[0377]

R2469 Fut8_CasPhi12_6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	1330
R2887_Fut8_CasPhi12_nsd_sg1	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCCCCAGAGTCCATGTCAGA	1331
R2888_Fut8_CasPhi12_nsd_sg2	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCAGTGCGTCTGACATGGAC	1332
R2889_Fut8_CasPhi12_nsd_sg3	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGTCAGTGCGTCTGACATGGA	1333
R2890_Fut8_CasPhi12_nsd_sg4	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCCACTTTGTCAGTGCGTCTG	1334
R2891_Fut8_CasPhi12_nsd_sg5	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTGTTCCCACTTTGTCAGTGC	1335
R2892_Fut8_CasPhi12_nsd_sg6	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCTCAATGGGATGGAAGGCTG	1336
R2893_Fut8_CasPhi12_nsd_sg7	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCATCCCATTGAGGAATACAT	1337
R2894_Fut8_CasPhi12_nsd_sg8	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAGGAATACATGGTACACGTT	1338
R2895_Fut8_CasPhi12_nsd_sg9	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAACGTGTACCATGTATTCCT	1339
R2896_Fut8_CasPhi12_nsd_sg10	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTCAACGTGTACCATGTATT	1340
R2897_Fut8_CasPhi12_nsd_sg11	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAAGAACATTTTCAGCTTCTC	1341
R2898_Fut8_CasPhi12_nsd_sg12	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGAGAAGCTGAAAATGTTCTT	1342
R2899_Fut8_CasPhi12_nsd_sg13	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCAGCTTCTCGAACGCAGAA	1343
R2900_Fut8_CasPhi12_nsd_sg14	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCAGCTTCTCGAACGCAGAAT	1344
R2901_Fut8_CasPhi12_nsd_sg15	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTGCGTTCGAGAAGCTGAAAA	1345
R2902_Fut8_CasPhi12_nsd_sg16	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAGCTTCTCGAACGCAGAATG	1346
R2903_Fut8_CasPhi12_nsd_sg17	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACATTCTGCGTTCGAGAAGCTG	1347
R2904_Fut8_CasPhi12_nsd_sg18	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCATTCTGCGTTCGAGAAGCT	1348
R2905_Fut8_CasPhi12_nsd_sg19	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCGAACGCAGAATGAAAGTG	1349
R2906_Fut8_CasPhi12_nsd_sg20	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACATCCACTTTCATTCTGCGTT	1350
R2907_Fut8_CasPhi12_nsd_sg21	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTATCCACTTTCATTCTGCGT	1351
R2908_Fut8_CasPhi12_nsd_sg22	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTATCCACTTTCATTCTGCG	1352
R2909_Fut8_CasPhi12_nsd_sg23	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTTATCCACTTTCATTCTGC	1353
R2910_Fut8_	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG	1354

[0378]

CasPhi12_nsd_sg24	AGGAGACTTTTATCCACTTTCATTCTG	
R2911_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg25	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACAACAAAGAAGGGTCATCAGT	1355
R2912_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg26	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACCCTCCTTTAACAAAGAAGGG	1356
R2913_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg27	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGCCTCCTTTAACAAAGAAGG	1357
R2914_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg28	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	1358
R2915_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg29	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGTTAAAGGAGGCAAAGACAA	1359
R2916_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg30	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTAAAGGAGGCAAAGACAAA	1360
R2917_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg31	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTCTTTGCCTCCTTTAACAAA	1361
R2918_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg32	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGTCTTTGCCTCCTTTAACAA	1362
R2919_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg33	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACGTCTAACTTACTTTGTCTTT	1363
R2920_Fut8_ CasPhi12_nsd_sg34	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACG AGGAGACTTGGTCTAACTTACTTTGTC	1364

[0379] 表X:CHO细胞中靶向Fut8的CasΦ.32gRNA

[0380]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R2464 Fut8_CasPhi32_1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCCACTTTGTCAGTGCGTCTG	1365
R2465 Fut8_CasPhi32_2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCTCAATGGGATGGAAGGCTG	1366
R2466 Fut8_CasPhi32_3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAGGAATACATGGTACACGTT	1367
R2467 Fut8_CasPhi32_4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACAAGAACATTTTCAGCTTCTC	1368
R2468 Fut8_CasPhi32_5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACATCCACTTTCATTCTGCGTT	1369
R2469 Fut8_CasPhi32_6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	1370
R2887_Fut8_CasPhi32_nsd_sg1	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTCCCCAGAGTCCATGTCAGA	1371
R2888_Fut8_ CasPhi32_nsd_sg2	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTCAGTGCGTCTGACATGGAC	1372
R2889_Fut8_ CasPhi32_nsd_sg3	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACGTCAGTGCGTCTGACATGGA	1373
R2890_Fut8_ CasPhi32_nsd_sg4	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACCCACTTTGTCAGTGCGTCTG	1374
R2891_Fut8_ CasPhi32_nsd_sg5	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC GGCGAGACTGTTCCCACTTTGTCAGTGC	1375

[0381]

R2892_Fut8_CasPhi32_nsd_sg6	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCTCAATGGGATGGAAGGCTG	1376
R2893_Fut8_CasPhi32_nsd_sg7	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCATCCCATTGAGGAATACAT	1377
R2894_Fut8_CasPhi32_nsd_sg8	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAGGAATACATGGTACACGTT	1378
R2895_Fut8_CasPhi32_nsd_sg9	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAACGTGTACCATGTATTCCT	1379
R2896_Fut8_CasPhi32_nsd_sg10	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTCAACGTGTACCATGTATT	1380
R2897_Fut8_CasPhi32_nsd_sg11	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAAGAACATTTTCAGCTTCTC	1381
R2898_Fut8_CasPhi32_nsd_sg12	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGAGAAGCTGAAAATGTTCTT	1382
R2899_Fut8_CasPhi32_nsd_sg13	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCAGCTTCTCGAACGCAGAA	1383
R2900_Fut8_CasPhi32_nsd_sg14	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCAGCTTCTCGAACGCAGAAT	1384
R2901_Fut8_CasPhi32_nsd_sg15	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTGCGTTCGAGAAGCTGAAAA	1385
R2902_Fut8_CasPhi32_nsd_sg16	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAGCTTCTCGAACGCAGAATG	1386
R2903_Fut8_CasPhi32_nsd_sg17	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACATTCTGCGTTCGAGAAGCTG	1387
R2904_Fut8_CasPhi32_nsd_sg18	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCATTCTGCGTTCGAGAAGCT	1388
R2905_Fut8_CasPhi32_nsd_sg19	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCGAACGCAGAATGAAAGTG	1389
R2906_Fut8_CasPhi32_CasPhi32_nsd_sg20	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACATCCACTTTCATTCTGCGTT	1390
R2907_Fut8_CasPhi32_nsd_sg21	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTATCCACTTTCATTCTGCGT	1391
R2908_Fut8_CasPhi32_nsd_sg22	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTATCCACTTTCATTCTGCG	1392
R2909_Fut8_CasPhi32_nsd_sg23	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTTATCCACTTTCATTCTGC	1393
R2910_Fut8_CasPhi32_nsd_sg24	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTTTATCCACTTTCATTCTG	1394
R2911_Fut8_CasPhi32_nsd_sg25	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACAACAAAGAAGGGTCATCAGT	1395
R2912_Fut8_CasPhi32_nsd_sg26	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACCCTCCTTTAACAAAGAAGGG	1396
R2913_Fut8_CasPhi32_nsd_sg27	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGCCTCCTTTAACAAAGAAGG	1397
R2914_Fut8_	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGC	1398

CasPhi32_nsd_sg28	GGCGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGA	
R2915_Fut8_CasPhi32_nsd_sg29	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTTAAAGGAGGCAAAGACAA	1399
R2916_Fut8_CasPhi32_nsd_sg30	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTAAAGGAGGCAAAGACAAA	1400
R2917_Fut8_CasPhi32_nsd_sg31	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTCTTTGCCTCCTTTAACAAA	1401
R2918_Fut8_CasPhi32_nsd_sg32	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTCTTTGCCTCCTTTAACAA	1402
R2919_Fut8_CasPhi32_nsd_sg33	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACGTCTAACTTACTTTGTCTTT	1403
R2920_Fut8_CasPhi32_nsd_sg34	GCTGGGGACCGATCCTGATTGCTCGCTGCGGCGAGACTTGGTCTAACTTACTTTGTC	1404

[0382]

[0383] 表Y:靶向人类T细胞中的TRAC的CasΦ.12gRNA

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R3040_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGATATCTGTGGGACA	1533
R3041_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCCACAGATATCCAGA	1534
R3042_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGTCTCTCAGCTGGTA	1535
R3043_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGAGTCTCTCAGCTGGT	1536
R3044_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCACTGGATTTAGAGTC	1537
R3045_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGAATCAAAATCGGTGA	1538
R3046_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGAATCAAAATCGGTG	1539
R3047_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACCGATTTTGATTCTCA	1540
R3048_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTGAGAATCAAAATCG	1541
R3049_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTTTGAGAATCAAAATC	1542
R3050_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGATTCTCAAACAAATG	1543
R3051_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGATTCTCAAACAAATGT	1544
R3052_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACATTCTCAAACAAATGTG	1545
R3053_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGACACATTTGTTTGAG	1546

[0384]

	R3054_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAAACAAATGTGTCAC	1547
	R3055_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTGACACATTTGTTTGA	1548
	R3056_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTTTGTGACACATTTGT	1549
	R3057_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGATGTGTATATCACAG	1550
	R3058_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTGTGATATACACATC	1551
	R3059_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTCTGTGATATACACAT	1552
	R3060_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGTCTGTGATATACACA	1553
	R3061_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGTCCATAGACCTCAT	1554
	R3062_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCTTGAAGTCCATAGA	1555
	R3063_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGAGCAACAGTGCTGT	1556
	R3064_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCCAGGCCACAGCACT	1557
	R3065_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTGCTCCAGGCCACAGC	1558
[0385]	R3066_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTTGCTCCAGGCCACAG	1559
	R3067_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCACATGCAAAGTCAGAT	1560
	R3068_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCACATGCAAAGTCAGA	1561
	R3069_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCATGTGCAAACGCCTT	1562
	R3070_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGGCGTTTGCACATGC	1563
	R3071_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCATGTGCAAACGCCTTC	1564
	R3072_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTGAAGGCGTTTGCACA	1565
	R3073_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAACAACAGCATTATTCC	1566
	R3074_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGAATAATGCTGTTGT	1567
	R3075_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCAGAAGACACCTTC	1568
	R3076_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGAAGACACCTTCTTC	1569
	R3077_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTGGGCTGGGGAAGAA	1570
	R3078_CasPhi	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCCCAGCCCA	1571

12_S	GGTAA	
R3079_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCCAGCCCAGGTAAGGG	1572
R3080_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTAAAAGGAAAAACAGAC	1573
R3081_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAAAAGGAAAAACAGA	1574
R3082_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCTTTTAGAAAGTTC	1575
R3083_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCTTTTAGAAAGTTCC	1576
R3084_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTTTTAGAAAGTTCCT	1577
R3085_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTTTTAGAAAGTTCCTG	1578
R3086_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTAGAAAGTTCCTGTGAT	1579
R3136_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGAAAGTTCCTGTGATG	1580
R3137_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGTTCCTGTGATGT	1581
R3138_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACATCACAGGAACTTTC	1582
R3139_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGTGATGTCAAGCTGG	1583
R3140_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCGACCAGCTTGACATC	1584
R3141_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCGACCAGCTTGACAT	1585
R3142_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTCGACCAGCTTGACA	1586
R3143_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAAGCTTTTCTCGACCA	1587
R3144_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAAAGCTTTTCTCGACC	1588
R3145_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTGTTTCAAAGCTTTT	1589
R3146_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAACAGGTAAGACAGG	1590
R3147_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAACAGGTAAGACAGGG	1591

[0386]

[0387] 表Z:靶向人类T细胞中的B2M的CasΦ.12gRNA

[0388]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为 DNA**	**SEQ ID NO**
R3115_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCATCCATCCGACATTGA	1592

[0389]

R3116_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACATCCATCCGACATTGAA	1593
R3117_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGTAAGTCAACTTCAAT	1594
R3118_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCAGTAAGTCAACTTC	1595
R3119_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGTTGACTTACTGAAG	1596
R3120_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACTTACTGAAGAATGGA	1597
R3121_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTCTCCATTCTTCAGT	1598
R3122_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGAAGAATGGAGAGAG	1599
R3123_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAATTCTCTCTCCATTCT	1600
R3124_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAATTCTCTCTCCATTC	1601
R3125_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAATTCTCTCTCCATT	1602
R3126_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCAATTCTCTCTCCAT	1603
R3127_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAAAAGTGGAGCATTCA	1604
R3128_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGAAAGACAAGTCTGA	1605
R3129_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGACTTGTCTTTCAGCA	1606
R3130_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTTTCAGCAAGGACTG	1607
R3131_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGCAAGGACTGGTCTT	1608
R3132_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCAAGGACTGGTCTTT	1609
R3133_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTATCTCTTGTACTACA	1610
R3134_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTATCTCTTGTACTACAC	1611
R3135_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGTGTAGTACAAGAGAT	1612
R3148_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTACTACACTGAATTCAC	1613
R3149_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGTGGGGGTGAATTCAG	1614
R3150_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGTGGGGGTGAATTCA	1615
R3151_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAGTGGGGGTGAATTC	1616
R3152_CasP	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCAGTGGGGG	1617

hi12_S	TGAATT	
R3153_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACCCCCACTGAAAAAGA	1618
R3154_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACACGGCAGGCATACTC	1619
R3155_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGGCTGTGACAAAGTCAC	1620
R3156_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTCACAGCCCAAGATAG	1621
R3157_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCACAGCCCAAGATAGT	1622
R3158_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACTATCTTGGGCTGTGA	1623
R3159_CasPhi12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCCCACTTAACTATCTT	1624

[0390]

[0391] 表AA:靶向人类T细胞中的PD1的CasΦ.12gRNA

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R2921_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUCCGCUCACCUCCG	1625
R2922_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUCCGCUCACCUCCG	1626
R2923_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCUCACCUCCGCCUGA	1627
R2924_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACUGCUCAGGCGGA	1628
R2925_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGCACCGCCCAGACGA	1629
R2926_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAUGCAGAUCCCAC	1630
R2927_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAGGCGCCCUGGCCA	1631
R2928_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGGGCGGUGCUACAA	1632
R2929_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAUGCCUGGAGCAGCC	1633
R2930_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGCACCGCCCAGACGA	1634
R2931_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGCCGCCAGCCCAGUU	1635
R2932_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUUCCGCUCACCUCCGC	1636
R2933_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGGCCUGUCUGGGGA	1637
R2934_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCCAGCCCUGCUCGU	1638

[0392]

[0393]

R2935_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGUCACCACGAGCAGGG	1639
R2936_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCCUUCGGUCACCAC	1640
R2937_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGAAGCUGCAGGUGAA	1641
R2938_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACCUGCAGCUUCUCCAA	1642
R2939_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAACACAUCGGAGAG	1643
R2940_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCACGAAGCUCUCCGAU	1644
R2941_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCACGAAGCUCUCCGA	1645
R2942_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGCUAAACUGGUACCG	1646
R2943_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGGGCUCAUGCGGUA	1647
R2944_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCGUCUGGUUGCUGGG	1648
R2945_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCGAGGACCGCAGCCA	1649
R2946_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGUGACACGGAAGCGGC	1650
R2947_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGUGUCACACAACUGCC	1651
R2948_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCAGUUGUGUGACACG	1652
R2949_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAUGAGCGUGGUCAG	1653
R2950_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCCGGGCCCUGACCAC	1654
R2951_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGCCAGGGAGAUGGC	1655
R2952_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUCUGCGCCUUGGGGGC	1656
R2953_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAUCUGCGCCUUGGGGG	1657
R2954_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGACAGGCCCUGGAA	1658
R2955_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGCCCUGCUCGUGGU	1659
R2956_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUCUGGAAGGGCACAA	1660
R2957_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGCCCUUCCAGAGAGA	1661
R2958_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCCCUUCCAGAGAGAA	1662
R2959_CasPhi	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCCCUUC	1663

[0394]

12_S	UCUCUGGAA	
R2960_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGAGAGA AGGGCAGAA	1664
R2961_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAACUGGC CGGCUGGCC	1665
R2962_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAACUGG CCGGCUGGC	1666
R2963_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAAACCCU GGUGGUUGG	1667
R2964_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGUCGUG GGCGGCCUG	1668
R2965_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUCGUGC GGCCCGGGA	1669
R2966_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCUGCA GAGAAACAC	1670
R2967_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCUGCAG GGACAAUAG	1671
R2968_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGCAGG GACAAUAGG	1672
R2969_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCCUCAA AGAAGGAGG	1673
R2970_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCUCAAA GAAGGAGGA	1674
R2971_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGUGGA CUAUGGGGA	1675
R2972_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUCGCCA CUGGAAAUC	1676
R2973_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGUGGC GAGAGAAGA	1677
R2974_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGUGGCG AGAGAAGAC	1678
R2975_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCUAGGA AAGACAAUG	1679
R2976_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUUUCCU AGCGGAAUG	1680
R2977_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUAGCGG AAUGGGCAC	1681
R2978_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUAGCGGA AUGGGCACC	1682
R2979_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCCUCU GACCGGCUU	1683
R2980_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUUGGCCA CCAGUGUUC	1684
R2981_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACCAG UGUUCUGCA	1685
R2982_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCAGACC CUCCACCAU	1686
R2983_CasPhi 12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCUGAGG AAAUGCGCU	1687

[0395]

R2984_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUCAGGAGAAGCAGGC	1688
R2985_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCAGGAGAAGCAGGCA	1689
R2986_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGCCGUCCAGGGGCU	1690
R2987_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGACAUGAGUCCUGUGG	1691
R2988_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGUCCUGCCAGCACAG	1692
R2989_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGAGCUGGACGCAGG	1693
R2990_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCCCCGGGCCGCAGGC	1694
R2991_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAGGAGGCUCCGGG	1695
R2992_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGCUGGUUGGAGAUG	1696
R2993_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGAUGGCCUUGGAGCA	1697
R2994_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUGCUCCAAGGCCAUC	1698
R2995_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGCAGCCAAGGUGCCC	1699
R2996_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAUGCCACUGCCAGG	1700
R2997_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGGGAUGCCACUGCCAG	1701
R2998_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCCCUGCGUCCAGGGC	1702
R2999_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGCUCCCUGCAGGCC	1703
R3000_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUAGGCCUGCAGGGAG	1704
R3001_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGAAACUUCUCUAGG	1705
R3002_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGACCUUCCCUGAAACU	1706
R3003_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGGAAGGUCAGAAGA	1707
R3004_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGAAGGUCAGAAGAG	1708
R3005_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCCCUGCCCACCACA	1709
R3006_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGCCCUGCCCACCAC	1710
R3007_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACACAUGCCCAGGCAGC	1711
R3008_CasPhi	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAUGCC	1712

12_S	CAGGCAGCA	
R3009_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGCCCCACAAAGGGC	1713
R3010_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGGGGCAGGGAAGCUG	1714
R3011_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGGGCAGGGAAGCUGA	1715
R3012_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCCUCAGCUUCCCUG	1716
R3013_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGCCCAGCCAGCACU	1717
R3014_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCCCAGCCAGCACUC	1718
R3015_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACCCCAGCCCCUCACA	1719
R3016_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGACCGUAGGAUGUCCC	1720

[0396]

[0397] 表AB:靶向人类CIITA的缩短的CasΦ.12gRNA

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')**	**SEQ ID NO**
R4503_CasPhi12_C2TA_T1.1_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUACACAAUGCGUUGCC	1721
R4504_CasPhi12_C2TA_T1.2_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGCUCUGACAGGUAGG	1722
R4505_CasPhi12_C2TA_T1.3_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGUAGGAAUCCCAGCCA	1723
R4506_CasPhi12_C2TA_T1.8_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGGCUCCACGCCCUG	1724
R4507_CasPhi12_C2TA_T1.9_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAAGCUGAGGGCACG	1725
R4508_CasPhi12_C2TA_T2.1_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACAGCGAUGCUGACCCC	1726
R4509_CasPhi12_C2TA_T2.2_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUAACAGCGAUGCUGAC	1727
R4510_CasPhi12_C2TA_T2.3_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAUGACCAGAUGGACCU	1728
R4511_CasPhi12_C2TA_T2.4_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGCCCCUAGAAGGUGG	1729
R4512_CasPhi12_C2TA_T2.5_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGGGGCCCCAACUCCA	1730
R4513_CasPhi12_C2TA_T2.6_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGAAGCUCCAGGUAGCC	1731
R4514_CasPhi12_C2TA_T2.7_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGCCAGGUCCAUCU	1732
R4515_CasPhi12_C2TA_T2.8_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCUCCAGCCAGGUCCA	1733

[0398]

[0399]

R5200_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCAGGCUGUUGUGUGA	2290
R5201_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUGUCACACAACAGCC	2291
R5202_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGUGACAUGGAAGGUGA	2292
R5203_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUCACCUUCCAUGUCAC	2293
R5204_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAUAAGCCUCCCUGGU	2294
R5205_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGACUCCCAGCUGGA	2295
R5206_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCAGGCCCUCCAGCUG	2296
R5207_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCUGGCAUCUCCAUAC	2297
R5208_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCCCAACUUCUGCUGG	2298
R5209_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCCCAACUUCUGCUG	2299
R5210_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGCCCAACUUCUGCU	2300
R5211_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGACUUUUCUGCCCAAC	2301
R5212_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGACUUUUCUGCCCAA	2302
R5213_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGACUUUUCUGCCCA	2303
R5214_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGAGGAGCUUCCGGC	2304
R5215_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGUCUGCCGGAAGCUC	2305
R5216_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGGCAGACCUGAAGCAC	2306
R5217_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGUGCUUCAGGUCUGC	2307
R5218_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAACAGCGCAGGCAGUGG	2308
R5219_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAACCAGGAGCCAGCCUC	2309
R5220_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGGCGCAUCUGGCC	2310
R5221_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCCAGGCGCAUCUGGC	2311
R5222_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUCCAGGCGCAUCUGG	2312
R5223_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCCAGUUCCUCGUUGA	2313
R5224_CasPhi1	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGUUC	2314

	2_S	CUCGUUGAG	
	R5225_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAGCUCAACGAGGA	2315
	R5226_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCGUUGAGCUGCCUGA	2316
	R5227_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCUGCCUGAAUCUCCC	2317
	R5228_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCCCCACCAUCUCCAC	2318
	R5229_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCCACCAUCUCCACU	2319
	R5230_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGAGCCCAUGGGGCA	2320
	R5231_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCAGAGCCCAUGGGGC	2321
	R5232_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCUCAGAGAUUUGC	2322
	R5233_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAGGCCGUGGACAGUG	2323
	R5234_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACUGUCCACGGCCUCCC	2324
	R5235_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCCAUCAGCCACUGA	2325
[0400]	R5236_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAUGCUGGGCAGGU	2326
	R5237_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCGGGAGGUCAGGGCA	2327
	R5238_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCGGGAGGUCAGGGC	2328
	R5239_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGACCUCUCCAGCUGC	2329
	R5240_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUGGAGACCUCUCCAGC	2330
	R5241_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAAGCUUGUUGGAGACC	2331
	R5242_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAAGCUUGUUGGAGAC	2332
	R5243_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGAAGCUUGUUGGAGA	2333
	R5244_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUACCGCUCACUGCAGGA	2334
	R5245_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCUGCUCCUCUCCAG	2335
	R5246_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGCUCCAGGCUCUUGC	2336
	R5247_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCCCAGUCCGGGGUGG	2337
	R5248_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCCAGCUGCCGUUCUG	2338

	R5249_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAGCCAACAGCACCUC	2339
	R5250_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUGCCAAGGAGCACCG	2340
	R5251_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAGCACAGCAAUCAC	2341
	R5252_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCAGCACAGCAAUCA	2342
	R5253_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGUGCUGGGCAAAGCU	2343
	R5254_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCUGACCAGCUUUGCC	2344
	R5255_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCUGGGGCAGUGAGCC	2345
	R5256_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGCCGGCUUCCCCAGU	2346
	R5257_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAGUACGACUUUGUC	2347
	R5258_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCUUCUCUGUCCCCUG	2348
	R5259_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUUCUCUGUCCCCUGC	2349
	R5260_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGUCCCCUGCCAUUG	2350
[0401]	R5261_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAGCAAUGGCAGGGGAC	2351
	R5262_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUUGAACCGUCCGGGGG	2352
	R5263_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAACCGUCCGGGGGAUGC	2353
	R5264_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCUGGGCCCACAGCC	2354
	R5265_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAGAUGUGGCUGAAAAC	2355
	R5266_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCAGCCACAUCUUGAAG	2356
	R5267_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCACAUCUUGAAGA	2357
	R5268_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCCACAUCUUGAAGAG	2358
	R5269_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAGAGACCUGACCGCGU	2359
	R5270_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCUCAUCCUAGACGGC	2360
	R5271_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCUCCUCGAAGCCGU	2361
	R5272_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCUUCCAGCUCCUCGA	2362
	R5273_CasPhi1	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGGAGCU	2363

[0402]

2_S	GGAAGCGCA	
R5274_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCACAGCACGUGCGG	2364
R5275_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGAAAAGGCCGGCCAG	2365
R5276_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCUGGAAAAGGCCGGC	2366
R5277_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGAAGAAGCUGCUC	2367
R5278_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGAAGAAGCUGCUCC	2368
R5279_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGAAGAAGCUGCUCCG	2369
R5280_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACCCUCCUCCUCACAG	2370
R5281_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCAGGCUCUGGACCAG	2371
R5282_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGCUGUCCGGCUUCUC	2372
R5283_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCUGUCCGGCUUCUCC	2373
R5284_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAUGGAGCAGGCCCA	2374
R5285_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGAGCUCAGGGAUGAC	2375
R5286_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGAGCUCAGGGAUGACA	2376
R5287_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGCUCUGUCAUCCCUG	2377
R5288_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCUCAGUCACAGCCAC	2378
R5289_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCAGUCACAGCCACAGC	2379
R5290_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGCCGGGCAGUGUGCC	2380
R5291_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCCGGGCAGUGUGCCA	2381
R5292_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCGUCCUCCCCAAGCUC	2382
R5293_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAGGACGCCAAGCUG	2383
R5294_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCAGCUCUGCCAGGGC	2384
R5295_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGUCUGCGGCCCAGCU	2385
R5392_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAUGUCUGCGGCCCAGC	2386
R5393_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAUCCGCAGACGUGAG	2387

	R5394_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCAUCGCCCAGGUCCU	2388
	R5395_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCCAUCGCCCAGGUCC	2389
	R5396_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGACUAAGCCUUUGGCCA	2390
	R5397_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCCAACACCCACCGCG	2391
	R5398_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGAGGAAGCUGGGGA	2392
	R5399_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAGCUUCCUCCUGCA	2393
	R5400_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCCUGCAAUGCUUCCU	2394
	R5401_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGGGGCCCUGUGGCU	2395
	R5402_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACUCAGAGCCAGCC	2396
	R5403_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGCCACUCAGAGCCAGC	2397
	R5404_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUUUCGCCACUCAGAGC	2398
	R5405_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCUUGAUUUCGCCACU	2399
[0403]	R5406_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGUCAAUGCUAGGUAC	2400
	R5407_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUUGGGGUCAAUGCUAG	2401
	R5408_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCCUUGGGGUCAAUGC	2402
	R5409_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACCCCAAGGAAGAAGAG	2403
	R5410_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCAUAGGGCCUCUUCUU	2404
	R5411_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGCUGGGCUGAUCUU	2405
	R5412_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGCUGGGCUGAUCUUC	2406
	R5413_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCUCCCGCCCGCUG	2407
	R5414_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGUCCACCGAGGCAGC	2408
	R5415_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCUUCCUGUCCACCGA	2409
	R5416_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGUACCUCGCAAGCAC	2410
	R5417_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGAGGUACCUGAAGCGG	2411
	R5418_CasPhi1	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCUCC	2412

[0404]

2_S	UCGGCCUCG	
R5419_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGCAGCACGUGGUACAG	2413
R5420_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAGCACGUGGUACAGG	2414
R5421_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUGGGCACCCGCCUCA	2415
R5422_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGGCACCCGCCUCAC	2416
R5423_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGGCACCCGCCUCACG	2417
R5424_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAGUACAUGUGCAUC	2418
R5425_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCGCCGCCUCCAAGG	2419
R5426_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGGCGGCGGGCCAAGA	2420
R5427_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCUGGACCUCCGCAG	2421
R5428_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCCUCUGGAUUGGGG	2422
R5429_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCUCUGGAUUGGGGA	2423
R5430_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAGCCUCGUGGGACU	2424
R5431_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCUCCCCAUGCUGCUG	2425
R5432_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCUCUGCUGCCUGAAG	2426
R5433_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGCAGCAGAGGAGAAG	2427
R5434_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAAGGCUCGAUGGUGAA	2428
R5435_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAAAGGCUCGAUGGUGA	2429
R5436_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACCAUCGAGCCUUUCAA	2430
R5437_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUUUGAAAGGCUCGAU	2431
R5438_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGACUUGGCUUUGAA	2432
R5439_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAAAGCCAAGUCCCUGA	2433
R5440_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAAGCCAAGUCCCUGAA	2434
R5441_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACAUCCUUCAGGGACU	2435
R5442_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGGUCUUCCACAUCC	2436

	R5443_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAGGUCUUCCACAUC	2437
	R5444_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCGGAAGACACAGCUG	2438
	R5445_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGUCCCGAACAGCAGGG	2439
	R5446_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGUCCCGAACAGCAGG	2440
	R5447_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUUAGGUCCGAACAGC	2441
	R5448_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUUUAGGUCCCGAACAG	2442
	R5449_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGACCUAAAGAAACUG	2443
	R5450_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGAAAGCCUGGGGGCC	2444
	R5451_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGAAAGCCUGGGGGC	2445
	R5452_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCAAACUGGUGCGGA	2446
	R5453_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCAAACUGGUGCGGAU	2447
	R5454_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCUCACUCAGCGCAUC	2448
[0405]	R5455_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCUGGGGGAAGGUGGC	2449
	R5456_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCAGCUGAAGUCCUU	2450
	R5457_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAAGGACUUCAGCUGGG	2451
	R5458_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAAGGACUUCAGCUGG	2452
	R5459_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGUUUCCAAGGACUU	2453
	R5460_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGGCACCCAGGUCAGU	2454
	R5461_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUAGGCACCCAGGUCAG	2455
	R5462_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCGCUGCAUCCCUGC	2456
	R5463_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCUGAGCAGGGAUGCA	2457
	R5464_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUACAAUAACUGCAUCUG	2458
	R5465_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCGUGUGCUUCCGGA	2459
	R5466_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGGACAUGGUGUCCCUC	2460
	R5467_CasPhi1	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACGGCUGC	2461

	2_S	CGGGGCCCA	
	R5468_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAGGUGUCCUCAUGUG	2462
	R5469_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGACACUGAAUGGGA	2463
[0406]	R5470_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGUGUCCAGGAACACCU	2464
	R5471_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGGUGUUCCUGGACAC	2465
	R5472_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUGCAGGUGUUCCUGGA	2466
	R5473_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACGGAUCAGCCUGAGAU	2467

[0407] 表AC:靶向小鼠PCSK9的CasΦ.12gRNA

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')	SEQ ID NO
R4238_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGCUGUUGCCGCCGCU	1734
R4239_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGCCGCUGCUGCUGCU	1735
R4240_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCUACUGUGCCCCAC	1736
R4241_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUAAUCUCCAUCCUCGU	1737
R4242_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGAAGAGCUGAUGCUCG	1738
R4243_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGCAACGGCGGAAGGU	1739
[0408] R4244_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGGCAGCCUCCAGGCC	1740
R4245_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGUGCUGAUGGAGGAG	1741
R4246_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAUCUGUAGCCUCUGGG	1742
R4247_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCAAUCUGUAGCCUCU	1743
R4248_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUUCAAUCUGUAGCCUC	1744
R4249_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAACAAACUGCCCACCGC	1745
R4250_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACAUAGCCCCGGCG	1746
R4251_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUACAUAUCUUUUAUGAC	1747
R4252_CasPhi12	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUAUGACCUCUUCC	1748

[0409]

_S	CUGG	
R4253_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACCUCUUCCCUGGC	1749
R4254_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGACCUCUUCCCUGGCU	1750
R4255_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACCAAGAAGCCAGGGAA	1751
R4256_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGGCUUCUUGGUGAA	1752
R4257_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUGGUGAAGAUGAGCAG	1753
R4258_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGAAGAUGAGCAGUGA	1754
R4259_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCAUGUGGAGUACAU	1755
R4260_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCAAUGUACUCCACAU	1756
R4261_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAGACUCCUUUGUC	1757
R4262_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCUUCGCCCAGAGCAU	1758
R4263_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUUCGCCCAGAGCAUC	1759
R4264_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCAGAGCAUCCCAUG	1760
R4265_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUGGGAUGCUCUGGGC	1761
R4266_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUCCAGGUUCCAUGGG	1762
R4267_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCCAGCAUGGCACCAG	1763
R4268_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUCUGUCUGGUGCCAUG	1764
R4269_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAUACCAGCAUCCAGGG	1765
R4270_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGCAGGGUCACCAUC	1766
R4271_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAAGUCGGUGAUGGUGAC	1767
R4272_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAACAGCGUGCCGGAGGA	1768
R4273_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACACCAGCAUCCCG	1769
R4274_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCACACGCAGGCUGUG	1770
R4275_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACACAGUUGAGCACACGCA	1771
R4276_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUGACAGUUGAGCAC	1772

	R4277_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCUGACUCUUCCGAAUA	1773
	R4278_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUUCGGAAGAGUCAGCU	1774
	R4279_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUUCGGAAGAGUCAGCUA	1775
	R4280_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAAGAGUCAGCUAAUC	1776
	R4281_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCUGCCCCUGGCCGGU	1777
	R4282_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAUGCGGCUAUACCC	1778
	R4283_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCAGCUGCUGCAACCAG	1779
	R4284_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCAGCUGGGAACUUC	1780
	R4285_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCGGGACGACGCCUGCCU	1781
	R4286_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGGCCCCGACUGUGAU	1782
	R4287_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUUGGGGACUUUGGGG	1783
	R4288_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUCCCCAAAGUCCCCAA	1784
[0410]	R4289_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGACUUUGGGGACUAA	1785
	R4290_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGACUAAUUUUGGAC	1786
	R4291_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGACUAAUUUUGGACG	1787
	R4292_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGACGCUGUGUGGAUC	1788
	R4293_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGACGCUGUGUGGAUCU	1789
	R4294_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGACGCUGUGUGGAUCUC	1790
	R4295_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCGGGGGCAAAGAGAUC	1791
	R4296_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCCCCGGGAAGGACAU	1792
	R4297_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCCCGGGAAGGACAUC	1793
	R4298_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGUCACAGAGUGGGAC	1794
	R4299_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGCUCGGAUGCUGAGC	1795
	R4300_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCUGGCCGAGCUGCGG	1796
	R4301_CasPhi12	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUAGAGAAGUGG	1797

[0411]

_S	AUCAG	
R4302_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGUAGAGAAGUGGAUCA	1798
R4303_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCUACCAAAGACGUCAU	1799
R4304_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUGACGUCUUUGGUAGA	1800
R4305_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCUGAGGACCAGCAGGU	1801
R4306_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGUCAGCACCUGCUG	1802
R4307_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUGGGCCCCGAGUGU	1803
R4308_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGGGCACAGCGGGCUG	1804
R4309_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCAGGAGCGGGAGGCG	1805
R4310_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGACCUGCUGGCCUCC	1806
R4311_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGGCCUUGCAGACCUG	1807
R4312_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGGUGAGGGUGUCUA	1808
R4313_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGGUGAGGGUGUCUAU	1809
R4314_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCACGGGGAACCAGGCA	1810
R4315_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCCGUGCCAACUGCAGC	1811
R4316_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGAUGCUGCAGUUGGC	1812
R4317_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGGUGGCAGUGGACAUG	1813
R4318_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCACUUCCCAAUGGAAGC	1814
R4319_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUUGGGAAGUGGAAGA	1815
R4320_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGAAGUGGAAGACCUUA	1816
R4321_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGUGUCCGGAGGCAGCCU	1817
R4322_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCCACCAGGCGGCCAGU	1818
R4323_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGCUGCCAUGCCCCAG	1819
R4324_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGCCCUGGGGCAUGGC	1820
R4325_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUUCCAGCCCUGGGGC	1821

[0412]

R4326_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGCAUUCCAGCCCUGGGG	1822
R4327_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUGCAUUCCAGCCCUGGG	1823
R4328_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAUUUUGCAUUCCAGCCC	1824
R4329_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAUCCAGUCAGGGUCCA	1825
R4330_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACGCUGUAGGCUCC	1826
R4331_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCCACACACAGGUUGUCC	1827
R4332_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACUCCACUGGUCCUGUCUG	1828
R4333_CasPhi12_S	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCUGAAGGCCGGCUCCGG	1829

[0413] 表AD:CHO细胞中靶向Bak1的CasΦ.12gRNA

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA	SEQ ID NO
R2452 Bak1_CasPhi12_1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAGCTATGTTTTCCAT	1830
R2453 Bak1_CasPhi12_2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCC	1831
R2454 Bak1_CasPhi12_3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCCTAGAACCCAACAG	1832
R2455 Bak1_CasPhi12_4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGACCTCCTCTGTG	1833
R2456 Bak1_CasPhi12_5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCGGGGTTGGC	1834
R2457 Bak1_CasPhi12_6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCTGATGGTGGAGAT	1835
R2849_Bak1_CasPhi12_nsd_sg1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGACTCCCAGCTCTGA	1836
R2850_Bak1_CasPhi12_nsd_sg2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGGGTCAGAGCTGGGA	1837
R2851_Bak1_CasPhi12_nsd_sg3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGACCTCCTCTGTG	1838
R2852_Bak1_CasPhi12_nsd_sg4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCGAAGCTATGTTTTCCA	1839
R2853_Bak1_CasPhi12_nsd_sg5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAGCTATGTTTTCCAT	1840
R2854_Bak1_CasPhi12_nsd_sg6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCCACCATCAG	1841
R2855_Bak1_CasPhi12_nsd_sg7_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCATCTCCACCATCAGG	1842

[0415]

R2856_Bak1_CasPhi12_nsd_sg8_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGTGGAGATGGA	1843
R2857_Bak1_CasPhi12_nsd_sg9_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCATCTCCACCATCAGGA	1844
R2858_Bak1_CasPhi12_nsd_sg10_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCTGATGGTGGAGAT	1845
R2859_Bak1_CasPhi12_nsd_sg11_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCC	1846
R2860_Bak1_CasPhi12_nsd_sg12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCGGGGTTGGC	1847
R2861_Bak1_CasPhi12_nsd_sg13_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTAGGAGCAAATTGTCCA	1848
R2862_Bak1_CasPhi12_nsd_sg14_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGGTTCTAGGAGCAAATT	1849
R2863_Bak1_CasPhi12_nsd_sg15_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCTCCTAGAACCCAACA	1850
R2864_Bak1_CasPhi12_nsd_sg16_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCCTAGAACCCAACAG	1851
R3977 Bak1_CasPhi12_外显子1_sg1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCAGACGCCATCTTTC	1852
R3978 Bak1_CasPhi12_外显子1_sg2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGTAAGAGTCCTCCTG	1853
R3979 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTACAGCATCTTGGGTC	1854
R3980 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGGTCAGGTGGGCCGGCA	1855
R3981 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTATCATTGGAGATGAC	1856
R3982 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGATGACATTAACCGG	1857
R3983 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGAACTCTGTGTCGTA	1858
R3984 Bak1_CasPhi12_外显子	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGAATTTACTGGAGCA	1859

	3_sg6_S		
	R3985 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg7_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACTGGAGCAGCTGCAGC	1860
	R3986 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg8_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCAGCTGTGGGCTGCAG	1861
	R3987 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg9_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTAGGCATTCCCAGCTG	1862
[0416]	R3988 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg10_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTGAAGAGTTCGTAGGC	1863
	R3989 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg11_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACACCAAGATTGCCTCCAG	1864
	R3990 Bak1_CasPhi12_外显子3_sg12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTCCAGGTACCCACCA	1865

[0417] 表AE:CHO细胞中靶向Bax的CasΦ.12gRNA

名称	重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA)	SEQ ID NO
R2458 Bax_CasPhi12_1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAATGTGGATACTAAC	1866
R2459 Bax_CasPhi12_2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGA	1867
R2460 Bax_CasPhi12_3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGCAACTTCAAC	1868
[0418] R2461 Bax_CasPhi12_4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTACTTTGCTAGCAAACT	1869
R2462 Bax_CasPhi12_5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCACCAGTTTGCTAGC	1870
R2463 Bax_CasPhi12_6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAACTGGGGCCGGGTTGT	1871
R2865_Bax_CasPhi12_nsd_sg1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCTCTTTCCTGTAGGA	1872
R2866_Bax_CasPhi12_nsd_sg2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTTTCCTGTAGGATGA	1873
R2867_Bax_CasPhi12_nsd_sg	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTGTAGGATGATTGCT	1874

[0419]

3_S		
R2868_Bax_CasPhi12_nsd_sg4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGTAGGATGATTGCTA	1875
R2869_Bax_CasPhi12_nsd_sg5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAATGTGGATACTAAC	1876
R2870_Bax_CasPhi12_nsd_sg6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGA	1877
R2871_Bax_CasPhi12_nsd_sg7_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCGTGTGGCAGCTGACAT	1878
R2872_Bax_CasPhi12_nsd_sg8_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCATCAGCAAACATGTC	1879
R2873_Bax_CasPhi12_nsd_sg9_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGTTGCCATCAGCAAA	1880
R2874_Bax_CasPhi12_nsd_sg10_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCTGATGGCAACTTCAA	1881
R2875_Bax_CasPhi12_nsd_sg11_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGCAACTTCAAC	1882
R2876_Bax_CasPhi12_nsd_sg12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAACTGGGGCCGGGTTGT	1883
R2877_Bax_CasPhi12_nsd_sg13_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTGCCCTTTTCTACTTT	1884
R2878_Bax_CasPhi12_nsd_sg14_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCCTTTTCTACTTTGCT	1885
R2879_Bax_CasPhi12_nsd_sg15_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAGCAAAGTAGAAAAG	1886
R2880_Bax_CasPhi12_nsd_sg16_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCTAGCAAAGTAGAAAA	1887
R2881_Bax_CasPhi12_nsd_sg17_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTACTTTGCTAGCAAA	1888
R2882_Bax_CasPhi12_nsd_sg18_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTACTTTGCTAGCAAAC	1889
R2883_Bax_CasPhi12_nsd_sg19_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTACTTTGCTAGCAAACT	1890

[0420]

R2884_Bax_CasPhi12_nsd_sg20_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCTAGCAAACTGGTGCT	1891
R2885_Bax_CasPhi12_nsd_sg21_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAGCAAACTGGTGCTC	1892
R2886_Bax_CasPhi12_nsd_sg22_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCACCAGTTTGCTAGC	1893

[0421] 表AF:CHO细胞中靶向Fut8的CasΦ.12gRNA

[0422]

名称	**重复区+间隔区 RNA 序列(5'-->3')，示为DNA**	**SEQ ID NO**
R2464 Fut8_CasPhi12_1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCACTTTGTCAGTGCGT	1894
R2465 Fut8_CasPhi12_2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCAATGGGATGGAAGG	1895
R2466 Fut8_CasPhi12_3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGGAATACATGGTACAC	1896
R2467 Fut8_CasPhi12_4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGAACATTTTCAGCTT	1897
R2468 Fut8_CasPhi12_5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACATCCACTTTCATTCTGC	1898
R2469 Fut8_CasPhi12_6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAA	1899
R2887_Fut8_CasPhi12_nsd_sg1_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCCCAGAGTCCATGTC	1900
R2888_Fut8_CasPhi12_nsd_sg2_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAGTGCGTCTGACATG	1901
R2889_Fut8_CasPhi12_nsd_sg3_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTCAGTGCGTCTGACAT	1902
R2890_Fut8_CasPhi12_nsd_sg4_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCACTTTGTCAGTGCGT	1903
R2891_Fut8_CasPhi12_nsd_sg5_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGTTCCCACTTTGTCAG	1904
R2892_Fut8_CasPhi12_nsd_sg6_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCAATGGGATGGAAGG	1905
R2893_Fut8_CasPhi12_nsd_sg7_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCATCCCATTGAGGAATA	1906
R2894_Fut8_CasPhi12_nsd_sg8_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGGAATACATGGTACAC	1907
R2895_Fut8_CasPhi12_nsd_sg9_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAACGTGTACCATGTATT	1908
R2896_Fut8_CasPhi12_nsd_sg10_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCAACGTGTACCATGT	1909
R2897_Fut8_CasPhi12_nsd_sg11_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGAACATTTTCAGCTT	1910

[0423]

R2898_Fut8_CasPhi12_nsd_sg12_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGAAGCTGAAAATGTT	1911
R2899_Fut8_CasPhi12_nsd_sg13_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCAGCTTCTCGAACGCA	1912
R2900_Fut8_CasPhi12_nsd_sg14_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGCTTCTCGAACGCAG	1913
R2901_Fut8_CasPhi12_nsd_sg15_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTGCGTTCGAGAAGCTGA	1914
R2902_Fut8_CasPhi12_nsd_sg16_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCTTCTCGAACGCAGA	1915
R2903_Fut8_CasPhi12_nsd_sg17_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACATTCTGCGTTCGAGAAG	1916
R2904_Fut8_CasPhi12_nsd_sg18_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCATTCTGCGTTCGAGAA	1917
R2905_Fut8_CasPhi12_nsd_sg19_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCGAACGCAGAATGAAA	1918
R2906_Fut8_CasPhi12_nsd_sg20_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACATCCACTTTCATTCTGC	1919
R2907_Fut8_CasPhi12_nsd_sg21_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTATCCACTTTCATTCTG	1920
R2908_Fut8_CasPhi12_nsd_sg22_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTATCCACTTTCATTCT	1921
R2909_Fut8_CasPhi12_nsd_sg23_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTATCCACTTTCATTC	1922
R2910_Fut8_CasPhi12_nsd_sg24_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTTATCCACTTTCATT	1923
R2911_Fut8_CasPhi12_nsd_sg25_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACAACAAAGAAGGGTCATC	1924
R2912_Fut8_CasPhi12_nsd_sg26_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTCCTTTAACAAAGAA	1925
R2913_Fut8_CasPhi12_nsd_sg27_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGCCTCCTTTAACAAAGA	1926
R2914_Fut8_CasPhi12_nsd_sg28_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAA	1927
R2915_Fut8_CasPhi12_nsd_sg29_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTTAAAGGAGGCAAAGA	1928
R2916_Fut8_CasPhi12_nsd_sg30_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTAAAGGAGGCAAAGAC	1929
R2917_Fut8_CasPhi12_nsd_sg31_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTCTTTGCCTCCTTTAAC	1930
R2918_Fut8_CasPhi12_nsd_sg32_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTCTTTGCCTCCTTTAA	1931
R2919_Fut8_CasPhi12_nsd_sg33_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACGTCTAACTTACTTTGTC	1932
R2920_Fut8_CasPhi12_nsd_sg34_S	ATTGCTCCTTACGAGGAGACTTGGTCTAACTTACTTT	1933

[0424] 表AG:靶向Fut8的CasΦ.12gRNA

[0425]

名称	重复区长度	间隔区长度	重复区序列(5'-->3')	间隔区序列(5'-->3')	crRNA 序列(5'-->3')
R3582	36	30	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACAUU (SEQ ID NO: 1482)	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACAUU (SEQ ID NO:1499)
R3583	36	29	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACAU (SEQ ID NO: 1483)	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACAU (SEQ ID NO:1500)
R3584	36	28	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACA (SEQ ID NO: 1484)	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAACA (SEQ ID NO:1501)
R3585	36	27	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAAC (SEQ ID NO: 1485)	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAAC (SEQ ID NO:1502)
R3586	36	26	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAA (SEQ ID NO: 1486)	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUGAAGAA (SEQ

[0426]

					ID NO:1503)
R3587	36	25	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG A (SEQ ID NO: 1487)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUUG AAGA (SEQ ID NO:1504)
R3588	36	24	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG (SEQ ID NO: 1488)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUUG AAG (SEQ ID NO:1505)
R3589	36	23	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAA (SEQ ID NO: 1489)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUUG AA (SEQ ID NO:1506)
R3590	36	22	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGA (SEQ ID NO: 1490)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUUGA (SEQ ID NO:1507)
R3591	36	21	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUG (SEQ ID NO: 1491)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUUG (SEQ ID NO:1508)
R3592	36	20	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU

[0427]

			CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	ID NO: 1492)	UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUU (SEQ ID NO:1509)
R3593	36	19	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGU (SEQ ID NO: 1493)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGU (SEQ ID NO:1510)
R3594	36	18	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA CG (SEQ ID NO: 1494)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACG (SEQ ID NO:1511)
R3595	36	17	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA C (SEQ ID NO: 1495)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACAC (SEQ ID NO:1512)
R3596	36	16	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUACA (SEQ ID NO: 1496)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACA (SEQ ID NO:1513)
R3597	36	15	CUUUCAAGA CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 2469)	AGGAAUAC AUGGUAC (SEQ ID NO: 1497)	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU AC (SEQ ID NO:1514)
R3598	35	20	UUUCAAGAC UAAUAGAUU GCUCCUUAC	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ	UUUCAAGA CUAAUAGA UUGCUCCUU

[0428]

			GAGGAGAC (SEQ ID NO: 1466)	ID NO: 1498)	ACGAGGAG ACAGGAAU ACAUGGUA CACGUU (SEQ ID NO:1515)
R3599	34	20	UUCAAGACU AAUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGAC (SEQ ID NO: 1467)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UUCAAGAC UAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGA CAGGAAUA CAUGGUAC ACGUU (SEQ ID NO:1516)
R3600	33	20	UCAAGACUA AUAGAUUGC UCCUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1468)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UCAAGACU AAUAGAUU GCUCCUUAC GAGGAGAC AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO:1517)
R3601	32	20	CAAGACUAA UAGAUUGCU CCUUACGAG GAGAC (SEQ ID NO: 1469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	CAAGACUA AUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGACA GGAAUACA UGGUACAC GUU (SEQ ID NO:1518)
R3602	31	20	AAGACUAAU AGAUUGCUC CUUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 1470)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	AAGACUAA UAGAUUGC UCCUUACGA GGAGACAG GAAUACAU GGUACACG UU (SEQ ID NO:1519)
R3603	30	20	AGACUAAUA GAUUGCUCC UUACGAGGA GAC (SEQ ID NO: 1471)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	AGACUAAU AGAUUGCU CCUUACGAG GAGACAGG AAUACAUG GUACACGU U (SEQ ID NO:1520)
R3604	29	20	GACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGAG AC (SEQ ID	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	GACUAAUA GAUUGCUCC UUACGAGG AGACAGGA

[0429]

			NO: 1472)		AUACAUGG UACACGUU (SEQ ID NO:1521)
R3605	28	20	ACUAAUAGA UUGCUCCUU ACGAGGAGA C (SEQ ID NO: 1473)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	ACUAAUAG AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUU (SEQ ID NO:1522)
R3606	27	20	CUAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1474)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	CUAAUAGA UUGCUCCUU ACGAGGAG ACAGGAAU ACAUGGUA CACGUU (SEQ ID NO:1523)
R3607	26	20	UAAUAGAUU GCUCCUUAC GAGGAGAC (SEQ ID NO: 1475)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UAAUAGAU UGCUCCUUA CGAGGAGA CAGGAAUA CAUGGUAC ACGUU (SEQ ID NO:1524)
R3608	25	20	AAUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGAC (SEQ ID NO: 1476)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AAUAGAUU GCUCCUUAC GAGGAGAC AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO:1525)
R3609	24	20	AUAGAUUGC UCCUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1477)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGACA GGAAUACA UGGUACAC GUU (SEQ ID NO:1526)
R3610	23	20	UAGAUUGCU CCUUACGAG GAGAC (SEQ ID NO: 1478)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	UAGAUUGC UCCUUACGA GGAGACAG GAAUACAU GGUACACG UU (SEQ ID NO:1527)
R3611	22	20	AGAUUGCUC CUUACGAGG	AGGAAUAC AUGGUACA	AGAUUGCU CCUUACGAG

[0430]

			AGAC (SEQ ID NO: 1479)	CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	GAGACAGG AAUACAUG GUACACGU U (SEQ ID NO:1528)
R3612	21	20	GAUUGCUCC UUACGAGGA GAC (SEQ ID NO: 1480)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	GAUUGCUCC UUACGAGG AGACAGGA AUACAUGG UACACGUU (SEQ ID NO:1529)
R3613	20	20	AUUGCUCCU UACGAGGAG AC (SEQ ID NO: 1481)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AUUGCUCCU UACGAGGA GACAGGAA UACAUGGU ACACGUU (SEQ ID NO:1530)

[0431] 表AH:靶向B2M和TRAC的CasΦ.12gRNA

[0432]

名称	**靶标**	**修饰**	**重复区序列** (5'-->3')	**间隔区序列** (5'-->3')	**crRNA 序列** (5'-->3')
R3150 20-20	B2M 外显子 2	未经修饰，最后一个3'碱基处的2'OMe (1me) 最后两个3'碱基处的2'OMe (2me) 最后三个3'碱基处的2'OMe (3me)	AUUGCUCC CUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	CAGUGGGG GUGAAUUC AGUG (SEQ ID NO: 1434)	AUUGCUCC UUACGAGG AGACCAGU GGGGGUGA AUUCAGUG (SEQ ID NO: 1435)
R3042 20-20	TRAC外显子 1	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUC CUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	GAGUCUCU CAGCUGGU ACAC (SEQ ID NO: 1436)	AUUGCUCC UUACGAGG AGACGAGU CUCUCAGC UGGUACAC (SEQ ID NO: 1437)
R3150 20-17	B2M 外显子 2	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUC CUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO:	CAGUGGGG GUGAAUUC A (SEQ ID NO: 1438)	AUUGCUCC UUACGAGG AGACCAGU GGGGGUGA

[0433]

			1433)		AUUCA (SEQ ID NO: 1439)
R3042 20-17	TRAC外显子1	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	CAGUGGGGGUGAAUUCA (SEQ ID NO: 1440)	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUCUCUCAGCUGGUA (SEQ ID NO: 1441)

[0434] 在一些实施方案中，指导核酸包含与来自表A至H的间隔区序列相同或相差不超过5个核苷酸、与来自表A至H的间隔区序列相差不超过4个核苷酸、与来自表A至H的间隔区序列相差不超过3个核苷酸、与来自表A至H的间隔区序列相差不超过2个核苷酸，或与来自表A至H的间隔区序列相差不超过1个核苷酸的间隔区序列。差异可能是添加、删除或取代，并且如果有多个差异，则差异可以是添加、删除和/或取代。

[0435] 在一些实施方案中，指导核酸包含与来自表I至AH的序列相同或相差不超过5个核苷酸、与来自表I至AH的序列相差不超过4个核苷酸、与来自表I至X的序列相差不超过3个核苷酸、与来自表I至AH的序列相差不超过2个核苷酸，或与来自表I至AH的序列相差不超过1个核苷酸的序列。差异可能是添加、删除或取代，并且如果有多个差异，则差异可以是添加、删除和/或取代。

[0436] 在一些实施方案中，指导核酸包含来自表I至X、AG和AH的序列(SEQ ID NO:547-1404、1433-1441、1466-1530或2112-2289)的至少30、至少31、至少32、至少33、至少34、至少35、至少36、至少37、至少38、至少39、至少40、至少41、至少42、至少43、至少44、至少45、至少46、至少47、至少48、至少49、至少50、至少51、至少52、至少53、至少54、至少55、至少56或至少57个连续核碱基的序列。

[0437] 在一些实施方案中，指导核酸包含来自表I至X、AG和AH的序列(SEQ ID NO:547-1404、1433-1441、1466-1530或2112-2289)的30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56或57个连续核碱基的序列。

[0438] 在一些实施方案中，指导核酸包含来自表Y至AF的序列(SEQ ID NO:1533-1933或2290-2467)的至少30、至少31、至少32、至少33、至少34、至少35、至少36或至少37个连续核碱基的序列。

[0439] 在一些实施方案中，指导核酸包含来自表Y至AF的序列(SEQ ID NO:1533-1933或2290-2467)的30、31、32、33、34、35、36或37个连续核碱基的序列。

[0440] 在一些实施方案中，指导核酸包含来自表2的重复区序列和来自表A至H的间隔区序列。

[0441] 在表A至AH中提供的序列中，当指导核酸是或包含核糖核酸核苷或脱氧核糖核酸核苷时，碱基T可与U互换。

[0442] 编码序列和表达载体

[0443] 在一些方面，本公开提供了编码本文公开的可编程CasΦ核酸酶的核酸。在一些实施方案中，核酸是载体，优选地载体是表达载体。适合的表达载体很容易鉴定目标细胞类型。例如，表达载体包含适合在目标细胞类型中转录的启动子。表达载体还可以包含支持转

录的其他元件，诸如土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调节元件(WPRE)。

[0444] 在一些实施方案中，编码可编程CasΦ核酸酶的核酸(例如在表达载体内)包含适合在真核细胞中表达的元件。在一些实施方案中，核酸包含适合于在真核细胞中转录的启动子，例如含有TATA盒和/或TFIIB识别元件。核酸(例如在表达载体内)通常包含适合于在真核细胞中编码可编程CasΦ核酸酶的序列上游转录的启动子，并且可以包含编码可编程CasΦ核酸酶的序列下游的转录终止子。核酸(例如在表达载体内)还可以包含编码可编程CasΦ核酸酶的序列上游和/或下游的增强子。启动子可以是诱导性启动子。核酸还可以包含指导RNA。合适的启动子是本领域熟知的并且包括CMV启动子、EF1a启动子、无内含子EF1a短启动子、SV40启动子、人类或小鼠PGK1启动子、Ubc(泛素C)启动子和小鼠或人类U6启动子。合适的哺乳动物启动子包括EF1a启动子、无内含子的EF1a短启动子和人类U6启动子。

[0445] 在一些实施方案中，载体是病毒载体。在一些实施方案中，载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。在优选的实施方案中，载体是腺相关病毒(AAV)载体。可用于本文公开的组合物和方法的AAV载体存在几种血清型，包括AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9和AAV DJ。在更优选的实施方案中，AAV载体是AAV DJ载体。

[0446] 载体可以整合到宿主细胞基因组中。

[0447] 在一些实施方案中，载体包含编码可编程CasΦ核酸酶的核酸。在一些实施方案中，载体包含编码指导核酸的核酸。在一些实施方案中，载体包含供体多核苷酸。在一些实施方案中，编码可编程CasΦ核酸酶的核酸、编码指导核酸的核酸和供体多核苷酸包含在独立的载体中。在一些实施方案中，载体包含编码可编程CasΦ核酸酶的核酸和编码指导核酸的核酸。

[0448] 在此领域中众所周知的是，Cas9核酸酶的大尺寸使得Cas9无法用于多种应用。例如，随着载体尺寸的增加，将载体包装到病毒颗粒中变得更加困难。因此难以在包含编码Cas9核酸酶的核酸的病毒载体中包含其他组分。因此，本文公开的可编程CasΦ核酸酶的优点之一是可编程CasΦ核酸酶的尺寸较小，当载体还包含编码其他组分(诸如编码指导核酸的核酸和/或供体多核苷酸)的核酸时允许包含编码可编程CasΦ核酸酶的核酸的载体容易地包装到病毒颗粒中。在优选的实施方案中，载体编码编码可编程CasΦ核酸酶的核酸和编码指导核酸的核酸。在优选的实施方案中，载体编码编码可编程CasΦ核酸酶的核酸、编码指导核酸的核酸和供体多核苷酸。在一些优选的实施方案中，载体包含高达1kb的供体多核苷酸、用于表达指导核酸的启动子、编码所述核酸的核酸、用于表达可编程CasΦ核酸酶的哺乳动物启动子、编码所述可编程CasΦ核酸酶的核酸和多聚A信号。在另选的优选实施方案中，供体多核苷酸包含在编码标签诸如荧光蛋白的核酸中。在进一步优选的实施方案中，由载体编码的可编程CasΦ核酸酶与两个核定位信号融合或连接。

[0449] 在一些实施方案中，表达载体包含适合在原核细胞中表达的元件。在一些实施方案中，表达载体包含适合在原核细胞中转录的启动子，例如包含Shine Dalgarno序列的启动子。

[0450] 在一些实施方案中，可以通过电穿孔、核转染、化学方法、转染、转导、转化或显微注射的方式将CasΦ核酸酶、指导核酸或编码其任何组合的核酸插入宿主细胞中。在一些实施方案中，可以通过挤压细胞使其变形，从而破坏细胞膜并允许CasΦ核酸酶、指导核酸或编码其任何组合的核酸进入细胞来将CasΦ核酸酶、指导核酸或编码其任何组合的核酸引

入细胞。

[0451] 在一些实施方案中,Amaxa 4D核转染仪可用于进行核转染。在一些实施方案中,化学方法或转染包括脂质转染胺。

[0452] 脂质纳米颗粒(LNP)递送是用于基因治疗的临床上最先进的非病毒递送系统之一。LNP具有许多使其成为用于递送核酸的理想候选者的特性,包括易于制造、低细胞毒性和免疫原性、高效的核酸包封和细胞转染、多剂量能力和设计灵活性(Kulkarni等人,(2018)Nucleic Acid Therapeutics)。在一些实施方案中,LNP用于递送编码本文所述的可编程CasΦ核酸酶的核酸。在一些实施方案中,LNP用于递送编码指导核酸的核酸。在一些实施方案中,LNP用于递送编码可编程CasΦ核酸酶和指导核酸的核酸。在一些实施方案中,LNP具有在2和10之间、在3和10之间,或在5和9之间的氨基磷酸盐(N/P)比。在优选的实施方案中,LNP具有在5和9之间的N/P比。在更优选的实施方案中,LNP具有为5的N/P比。在一些实施方案中,LNP其他组分,例如核酸、蛋白质、肽、小分子、糖、脂质。

[0453] 在更优选的实施方案中,LNP具有4/5的N/P比。在优选的实施方案中,LNP包含编码可编程CasΦ核酸酶的核酸,并且LNP具有4/5的N/P比。

[0454] 靶核酸和样品

[0455] 大量样品与本文公开的组合物和方法相容。如本文所述,样品可用于本文公开的对靶核酸进行切口的方法。如本文所述,样品可用于本文公开的DETECTR测定方法。如本文所述,样品与本文公开的任何可编程核酸酶和所述可编程核酸酶在检测靶核酸的方法中的用途相容。如本文所述,样品与包含可编程核酸酶和缓冲液的任何组合物相容。本文所述的是含有脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或两者的样品,其可以使用本公开的可编程核酸酶进行修饰或检测。如本文所述,在指导核酸与靶核酸杂交后,可编程核酸酶在与样品中的目标靶核酸结合后被激活。随后,激活的可编程核酸酶在报告基因中表现出不依赖于序列的核酸切割。报告基因另外包含可检测部分,所述可检测部分在报告基因中的核酸发生不依赖于序列的切割时释放。可检测部分发出可检测信号,所述可检测信号可以通过多种方法(例如,分光光度法、荧光测量、电化学测量)测量。

[0456] 包含目标靶核酸的各种样品类型与本公开一致。这些样品可以包含用于检测的靶核酸序列。在一些实施方案中,靶核酸的检测表明病(诸如疾病、癌症或遗传病症)或遗传信息(诸如用于表型分析、基因分型或确定祖先),并且与如本文所述的试剂和支持介质相容。通常,可以获得来自个体或动物或环境的样品以测试疾病、癌症、遗传病症或任何目标突变的存在。来自个体的生物样品可以是血液、血清、血浆、唾液、尿液、粘膜样品、腹膜样品、脑脊液、胃分泌物、鼻腔分泌物、痰、咽部渗出物、尿道或阴道分泌物、渗出物、积液或组织。组织样品在应用于本公开的检测系统之前可以被解离或液化。来自环境的样品可以来自土壤、空气或水。在一些情况下,环境样品取为目标表面的拭子或直接取自目标表面。在一些情况下,将原始样品应用于检测系统。在一些情况下,样品在应用于检测系统之前用缓冲液或流体稀释或浓缩,或者直接应用于检测系统。有时,含有不超过20μl的样品。在一些情况下,含有不超过1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、200、300、400、500μl,或1μl至500μl的任何值,优选地10μL至200μL,或更优选地50μL至100μL的样品。有时,含有超过500μl的样品。

[0457] 在一些实施方案中,靶核酸是单链DNA。本文公开的方法、试剂、酶和试剂盒可以允

许直接检测编码目标序列的DNA，特别是编码目标序列的单链DNA，而无需将DNA转录成RNA，例如，通过使用RNA聚合酶。本文公开的组合物和方法可以允许检测靶核酸，即目标核酸的扩增核酸。在一些实施方案中，靶核酸是cDNA、基因组DNA、基因组DNA的扩增子或RNA的DNA扩增子。核酸可以编码来自基因组基因座的序列。在一些情况下，与指导核酸结合的靶核酸的长度为5至100、5至90、5至80、5至70、5至60、5至50、5至40、5至30、5至25、5至20、5至15或5至10个核苷酸。核酸的长度可以是10至90、20至80、30至70或40至60个核苷酸。核酸的长度可以是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、60、70、80、90或100个核苷酸。靶核酸可以编码与指导核酸序列反向互补的序列。

[0458] 在一些情况下，样品取自单细胞真核生物体；植物或植物细胞；藻类细胞；真菌细胞；动物细胞、组织或器官；来自无脊椎动物的细胞、组织或器官；来自脊椎动物(诸如鱼、两栖动物、爬行动物、鸟类和哺乳动物)的细胞、组织、体液或器官；来自哺乳动物(诸如人类、非人灵长类动物、有蹄类动物、猫科动物、牛、绵羊和山羊)的细胞、组织、体液或器官。在一些情况下，样品取自线虫、原生动物、蠕虫或疟原虫。在一些情况下，样品包含来自真核细胞、哺乳动物细胞、人类细胞、原核细胞或植物细胞的细胞裂解液的核酸。在一些情况下，样品包含从细胞表达的核酸。

[0459] 本文所述的样品可以包含至少一种靶核酸。靶核酸包含与指导核酸片段反向互补的片段。通常，样品包含靶核酸片段和至少一种与靶核酸片段具有至少50％的序列同一性的核酸。有时，所述至少一种核酸包含与靶核酸片段具有至少60％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性的片段。通常，样品包含靶核酸片段和至少一种与靶核酸具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50％的序列同一性的核酸片段。有时，样品包含靶核酸片段和至少一种与靶核酸具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于60％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性的核酸片段。例如，与至少一种包含与靶核酸片段具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50％的序列同一性的片段的核酸相比，靶核酸片段包含突变。有时，与至少一种包含与靶核酸片段具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于60％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性的片段的核酸相比，靶核酸片段包含突变。通常，与至少一种包含与靶核酸片段具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50％的序列同一性的片段的核酸相比，靶核酸片段包含突变。突变可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个核苷酸的突变。通常，突变是单核苷酸突变。单核苷酸突变可以是单核苷酸多态性(SNP)，其为少于1％的群体中存在的DNA序列中的单碱基对变异。有时，靶核酸包含单核苷酸突变，其中单核苷酸突变包括SNP的野生型变体。单核苷酸突变或SNP可以与样品的表型或从中获取样品的生物体的表型相关。在一些情况下，SNP与由野生型表型改变的表型相关。通常，与至少一种包含与靶核酸片段具有小于100％的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50％的序列同一性的片段的核酸相比，靶核酸序列片段包含缺失。突变可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个核苷酸的缺失。突变可以是约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约

95、约100、约200、约300、约400、约500、约600、约700、约800、约900或约1000个核苷酸的缺失。突变可以是1至5、5至10、10至15、15至20、20至25、25至30、30至35、35至40、40至45、45至50、50至55、55至60、60至65、65至70、70至75、75至80、80至85、85至90、90至95、95至100、100至200、200至300、300至400、400至500、500至600、600至700、700至800、800至900、900至1000、1至50、1至100、25至50、25至100、50至100、100至500、100至1000或500至1000个核苷酸的缺失。本文所述方法的指导核酸结合的靶核酸片段包含突变，诸如SNP或缺失。突变可以是单核苷酸突变或SNP。SNP可以是同义取代或非同义取代。非同义取代可以是错义取代或无义点突变。同义取代可以是无声取代。突变可以是一个或多个核苷酸的缺失。通常，单核苷酸突变、SNP或缺失与疾病诸如癌症或遗传病症有关。可以将突变(诸如单核苷酸突变、SNP或缺失)编码在来自生物体种系的靶核酸的序列中，或者编码在来自患病细胞(诸如癌细胞)的靶核酸中。

[0460] 用于疾病测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。用于疾病测试的样品可以至少包含被扩增以产生可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸的目标核酸。目标核酸可以包括DNA、RNA或其组合。

[0461] 靶核酸(例如，靶DNA)可以是来自导致样品中疾病的病毒或细菌或其他因子的核酸的一部分。靶核酸可以是来自在样品中的癌症或遗传病症中表达的基因的核酸的一部分。在一些情况下，序列是靶核酸序列的片段。靶核酸序列的片段可以来自基因组基因座、转录的mRNA或逆转录的cDNA。靶核酸序列片段的长度可以是5至100、5至90、5至80、5至70、5至60、5至50、5至40、5至30、5至25、5至20、5至15或5至10个核苷酸。靶核酸序列片段的长度可以是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、60、70、80、90或100个核苷酸。靶核酸片段的序列可以与指导核酸序列的片段反向互补。相对于标准样品，靶核酸可以包含与疾病表型或疾病易感性相关的遗传变异(例如，单核苷酸多态性)。靶核酸可以是RNA的一部分的扩增子，可以是DNA，或者可以是来自样品中任何生物体的DNA扩增子。

[0462] 在一些实施方案中，靶核酸序列包含导致样品中疾病的病毒或细菌的核酸序列或其他因子。在一些实施方案中，靶核酸包含在使用本文公开的组合物、系统和方法通过可编程核酸酶检测之前使用逆转录酶从RNA逆转录得到的DNA。在一些情况下，靶核酸是样品中来自性传播感染或传染病的核酸的一部分。在一些情况下，靶核酸是来自基因组基因座的核酸的一部分或任何DNA扩增子，诸如来自基因座的逆转录mRNA或cDNA、转录mRNA或来自以下至少一种中的基因座的逆转录cDNA：人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、衣原体、淋病、梅毒、滴虫病、性传播感染、疟疾、登革热、埃博拉、切昆贡亚热(chikungunya)和利什曼病(leishmaniasis)。病原体包括病毒、真菌、蠕虫、原生动物、疟原虫、疟原虫寄生虫(Plasmodium parasites)、弓形虫寄生虫和血吸虫寄生虫。蠕虫包括蛔虫、心丝虫和植食性线虫、吸虫、棘头虫和绦虫。原生动物感染包括来自贾第鞭毛虫属物种、毛滴虫属物种、非洲锥虫病、阿米巴痢疾(amoebic dysentery)、巴贝斯虫病(babesiosis)、结肠小袋纤毛虫痢疾(balantidial dysentery)、查加斯病(Chaga's disease)、球虫病、疟疾和弓形虫病的感染。病原体诸如寄生/原生动物病原体的实例包括但不限于：恶性疟原虫、间日疟原虫(P.vivax)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)和刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)。真菌病原体包括但不限于新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌、皮炎芽生菌、沙眼衣原体和白

色念珠菌。病原性病毒包括但不限于冠状病毒;免疫缺陷病毒(例如,HIV);流感病毒;登革热;西尼罗河病毒(West Nile virus);疱疹病毒;黄热病病毒;肝炎病毒C;肝炎病毒A;肝炎病毒B;乳头瘤病毒等。病原体包括,例如,HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产肝菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、生殖支原体(M.genitalium)、滴虫性阴道炎、水痘-带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人类T细胞白血病病毒、EB病毒(Epstein-Barr virus)、小鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德贝斯病毒(Sindbis virus)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus,)、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒(Sendai virus)、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、弓形虫、让氏锥虫(Trypanosoma rangeli)、克氏锥虫、罗得西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝斯虫、艾美球虫(Eimeria tenella)、盘尾丝虫、热带利什曼原虫(Leishmania tropica)、结核分枝杆菌、旋毛虫、小泰累尔梨浆虫(Theileria parva)、水泡绦虫、羊绦虫、牛绦虫、细粒棘球绦虫(Echinococcus granulosus)、中殖孔绦虫(Mesocestoides corti)、关节炎支原体、猪鼻支原体(M.hyorhinis)、口腔支原体、精氨酸支原体(M.arginini)、拉氏无胆甾原体(Acholeplasma laidlawii)、唾液支原体(M.salivarium)和肺炎支原体.在一些情况下,靶序列是来自基因组基因座的核酸的一部分、转录mRNA或来自导致样品中疾病的细菌或其他因子的基因座的逆转录cDNA,所述靶序列包含赋予对治疗的抗性的突变,诸如赋予对抗生素治疗的抗性的单核苷酸突变。在一些情况下,赋予对治疗的抗性的突变是缺失。

[0463] 本公开的组合物和方法可用于细胞系工程化改造(例如,工程化改造来自细胞系的细胞用于生物生产)。例如,本公开的组合物和方法可用于从细胞系表达所需蛋白质。在一些实施方案中,靶核酸序列包含细胞系的核酸序列。在一些实施方案中,靶核酸序列包含细胞系的基因组核酸序列。在一些实施方案中,细胞系是中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)、人胚肾细胞系(HEK)、来源于癌细胞的细胞系、来源于淋巴细胞的细胞系等。细胞系的非限制性实例包括:C8161、CCRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、CIR、Rat6、CV1、RPTE、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、Jurkat、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、Hep G2、HeLa B、HeLa T4、COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1猴肾上皮细胞、BALB/3T3小鼠胚胎成纤维细胞、3T3 Swiss、3T3-L1、132-d5人类胎儿成纤维细胞;10.1小鼠成纤维细胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、AsPC-1、B16、B35、BCP-1细胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、Capan-1、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-S、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HAP1、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1-6、Hep3B、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、Jurkat、JY细胞、K562

细胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Mel 1-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC 6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、Neuro2A、NK92、NW-145、OPCN/OPCT细胞系、Peer、PNT-1A/PNT 2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2细胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1细胞系、U373、U87、U937、VCaP、Vero细胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1和YAR。可用于本公开的其他细胞的非限制性实例包括免疫细胞，诸如CART、T细胞、B细胞、NK细胞(包括iNK细胞)、粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、抗原呈递细胞(APC)或适应性细胞。可用于本公开的细胞的非限制性实例还包括植物细胞，诸如薄壁组织、厚壁组织、厚角组织、木质部、韧皮部、种系(例如，花粉)。细胞可以来自石松类植物、蕨类植物、裸子植物、被子植物、苔藓植物、轮藻植物、绿藻、红藻或灰藻。细胞可以获得自非人类动物，包括但不限于大鼠、狗、兔、猫和猴。可用于本公开的细胞的非限制性实例还包括干细胞，诸如人类干细胞、动物干细胞、非来源于人类胚胎干细胞的干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞、多能干细胞细胞、诱导多能干细胞(iPS)、成体干细胞(somatic stem cell)、成体干细胞(adult stem cell)、造血干细胞、组织特异性干细胞。可以与本公开一起使用的细胞的非限制性实例还包括来自动物的各种器官(诸如脑、心脏、肺、肝、胰腺和肌肉)的神经元细胞。在优选的实施方案中，可用于本公开的细胞是T细胞，诸如CAR-T(CART)细胞。

[0464] CHO细胞是一种上皮细胞系，其在生物学和医学研究中特别有用。特别地，CHO细胞经常用于重组治疗剂的工业生产。在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在CHO细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在CHO细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑CHO细胞。在一些实施方案中，提供了经修饰的CHO细胞，其中所述CHO细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了CHO细胞，其中所述CHO细胞包含本文公开的CasΦ多肽。

[0465] T细胞是重要的治疗靶标。在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在T细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在T细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑T细胞。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰T细胞的PDCD1基因。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰T细胞的TRAC基因。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰T细胞的B2M基因。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰T细胞的PDCD1基因、T细胞的TRAC基因、T细胞的B2M基因或其组合。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰T细胞的PDCD1基因、TRAC基因和B2M基因。在一些实施方案中，提供了经修饰的T细胞，其中所述T细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了T细胞，其中所述T细胞包含本文公开的CasΦ多肽。

[0466] T细胞，也称为T淋巴细胞，通过T细胞受体(TCR)的表面表达可容易地鉴定。在一些实施方案中，T细胞包括一个或多个T细胞亚组，诸如CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群。在一些实施方案中，T细胞是CD4+细胞。在一些实施方案中，T细胞是CD8+T细胞。在一些实施方案中，T细胞群包含CD4+T细胞和CD8+T细胞。在一些实施方案中，T细胞包括TCR-T、Tscm或iT细胞。

[0467] CD4+和CD8+T细胞亚群包括幼稚T细胞、效应T细胞、记忆T细胞、幼T细胞、成熟T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞、α/βT细胞和δ/γT细胞。记忆T细胞的亚型

包括干细胞记忆T细胞、中心记忆T细胞、效应记忆T细胞和终末分化效应记忆T细胞。辅助性T细胞的亚型包括辅助性T细胞1、辅助性T细胞2、辅助性T细胞3、辅助性T细胞17、辅助性T细胞9、辅助性T细胞22和滤泡辅助性T细胞。在一些实施方案中，细胞是调节性T细胞(Treg)。

[0468] CART细胞是已被基因工程化改造以表达靶向特定抗原的独特嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。CART细胞是免疫治疗的重要靶标。在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在CART细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在CART细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑CART细胞。在一些实施方案中，提供了经修饰的CART细胞，其中所述CART细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了CART细胞，其中所述CART细胞包含本文公开的CasΦ多肽。

[0469] 还提供了修饰的干细胞和修饰干细胞的方法。在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑干细胞。在一些实施方案中，提供了经修饰的干细胞，其中干细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了干细胞，其中所述干细胞包含本文公开的CasΦ多肽。在一些实施方案中，经修饰的干细胞通过本文公开的方法获得或可获得。在一些实施方案中，提供了经修饰的干细胞，其中所述CART细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。

[0470] 诱导多能干细胞(iPSC)是由体细胞生成的多能干细胞。它们可以无限繁殖并在体内产生任何细胞类型。这些特性使iPSC成为用于研究人类疾病的有力工具，并为一系列医学病症的细胞治疗提供了有希望的前景。iPSC可以以患者特异性方式生成并用于自体移植，从而克服宿主免疫系统的排斥的并发症(Moradi等人(2019)，Stem Cell Research& Therapy)。

[0471] 在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在诱导多能干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在诱导多能干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑诱导多能干细胞。在一些实施方案中，提供了经修饰的诱导多能干细胞，其中诱导多能干细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了诱导多能干细胞，其中所述诱导多能干细胞包含本文公开的CasΦ多肽。在一些实施方案中，经修饰的诱导多能细胞通过本文公开的方法获得或可获得。

[0472] 造血干细胞(HSC)可通过标记物CD34鉴定。HSC是干细胞，其分化产生血细胞，诸如T和B淋巴细胞、红细胞、单核细胞和巨噬细胞。HSC是未来干细胞治疗的重要细胞，因为它们有潜力用于治疗遗传性血细胞疾病(Morgan等人(2017)，Cell Stem Cell)。

[0473] 在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽在造血干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在造血干细胞中表达。在一些实施方案中，本文公开的方法包括修饰或编辑造血干细胞。在一些实施方案中，提供了经修饰的造血干细胞，其中造血干细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中，提供了造血干细胞，其中所述造血干细胞包含本文公开的CasΦ多肽。在一些实施方案中，经修饰的造血干细胞通过本文公开的方法获得或可获得。

[0474] 本公开的组合物和方法可用于农业工程。例如，本公开的组合物和方法可用于赋予植物所需的性状。可以使用本公开对植物进行工程化改造以获得所需的生理学和农艺学特征。在一些实施方案中，靶核酸序列包含植物的核酸序列。在一些实施方案中，靶核酸序

列包含植物细胞的基因组核酸序列。在一些实施方案中，靶核酸序列包含植物细胞的细胞器核酸序列。在一些实施方案中，靶核酸序列包含植物细胞的叶绿体的核酸序列。

[0475] 所述植物可以是单子叶植物。所述植物可以是双子叶植物。双子叶植物的非限制性实例包括木兰目(Magniolales)、八角目(Illiciales)、樟目(Laurales)、胡椒目(Piperales)、马兜铃目(Aristochiales)、睡莲目(Nymphaeales)、毛茛目(Ranunculales)、罂粟目(Papeverales)、瓶子草目(Sarraceniaceae)、昆栏树目(Trochodendrales)、金缕梅目(Hamamelidales)、Eucomiales、塞子木目(Leitneriales)、杨梅目(Myricales)、壳斗目(Fagales)、木麻黄目(Casuarinales)、石竹目(Caryophyllales)、杠打目(Batales)、蓼目(Polygonales)、白花丹目(Plumbaginales)、五桠果目(Dilleniales)、山茶目(Theales)、锦葵目(Malvales)、荨麻目(Urticales)、玉蕊目(Lecythidales)、堇菜目(Violales)、杨柳目(Salicales)、白花菜目(Capparales)、欧石楠目(Ericales)、Diapensales、柿目(Ebenales)、报春花目(Primulales)、蔷薇目(Rosales)、豆目(Fabales)、川草目(Podostemales)、小二仙草目(Haloragales)、桃金娘目(Myrtales)、山茱萸目(Cornales)、山龙眼目(Proteales)、檀香目(Santales)、大花草目(Rafflesiales)、卫矛目(Celastrales)、大戟目(euphorbiales)、鼠李目(Rhamnales)、无患子目(Sapindales)、胡桃目(Juglandales)、牻牛儿苗目(Geraniales)、远志目(Polygalales)、伞形目(Umbellales)、龙胆目(Gentianales)、花葱目(Polemoniales)、唇形目(Lamiales)、车前目(Plantaginales)、玄参目(Scrophulariales)、桔梗目(Campanulales)、茜草目(Rubiales)、川续断目(Dipsacales)和菊目(Asterales)。

[0476] 单子叶植物的非限制性实例包括泽泻目(Alismatales)、水鳖目(Hydrocharitales)、茨藻目(Najadales)、霉草目(Triuridales)、鸭跖草目(Commelinales)、谷精草目(Eriocaulales)、帚灯草目(Restionales)、禾本目(Poales)、灯心草目(Juncales)、莎草目(Cyperales)、香蒲目(Typhales)、凤梨目(Bromeliales)、姜目(Zingiberales)、槟榔目(Arecales)、环花目(Cyclanthales)、露兜树目(Pandanales)、天南星目(Arales)、百合目(Lilliales)和兰目(Orchid ales)。植物可以属于这些目，例如，裸子植物、松目、银杏目、苏铁目、南洋杉目、柏木目和买麻藤目。

[0477] 植物的非限制性实例包括植物作物、水果、蔬菜、谷物、大豆、玉米、玉蜀黍、小麦、种子、番茄、水稻、木薯、甘蔗、南瓜、干草、马铃薯、棉花、大麻、烟草、开花植物、针叶树、裸子植物、蕨类植物、石松、角苔、地钱、苔藓、小麦、玉蜀黍、水稻、小米、大麦、番茄、苹果、梨、草莓、橙子、刺槐、胡萝卜、马铃薯、甜菜、山药、生菜、菠菜、向日葵、油菜籽、拟南芥、苜蓿、苋菜、苹果、杏、朝鲜蓟、白蜡树、芦笋、鳄梨、香蕉、大麦、豆类、甜菜、桦树、山毛榉、黑莓、蓝莓、西兰花、球芽甘蓝(Brussel's sprout)、卷心菜、油菜、哈密瓜、胡萝卜、木薯、花椰菜、雪松、谷物、芹菜、板栗、樱桃、大白菜、柑橘、小柑橘、三叶草、咖啡豆、玉米、棉花、豇豆、黄瓜、柏树、茄子、榆树、菊苣、桉树、茴香、无花果、冷杉、天竺葵、葡萄、葡萄柚、花生、地樱桃、铁杉(gum hemlock)、山核桃、羽衣甘蓝、猕猴桃、大头菜、落叶松、生菜、韭菜、柠檬、酸橙、刺槐、松树、铁线蕨、玉蜀黍、芒果、枫树、甜瓜、小米、蘑菇、芥菜、坚果、橡树、燕麦、油棕、秋葵、洋葱、橙子、观赏植物或花卉或树木、木瓜、棕榈、欧芹、防风草、豌豆、桃子、花生、梨、泥炭、胡椒、柿子、木豆、松树、菠萝、车前草、李子、石榴、马铃薯、南瓜、紫叶菊苣(radicchio)、萝卜、油菜籽、覆盆子、大米、黑麦、高粱、红花、黄华柳、大豆、菠菜、云杉、笋瓜(squash)、草莓、甜

菜、甘蔗、向日葵、红薯、甜玉米、柑橘、茶叶、烟草、番茄、树木、黑小麦、草坪草、芜菁、藤蔓、核桃、豆瓣菜、西瓜、小麦、山药、红豆杉和西葫芦。植物可以包括藻类。

[0478] 在一些实施方案中，靶核酸序列包含导致植物(例如，作物)中疾病的病毒或细菌或其他病原体的核酸序列。本公开的方法和组合物可用于治疗或检测植物中的疾病。例如，本公开的方法可用于靶向植物中的病毒核酸序列。本公开的可编程核酸酶(例如，CasΦ)可以切割病毒核酸。在一些实施方案中，靶核酸序列包含导致植物(例如，作物)中疾病的病毒或细菌或其他因子(例如，任何病原体)的核酸序列。在一些实施方案中，靶核酸包含在使用本文公开的组合物、系统和方法通过可编程核酸酶检测之前使用逆转录酶从RNA逆转录得到的DNA。在一些情况下，靶核酸是来自导致植物(例如，作物)中疾病的病毒或细菌或其他因子的核酸的一部分。在一些情况下，靶核酸是来自基因组基因座的核酸的一部分，或任何DNA扩增子，诸如来自导致植物(例如，作物)中疾病的病毒或细菌或其他因子(例如，任何病原体)中的基因座的逆转录的mRNA或cDNA、转录的mRNA或来自基因座的逆转录的cDNA。感染植物的病毒可以是RNA病毒。感染植物的病毒可以是DNA病毒。本公开可以被靶向的病毒的非限制性实例包括烟草花叶病毒(TMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯Y病毒(PVY)、花椰菜花叶病毒(CaMV)(RT病毒)、李痘病毒(PPV)、雀麦花叶病毒(BMV)和马铃薯X病毒(PVX)。

[0479] 用于癌症测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。在一些情况下，靶核酸包含含有与癌症相关的突变的基因、其过表达与癌症相关的基因、肿瘤抑制基因、癌基因、检查点抑制剂基因、与细胞生长相关的基因、与细胞代谢相关的基因，或与细胞周期相关的基因的一部分。有时，靶核酸编码癌症生物标记物，诸如前列腺癌生物标记物或非小细胞肺癌。在一些情况下，测定可用于检测可以预测肺癌的靶核酸中的“热点”。在一些情况下，靶核酸包含与血热相关的核酸的一部分。在一些情况下，靶核酸是来自基因组基因座的核酸的一部分、任何DNA扩增子、逆转录的mRNA的或来自以下至少一个的基因座的cDNA:ALK、APC、ATM、AXIN2、BAP1、BARD1、BLM、BMPR1A、BRCA1、BRCA2、BRIP1、CASR、CDC73、CDH1、CDK4、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CEBPA、CHEK2、CTNNA1、DICER1、DIS3L2、EGFR、EPCAM、FH、FLCN、GATA2、GPC3、GREM1、HOXB13、HRAS、KIT、MAX、MEN1、MET、MITF、MLH1、MSH2、MSH3、MSH6、MUTYH、NBN、NF1、NF2、NTHL1、PALB2、PDGFRA、PHOX2B、PMS2、POLD1、POLE、POT1、PRKAR1A、PTCH1、PTEN、RAD50、RAD51C、RAD51D、RB1、RECQL4、RET、RUNX1、SDHA、SDHAF2、SDHB、SDHC、SDHD、SMAD4、SMARCA4、SMARCB1、SMARCE1、STK11、SUFU、TERC、TERT、TMEM127、TP53、TSC1、TSC2、VHL、WRN和WT1。可以使用本文公开的组合物和方法探测前述基因座的任何区域的突变或缺失。例如，在EGFR基因座中，本文公开的用于检测的组合物和方法可用于检测单核苷酸多态性或缺失。SNP或缺失可以发生在非编码区域或编码区域。SNP或缺失可以发生在外显子诸如外显子19中。SNP、缺失或其他突变可以介导基因敲除。

[0480] 用于遗传病症测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。在一些实施方案中，遗传病症是血友病、镰状细胞性贫血、β-地中海贫血症、杜氏肌营养不良症、重症联合免疫缺陷、亨廷顿氏病或囊性纤维化。在一些情况下，靶核酸来自具有与遗传病症相关的突变的基因、来自其过表达与遗传病症相关的基因、来自与导致遗传病症的异常细胞生长相关的基因，或来自与导致遗传病症的异常细胞代谢相关的基因。在一些情况下，靶核酸是来自基因组基因座的核酸、转录mRNA或逆转录mRNA、DNA扩增子

或来自以下至少一个的基因座的cDNA:CFTR、FMR1、SMN1、ABCB11、ABCC8、ABCD1、ACAD9、ACADM、ACADVL、ACAT1、ACOX1、ACSF3、ADA、ADAMTS2、ADGRG1、AGA、AGL、AGPS、AGXT、AIRE、ALDH3A2、ALDOB、ALG6、ALMS1、ALPL、AMT、AQP2、ARG1、ARSA、ARSB、ASL、ASNS、ASPA、ASS1、ATM、ATP6V1B1、ATP7A、ATP7B、ATRX、BBS1、BBS10、BBS12、BBS2、BCKDHA、BCKDHB、BCS1L、BLM、BSND、CAPN3、CBS、CDH23、CEP290、CERKL、CHM、CHRNE、CIITA、CLN3、CLN5、CLN6、CLN8、CLRN1、CNGB3、COL27A1、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL7A1、CPS1、CPT1A、CPT2、CRB1、CTNS、CTSK、CYBA、CYBB、CYP11B1、CYP11B2、CYP17A1、CYP19A1、CYP27A1、DBT、DCLRE1C、DHCR7、DHDDS、DLD、DMD、DNAH5、DNAI1、DNAI2、DYSF、EDA、EIF2B5、EMD、ERCC6、ERCC8、ESCO2、ETFA、ETFDH、ETHE1、EVC、EVC2、EYS、F9、FAH、FAM161A、FANCA、FANCC、FANCG、FH、FKRP、FKTN、G6PC、GAA、GALC、GALK1、GALT、GAMT、GBA、GBE1、GCDH、GFM1、GJB1、GJB2、GLA、GLB1、GLDC、GLE1、GNE、GNPTAB、GNPTG、GNS、GRHPR、HADHA、HAX1、HBA1,、HBA2、HBB、HEXA、HEXB、HGSNAT、HLCS、HMGCL、HOGA1、HPS1、HPS3、HSD17B4、HSD3B2、HYAL1、HYLS1、IDS、IDUA、IKBKAP、IL2RG、IVD、KCNJ11、LAMA2、LAMA3、LAMB3、LAMC2、LCA5、LDLR、LDLRAP1、LHX3、LIFR、LIPA、LOXHD1、LPL、LRPPRC、MAN2B1、MCOLN1、MED17、MESP2、MFSD8、MKS1、MLC1、MMAA、MMAB、MMACHC、MMADHC、MPI、MPL、MPV17、MTHFR、MTM1、MTRR、MTTP、MUT、MYO7A、NAGLU、NAGS、NBN、NDRG1、NDUFAF5、NDUFS6、NEB、NPC1、NPC2、NPHS1、NPHS2、NR2E3、NTRK1、OAT、OPA3、OTC、PAH、PC、PCCA、PCCB、PCDH15、PDHA1、PDHB、PEX1、PEX10、PEX12、PEX2、PEX6、PEX7、PFKM、PHGDH、PKHD1、PMM2、POMGNT1、PPT1、PROP1、PRPS1、PSAP、PTS、PUS1、PYGM、RAB23、RAG2、RAPSN、RARS2、RDH12、RMRP、RPE65、RPGRIP1L、RS1、RTEL1、SACS、SAMHD1、SEPSECS、SGCA、SGCB、SGCG、SGSH、SLC12A3、SLC12A6、SLC17A5、SLC22A5、SLC25A13、SLC25A15、SLC26A2、SLC26A4、SLC35A3、SLC37A4、SLC39A4、SLC4A11、SLC6A8、SLC7A7、SMARCAL1、SMPD1、STAR、SUMF1、TAT、TCIRG1、TECPR2、TFR2、TGM1、TH、TMEM216、TPP1、TRMU、TSFM、TTPA、TYMP、USH1C、USH2A、VPS13A、VPS13B、VPS45、VRK1、VSX2、WNT10A、XPA、XPC和ZFYVE26。

[0481] 用于表型分析测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。在一些情况下,靶核酸是编码与表型性状相关的序列的核酸。

[0482] 用于基因分型测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。在一些情况下,靶核酸是编码与目标基因型相关的序列的核酸。

[0483] 用于祖先测试的样品可以包含至少一种可以与本文所述试剂的指导核酸结合的靶核酸。在一些情况下,靶核酸是编码与起源地理区域或族群相关的序列的核酸。

[0484] 样品可用于鉴定疾病状态。例如,样品是本文所述的任何样品,并且从受试者获得用于鉴定受试者的疾病状态。疾病可以是癌症或遗传病症。有时,方法包括从受试者获得血清样品;以及鉴定受试者的疾病状态。通常,疾病状态是前列腺疾病状态,但任何疾病的状态都可以被评估。

[0485] 在一些情况下,靶核酸是单链核酸。另选地或组合地,靶核酸是双链核酸并且在接触试剂之前或之后被制备为单链核酸。靶核酸可以是逆转录的RNA、DNA、DNA扩增子、合成核酸或在生物或环境样品中存在的核酸。靶核酸包括但不限于mRNA、rRNA、tRNA、非编码RNA、长链非编码RNA和微小RNA(miRNA)。在一些情况下,靶核酸是单链DNA(ssDNA)或mRNA。在一些情况下,靶核酸来自本文所述的病毒、寄生虫或细菌。在一些情况下,靶核酸从如本文所述的基因转录,然后被逆转录成DNA扩增子。在一些情况下,miRNA是使用mirVANA试剂盒提

取的。在一些情况下，可以用虾碱性磷酸酶处理RNA以去除RNA5'和3'端的磷酸盐以进行分析。RNA分析还可包括使用热循环仪、Illumina的SR衔接子、连接酶、逆转录酶和用于聚合酶链式反应的合适引物。

[0486] 多个靶核酸与本文公开的方法和组合物一致。本文所述的一些方法可以检测以各种浓度或量作为靶核酸群体存在于样品中的靶核酸。在一些情况下，样品具有至少2个靶核酸。在一些情况下，样品具有至少3、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10000个靶核酸。在一些情况下，样品具有1至10,000、100至8000、400至6000、500至5000、1000至4000或2000至3000个靶核酸。在一些情况下，方法检测每10个非靶核酸、10^2个非靶核酸、10^3个非靶核酸、10^4个非靶核酸、10^5个非靶核酸中、10^6个非靶核酸、10^7个非靶核酸、10^8个非靶核酸、10^9个非靶核酸或10^{10}个非靶核酸至少存在一个拷贝的靶核酸。通常，靶核酸可以是样品中总核酸的0.05％至20％。有时，靶核酸是样品中总核酸的0.1％至10％。在一些情况下，靶核酸是样品中总核酸的0.1％至5％。靶核酸也可以是样品中总核酸的0.1％至1％。靶核酸可以是DNA或RNA。靶核酸可以是小于样品中总核酸100％的任何量。靶核酸可以是样品中总核酸的100％。

[0487] 在一些实施方案中，样品包含浓度小于1nM、小于2nM、小于3nM、小于4nM、小于5nM、小于6nM、小于7nM、小于8nM、小于9nM、小于10nM、小于20nM、小于30nM、小于40nM、小于50nM、小于60nM、小于70nM、小于80nM、小于90nM、小于100nM、小于200nM、小于300nM、小于400nM、小于500nM、小于600nM、小于700nM、小于800nM、小于900nM、小于1μM、小于2μM、小于3μM、小于4μM、小于5μM、小于6μM、小于7μM、小于8μM、小于9μM、小于10μM、小于100μM或小于1mM的靶核酸。在一些实施方案中，样品包含浓度为1nM至2nM、2nM至3nM、3nM至4nM、4nM至5nM、5nM至6nM、6nM至7nM、7nM至8nM、8nM至9nM、9nM至10nM、10nM至20nM、20nM至30nM、30nM至40nM、40nM至50nM、50nM至60nM、60nM至70nM、70nM至80nM、80nM至90nM、90nM至100nM、100nM至200nM、200nM至300nM、300nM至400nM、400nM至500nM、500nM至600nM、600nM至700nM、700nM至800nM、800nM至900nM、900nM至1μM、1μM至2μM、2μM至3μM、3μM至4μM、4μM至5μM、5μM至6μM、6μM至7μM、7μM至8μM、8μM至9μM、9μM至10μM、10μM至100μM、100μM至1mM、1nM至10nM、1nM至100nM、1nM至1μM、1nM至10μM、1nM至100μM、1nM至1mM、10nM至100nM、10nM至1μM、10nM至10μM、10nM至100μM、10nM至1mM、100nM至1μM、100nM至10μM、100nM至100μM、100nM至1mM、1μM至10μM、1μM至100μM、1μM至1mM、10μM至100μM、10μM至1mM或100μM至1mM的靶核酸序列。在一些实施方案中，样品包含浓度为20nM至200μM、50nM至100μM、200nM至50μM、500nM至20μM或2μM至10μM的靶核酸。在一些实施方案中，靶核酸不存在于样品中。

[0488] 在一些实施方案中，样品包含少于10个拷贝、少于100个拷贝、少于1000个拷贝、少于10,000个拷贝、少于100,000个拷贝或少于1,000,000个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方案中，样品包含10个拷贝至100个拷贝、100个拷贝至1000个拷贝、1000个拷贝至10,000个拷贝、10,000个拷贝至100,000个拷贝、100,000个拷贝至1,000,000个拷贝、10个拷贝至1000个拷贝、10个拷贝至10,000个拷贝、10个拷贝至100,000个拷贝、10个拷贝至1,000,000个拷贝、100个拷贝至10,000个拷贝、100个拷贝至100,000个拷贝、100个拷贝至1,000,000个拷贝、1,000个拷贝至100,000个拷贝或1,000个拷贝至1,000,000个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方案中，样品包含10个拷贝至500,000个拷贝、200个拷贝至200,000个拷贝、500个拷贝至100,000个拷贝、1000个拷贝至50,000个拷贝、2000个拷贝至20,000个拷贝、3000

个拷贝至10,000个拷贝或4000个拷贝至8000个拷贝。在一些实施方案中,靶核酸不存在于样品中。

[0489] 多个靶核酸群体与本文公开的方法和组合物一致。本文所述的一些方法可以检测以各种浓度或量存在于样品中的两种或更多种靶核酸群体。在一些情况下,样品具有至少2个靶核酸群体。在一些情况下,样品具有至少3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50个靶核酸群体。在一些情况下,样品具有3至50、5至40或10至25个靶核酸群体。在一些情况下,方法检测每10^1个非靶核酸、10^2个非靶核酸、10^3个非靶核酸、10^4个非靶核酸、10^5个非靶核酸中、10^6个非靶核酸、10^7个非靶核酸、10^8个非靶核酸、10^9个非靶核酸或10^{10}个非靶核酸至少存在一个拷贝的靶核酸群体。靶核酸群体可以不同浓度或量存在于样品中。

[0490] 在一些实施方案中,如本文公开的靶核酸可以激活可编程核酸酶以启动序列非依赖性切割基于核酸的报告基因(例如,包含DNA序列的报告基因、包含RNA序列的报告基因或包含DNA和RNA的报告基因)。例如,本公开的可编程核酸酶被靶DNA激活以切割具有RNA的报告基因(本文也称为"RNA报告基因")。或者,本公开的可编程核酸酶被靶RNA激活以切割具有RNA的报告基因。或者,本公开的可编程核酸酶被靶DNA激活以切割具有DNA的报告基因(本文也称为"DNA报告基因")。RNA报告基因可以包含用检测部分标记的单链RNA或者可以是如本文公开的任何RNA报告基因。DNA报告基因可以包含用检测部分标记的单链DNA或者可以是如本文公开的任何DNA报告基因。

[0491] 在一些实施方案中,如本文方法中所述的靶核酸起初不包含PAM序列。然而,可以使用本文所述的方法生成任何目标靶核酸以包含PAM序列,因此成为PAM靶核酸。如本文所用,PAM靶核酸是指已经被扩增以插入被CRISPR/Cas系统识别的PAM序列的靶核酸。

[0492] 在一些实施方案中,靶核酸在细胞中。在一些实施方案中,细胞是单细胞真核生物体;植物细胞;藻类细胞;真菌细胞;动物细胞;来自无脊椎动物的细胞;来自脊椎动物(诸如鱼、两栖动物、爬行动物、鸟类和哺乳动物)的细胞;或者来自哺乳动物(诸如人类、非人灵长类动物、有蹄类动物、猫科动物、牛、绵羊和山羊)的细胞。在优选的实施方案中,细胞是真核细胞。在优选的实施方案中,细胞是哺乳动物细胞、人类细胞或植物细胞。

[0493] 任何以上公开的样品均与本文公开的方法、组合物、试剂、酶和试剂盒一致,并且可以用作本文公开的任何疾病的伴随诊断,或可用于试剂盒、护理点诊断或非处方诊断。

[0494] 修饰或编辑靶核酸序列的方法

[0495] 本公开提供了用于修饰或编辑靶核酸序列的组合物和方法。在一些实施方案中,靶核酸序列与(例如,至少部分引起)本文所述的疾病或病症相关,包括肝脏疾病或病症、眼部疾病或病症、囊性纤维化或肌肉疾病或病症。在一些实例中,靶核酸包含以下基因中的任何一个的至少一部分:DNMT1、HPRT1、RPL32P3、CCR5、FANCF、GRIN2B、EMX1、AAVS1、ALKBH5、CLTA、CDK11、CTNNB1、AXIN1、LRP6、TBK1、BAP1、TLE3、PPM1A、BCL2L2、SUFU、RICTOR、VPS35、TOP1、SIRT1、PTEN、MMD、PAQR8、H2AX、POU5F1、OCT4、SYS1、ARFRP1、TSPAN14、EMC2、EMC3、SEL1L、DERL2、UBE2G2、UBE2J1、HRD1、PCSK9、BAK1和CFTR。在一些实施方案中,靶核酸包含至少一部分PCSK9基因。在一些实施方案中,PCSK9基因包含与肝脏疾病或病症相关的突变。在一些实施方案中,靶核酸包含至少一部分BAK1基因。在一些实施方案中,BAK1基因包含与眼部疾病或病症相关的突变。在一些实施方案中,靶核酸包含至少一部分CFTR基因。在一些实施方案中,CFTR基因包含与囊性纤维化相关的突变。在一些实施方案中,CFTR基因包含δ

F508突变。本公开的组合物和方法可用于在靶核酸序列中引入位点特异性切割。位点特异性切割可以是双链切割。位点特异性切割可以是单链切割(例如切口)。修饰可以导致在靶核酸中引入突变(例如,点突变、缺失)。修饰可以导致去除核酸序列中的致病突变。本公开的方法可以靶向细胞基因组中的任何基因座。它们可以在靶核酸序列中生成点突变、缺失、无效突变或组织特异性突变。包含本公开的可编程核酸酶和指导核酸的复合物可用于生成基因敲除、基因敲入、基因编辑、基因标记或其组合。在一些实施方案中,可以使用凝胶电泳或核酸测序分析核酸酶诸如切割产物的活性。

[0496] 本文所述的方法(例如,将切口或双链断裂引入靶核酸的方法)可用于编辑或修饰靶核酸。修饰靶核酸的方法可以使用包含如本文所述的可编程核酸酶和gRNA的组合物。修饰靶核酸可包括切割靶核酸、删除靶核酸的一个或多个核苷酸、将一个或多个核苷酸插入靶核酸、使靶核酸的一个或多个核苷酸发生突变,或修饰(例如甲基化、去甲基化、脱氨基或氧化)靶核酸的一个或多个核苷酸中的一种或多种。

[0497] 在一些实施方案中,修饰靶核酸包括基因组编辑。基因组编辑可包括修饰基因组、染色体、质粒或细胞或生物体的其他遗传物质。在一些实施方案中,细胞或生物体的基因组、染色体、质粒或其他遗传物质在体内被修饰。在一些实施方案中,细胞或生物体的基因组、染色体、质粒或其他遗传物质在细胞中被修饰。在一些实施方案中,细胞或生物体的基因组、染色体、质粒或其他遗传物质在体外被修饰。例如,可以使用本文所述的组合物在体外修饰质粒并将其引入细胞或生物体中。在一些实施方案中,修饰靶核酸可包括从靶核酸中删除序列。例如,可以从靶核酸中去除突变序列或与疾病相关的序列。在一些实施方案中,修饰靶核酸可包括用第二序列替换靶核酸中的序列。例如,可以用缺少突变或与疾病无关的第二序列替换突变序列或与疾病相关的序列。在一些实施方案中,修饰靶核酸可包括将序列引入靶核酸。例如,可以将有益序列或可以减轻或消除疾病的序列插入靶核酸中。

[0498] 在一些实施方案中,本公开提供了用于编辑包含能够将双链断裂引入双链DNA(dsDNA)靶序列中的可编程核酸酶的靶核酸序列的方法和组合物。可编程核酸酶可以与靶向dsDNA中的特定目标区域的指导核酸偶联。双链断裂可以通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)进行修复和重新连接。因此,如本文所公开的能够引入双链断裂的可编程核酸酶可用于基因组编辑方法,例如,用于治疗疾病或病症的治疗应用,或用于农业应用。可以通过本文所述的方法和组合物治疗的此类疾病或病症包括肝脏疾病或病症、眼部疾病或病症、囊性纤维化或肌肉疾病或病症。本文公开的CasΦ可编程核酸酶可用于生成双链断裂的基因组编辑目的以切除DNA区域并随后将DNA区域(例如,供体DNA)引入切除区域。

[0499] 在一些实施方案中,本公开提供了用于修饰或编辑包含两种或更多种可编程切口酶的靶核酸序列的方法和组合物。例如,修饰靶核酸可包括在靶核酸中引入两个或更多个单链断裂。在一些实施方案中,可以通过使靶核酸与可编程切口酶和指导核酸接触来引入断裂。指导核酸可以与可编程切口酶结合并与靶核酸区域杂交,从而将可编程切口酶募集到靶核酸区域。可编程切口酶与指导核酸和靶核酸区域的结合可以激活可编程切口酶,并且可编程切口酶可以在靶核酸区域中引入断裂(例如,单链断裂)。在一些实施方案中,修饰靶核酸可包括在靶核酸的第一区域中引入第一断裂和在靶核酸的第二区域中引入第二断裂。例如,修饰靶核酸可包括使靶核酸和与第一可编程切口酶结合并与靶核酸的第一区域杂交的第一指导核酸和与第二可编程切口酶结合并与靶核酸的第二区域杂交的第二指导

核酸接触。第一可编程切口酶可以在靶核酸的第一区域的第一链中引入第一断裂，并且第二可编程切口酶可以在靶核酸的第二区域的第二链中引入第二断裂。在一些实施方案中，可以去除第一断裂和第二断裂之间的靶核酸片段，从而修饰靶核酸。在一些实施方案中，可以替换(例如，用插入序列)第一断裂和第二断裂之间的靶核酸片段，从而修饰靶核酸。

[0500] 本公开的方法可以使用HDR或NHEJ。切割靶基因组序列后，两种替代DNA修复机制之一可以恢复染色体完整性：非同源末端连接(NHEJ)，其可以生成一些DNA碱基对在切割位点的插入和/或缺失。或者，细胞可以采用同源定向修复(HDR)，其可以通过跨越切割位点的其他DNA模板(例如，供体)来纠正损伤。在一些情况下，本公开的方法使用微同源介导的末端连接(MMEJ)。

[0501] 本公开的方法和组合物可用于将供体多核苷酸插入靶核酸序列中。供体多核苷酸可以包含要整合到靶基因组基因座的核酸片段。供体多核苷酸可以包含一个或多个目标多核苷酸。供体多核苷酸可以包含一个或多个表达盒。表达盒可以包含目标供体多核苷酸、编码选择标记物的多核苷酸和/或报告基因和影响表达的调节组分。

[0502] 供体多核苷酸可以包含基因组核酸。基因组核酸可以来源于动物、小鼠、人类、非人类、啮齿动物、非人类、大鼠、仓鼠、兔、猪、牛、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类动物(例如狨猴、猕猴)、驯养哺乳动物或农业哺乳动物、鸟类、细菌、古细菌、病毒或任何其他目标生物体或其组合。供体多核苷酸可以是合成的。

[0503] 可以将任何合适尺寸的供体多核苷酸整合到基因组中。在一些实施方案中，整合到基因组中的供体多核苷酸长度为少于3、约3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500或超过500千碱基(kb)。在一些实施方案中，整合到基因组中的供体多核苷酸长度为至少约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500或超过500kb。在一些实施方案中，整合到基因组中的供体多核苷酸长度为多至约3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500或超过500kb。

[0504] 供体多核苷酸的侧翼可以是靶向载体上的位点特异性重组靶序列(例如，5'和3'同源臂)。同源臂的长度可以是约50至约1000bp。同源臂的长度可以是约400至约1000bp。同源臂可以是足以促进与相应靶位点的同源重组事件的任何长度，包括例如约400bp至约500bp、约500bp至约600bp、约600bp至约700bp、约700bp至约800bp、约800bp至约900bp、或约900bp至约1000bp。在优选的实施方案中，同源臂的长度可以为约200至约300bp。5'和3'同源臂的总和可以为约0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、约0.5kb至约1kb、约1kb至约1.5kb、约1.5kb至约2kb、约2kb至约3kb、约3kb至约4kb、约4kb至约5kb、约5kb至约6kb、约6kb至约7kb、约8kb至约9kb，或至少为10kb。

[0505] 在一些实施方案中，供体多核苷酸在核碱基之间包含一个或多个硫代磷酸酯键。在一些实施方案中，供体多核苷酸的前五个5'核碱基中的一个或多个通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中，供体多核苷酸3'端的五个核碱基中的一个或多个通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中，供体多核苷酸的前三个5'核碱基中的一个或多个通过硫代磷

酸酯键连接。在一些实施方案中，供体多核苷酸3'端的三个核碱基中的一个或多个通过硫代磷酸酯键连接。在优选的实施方案中，供体多核苷酸5'端的两个核碱基通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中，供体多核苷酸3'端的两个核碱基通过硫代磷酸酯键连接。在更优选的实施方案中，供体多核苷酸5'端的两个核碱基通过硫代磷酸酯键连接并且供体多核苷酸3'端的两个核碱基通过硫代磷酸酯键连接。

[0506] 可以使用的位点特异性重组酶的实例包括但不限于Cre、Flp和Dre重组酶。可以通过任何方式将位点特异性重组酶引入细胞，包括通过将重组酶多肽引入细胞或通过将编码位点特异性重组酶的多核苷酸引入宿主细胞。编码位点特异性重组酶的多核苷酸可以位于插入多核苷酸内或单独的多核苷酸内。位点特异性重组酶可以可操作地连接至在细胞中有活性的启动子，包括例如诱导型启动子、细胞内源性启动子、细胞异源性启动子、细胞特异性启动子、组织特异性启动子，或发育阶段特异性启动子。可以侧接插入多核苷酸或插入多核苷酸中的任何目标多核苷酸的位点特异性重组靶序列可以包括但不限于loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attp、att、FRT、rox及其组合。

[0507] 靶核酸可以包含基因组、染色体、质粒、基因、启动子、非翻译区域、开放阅读框、内含子、外显子或操纵子中的一个或多个。靶核酸可以包含基因组、染色体、质粒、基因、启动子、非翻译区域、开放阅读框、内含子、外显子或操纵子中的一个或多个的片段。在一些实施方案中，靶核酸可以是细胞或生物体的部分。在一些实施方案中，靶核酸可以是无细胞遗传组分。

[0508] 在一些实施方案中，基因修饰或基因编辑是通过将可编程核酸酶(诸如CasΦ蛋白)与异源序列融合来实现的。异源序列可以是合适的融合伴侣，例如通过作用于靶核酸序列提供重组酶活性的多肽。在一些实施方案中，融合蛋白包含可编程核酸酶，诸如通过接头与异源序列融合的CasΦ蛋白。

[0509] 异源序列或融合伴侣可以是位点特异性重组酶。位点特异性重组酶可以具有重组酶活性。可以使用的位点特异性重组酶的实例包括但不限于Cre、Hin、Tre和FLP重组酶。异源序列或融合伴侣可以是重组酶催化结构域。重组酶催化结构域可以来自例如酪氨酸重组酶、丝氨酸重组酶、Gln重组酶、Hin重组酶、β重组酶、Sin重组酶、Tn3重组酶、γδ重组酶、Cre重组酶、FLP重组酶或phC31整合酶。

[0510] 异源序列或融合伴侣可以融合到可编程核酸酶的C端、N端或内部部分(例如，N端或C端以外的部分)，例如死CasΦ多肽。

[0511] 异源序列或融合伴侣可以通过接头与可编程核酸酶融合。接头可以是肽接头或非肽接头。在一些实施方案中，接头是XTEN接头。在一些实施方案中，接头包含一个或多个重复的三肽GGS。在一些实施方案中，接头的长度为1至100个氨基酸。在一些实施方案中，接头的长度为多于100个氨基酸。在一些实施方案中，接头的长度为10至27个氨基酸。非肽接头可以是聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、共聚(乙烯/丙烯)乙二醇、聚氧乙烯(POE)、聚氨酯、聚磷腈、多糖、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯乙醚、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、脂质聚合物、几丁质、透明质酸、肝素或烷基接头。

[0512] 在一些实施方案中，CasΦ蛋白可以包含与具有重组酶活性的多肽组合(例如，融合)的酶促失活的和/或“死的”(缩写为“d”)可编程核酸酶。尽管可编程CasΦ核酸酶通常具有核酸酶活性，但在一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶没有核酸酶活性。

[0513] 可编程核酸酶可以包含野生型对应物的经修饰形式。野生型对应物的经修饰形式可以包含降低可编程核酸酶的核酸切割活性的氨基酸变化(例如,缺失、插入或取代)。例如,CasΦ多肽的核酸酶结构域(例如,RuvC结构域)可以被删除或突变,使得其不再有功能性或具有降低的核酸酶活性。可编程核酸酶的经修饰形式可以具有少于90%、少于80%、少于70%、少于60%、少于50%、少于40%、少于30%、少于20%、少于10%、少于5%或少于1%的野生型对应物的核酸切割活性。可编程核酸酶的经修饰形式可以没有实质性的核酸切割活性。当可编程核酸酶是没有实质性核酸切割活性的经修饰形式时,它可以被称为酶促失活的和/或死的。死的CasΦ多肽(例如,dCasΦ)可以与靶核酸序列结合,但可能不会切割靶核酸序列。dCasΦ多肽可以与指导核酸缔合以激活或抑制靶核酸序列的转录。

[0514] 在一些实施方案中,可编程核酸酶是死的CasΦ多肽。死的CasΦ多肽可以与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,可编程核酸酶是死的CasΦ多肽,其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少85%的序列同一性。在一些实施方案中,可编程核酸酶是死的CasΦ多肽,其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少90%的序列同一性。在一些实施方案中,可编程核酸酶是死的CasΦ多肽,其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少95%的序列同一性。在一些实施方案中,可编程核酸酶是死的CasΦ多肽,其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少98%的序列同一性。

[0515] 死的CasΦ(本文也称为"dCasΦ")多肽可以与指导核酸形成核糖核蛋白复合物。指导核酸可以包含与SEQ ID NO:48-SEQ ID NO:86中的任何一个具有至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%或至少99%或100%的序列同一性的crRNA序列,或其反向互补序列。

[0516] 酶促失活可以指可以以序列特异性方式与多核苷酸中的核酸序列结合,但可能不切割靶多核苷酸的多肽。酶促失活的定点多肽可以包含酶促失活的结构域(例如可编程核酸酶结构域)。酶促失活可以指无活性。酶促失活可以指实质上无活性。酶促失活可以指基本上无活性。酶促失活可以指与野生型示例性活性(例如,核酸切割活性、野生型CasΦ活性)相比,活性少于1%、少于2%、少于3%、少于4%、少于5%、少于6%、少于7%、少于8%、少于9%或少于10%。

[0517] 在进一步的实施方案中,提供了修饰细胞的方法。在一些实施方案中,提供了一种修饰包含靶核酸的细胞的方法,其中所述方法包括将本文公开的可编程CasΦ核酸酶或其变体引入细胞,其中可编程CasΦ核酸酶或变体切割或修饰靶核酸。

[0518] 提供了通过本文所述的方法获得或可获得的修饰细胞。在一些实施方案中,经修饰的细胞是通过本文公开的修饰细胞的方法获得或可获得的。

[0519] 在一些实施方案中,本文公开的CasΦ多肽在细胞中表达。在一些实施方案中,本文公开的与指导核酸复合的CasΦ多肽在细胞中表达。在一些实施方案中,本文公开的方法包括修饰或编辑细胞。在一些实施方案中,提供了经修饰的细胞,其中所述细胞被本文公开的CasΦ多肽修饰。在一些实施方案中,提供了细胞,其中所述细胞包含本文公开的CasΦ多

肽。

[0520] 对靶核酸进行切口的方法

[0521] 本文公开了将断裂引入靶核酸的方法。在一些实施方案中，断裂可以是单链断裂(例如，切口)。本文公开的可编程切口酶和本文公开的gRNA可用于将单链断裂引入靶核酸，例如双链DNA中的单链断裂。

[0522] 将断裂引入靶核酸的方法可包括使靶核酸与第一指导核酸(例如，包含与第一可编程切口酶结合的区域的指导核酸)和第二指导核酸(例如，包含与第二可编程切口酶结合的区域的指导核酸)接触。第一指导核酸可以包含与靶核酸结合的附加区域，并且第二指导核酸可以包含与靶核酸结合的附加区域。第一指导核酸的附加区域和第二指导核酸的额外区域可以与靶核酸的相反链结合。

[0523] 在一些实施方案中，本公开的可编程切口酶可以切割双链靶核酸(例如，DNA)的非靶链。在一些实施方案中，可编程切口酶可以不切割双链靶核酸(例如，DNA)的靶链。与指导核酸互补并杂交的双链靶核酸链可以称为靶链。与靶链互补且因此不与指导核酸互补的双链靶DNA的链可以称为非靶链。

[0524] 包含可编程核酸酶和指导核酸的核糖核蛋白(RNP)复合物形成的温度(即RNP复合温度)可以影响可编程核酸酶的切口酶活性。例如，在室温下形成的RNP复合物比在37℃下形成的RNP复合物具有更强的切口酶活性。在一些情况下，RNP复合物可以在室温(例如，从20℃至22℃)下形成。在一些情况下，RNP复合物可以在例如约15℃、约16℃、约17℃、约18℃、约19℃、约20℃、约21℃、约22℃、约23℃、约24℃或约25℃下形成。

[0525] 在一些实施方案中，当在室温下与指导RNA复合时，可编程核酸酶可以表现出与在37℃下复合时相比强至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.1倍、至少约2.2倍、至少约2.3倍、至少约2.4倍、至少约2.5倍、至少约2.6倍、至少约2.7倍、至少约2.8倍、至少约2.9倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍或至少约50倍的切口活性。

[0526] 指导核酸的crRNA重复序列可以影响可编程核酸酶的切口酶活性。例如，当与包含某些crRNA重复序列的指导核酸复合时，可编程核酸酶可以包含增强的或更强的切口酶活性。例如，如表2所示，当与包含CasΦ.18的crRNA重复序列的指导RNA复合时，可编程核酸酶可以具有更强的切口酶活性。在另一个实例中，如表2所示，当与包含CasΦ.7的crRNA重复序列的指导RNA复合时，可编程核酸酶可以具有更强的切口酶活性。在一些实施方案中，当与包含特异性crRNA重复序列的指导RNA复合时，可编程核酸酶可以表现出和与包含另一crRNA重复序列的指导RNA复合时相比强至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.1倍、至少约2.2倍、至少约2.3倍、至少约2.4倍、至少约2.5倍、至少约2.6倍、至少约2.7倍、至少约2.8倍、至少约2.9倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍或至少约50倍的切口活性。

[0527] 本文公开的可编程核酸酶可以表现出顺式切割活性或靶向切割活性。靶向切割活

性可以指可编程核酸酶对靶核酸的切割。在一些情况下，顺式切割活性导致靶核酸中的双链断裂。在一些情况下，顺式切割活性导致靶核酸中的单链断裂。在一些情况下，顺式切割活性在靶核酸中产生双链和单链断裂的混合物。在其他情况下，顺式切割双链和单链断裂形成的速率可能取决于指导核酸的序列。在一些情况下，顺式切割双链和单链断裂形成的比率可能取决于指导核酸的序列。在一些情况下，顺式切割双链和单链断裂形成的比率或速率可能取决于指导核酸的crRNA的重复序列。在一些情况下，顺式切割双链和单链断裂形成的比率或速率可能取决于包含可编程核酸酶和指导核酸的核糖核蛋白复合物复合时的温度。

[0528] 与双链切割活性相比，用于修饰靶核酸的可编程核酸酶可以具有更强的切口活性。在一些实施方案中，与双链切割活性相比，可编程核酸酶可以表现出强至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.1倍、至少约2.2倍、至少约2.3倍、至少约2.4倍、至少约2.5倍、至少约2.6倍、至少约2.7倍、至少约2.8倍、至少约2.9倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍或至少约50倍的切口活性。

[0529] 在其他情况下，与切口活性相比，用于修饰靶核酸的可编程核酸酶可以具有更强的双链切割活性。在一些实施方案中，与切口活性相比，可编程核酸酶可以表现出强至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.1倍、至少约2.2倍、至少约2.3倍、至少约2.4倍、至少约2.5倍、至少约2.6倍、至少约2.7倍、至少约2.8倍、至少约2.9倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍或至少约50倍的双链切割活性。

[0530] 在一些实施方案中，可编程核酸酶的切口活性和双链切割活性取决于含有可编程核酸酶的样品中存在的条件和种类。在一些情况下，可编程核酸酶的切口活性和双链切割活性响应于指导核酸中存在的crRNA的序列。在一些情况下，可以通过改变存在的crRNA序列来调控切口活性和双链切割活性的比率。在一些情况下，可编程核酸酶的切口活性和双链切割活性对温度(例如，RNP复合温度)、pH、克分子渗透压浓度、缓冲液、靶核酸浓度、离子强度和抑制剂浓度的变化有不同的反应。在一些实施方案中，可以通过调整样品条件和crRNA序列来主动控制可编程核酸酶的切口活性与切割活性的比率。

[0531] 调节基因表达的方法

[0532] 在一些实施方案中，本公开提供了用于调节基因表达的方法和组合物。方法和组合物可以包括使用与具有转录调节活性的多肽组合(例如，融合)的酶促失活的和/或“死的”(缩写为“d”)可编程核酸酶。尽管可编程CasΦ核酸酶通常具有核酸酶活性，但在一些实施方案中，可编程CasΦ核酸酶没有核酸酶活性。

[0533] 可编程核酸酶可以包含野生型对应物的经修饰形式。野生型对应物的经修饰形式可以包含降低可编程核酸酶的核酸切割活性的氨基酸变化(例如，缺失、插入或取代)。例如，CasΦ多肽的核酸酶结构域(例如，RuvC结构域)可以被删除或突变，使得其不再有功能

性或具有降低的核酸酶活性。可编程核酸酶的经修饰形式可以具有少于90％、少于80％、少于70％、少于60％、少于50％、少于40％、少于30％、少于20％、少于10％、少于5％或少于1％的野生型对应物的核酸切割活性。可编程核酸酶的经修饰形式可以没有实质性的核酸切割活性。当可编程核酸酶是没有实质性核酸切割活性的经修饰形式时，它可以被称为酶促失活的和/或死的。死的CasΦ多肽(例如，dCasΦ)可以与靶核酸序列结合，但可能不会切割靶核酸序列。dCasΦ多肽可以与指导核酸缔合以激活或抑制靶核酸序列的转录。

[0534] 在一些实施方案中，本公开提供选择性调控细胞中的基因转录的方法。方法可以包括向细胞中引入：(i)融合多肽，其包含dCasΦ多肽和具有转录调节活性的多肽，或包含编码融合多肽的核苷酸序列的核酸，其中dCasΦ多肽是酶促失活的或表现出减少的核酸切割活性；ii)指导核酸，或包含编码指导核酸的核苷酸序列的核酸。

[0535] 在一些实施方案中，可编程核酸酶是死的CasΦ多肽。死的CasΦ多肽可以与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，可编程核酸酶是死的CasΦ多肽，其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO.105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少85％的序列同一性。在一些实施方案中，可编程核酸酶是死的CasΦ多肽，其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少90％的序列同一性。在一些实施方案中，可编程核酸酶是死的CasΦ多肽，其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少95％的序列同一性。在一些实施方案中，可编程核酸酶是死的CasΦ多肽，其与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO 105和SEQ ID NO 107中的任何一个具有至少98％的序列同一性。

[0536] 死的CasΦ(本文也称为“dCasΦ”)多肽可以与指导核酸形成核糖核蛋白复合物。指导核酸可以包含与SEQ ID NO:48-SEQ ID NO:86中的任何一个具有至少70％、至少80％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％或至少99％或100％的序列同一性的crRNA序列，或其反向互补序列。

[0537] 酶促失活可以指可以以序列特异性方式与多核苷酸中的核酸序列结合，但可能不切割靶多核苷酸的多肽。酶促失活的定点多肽可以包含酶促失活的结构域(例如可编程核酸酶结构域)。酶促失活可以指无活性。酶促失活可以指实质上无活性。酶促失活可以指基本上无活性。酶促失活可以指与野生型示例性活性(例如，核酸切割活性、野生型CasΦ活性)相比，活性少于1％、少于2％、少于3％、少于4％、少于5％、少于6％、少于7％、少于8％、少于9％或少于10％。

[0538] 转录调控可以通过将可编程核酸酶(诸如死的CasΦ蛋白)融合到异源序列来实现。异源序列可以是合适的融合伴侣，例如，通过作用于靶核酸序列或与靶核酸序列相关的多肽来(例如，组蛋白或其他DNA结合蛋白)提供增加、降低或以其他方式调节转录的活性的多肽。合适的融合伴侣的非限制性实例包括提供转录激活活性、转录抑制活性、核酸酶活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、组蛋白乙酰转移酶活性、核酸结合活性、DNA甲基化酶活性、直接或间接DNA脱甲基酶活性、甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷化活性、脱氨酶活性、去腺苷化活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆

蔻酰化活性或去豆蔻酰化活性的多肽。

[0539] 融合多肽进行的示例性修饰可以包括甲基化、去甲基化、乙酰化、去乙酰化、泛素化、去泛素化、脱氨基、烷基化、脱嘌呤、氧化、嘧啶二聚体形成、转位、重组、链延长、连接、糖基化。磷酸化、去磷酸化、腺苷化、去腺苷化、SUMO化、去SUMO化、核糖基化、去核糖基化、豆蔻酰化、重塑、切割、氧化还原、水解或异构化。

[0540] 异源序列或融合伴侣可以融合到可编程核酸酶的C端、N端或内部部分(例如,N端或C端以外的部分),例如死CasΦ多肽。融合伴侣的非限制性实例包括转录激活因子、转录抑制因子、组蛋白赖氨酸甲基转移酶(KMT)、组蛋白赖氨酸去甲基化物、组蛋白赖氨酸乙酰转移酶(KAT)、组蛋白赖氨酸去乙酰酶、DNA甲基化酶(腺苷或胞嘧啶修饰)、脱氨酶、CTCF、外周募集元件(例如,Lamin A、Lamin B)和蛋白质对接元件(例如,FKBP/FRB)。

[0541] 转录激活因子的非限制性实例包括GAL4、VP16、VP64和p65子结构域(NFkappaB)。

[0542] 转录抑制因子的非限制性实例包括Kruippel相关盒(KRAB或SKD)、Mad mSIN3相互作用结构域(SID)和ERF抑制因子结构域(ERD)。

[0543] 组蛋白赖氨酸甲基转移酶(KMT)的非限制性实例包括来自KMT1家族的成员(例如,SUV39H1、SUV39H2、G9A、ESET/SETDB1、Clr4、Su(var)3-9)、KMT2家族成员(例如,hSET1A、hSET1 B、MLL 1至5、ASH1和同系物(Trx、Trr、Ash1))、KMT3家族(SYMD2、NSD1)、KMT4(DOT1L和同系物)、KMT5家族(Pr-SET7/8、SUV4-20H1和同系物)、KMT6(EZH2)和KMT8(例如,RIZ1)。

[0544] 组蛋白赖氨酸去甲基化物(KDM)的非限制性实例包括来自KDM1家族的成员(LSD1/BHC110、Splsd1/Swm1/Saf11 0、Su(var)3-3)、KDM3家族(JHDM2a/b)、KDM4家族(JMJD2A/JHDM3A、JMJD2B、JMJD2C/GASC1、JMJD2D和同系物(Rph1))、KDM5家族(JARID1A/RBP2、JARID1B/PLU-1、JARIDIC/SMCX、JARID1D/SMCY和同系物(Lid、Jhn2、Jmj2))和KDM6家族(例如UTX、JMJD3)。

[0545] KAT的非限制性示例包括KAT2家族成员(hGCN5、PCAF和同系物(dGCN5/PCAF、Gcn5)、KAT3家族(CBP、p300和同系物(dCBP/NEJ))、KAT4、KAT5、KAT6、KAT7、KAT8和KAT13。

[0546] 在一些实施方案中,本公开提供了用于增加靶核酸序列转录的方法。与靶核酸序列在不存在包含酶促失活或酶促降低的可编程核酸酶(例如,死的CasΦ蛋白)的融合多肽的情况下的转录水平相比,靶核酸序列的转录可以增加至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约12倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约50倍、至少约70倍或至少约100倍。

[0547] 在一些实施方案中,本公开提供了用于减少靶核酸序列转录的方法。与靶核酸序列在不存在包含酶促失活或酶促降低的可编程核酸酶(例如,死的Cas 12j蛋白)的融合多肽的情况下的转录水平相比,靶核酸序列的转录可以增加至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约1.9倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约12倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约50倍、至少约70倍或至少约100倍。

[0548] 治疗病症的方法

[0549] 本文所述的组合物和方法可用于治疗、预防或抑制受试者的病。所述病可包括疾病、癌症、遗传病症、瘤形成和感染。在一些情况下，用于治疗的疾病或病症是肝脏疾病或病症、眼部疾病或病症、囊性纤维化或肌肉疾病或病症。在一些实施方案中，病与一个或多个遗传序列相关，包括单不限于11-羟化酶缺乏症;17,20-碳链酶缺乏症;17-羟化酶缺乏症;3-羟基异丁酸尿症;3-羟甾类脱氢酶缺乏症;46,XY性腺发育不全;AAA综合征;ABCA3缺乏症;ABCC8相关高胰岛素血症;无铜蓝蛋白血症;2型软骨成长不全;肢端皮肤剥脱综合征;肠病性肢端皮炎;肾上腺皮质微结节增生;肾上腺脑白质营养不良;肾上腺脊髓神经病;Aicardi-Goutieres综合征;Alagille病;阿尔珀斯氏综合征(Alpers syndrome);α-甘露糖苷贮积症;阿尔施特伦综合征(Alstrom syndrome);阿尔茨海默病;釉质生长不全;阿米什型小头畸形(amish type microcephaly);肌萎缩侧索硬化症(ALS);厌食性发育不良;雄激素不敏感综合征;Antley-Bixler综合征;APECED;Apert综合征;泪腺和唾液腺发育不全;精氨酸血症;致心律失常性右心室发育不良;Arts综合征;ARVD2;芳基硫酸酯酶缺乏型异染性狼疮病;共济失调毛细血管扩张症;自身免疫性淋巴增生综合征;1型自身免疫性多腺体综合征;常染色体显性无汗性外胚层发育不良;常染色体显性多囊肾病;常染色体隐性小症;常染色体显性肾性糖尿;常染色体内脏异位症;巴德毕氏综合征(Bardet-Biedl syndrome)、巴特综合征(Bartter syndrome)、基底细胞痣综合征、巴顿病(Batten disease);良性复发性肝内胆汁淤积症;β甘露糖苷贮积症;Bethlem肌病;布-戴二氏贫血综合征(Blackfan-Diamond anemia);睑裂狭小;拜勒病(Byler disease);C综合征;CADASIL;氨甲酰磷酸合成酶缺乏症;心-面-皮肤综合征;Carney三联征;肉碱棕榈酰转移酶缺陷;软骨毛发发育不良;cblC型合并甲基丙二酸尿症;CD18缺陷;CD3Z相关原发性T细胞免疫缺陷;CD40L缺陷;CDAGS综合征;CDG1A;CDG1B;CDG1M;CDG2C;CEDNIK综合征;中央轴肌病;中央核肌病;脑毛细血管畸形;4型脑-脊髓-骨骼综合征;脑-脑-骨骼综合征(cerebrooculogacioskeletal syndrome);脑腱黄瘤病;CHARGE联合征;颌骨增大症;CHILD综合征;慢性肉芽肿病;慢性复发性多灶性骨髓炎;希特林蛋白缺乏症(citrin deficiency);经典血色病;CNPPB综合征;钴胺素C病;科凯恩综合征(Cockayne syndrome);辅酶Q10缺乏症;科-洛二氏综合征(Coffin-Lowry syndrome);Cohen综合征;凝血因子V联合缺乏症;普通可变性免疫缺陷;完全性雄激素不敏感;锥杆营养不良;构象性疾病;1型先天性胆管合成缺陷;2型先天性胆管合成缺陷;胆汁酸合成型先天缺陷;先天性红细胞生成性卟啉病;先天性全身骨硬化;德朗热综合征(Cornelia de Lange syndrome);Cousin综合征;考登病(Cowden disease);COX缺陷症;科-纳二氏病(Crigler-Najjar disease);1型科-纳二氏综合征(Crigler-Najjar syndrome type 1);Crisponi综合征;Currarino综合征;克斯-麦克林型鱼鳞病(Curth-Macklin type ichthyosis hystrix);皮肤松弛;囊性纤维化;胱氨酸贮积症(cystinosis);d-2-羟基戊二酸尿症;DDP综合征;肥大性间质性多发性神经病;Denys-Drash综合征;结蛋白心肌病;结蛋白肌病;DGUOK相关线粒体DNA缺失;谷氨酸代谢紊乱;5型脊髓远端肌萎缩;DNA修复疾病;显性视神经萎缩;多英蜂窝状视网膜营养不良(Doyne honeycomb retinal dystrophy);杜氏肌营养不良;先天性角化不良(Duchenne muscular dystrophy);4型埃-当氏综合征(Ehlers-Danlos syndrome type 4);埃-当氏综合征;埃莱哈尔德病(Elejalde disease);埃利伟氏病(Ellis-van Creveld disease);埃默里-德赖弗斯肌营养不良(Emery-Dreifuss muscular dystrophy);脑肌病

mtDNA耗竭综合征;酶促疾病;EPCAM相关先天性簇状肠病;大疱性表皮松解症伴幽门闭锁;运动性低血糖;面肩肱型肌营养不良;费萨拉巴德组织细胞增生症(Faisalabad histiocytosis);家族性非典型分枝杆菌病;家族性毛细血管畸形动静脉;家族性食管失弛缓症;家族性肾小球静脉畸形;家族性噬血细胞性淋巴组织细胞病;家族性地中海热;家族性巨萼;家族性神经鞘瘤病;家族性脊柱裂;家族性脾闭锁/发育不全;家族性血栓性血小板减少性紫癜;范科尼病(Fanconi disease);Feingold综合征;FENIB;进行性骨化性纤维发育不良;FKTN;弗朗索瓦尼滕斯斑点角膜营养不良(Francois-Neetens fleck corneal dystrophy);弗雷泽综合征(Frasier syndrome);弗里德里希共济失调(Friedreich ataxia);FTDP-17;岩藻糖苷贮积症;G6PD缺乏症;半乳糖唾液症;加洛韦综合征(Galloway syndrome);加德纳综合征(Gardner syndrome);戈谢病(Gaucher disease);吉特曼综合征(Gitelman syndrome);GLUT1缺乏症;1b型糖原累积病;2型糖原累积病;3型糖原累积病;4型糖原累积病;9a型糖原累积病;糖原累积性疾病;GM1-神经节苷脂病;格林伯格综合征(Greenberg syndrome);格雷格头多趾综合征(Greig cephalopolysyndactyly syndrome);毛发遗传病;HANAC综合征;花斑眼镜蛇型先天性鱼鳞病(harlequin type ichtyosis congenita);HDR综合征;3型血色病;4型血色病;血友病A;3型遗传性血管性水肿;遗传性血管水肿;遗传性出血性毛细血管扩张;遗传性低纤维蛋白原血症;遗传性骨内血管畸形;遗传性平滑肌瘤病与肾细胞癌;遗传性神经痛性肌萎缩;遗传性感觉和自主神经病变型;海一普综合征(Hermansky-Pudlak disease);HHH综合征;HHT2;1型多汗性外胚层发育不良;多汗性外胚层发育不良;HNF4A相关性高胰岛素血症;HNPCC;人类免疫缺陷伴小头畸形;亨廷顿病;高IgD综合征;高胰岛素血症-高氨血症综合征;视网膜色素上皮肥大;软骨发育不全;少汗性外胚层发育不良;ICF综合征;特发性先天性假性肠梗阻;1型高IgM免疫缺陷;3型高IgM免疫缺陷;4型高IgM免疫缺陷;5型高IgM免疫缺陷;甲状腺代谢异常;婴儿内脏肌病;婴儿X连锁脊髓性肌萎缩;妊娠期肝内胆汁淤积症;IPEX综合征;IRAK4缺乏症;孤立性先天性无脾;热纳综合征(Jeune syndrome Imag);约-布二氏综合征(Johanson-Blizzard syndrome);Joubert综合征;JP-HHT综合征;幼年血色病;幼年透明蛋白纤维瘤病;幼年肾消耗病;歌舞伎面谱综合征(Kabuki mask syndrome);卡尔曼综合征(Kallmann Syndrome);卡塔格内综合征(Kartagener syndrome);KCNJ11相关性高胰岛素血症;卡恩斯-塞尔综合征(Kearns-Sayre syndrome);卡斯特曼病(Kostmann disease);Kozlowski型脊柱干骺端发育不良;克拉布病(Krabbe disease);LADD综合征;晚发性神经元性蜡样脂褐症;LCK缺乏症;LDHCP综合征;莱克斯综合征(Legius syndrome);Leigh综合征;2型致死性先天性挛缩综合征;致死性先天性挛缩综合征;3型致死性挛缩综合征;2型致命新生儿CPT缺乏症;致死性骨硬化性骨发育不良;LIG4综合征;1型无脑回畸形(lissencephaly type 1Imag);3型无脑回畸形;洛伊-迪茨综合征(Loeys-Dietz syndrome);低磷脂相关性胆石症;赖氨酸蛋白不耐受;马富西综合征(Maffucci syndrome);马吉德综合征(Majeed syndrome);甘露糖结合蛋白缺乏;马凡病(Marfan disease);马歇尔综合征(Marshall syndrome);MASA综合征;MCAD缺乏症;McCune-Albright综合征(McCune-Albright syndrome);MCKD2;梅克尔综合征(Meckel syndrome);米斯曼角膜营养不良(Meesmann corneal dystrophy);巨膀胱-小结肠-肠道蠕动迟缓(megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis);1型巨幼细胞性贫血;MEHMO;MELAS;梅-尼二氏综合征

(Melnick-Needles syndrome);MEN2;门克斯病(Menkes disease);异染性白细胞营养不良;甲基丙二酸尿症;甲基戊酸尿症;微腔先天性肾病综合征;微绒毛萎缩;线粒体神经胃肠道脑肌病;念珠菌病;单体性染色体X;9号染色体三体嵌合型综合征;Mowat-Wilson综合征;2型粘脂病;Ma型粘脂病;IV型粘脂病;粘多糖酶;3A型粘多糖病;3C型粘多糖病;4B型粘多糖病;多发性疾病;多酰基辅酶A脱氢缺陷;多发性皮肤和粘膜静脉畸形;1型多发性内分泌肿瘤;多重硫酸酯酶缺乏症;NAIC;指甲髌骨综合征;线状肌病;新生儿糖尿病;新生儿表面活性剂缺乏;肾痛;内瑟顿病(Netherton disease);神经纤维瘤病;1型神经纤维瘤病;A型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease);B型尼曼-皮克病;C型尼曼-皮克病;NKX2E;努南综合征(Noonan syndrome);北美印第安儿童肝硬化;NROB1复制相关DSD;眼部遗传病;眼耳综合征;OLEDAID;肾单位稀少巨大症(oligomeganephronia);奥利尔病(Ollier disease);Opitz-Kaveggia综合征;1型口面指综合征;2型口面指综合征;骨性佩吉特病(osseous Paget disease);2型耳腭指综合征;OXPHOS病;掌跖角化过度;全叶肾母细胞瘤病;帕克斯韦伯综合征(Parkes-Weber syndrome);帕金森病;21q22.2-q22.3部分缺失;皮尔逊综合征(Pearson syndrome);佩梅病(Pelizaeus-Merzbacher disease);彭德莱综合征(Pendred syndrome);坎特雷尔五联症(pentalogy of Cantrell);过氧化物酶体酰基-CoA-氧化酶缺乏症;Peutz-Jeghers综合征;菲佛氏综合征(Pfeiffer syndrome);皮尔森综合征(Pierson syndrome);色素性结节性肾上腺皮质疾病;管结肠酸血症;皮特霍普金斯综合征(Pitt-Hopkins syndrome);血浆蛋白缺乏症;胸膜肺母细胞瘤和囊性肾瘤;多囊脂膜性骨发育不良;血卟啉症;卵巢早衰;原发性红斑皮痛;原发性血色病;原发性高草酸尿症;进行性家族性肝内胆汁淤积症;丙酸血症;丙酮酸脱羧酶缺乏症;RAPADILINO综合征;肾性膀胱炎;横纹肌样瘤易感综合征;里格尔综合征(Rieger syndrome);环状4号染色体;罗伯茨综合征(Roberts syndrome);罗宾索劳夫综合征(Robinow-Sorauf syndrome);罗思蒙德-汤姆森综合征(Rothmund-Thomson syndrome);SCID;Saethre Chotzen综合征;桑德霍夫病(Sandhoff disease);SC海豹肢综合征(SC phocomelia syndrome);SCAS;海豹肢综合征(Schinzel phocomelia syndrome);1型短肋骨多指综合征;4型短肋骨多指综合征;2型短肋骨多指综合征;3型短肋骨多指综合征;Shwachman病;Shwachman-Diamond病;镰状细胞贫血;Silver-Russell综合征;辛普森变异综合征(Simpson-Golabi-Behmel syndrome);Smith-Lemli-Opitz综合征;SPG7相关遗传性痉挛性截瘫;球形细胞增多症;手/脚畸形伴长骨缺损;脊柱肋骨发育不良;散发性内脏肌病伴包涵体;贮藏病;STRA6相关综合征;泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease);致死性发育不良;甲状腺代谢疾病;抽动秽语综合征;转甲状腺素相关淀粉样变性;第13号染色体三体性;第22号染色体三体性;三体2p综合征;结节性硬化;簇状肠病;尿素循环疾病;Van Den Ende-Gupta综合征;范德伍德综合征(Van der Woude syndrome);杂合嵌合非整倍体综合征;VLCAD缺乏症;冯希-林二氏病(von Hippel-Lindau disease);瓦尔登伯格综合征(Waardenburg syndrome);WAGR综合征;沃克-沃伯格综合征(Walker-Warburg syndrome);沃纳综合征(Werner syndrome);威尔逊病(Wilson disease);Wolcott-Rallison综合征;沃尔夫综合征(Wolfram syndrome);X-连锁无丙种球蛋白血症;X连锁慢性特发性肠假性梗阻;X连锁腭裂伴舌强直;X-连锁显性点状软骨发育不良;X连锁外胚层发育不良;X连锁埃默里-德赖弗斯肌营养不良(X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy);X连锁无脑回畸形;X-连锁淋巴增生性疾病;X连锁内脏异位;1型黄

嘌呤尿症;2型黄嘌呤尿症;着色性干皮病;XPV;以及泽尔韦格病(Zellweger disease)。在一些实施方案中,病是杜兴氏肌营养不良。在一些实施方案中,病是1型强直性营养不良(DM1)。在一些实施方案中,病是失明或影响眼后部的遗传性疾病。在一些实施方案中,病是耳聋。在一些实施方案中,病是早衰。在一些实施方案中,病是多发性硬化症。在一些实施方案中,病是癌症。在一些实施方案中,病是溶酶体贮积病,例如亨特综合征(Hunter syndrome)、胡尔勒综合征(Hurler syndrome)。在一些实施方案中,病是高胆固醇血症。在一些实施方案中,病是斯塔加特黄斑营养不良(Stargardt macular dystrophy)。在一些实施方案中,病是在优选的实施方案中,疾病是囊性纤维化。

[0550] 在一些实施方案中,治疗、预防或抑制受试者的病可包括使与特定病相关的靶核酸与可编程核酸酶(例如,CasΦ可编程核酸酶)接触。在一些方面,治疗、预防或抑制病的方法可以涉及去除、修饰、替换、转位或影响调节有需要的患者的基因组序列。在一些实施方案中,治疗、预防或抑制病的方法可以涉及调控基因表达。在一些实施方案中,治疗、预防或抑制疾病的方法可包括将与病原体诸如病毒或细菌相关的核酸序列靶向本公开的可编程核酸酶。

[0551] 本文所述的组合物和方法可用于治疗、预防、诊断或鉴定受试者的癌症。在一些方面,方法可以靶向细胞或组织。在一些实施方案中,方法可以应用于受试者,诸如人类。如本文所用,术语“癌症”是指可以以异常或失调的细胞生长或活性为特征的生理病状。在一些情况下,癌症可以涉及表现出异常或不受调节的生长或活性的细胞在受试者的各种组织之间的扩散。在一些方面,癌症可以是遗传病状。癌症的实例包括但不限于:急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、肾上腺皮质癌、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)、恶性肿瘤、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增生性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、导管癌、胚胎肿瘤、子宫内膜癌、管膜瘤、食管癌、嗅神经母细胞瘤、尤因肉瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、输卵管癌、纤维组织细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤、妊娠滋养细胞疾病、毛细胞白血病、头颈癌、心脏肿瘤、肝细胞癌、组织细胞增生症、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生、喉癌、白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、转移性鳞状颈部癌、中端道癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、真菌样真菌病、骨髓增生异常综合征、髓细胞白血病、髓细胞性白血病、骨髓增生性肿瘤、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤、乳头瘤病、副神经节瘤、副鼻窦和鼻腔癌、甲状腺癌、阴茎癌、喉癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞肿瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、原发腹膜癌、前列腺癌、直肠癌、复发癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、涎腺癌、Sézary综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、隐匿原发性鳞状颈部癌、胃癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、气管支气管癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、尿道癌、肾盂癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、血管瘤、外阴癌和肾母细胞瘤。

[0552] 在一些情况下,癌症与一种或多种特定生物标记物相关。生物标记物是一种化学物质或特征,可以作为细胞或有机体状态(例如,疾病的存在或不存在)的指标。生物标记物

的非限制性实例包括生物分子、核酸序列、蛋白质、代谢物、核酸、蛋白质修饰。生物标记物可以指一个物种或指多个物种，诸如细胞表面形态。

[0553] 本公开的方法(例如，修饰靶核酸的方法)可包括用本公开的可编程核酸酶(例如，CasΦ)靶向生物标记物或与生物标记物相关的核酸。在一些情况下，生物标记物是与癌症相关的基因。与癌症相关的基因的非限制性实例包括:ABL、AF4/HRX、AKT-2、ALK、ALK/NPM、AML1、AML1/MTG8、APC、ATM、AXIN2、AXL、BAP1、BARD1、BCL-2、BCL-3、BCL-6、BCR/ABL、BLM、BMPR1A、BRCA1、BRCA2、BRIP1、c-MYC、CASR、CDC73、CDH1、CDK4、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CEBPA、CHEK2、CTNNA1、DBL、DEK/CAN、DICER1、DIS3L2、E2A/PBX1、EGFR、ENL/HRX、EPCAM、ERG/TLS、ERBB、ERBB-2、ETS-1、EWS/FLI-1、FH、FLCN、FMS、FOS、FPS、GATA2、GLI、GPGSP、GREM1、HER2/neu、HOX11、HOXB13、HST、IL-3、INT-2、JUN、KIT、KS3、K-SAM、LBC、LCK、LMO1、LMO2、L-MYC、LYL-1、LYT-10、LYT-10/Cα1、MAS、MAX、MDM-2、MEN1、MET、MITF、MLH1、MLL、MOS、MSH1、MSH2、MSH3、MSH6、MTG8/AML1、MUTYH、MYB、MYH11/CBFB、NBN、NEU、NF1、NF2、N-MYC、NTHL1、OST、PALB2、PAX-5、PBX1/E2A、PDGFRA、PHOX2B、PIM-1、PMS2、POLD1、POLE、POT1、PRAD-1、PRKAR1A、PTCH1、PTEN、RAD50、RAD51C、RAD51D、RAF、RAR/PML、RAS-H、RAS-K、RAS-N、RB1、RECQL4、REL/NRG、RET、RHOM1、RHOM2、ROS、RUNX1、SDHA、SDHAF、SDHB、SDHC、SDHD、SET/CAN、SIS、SKI、SMAD4、SMARCA4、SMARCB1、SMARCE1、SRC、STK11、SUFU、TAL1、TAL2、TAN-1、TIAM1、TERC、TERT、TMEM127、TP53、TSC1、TSC2、TRK、VHL、WRN和WT1。在一些情况下，癌症的基因生物标记物将携带一个或多个突变。在一些情况下，癌症的基因生物标记物相对于未患癌症的患者或样品将被上调或下调。

[0554] 本文所述的组合物和方法可以适用于自体或异体治疗，以及基于离体细胞的治疗。

[0555] 本文所述的组合物和方法可用于治疗、预防、诊断或鉴定受试者的感染。在一些实施方案中，受试者是动物(例如，哺乳动物诸如人类)。在一些实施方案中，受试者是植物(例如，作物)。

[0556] 在一些方面，本公开提供了本文所述的用于治疗方法的可编程CasΦ核酸酶和组合物。在一些实施方案中，本公开提供本文所述的CasΦ可编程核酸酶和组合物用于治疗上述病的方法。

[0557] 在一些方面，本公开提供了本文所述的用作药物的可编程CasΦ核酸酶和组合物。

[0558] 检测靶核酸的方法

[0559] 本公开提供了方法和组合物，其使得能够通过可编程核酸酶平台(诸如DNA内切核酸酶靶向CRISPR TransReporter(DETECTR)平台)检测靶核酸。在一些实施方案中，靶核酸是DNA。在一些实施方案中，靶核酸是RNA。

[0560] 许多试剂与本文公开的组合物和方法一致。本文所述的试剂可用于对靶核酸进行切口和用于检测靶核酸。本文公开的试剂可以包括可编程核酸酶、指导核酸、靶核酸和缓冲液。如本文所述，可以使用本文公开的可编程核酸酶(例如，本文公开的CasΦ)和其他试剂修饰或检测(例如，靶核酸与指导核酸杂交)包含DNA或RNA的靶核酸。如本文所述，包含DNA的靶核酸可以是目标核酸的扩增子，并且可以使用本文公开的可编程核酸酶(例如，如本文公开的CasΦ)和其他试剂检测扩增子。此外，使用两种或更多种可编程切口酶或可编程切口酶与非切口酶可编程核酸酶复合以指导靶向多种靶核酸的核酸，可以检测多种靶核酸，

其中可编程核酸酶表现出不同的报告基因核酸的序列非依赖性切割(例如,第一可编程核酸酶对RNA报告基因的切割和第二可编程核酸酶对DNA报告基因的切割)。

[0561] 在一些实施方案中,来自样品的靶核酸在测定报告基因的切割之前进行扩增。靶DNA可以通过PCR或等温扩增技术进行扩增。与DETECTR技术相容的DNA扩增方法可用于本文公开的可编程核酸酶。例如,ssDNA可以进行扩增。ssDNA而非dsDNA的扩增可以通过具有对ds-DNA激活的反式切割的PAM要求的蛋白质实现PAM非依赖性核酸检测。

[0562] 本公开的某些可编程核酸酶(例如,如本文所公开的CasΦ)可以表现出ssDNA的无差别反式切割,使得它们能够用于检测样品中的DNA。在一些实施方案中,从许多核酸模板(RNA、ss/dsDNA)生成靶ssDNA以在DETECTR平台中实现FQ报告基因的切割。某些可编程核酸酶可以被ssDNA激活,在激活后它们可以表现出ssDNA的反式切割,因此可用于切割DETECTR系统中的ssDNAFQ报告分子。这些可编程核酸酶可以靶向样品中存在的或从任意数量的核酸模板(RNA、ssDNA或dsDNA)中生成的和/或扩增的ssDNA。

[0563] 本文公开的组合物、试剂盒和方法可以在测定靶核酸的方法中使用。在一些实施方案中,测定样品中靶核酸的方法包括:在形成包含与靶核酸片段结合的指导核酸片段的复合物后,使样品与包含指导核酸的复合物接触,所述指导核酸包含与靶核酸片段反向互补的片段和本公开的表现出序列非依赖性切割的可编程核酸酶(例如,本公开的CasΦ),其中样品包含至少一种核酸,所述核酸与靶核酸片段具有至少50%的序列同一性;和测定报告基因核酸群体中至少一种报告基因核酸的切割,其中所述切割表明样品中存在靶核酸,并且其中不存在切割表明样品中不存在靶核酸。

[0564] 靶核酸可以是样品中总核酸的0.05%至20%。有时,靶核酸是样品中总核酸的0.1%至10%。在一些情况下,靶核酸是样品中总核酸的0.1%至5%。通常,样品包含靶核酸片段和至少一种与靶核酸片段具有小于100%的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50%的序列同一性的核酸。例如,与至少一种与靶核酸片段具有小于100%的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50%的序列同一性的核酸相比,靶核酸片段包含突变。通常,与至少一种与靶核酸片段具有小于100%的序列同一性但与靶核酸片段具有不小于50%的序列同一性的核酸相比,靶核酸片段包含单核苷酸突变。

[0565] 可编程核酸酶DETECTR反应混合物中各种试剂的浓度可以根据反应的特定规模而变化。例如,可编程核酸酶的最终浓度可以从1pM至1nM、1pM至10pM、10pM至100pM、100pM至1nM、1nM至10nM、10nM至20nM、20nM至30nM、30nM至40nM、40nM至50nM、50nM至60nM、60nM至70nM、70nM至80nM、80nM至90nM、90nM至100nM、100nM至200nM、200nM至300nM、300nM至400nM、400nM至500nM、500nM至600nM、600nM至700nM、700nM至800nM、800nM至900nM、900nM至1000nM变化。与靶核酸互补的sgRNA的最终浓度可以是1pM至1nM、1pM至10pM、10pM至100pM、100pM至1nM、1nM至10nM、10nM至20nM、20nM至30nM、30nM至40nM、40nM至50nM、50nM至60nM、60nM至70nM、70nM至80nM、80nM至90nM、90nM至100nM、100nM至200nM、200nM至300nM、300nM至400nM、400nM至500nM、500nM至600nM、600nM至700nM、700nM至800nM、800nM至900nM、900nM至1000nM。ssDNA-FQ报告基因的浓度可以是1pM至1nM、1pM至10pM、10pM至100pM、100pM至1nM、1nM至10nM、10nM至20nM、20nM至30nM、30nM至40nM、40nM至50nM、50nM至60nM、60nM至70nM、70nM至80nM、80nM至90nM、90nM至100nM、100nM至200nM、200nM至300nM、300nM至400nM、400nM至500nM、500nM至600nM、600nM至700nM、700nM至800nM、800nM至

900nM、900nM至1000nM。

[0566] DETECTR反应的实例包括、由或基本上由以下组成:最终浓度为100nM的CasΦ多肽或其变体、125nM sgRNA和50nM ssDNA-FQ报告基因,总反应体积为20μL。反应在荧光板读板器(Tecan Infinite Pro 200M Plex)中在37℃下温育2小时,每30秒进行一次荧光测量(例如,λex:485nm;λem:535nm)。检测到的荧光波长可以根据报告分子而变化。

[0567] 本文所述的是包含单链报告基因核酸的试剂,所述单链报告基因核酸包含检测部分,其中在使用本文所述的方法从核酸模板生成和扩增ssDNA时,报告基因核酸(例如,上述的ssDNA-FQ报告基因)能够被可编程核酸酶切割,从而生成第一可检测信号。

[0568] 因此,本文公开的方法包括从样品中的目标靶核酸模板(例如,cDNA、ssDNA或dsDNA)生成和扩增ssDNA,将ssDNA与ssDNA激活的可编程核酸酶一起温育,从而导致报告基因核酸(也称为ssDNA-FQ报告基因)无差别的PAM非依赖性切割以生成可检测信号,和定量可检测信号以检测目标靶核酸序列。

[0569] 报告基因

[0570] 本文所述的是包含报告基因的试剂。报告基因可以包含单链核酸和检测部分(例如,标记的单链DNA报告基因),其中核酸能够被激活的可编程核酸酶(例如,如本文公开的CasΦ)切割,从而释放检测部分,并产生可检测信号。如本文所用,“报告基因”与“报告基因核酸”或“报告分子”可互换使用。本文公开的可编程核酸酶在指导RNA与靶核酸杂交时被激活,可以切割报告基因。切割“报告基因”在本文中可以称为切割“报告基因核酸”、“报告分子”或“报告基因的核酸”。

[0571] 本文公开的组合物和方法的主要优点可以是针对未扩增或扩增样品中的总核酸设计过量报告基因,不包括报告基因的核酸。总核酸可以包括靶核酸和非靶核酸,不包括报告基因的核酸。非靶核酸可以来自裂解的或未裂解的初始样品。非靶核酸也可以是扩增的副产物。因此,非靶核酸可以包括来自初始样品的裂解或未裂解的非靶核酸,以及来自扩增样品的非靶核酸。存在大量非靶核酸时,激活的可编程核酸酶(例如,如本文公开的CasΦ)结合和切割报告基因序列的能力可以被抑制。这是因为激活的可编程核酸酶附带切割任何核酸。如果总核酸大量存在,它们可能会使可编程核酸酶胜过报告基因。本文公开的组合物和方法被设计成具有相对于总核酸过量的报告基因,使得来自DETECTR反应的可检测信号特别优越。在一些实施方案中,报告基因可以以相对于总核酸过量至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、1.5倍至100倍、2倍至10倍、10倍至20倍、20倍至30倍、30倍至40倍、40倍至50倍、50倍至60倍、60倍至70倍、70倍至80倍、80倍至90倍、90倍至100倍、1.5倍至10倍、1.5倍至20倍、10倍至40倍、20倍至60倍或10倍至80倍存在。

[0572] 本文公开的组合物和方法的另一个显著优点可以是包含指导核酸、可编程核酸酶(例如,如本文公开的CasΦ)和报告基因的过量体积的设计,其使包含样品的较小体积与目标靶核酸接触。包含样品的较小体积可以是未裂解样品、裂解样品或已经历逆转录、扩增和体外转录的任何组合的裂解样品。粗品、未切割样品、切割样品或切割和扩增样品中存在的各种试剂,诸如缓冲液、硫酸镁、盐、pH、还原剂、引物、dNTP、NTP、细胞切割物、非靶核酸、引

物或其他组分可以抑制可编程核酸酶被激活或发现和切割报告基因的的能力。这可能是由于对于可编程核酸酶，不是报告基因的核酸竞争胜过报告基因的核酸。或者，样品中的各种试剂可能只是抑制可编程核酸酶的活性。因此，本文提供的用于使包含指导核酸、可编程核酸酶和报告基因的过量体积与包含具有目标靶核酸的样品的较小体积接触的组合物和方法通过确保可编程核酸酶能够找到并切割报告基因的核酸提供了对靶核酸的优异检测。在一些实施方案中，包含指导核酸、可编程核酸酶和报告基因的体积(可以称为“第二体积”)比包含样品的体积(可以称为“第一体积”)多4倍。在一些实施方案中，包含指导核酸、可编程核酸酶和报告基因的体积(可以称为“第二体积”)比包含样品的体积(可以称为“第一体积”)多至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、1.5倍至100倍、2倍至10倍、10倍至20倍、20倍至30倍、30倍至40倍、40倍至50倍、50倍至60倍、60倍至70倍、70倍至80倍、80倍至90倍、90倍至100倍、1.5倍至10倍、1.5倍至20倍、10倍至40倍、20倍至60倍或10倍至80倍。在一些实施方案中，包含样品的体积为至少0.5μL、至少1μL、至少1μL、至少2μL、至少3μL、至少4μL、至少5μL、至少6μL、至少7μL、至少8μL、至少9μL、至少10μL、至少11μL、至少12μL、至少13μL、至少14μL、至少15μL、至少16μL、至少17μL、至少18μL、至少19μL、至少20μL、至少25μL、至少30μL、至少35μL、至少40μL、至少45μL、至少50μL、至少55μL、至少60μL、至少65μL、至少70μL、至少75μL、至少80μL、至少85μL、至少90μL、至少95μL、至少100μL、0.5μL至5μL、5μL至10μL、10μL至15μL、15μL至20μL、20μL至25μL、25μL至30μL、30μL至35μL、35μL至40μL、40μL至45μL、45μL至50μL、10μL至20μL、5μL至20μL、1μL至40μL、2μL至10μL或1μL至10μL。在一些实施方案中，包含可编程核酸酶、指导核酸和报告基因的体积为至少10μL、至少11μL、至少12μL、至少13μL、至少14μL、至少15μL、至少16μL、至少17μL、至少18μL、至少19μL、至少20μL、至少21μL、至少22μL、至少23μL、至少24μL、至少25μL、至少26μL、至少27μL、至少28μL、至少29μL、至少30μL、至少40μL、至少50μL、至少60μL、至少70μL、至少80μL、至少90μL、至少100μL、至少150μL、至少200μL、至少250μL、至少300μL、至少350μL、至少400μL、至少450μL、至少500μL、10μL至15μL、15μL至20μL、20μL至25μL、25μL至30μL、30μL至35μL、35μL至40μL、40μL至45μL、45μL至50μL、50μL至55μL、55μL至60μL、60μL至65μL、65μL至70μL、70μL至75μL、75μL至80μL、80μL至85μL、85μL至90μL、90μL至95μL、95μL至100μL、100μL至150μL、150μL至200μL、200μL至250μL、250μL至300μL、300μL至350μL、350μL至400μL、400μL至450μL、450μL至500μL、10μL至20μL、10μL至30μL、25μL至35μL、10μL至40μL、20μL至50μL、18μL至28μL或17μL至22μL。

[0573] 在一些情况下，报告基因核酸是包含脱氧核糖核苷酸的单链核酸序列。在其他情况下，报告基因核酸是包含核糖核苷酸的单链核酸序列。报告基因的核酸可以是包含至少一种脱氧核糖核苷酸和至少一种核糖核苷酸的单链核酸序列。在一些情况下，报告基因的核酸是单链核酸，其在充当切割位点的内部位置处包含至少一个核糖核苷酸残基。在一些情况下，报告基因的核酸在内部位置包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个核糖核苷酸残基。在一些情况下，报告基因的核酸在内部位置包含2至10个、3至9个、4至8个或5至7个核糖核苷酸残基。有时核糖核苷酸残基是连续的。或者，核糖核苷酸残基散布在非核糖核苷酸残基之间。在一些情况下，报告基因的核酸仅具有核糖核苷酸残基。在一些情况下，报告基因的核

酸仅具有脱氧核糖核苷酸残基。在一些情况下，核酸包含对本文所述的可编程核酸酶的切割具有抗性的核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含合成核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少一个核糖核苷酸残基和至少一个非核糖核苷酸残基。在一些情况下，报告基因的核酸长度为5-20、5-15、5-10、7-20、7-15或7-10个核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸长度为3至20、4至10、5至10或5至8个核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少一个尿嘧啶核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少两个尿嘧啶核糖核苷酸。有时报告基因的核酸仅具有尿嘧啶核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少一个腺嘌呤核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少两个腺嘌呤核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸仅具有腺嘌呤核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少一个胞嘧啶核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少两个胞嘧啶核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少一个鸟嘌呤核糖核苷酸。在一些情况下，报告基因的核酸包含至少两个鸟嘌呤核糖核苷酸。报告基因的核酸可以仅包含未经修饰的核糖核苷酸、仅包含未经修饰的脱氧核糖核苷酸或其组合。在一些情况下，报告基因的核酸长度为5至12个核苷酸。在一些情况下，报告基因核酸的长度为至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个核苷酸。在一些情况下，报告基因核酸的长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0574] 报告基因的单链核酸包含能够生成第一可检测信号的检测部分。有时报告基因核酸包含能够生成信号的蛋白质。信号可以是量热、电位、电流、光学(例如，荧光、比色等)或压电信号。在一些情况下，检测部分在切割位点的一侧。任选地，淬灭部分在切割位点的另一侧。有时淬灭部分是荧光淬灭部分。在一些情况下，淬灭部分在切割位点的5'处，并且检测部分在切割位点的3'处。在一些情况下，检测部分在切割位点的5'处，并且淬灭部分在切割位点的3'处。有时淬灭部分位于报告基因的核酸的5'端。有时检测部分位于报告基因的核酸的3'端。在一些情况下，检测部分位于报告基因的核酸的5'端。在一些情况下，淬灭部分位于报告基因的核酸的3'端。在一些情况下，报告基因的单链核酸是至少一个能够生成第一可检测信号的单链核酸群体。在一些情况下，报告基因的单链核酸是能够生成第一可检测信号的单链核酸群体。任选地，存在多于一个报告基因的单链核酸群体。在一些情况下，存在此列表范围涵盖的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50个或大于50个，或任何数量的能够生成可检测信号的不同报告基因单链核酸群体。在一些情况下，存在2至50、3至40、4至30、5至20或6至10个能够生成可检测信号的不同报告基因单链核酸群体。

[0575] 表3-报告基因中单链核酸的实例

[0576]

5'检测部分*	序列(SEQ ID NO)	3'淬灭剂*
/56-FAM/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IABkFQ/
/5IRD700/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IRQC1N/
/5TYE665/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IAbRQSp/

/5Alex594N/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IAbRQSp/
/5ATTO633N/	TTATTATT(SEQ ID NO:95)	/3IAbRQSp/
/56-FAM/	TTTTTT(SEQ ID NO:96)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTTTTTTT(SEQ ID NO:97)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTTTTTTTTT(SEQ ID NO:98)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTTTTTTTTTTT(SEQ ID NO:99)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTTTTTTTTTTTTT(SEQ ID NO:100)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	AAAAAA(SEQ ID NO:101)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	CCCCCC(SEQ ID NO:102)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	GGGGGG(SEQ ID NO:103)	/3IABkFQ/
/56-FAM/	TTATTATT(SEQ ID NO:104)	/3IABkFQ/

[0577] *此表以其商品名提及检测部分和淬灭剂部分，并且鉴定了它们的来源。然而，也可以使用来自其他来源的具有类似功能的替代品、仿制品或非商品名部分。

[0578] /56-FAM/:5'6-荧光素(整合DNA技术)

[0579] /3IABkFQ/:3'Iowa Black FQ(整合DNA技术)

[0580] /5IRD700/:5'IRDye 700(整合DNA技术)

[0581] /5TYE665/:5'TYE 665(整合DNA技术)

[0582] /5Alex594N/:5'Alexa Fluor 594(NHS酯)(整合DNA技术)

[0583] /5ATTO633N/:5'ATTO TM 633(NHS酯)(整合DNA技术)

[0584] /3IRQC1N/:3'IRDye QC-1淬灭剂(Li-Cor)

[0585] /3IAbRQSp/:3'Iowa Black RQ(整合DNA技术)

[0586] 检测部分可以是红外荧光团。检测部分可以是在500nm至720nm范围内发射荧光的荧光团。检测部分可以是在500nm至720nm范围内发射荧光的荧光团。在一些情况下，检测部分发射波长为700nm或更高的荧光。在其他情况下，检测部分发射约660nm或约670nm的荧光。在一些情况下，检测部分发射500至520、500至540、500至590、590至600、600至610、610至620、620至630、630至640、640至650、650至660、660至670、670至680、690至690、690至700、700至710、710至720或720至730nm范围内的荧光。在一些情况下，检测部分发射450nm至750nm、500nm至650nm或550至650nm范围内的荧光。检测部分可以是发射与6-荧光素、IRDye 700、TYE 665、Alex Fluor或ATTO TM 633(NHS酯)相同范围的可检测荧光信号的荧光团。检测部分可以是荧光素亚酰胺化物(fluorescein amidite)、6-荧光素、IRDye 700、TYE 665、Alex Fluor 594或ATTO TM 633(NHS酯)。检测部分可以是发射与6-荧光素(整合DNA技术)、IRDye 700(整合DNA技术)、TYE 665(整合DNA技术)、Alex Fluor 594(整合DNA技术)或ATTO TM 633(NHS酯)(整合DNA技术)相同范围的荧光的荧光团。检测部分可以是荧光素亚酰胺化物、6-荧光素(整合DNA技术)、IRDye 700(整合DNA技术)、TYE 665(整合DNA技术)、Alex Fluor 594(整合DNA技术)或ATTO TM 633(NHS酯)(整合DNA技术)。本文所述的任何检测部分可以来自任何商业可得来源，可以是所列检测部分的具有类似功能、仿制品或非商品名的替代物。

[0587] 可以基于待测试样品的类型来选择使用检测部分。例如，作为红外荧光团的检测部分与尿液样品一起使用。作为另一个实例，具有发射约520nm荧光的荧光团的SEQ ID NO:

87用于非尿液样品的测试,而具有发射约700nm荧光的荧光团的SEQ ID NO:94用于尿液样品的测试。

[0588] 淬灭部分可以基于其淬灭检测部分的能力来选择。淬灭部分可以是非荧光的荧光淬灭剂。淬灭部分可以淬灭发射500nm至720nm范围内的荧光的检测部分。淬灭部分可以淬灭发射500nm至720nm范围内的荧光的检测部分。在一些情况下,淬灭部分淬灭发射波长为700nm或更高的荧光的检测部分。在其他情况下,淬灭部分淬灭发射约660nm或约670nm的荧光的检测部分。在一些情况下,淬灭部分淬灭发射500至520、500至540、500至590、590至600、600至610、610至620、620至630、630至640、640至650、650至660、660至670、670至680、690至690、690至700、700至710、710至720或720至730nm范围内的荧光的检测部分。在一些情况下,淬灭部分淬灭发射450nm至750nm、500nm至650nm或550至650nm范围内的荧光的检测部分。淬灭部分可以淬灭荧光素亚酰胺化物、6-荧光素、IRDye 700、TYE 665、Alex Fluor 594或ATTO TM 633(NHS酯)。淬灭部分可以是Iowa Black RQ、Iowa Black FQ或IRDye QC-1淬灭剂。淬灭部分可以淬灭荧光素亚酰胺化物、6-荧光素(整合DNA技术)、IRDye 700(整合DNA技术)、TYE 665(整合DNA技术)、Alex Fluor 594(整合DNA技术)或ATTO TM 633(NHS酯)(整合DNA技术)。淬灭部分可以是Iowa Black RQ(整合DNA技术)、Iowa Black FQ(整合DNA技术)或IRDye QC-1淬灭剂(LiCor)。本文所述的任何淬灭部分可以来自任何商业可得来源,可以是所列淬灭部分的具有类似功能、仿制品或非商品名的替代物。

[0589] 生成来自释放检测部分的可检测信号表明可编程核酸酶的切割已经发生并且样品含有靶核酸。在一些情况下,检测部分包含荧光染料。有时,检测部分包含荧光共振能量转移(FRET)对。在一些情况下,检测部分包含红外(IR)染料。在一些情况下,检测部分包含紫外(UV)染料。或者或组合地,检测部分包含多肽。有时检测部分包含生物素。有时检测部分包含亲和素或链霉亲和素中的至少一种。在一些情况下,检测部分包含多糖、聚合物或纳米颗粒。在一些情况下,检测部分包含金纳米颗粒或胶乳纳米颗粒。

[0590] 检测部分可以是能够生成量热、电位、电流、光学(例如,荧光、比色等)或压电信号的任何部分。有时报告基因的核酸是能够在切割核酸时生成量热、电位、电流、光学(例如,荧光、比色等)或压电信号的蛋白质-核酸。通常,量热信号是切割报告基因的核酸后产生的热量。有时,量热信号是切割报告基因的核酸后吸收的热量。例如,电位信号是切割报告基因的核酸后产生的电势。电流信号可以是切割报告基因核酸后产生的电子运动。通常,信号是光学信号,诸如比色信号或荧光信号。例如,光学信号是切割报告基因的核酸后产生的光输出。有时,光学信号是切割报告基因的核酸前后的吸光度变化。通常,压电信号是切割报告基因的核酸前后的质量变化。

[0591] 可检测信号可以是比色信号或肉眼可见的信号。在一些情况下,可检测信号可以是荧光的、电的、化学的、电化学的或磁的。在一些情况下,第一检测信号可以通过检测部分与检测区域中的捕获分子结合而产生,其中第一检测信号表明样品含有靶核酸。有时此系统能够检测多于一种类型的靶核酸,其中系统包含多于一种类型的指导核酸和多于一种类型的报告基因核酸。在一些情况下,可检测信号可以由切割事件直接生成。或者或组合地,可检测信号可以由信号事件间接生成。有时可检测信号不是荧光信号。在一些情况下,可检测信号可以是比色信号或基于颜色的信号。在一些情况下,检测到的靶核酸可以基于其在支持介质的检测区域上的空间位置来鉴定。在一些情况下,第二可检测信号可以在与第一

生成信号不同的空间位置中生成。

[0592] 通常，蛋白质-核酸是酶-核酸。当存在于酶-核酸中时，酶可能受到空间阻碍，但随后在从核酸切割时发挥作用。通常，酶是与底物产生反应的酶。酶可以是转化酶。通常，转化酶的底物是蔗糖。当转化酶将蔗糖转化为葡萄糖时，DNS试剂会产生比色变化。在一些情况下，优选的是核酸(例如，DNA)和转化酶使用异双功能接头经由磺基-SMCC化学缀合。有时蛋白质-核酸是底物-核酸。通常底物是与酶产生反应的底物。

[0593] 蛋白质-核酸可以连接到固体支持物上。例如，固体支持物是表面。表面可以是电极。有时固体支持物是珠粒。通常珠粒是磁珠。切割时，蛋白质从固体中释放出来并与其他混合物相互作用。例如，蛋白质是酶，并且在切割酶-核酸的核酸后，酶流过室进入包含底物的混合物中。当酶遇到酶底物时，发生反应，诸如比色反应，然后进行检测。作为另一个实例，蛋白质是酶底物，并且在切割酶底物-核酸的核酸后，酶流过室进入包含酶的混合物中。当酶底物遇到酶时，发生反应，诸如比色反应，然后进行检测。

[0594] 通常，信号是比色信号或肉眼可见的信号。在一些情况下，信号是荧光的、电的、化学的、电化学的或磁的。信号可以是量热、电位、电流、光学(例如，荧光、比色等)或压电信号。在一些情况下，可检测信号是比色信号或肉眼可见的信号。在一些情况下，可检测信号是荧光的、电的、化学的、电化学的或磁的。在一些情况下，第一检测信号通过检测部分与检测区域中的捕获分子结合而产生，其中第一检测信号表明样品含有靶核酸。有时此系统能够检测多于一种类型的靶核酸，其中系统包含多于一种类型的指导核酸和多于一种类型的报告基因的核酸。在一些情况下，可检测信号由切割事件直接生成。或者或组合地，可检测信号由信号事件间接生成。有时可检测信号不是荧光信号。在一些情况下，可检测信号是比色信号或基于颜色的信号。在一些情况下，检测到的靶核酸是基于其在支持介质的检测区域上的空间位置来鉴定的。在一些情况下，第二可检测信号在与第一生成信号不同的空间位置中生成。

[0595] 在一些情况下，对于检测样品中单链靶核酸的受试者方法，检测阈值小于或等于10nM。术语“检测阈值”在本文中用于描述为了进行检测而必须存在于样品中的靶核酸的最小量。例如，当检测阈值是10nM时，当靶核酸以10nM或更高的浓度存在于样品中时，可以检测到信号。在一些情况下，检测阈值小于或等于5nM、1nM、0.5nM、0.1nM、0.05nM、0.01nM、0.005nM、0.001nM、0.0005nM、0.0001nM、0.00005nM、0.00001nM、10pM、1pM、500fM、250fM、100fM、50fM、10fM、5fM、1fM、500埃摩尔(aM)、100aM、50aM、10aM或1aM。在一些情况下，检测阈值在1aM至1nM、1aM至500pM、1aM至200pM、1aM至100pM、1aM至10pM、1aM至1pM、1aM至500fM、1aM至100fM、1aM至1fM、1aM至500aM、1aM至100aM、1aM至50aM、1aM至10aM、10aM至1nM、10aM至500pM、10aM至200pM、10aM至100pM、10aM至10pM、10aM至1pM、10aM至500fM、10aM至100fM、10aM至1fM、10aM至500aM、10aM至100aM、10aM至50aM、100aM至1nM、100aM至500pM、100aM至200pM、100aM至100pM、100aM至10pM、100aM至1pM、100aM至500fM、100aM至100fM、100aM至1fM、100aM至500aM、500aM至1nM、500aM至500pM、500aM至200pM、500aM至100pM、500aM至10pM、500aM至1pM、500aM至500fM、500aM至100fM、500aM至1fM、1fM至1nM、1fM至500pM、1fM至200pM、1fM至100pM、1fM至10pM、1fM至1pM、10fM至1nM、10fM至500pM、10fM至200pM、10fM至100pM、10fM至10pM、10fM至1pM、500fM至1nM、500fM至500pM、500fM至200pM、500fM至100pM、500fM至10pM、500fM至1pM、800fM至1nM、800fM至500pM、800fM至200pM、

800fM至100pM、800fM至10pM、800fM至1pM、1pM至1nM、1pM至500pM、1pM至200pM、1pM至100pM或1pM至10pM的范围内。在一些情况下，检测阈值在800fM至100pM、1pM至10pM、10fM至500fM、10fM至50fM、50fM至100fM、100fM至250fM或250fM至500fM的范围内。在一些情况下，检测阈值在2aM至100pM、20aM至50pM、50aM至20pM、200aM至5pM或500aM至2pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸在样品中被检测到的最小浓度在1aM至1nM、10aM至1nM、100aM至1nM、500aM至1nM、1fM至1nM、1fM至500pM、1fM至200pM、1fM至100pM、1fM至10pM、1fM至1pM、10fM至1nM、10fM至500pM、10fM至200pM、10fM至100pM、10fM至10pM、10fM至1pM、500fM至1nM、500fM至500pM、500fM至200pM、500fM至100pM、500fM至10pM、500fM至1pM、800fM至1nM、800fM至500pM、800fM至200pM、800fM至100pM、800fM至10pM、800fM至1pM、1pM至1nM、1pM至500pM、1pM至200pM、1pM至100pM或1pM至10pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸在样品中被检测到的最小浓度在2aM至100pM、20aM至50pM、50aM至20pM、200aM至5pM或500aM至2pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸可以在样品中被检测到的最小浓度在1aM至100pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸可以在样品中被检测到的最小浓度在1fM至100pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸可以在样品中被检测到的最小浓度在10fM至100pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸可以在样品中被检测到的最小浓度在800fM至100pM的范围内。在一些情况下，单链靶核酸可以在样品中被检测到的最小浓度在1pM至10pM的范围内。在一些情况下，本文所述的装置、系统、流体装置、试剂盒和方法检测包含多种核酸诸如多种非靶核酸的样品中的靶单链核酸，其中靶单链核酸以低至1aM、10aM、100aM、500aM、1fM、10fM、500fM、800fM、1pM、10pM、100pM或1pM的浓度存在。

[0596] 在一些实施方案中，靶核酸在切割反应中以约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约200nM、约300nM、约400nM、约500nM、约600nM、约700nM、约800nM、约900nM、约1μM、约10μM或约100μM的浓度存在。在一些实施方案中，靶核酸在切割反应中以10nM至20nM、20nM至30nM、30nM至40nM、40nM至50nM、50nM至60nM、60nM至70nM、70nM至80nM、80nM至90nM、90nM至100nM、100nM至200nM、200nM至300nM、300nM至400nM、400nM至500nM、500nM至600nM、600nM至700nM、700nM至800nM、800nM至900nM、900nM至1μM、1μM至10μM、10μM至100μM、10nM至100nM、10nM至1μM、10nM至10μM、10nM至100μM、100nM至1μM、100nM至10μM、100nM至100μM或1μM至100μM的浓度存在。在一些实施方案中，靶核酸在切割反应中以20nM至50μM、50nM至20μM或200nM至5μM的浓度存在。

[0597] 在一些情况下，本文所述的方法、组合物、试剂、酶和试剂盒可用于检测样品中的靶单链核酸，其中样品与试剂接触足以发生反式切割或完成切割反应的预定时长。在一些情况下，本文所述的装置、系统、流体装置、试剂盒和方法检测样品中的靶单链核酸，其中样品与试剂接触不超过60分钟。有时样品与试剂接触不超过120分钟、110分钟、100分钟、90分钟、80分钟、70分钟、60分钟、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟或1分钟。有时样品与试剂接触至少120分钟、110分钟、100分钟、90分钟、80分钟、70分钟、60分钟、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟或5分钟。在一些情况下，样品与试剂接触5分钟至120分钟、5分钟至100分钟、10分钟至90分钟、15分钟至45分钟或20分钟至35分钟。在一些情况下，本文所述的装置、系统、流体装置、试剂盒和方法可以在少于10小时、少于9小时、少于8小时、少于7小时、少于6小时、少于5小时、少于4小时、少于3小时、少于2小时、少于1小

时、少于50分钟、少于45分钟、少于40分钟、少于35分钟、少于30分钟、少于25分钟、少于20分钟、少于15分钟、少于10分钟、少于9分钟、少于8分钟、少于7分钟、少于6分钟或少于5分钟内检测样品中的靶核酸。在一些情况下，本文所述的装置、系统、流体装置、试剂盒和方法可以在5分钟至10小时、10分钟至8小时、15分钟至6小时、20分钟至5小时、30分钟至2小时或45分钟至1小时内检测样品中的靶核酸。

[0598] 当指导核酸与靶核酸结合时，可以启动可编程核酸酶的反式切割活性，并且可以切割报告基因的核酸，从而检测荧光。指导核酸可以是非天然存在的指导核酸。非天然存在的指导核酸可以包含工程化序列，所述序列具有与目标靶核酸序列杂交的重复和间隔区。非天然存在的指导核酸可以重组表达或化学合成。核酸报告基因可以包含检测部分，其中核酸报告基因可以被激活的可编程核酸酶切割，从而生成信号。如本文所述的一些方法可以是测定样品中靶核酸的方法，所述方法包括使样品与包含指导核酸的复合物接触，所述指导核酸包含与靶核酸的片段反向互补的片段和在形成包含与靶核酸片段结合的指导核酸片段的复合物时表现出序列非依赖性切割的可编程核酸酶；和测定指示切割蛋白质-核酸群体中至少一些蛋白质-核酸的信号，其中信号指示样品中存在靶核酸，并且其中不存在信号指示样品中不存在靶核酸。作为非限制性示例，使用可编程核酸酶切割报告基因的核酸可以以50％的效率切割，如通过量热、电位、电流、光学(例如，荧光、比色等)或压电信号的变化测量的。如本文所述的一些方法可以是检测样品中靶核酸的方法，所述方法包括使包含靶核酸的样品与靶向靶核酸片段的指导核酸接触，可编程核酸酶在与指导核酸和靶核酸片段、包含检测部分的报告基因的单链核酸复合时能够被激活，其中报告基因的核酸能够被激活的可编程核酸酶切割，从而生成第一可检测信号，使用如通过颜色变化测量的切割的可编程核酸酶切割报告基因的单链核酸，并测量支持介质上的第一可检测信号。使用可编程核酸酶切割报告基因的单链核酸可以以50％的效率切割，如通过颜色变化所测量的。在一些情况下，切割效率至少为40％、50％、60％、70％、80％、90％或95％，如通过颜色变化所测量的。颜色变化可以是可检测的比色信号或肉眼可见的信号。颜色变化可以测量为第一可检测信号。第一可检测信号可以在使包含靶核酸的样品与靶向靶核酸片段的指导核酸接触后5分钟内检测到，可编程核酸酶能够在与指导核酸和靶核酸片段复合时被激活，并且报告基因的单链核酸包含检测部分，其中报告基因的核酸能够被激活的核酸酶切割。第一可检测信号在接触样品的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110或120分钟内可以是可检测的。在一些实施方案中，第一可检测信号在接触样品的1至120、5至100、10至90、15至80、20至60或30至45分钟内可以是可检测的。

[0599] 在一些情况下，本文所述的方法、试剂、酶和试剂盒用样品中的可编程核酸酶和报告基因的单链核酸检测靶单链核酸，其中样品与试剂接触足以反式切割报告基因的单链核酸的预定时长。

[0600] 如本文所述的一些方法可以是检测样品中靶核酸的方法，所述方法包括使包含靶核酸的样品与靶向靶序列的指导核酸接触，可编程核酸酶在与指导核酸和靶序列、包含检测部分的单链报告基因核酸复合时能够被激活，其中报告基因的核酸能够被激活的核酸酶切割，从而生成第一可检测信号，使用如通过颜色变化测量的切割的可编程核酸酶切割单链报告基因核酸，并测量支持介质上的第一可检测信号。使用可编程核酸酶切割单链报告

基因核酸可以以50％的效率切割，如通过颜色变化所测量的。在一些情况下，切割效率为至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％，如通过颜色变化所测量的。颜色变化可以是可检测的比色信号或肉眼可见的信号。颜色变化可以测量为第一可检测信号。第一可检测信号可以在使包含靶核酸的样品与靶向靶序列的指导核酸接触后5分钟内检测到，可编程核酸酶能够在与指导核酸和靶序列复合时被激活，并且单链报告基因核酸包含检测部分，其中报告基因核酸能够被激活的核酸酶切割。第一可检测信号在接触样品的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110或120分钟内可以是可检测的。

[0601] 复用可编程核酸酶和可编程切口酶

[0602] 本文所述的是包含可编程核酸酶(例如，如本文公开的CasΦ)的组合物在与指导核酸和靶核酸分子复合时能够被激活。此外，这些试剂可以与不同类型的可编程核酸酶(例如，用于多重化可编程核酸酶)一起使用。在一些实施方案中，可编程核酸酶可以存在于同时靶向多个基因的RNP复合物中。在一些实施方案中，可编程切口酶可以与其他可编程核酸酶多重化。例如，可编程切口酶可以与其他可编程核酸酶多重化以修饰或检测靶核酸。在一些实施方案中，第一可编程切口酶可与第二可编程切口酶多重化。在一些实施方案中，可编程切口酶可以是CasΦ可编程切口酶。

[0603] 在一些实施方案中，本文公开的CasΦ多肽可以与同一样品中的多个指导核酸多重化，其中指导核酸可以包含不同序列。

[0604] 在一些实施方案中，用于多重化的其他可编程核酸酶是任何合适的可编程核酸酶。有时，可编程核酸酶是任何Cas蛋白(本文也称为Cas核酸酶)。在一些情况下，可编程核酸酶是Cas13。在一些实施方案中，Cas13是Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d或Cas13e。在一些情况下，可编程核酸酶可以是Mad7或Mad2。在一些情况下，可编程核酸酶是Cas12蛋白。有时Cas12是Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas12g、Cas12h或Cas12i。在一些情况下，可编程核酸酶是另一种CasΦ蛋白。在一些情况下，可编程核酸酶是Csm1、Cas9、C2c4、C2c8、C2c5、C2c10、C2c9或CasZ。有时，Csm1也可以称为smCms1、miCms1、obCms1或suCms1。有时CasZ也可以称为Cas14a、Cas14b、Cas14c、Cas14d、Cas14e、Cas14f、Cas14g或Cas14h。有时，可编程核酸酶可以是V型CRISPR-Cas系统。在一些情况下，可编程核酸酶可以是VI型CRISPR-Cas系统。有时可编程核酸酶可以是III型CRISPR-Cas系统。

[0605] 在一些情况下，用于多重化的其他可编程核酸酶可以来自，例如，沙希纤毛菌(Leptotrichia shahii)(Lsh)、斯氏李斯特氏菌(Listeria seeligeri)(Lse)、口腔纤毛菌(Leptotrichia buccalis)(Lbu)、韦德纤毛菌(Leptotrichia wadeu)(Lwa)、荚膜红细菌(Rhodobacter capsulatus)(Rca)、半纤维素降解菌(Herbinix hemicellulosilytica)(Hhe)、丙酸杆菌(Paludibacter propionicigenes)(Ppr)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)细菌(Lba)、直肠真杆菌(Eubacterium rectale)(Ere)、纽约李斯特菌(Listeria newyorkensis)(Lny)、嗜氨基梭状芽胞杆菌属(Clostridium aminophilum)(Cam)、普雷沃菌属(Prevotella sp.)(Psm)、犬源性嗜二氧化碳噬细胞菌(Capnocytophaga canimorsus)(Cca,)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)细菌(Lba)、动物溃疡伯格菌(Bergeyella zoohelcum)(Bzo)、中间普雷沃菌(Prevotella intermedia)(Pin)、颊普雷沃菌(Prevotella buccae)(Pbu)、另枝菌属(Alistipes sp.)(Asp)、鸭疫里默氏杆菌

(Riemerella anatipestifer)(Ran)、奥兰蒂亚克普雷沃菌(Prevotella aurantiaca)(Pau)、解糖普雷沃菌(Prevotella saccharolytica)(Psa)、中间普雷沃菌(Pin2)、犬源性嗜二氧化碳噬细胞菌(Capnocytophaga canimorsus)(Cca)、古卟啉单胞菌(Porphyromonas gulae)(Pgu)、普雷沃菌属(Prevotella sp.)(Psp)、牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)(Pig)、中间普雷沃菌(Pin3)、意大利肠球菌(Enterococcus italicus)(Ei)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)(Ls)或嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)(Tt)。在一些情况下,用于多重化的其他可编程核酸酶可以来自例如噬菌体(phage),诸如噬菌体(bacteriophage),也称为巨噬细胞。核酸酶可以来自称为Biggiephage的特定噬菌体分化枝。可编程核酸酶的任何组合都可用于多重化。在一些实施方案中,可编程核酸酶的多重化发生在一个反应体积中。在其他实施方案中,可编程核酸酶的多重化发生在单个装置中的单独反应体积中。

[0606] 扩增靶核酸

[0607] 本文公开了使用本文所述的任何方法、试剂、试剂盒或装置扩增靶核酸用于检测的方法。如本文所述的用于扩增靶核酸的组合物及其使用方法与本文公开的DETECTR测定方法相容。如本文所述的用于扩增靶核酸的组合物及其使用方法与本文公开的任何可编程核酸酶和所述可编程核酸酶在检测靶核酸的方法中的用途相容。靶核酸可以是扩增的目标核酸。目标核酸可以是本文公开的任何核酸或来自如本文公开的任何样品。这种扩增可以是热扩增(例如,使用PCR)或等温扩增。样品的这种核酸扩增可以提高靶核酸检测的灵敏度、特异性或准确性中的至少一项。用于核酸扩增的试剂可以包括重组酶、寡核苷酸引物、单链DNA结合(SSB)蛋白和聚合酶。核酸扩增可以是转录介导的扩增(TMA)。核酸扩增可以是解旋酶依赖性扩增(HDA)或环状解旋酶依赖性扩增(cHDA)。在其他情况下,核酸扩增是链置换扩增(SDA)。核酸扩增可以是重组酶聚合酶扩增(RPA)。核酸扩增可以是环介导扩增(LAMP)或指数扩增反应(EXPAR)中的至少一种。在一些情况下,核酸扩增通过滚环扩增(RCA)、连接酶链式反应(LCR)、简单方法扩增RNA靶标(SMART)、单引物等温扩增(SPIA)、多重置换扩增(MDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、铰链引发的引物依赖性核酸扩增(HIP)、切口酶扩增反应(NEAR)或改进的多重置换扩增(IMDA)进行。核酸扩增可以进行不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50或60分钟。有时,核酸扩增反应在20-45℃左右的温度下进行。核酸扩增反应可以在不高于20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃的温度下进行。核酸扩增反应可以在至少20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃或45℃的温度下进行。

[0608] 如本文所述的用于扩增靶核酸的组合物及其使用方法与包含可编程核酸酶和缓冲液的任何组合物相容,其已被开发以改善可编程核酸酶的功能和所述组合物在检测靶核酸的方法中的用途。如本文所述的用于扩增靶核酸的组合物及其使用方法与本文公开的任何方法相容,包括测定靶核酸序列中至少一个碱基差异(例如,测定SNP或碱基突变)的方法、通过扩增靶核酸序列以引入PAM来测定缺乏PAM的靶核酸的方法,以及用于经由扩增将PAM引入靶核酸序列的组合物。在一些情况下,靶核酸的扩增可以增加检测反应的灵敏度。在一些情况下,靶核酸的扩增可以增加检测反应的特异性。相对于不对应于靶核酸的核酸浓度,扩增靶核酸可以增加样品中靶核酸的浓度。在一些实施方案中,扩增靶核酸可用于修饰靶核酸序列。例如,扩增可用于将PAM序列插入到缺少PAM序列的靶核酸中。在一些情况

下,扩增可用于增加靶核酸序列的同质性。例如,扩增可用于去除靶核酸序列中的非目标核酸变异。

[0609] 扩增的靶核酸可以以相对于可编程核酸酶的量的量存在于DETECTR反应中。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于可编程核酸酶的量至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于可编程核酸酶的量不超过1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于可编程核酸酶的量1倍至2倍、1倍至3倍、1倍至4倍、1倍至5倍、1倍至10倍、1倍至25倍、1倍至50倍、1倍至100倍、1倍至500倍、1倍至1000倍、1倍至10,000倍、1倍至100,000倍、5倍至10倍、5倍至25倍、5倍至50倍、5倍至100倍、5倍至500倍、5倍至1000倍、5倍至10,000倍、5倍至100,000倍、10倍至25倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1000倍、10倍至10,000倍、10倍至100,000倍、100倍至500倍、100倍至1000倍、100倍至10,000倍、100倍至100,000倍、1000倍至10,000倍、1000倍至100,000倍或10,000倍至100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,可编程核酸酶以相对于靶核酸的量至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,可编程核酸酶以相对于靶核酸的量不超过1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,可编程核酸酶以相对于靶核酸的量1倍至2倍、1倍至3倍、1倍至4倍、1倍至5倍、1倍至10倍、1倍至25倍、1倍至50倍、1倍至100倍、1倍至500倍、1倍至1000倍、1倍至10,000倍、1倍至100,000倍、5倍至10倍、5倍至25倍、5倍至50倍、5倍至100倍、5倍至500倍、5倍至1000倍、5倍至10,000倍、5倍至100,000倍、10倍至25倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1000倍、10倍至10,000倍、10倍至100,000倍、100倍至500倍、100倍至1000倍、100倍至10,000倍、100倍至100,000倍、1000倍至10,000倍、1000倍至100,000倍或10,000倍至100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,靶核酸不存在于样品中。

[0610] 扩增的靶核酸可以以相对于指导核酸的量的量存在于DETECTR反应中。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于指导核酸的量至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于指导核酸的量不超过1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,扩增的靶核酸以相对于指导核酸的量1倍至2倍、1倍至3倍、1倍至4倍、1倍至5倍、1倍至10倍、1倍至25倍、1倍至50倍、1倍至100倍、1倍至500倍、1倍至1000倍、1倍至10,000倍、1倍至100,000倍、5倍至10倍、5倍至25倍、5倍至50倍、5倍至100倍、5倍至500倍、5倍至1000倍、5倍至10,000倍、5倍至100,000倍、10倍至25倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1000倍、10倍至10,000倍、10倍至100,000倍、100倍至500倍、100倍至1000倍、100倍至10,000倍、100倍至100,000倍、1000倍至10,000倍、1000倍至100,000倍或10,000倍至100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,指导核酸以相对于靶核酸的量至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,指导核酸以相对于靶核酸的量不超过1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍或100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,指导核酸以相对于靶核酸的

量1倍至2倍、1倍至3倍、1倍至4倍、1倍至5倍、1倍至10倍、1倍至25倍、1倍至50倍、1倍至100倍、1倍至500倍、1倍至1000倍、1倍至10,000倍、1倍至100,000倍、5倍至10倍、5倍至25倍、5倍至50倍、5倍至100倍、5倍至500倍、5倍至1000倍、5倍至10,000倍、5倍至100,000倍、10倍至25倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1000倍、10倍至10,000倍、10倍至100,000倍、100倍至500倍、100倍至1000倍、100倍至10,000倍、100倍至100,000倍、1000倍至10,000倍、1000倍至100,000倍或10,000倍至100,000倍摩尔过量存在。在一些实施方案中,靶核酸不存在于样品中。

[0611] 试剂盒

[0612] 本文公开的是用于使用如上讨论的方法检测、修饰、编辑或调节如本文公开的靶核酸序列的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含可编程核酸酶系统、试剂和支持介质。试剂和可编程核酸酶系统可以提供在试剂室中或支持介质上。或者,试剂和可编程核酸酶系统可以由使用试剂盒的个体放置到试剂室或支持介质中。任选地,试剂盒还包括缓冲液和滴管。试剂室可以是测试孔或容器。试剂室的开口可以足够大以容纳支持介质。缓冲液可以提供于滴瓶中以便于分配。滴管可以是一次性的并且转移固定体积。滴管可用于将样品放入试剂室中或支持介质上。

[0613] 用于检测本文所述的靶核酸的试剂盒或系统还包括用于样品中靶核酸的核酸扩增的试剂。等温核酸扩增允许在偏远区域或资源匮乏环境中使用试剂盒或系统,而无需专门的扩增设备。通常,用于核酸扩增的试剂包括重组酶、寡核苷酸引物、单链DNA结合(SSB)蛋白和聚合酶。有时,样品的核酸扩增提高检测靶核酸中测定的灵敏度、特异性或准确性中的至少一项。在一些情况下,核酸扩增在支持介质上的核酸扩增区域中进行。或者或组合地,核酸扩增在试剂室中进行,并且将所得样品应用于支持介质。有时,核酸扩增是等温核酸扩增。在一些情况下,核酸扩增是转录介导的扩增(TMA)。在其他情况下,核酸扩增是解旋酶依赖性扩增(HDA)或环状解旋酶依赖性扩增(cHDA)。在其他情况下,核酸扩增是链置换扩增(SDA)。在一些情况下,核酸扩增是通过重组酶聚合酶扩增(RPA)进行的。在一些情况下,核酸扩增是通过环介导扩增(LAMP)或指数扩增反应(EXPAR)中的至少一种进行的。在一些情况下,核酸扩增通过滚环扩增(RCA)、连接酶链式反应(LCR)、简单方法扩增RNA靶标(SMART)、单引物等温扩增(SPIA)、多重置换扩增(MDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、铰链引发的引物依赖性核酸扩增(HIP)、切口酶扩增反应(NEAR)或改进的多重置换扩增(IMDA)进行。通常,核酸扩增进行不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50或60分钟,或1至60分钟之间的任何值。有时,核酸扩增进行1至60、5至55、10至50、15至45、20至40或25至35分钟。有时,核酸扩增反应在20-45℃左右的温度下进行。在一些情况下,核酸扩增反应在不高于20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃或20℃至45℃间的任何值的温度下进行。在一些情况下,核酸扩增反应在至少20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃或20℃至45℃间的任何值的温度下进行。在一些情况下,核酸扩增反应在20℃至45℃、25℃至40℃、30℃至40℃或35℃至40℃的温度下进行。

[0614] 在一些实施方案中,用于检测靶核酸的试剂盒包括支持介质;靶向靶序列的指导核酸;能够在与指导核酸和靶序列复合时被激活的可编程核酸酶;以及包含检测部分的报告基因核酸,其中报告基因核酸能够被激活的核酸酶切割,从而生成第一可检测信号。通常,试剂盒还包括用于扩增目标靶核酸以产生PAM靶核酸的引物。

[0615] 在一些实施方案中，用于检测靶核酸的试剂盒包括PCR板；靶向靶序列的指导核酸；能够在与指导核酸和靶序列复合时被激活的可编程核酸酶；以及包含检测部分的单链报告基因核酸，其中报道核酸能够被激活的核酸酶切割，从而生成第一可检测信号。PCR板的孔可以预等分有靶向靶序列的指导核酸、当与指导核酸和靶序列复合时能够被激活的可编程核酸酶，以及至少一个包含检测部分的单链报告基因核酸群体。因此，用户可以将目标生物样品添加到预等分的PCR板的孔中，并使用荧光读取器或可见光读取器测量可检测信号。

[0616] 在一些实施方案中，用于修饰靶核酸的试剂盒包括支持介质；靶向靶序列的指导核酸；以及当与指导核酸和靶序列复合时能够被激活的可编程核酸酶。

[0617] 在一些实施方案中，用于修饰靶核酸的试剂盒包括PCR板；靶向靶序列的指导核酸；以及当与指导核酸和靶序列复合时能够被激活的可编程核酸酶。PCR板的孔可以预等分有靶向靶序列的指导核酸，以及当与指导核酸和靶序列复合时能够被激活的可编程核酸酶。因此，用户可以将目标生物样品添加到预等分的PCR板的孔中。

[0618] 在一些情况下，此类试剂盒可包括包装、载体或容器，所述试剂盒被分隔以容纳一个或多个容器，诸如小瓶、管等，每个容器都包括本文所述的方法中使用的单独元件之一。

[0619] 合适的容器包括例如试孔、瓶、小瓶和试管。在一些实施方案中，容器可以由多种材料诸如玻璃、塑料或聚合物形成。

[0620] 本文所述的试剂盒或系统含有包装材料。包装材料的实例包括但不限于小袋、泡罩包装、瓶、管、袋、小瓶、容器、瓶和任何适用于预期使用用模式的包装材料。

[0621] 试剂盒通常包括列出内容的标签和/或使用说明，以及带有使用说明的包装说明书。通常还会包括一组说明。在一个实施方案中，标签在容器上或与容器相关。在一些情况下，当形成标签的字母、数字或其他字符被附接、模制或蚀刻至容器本身内时，标签在容器上；当标签例如作为包装说明书存在于保存有容器的贮器或载体内时，标签与容器相关。在一个实施方案中，标签用于指示内容物将用于特定的治疗应用。标签还指示内容物的使用说明，诸如在本文所述的方法中。

[0622] 在包装形成的产品并包裹或装箱以保持无菌屏障后，可以通过热灭菌、气体灭菌、伽马辐照或通过电子束灭菌对产品进行最终灭菌。或者，可以通过无菌加工来制备和包装产品。

[0623] 除非另有限定，否则本文中所使用的所有技术术语具有与本发明领域内的普通技术人员对于该发明所属的通常理解的意义相同的意义。除非上下文另外明确规定，否则如在本说明书和所附权利要求中所用，单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个提及物。除非另有说明，本文任何对“或”的提及旨在涵盖“和/或”。

[0624] 如本文所用，术语“包括(comprising)”、及其语法等价词指明存在所述特征、整数、步骤、操作、元件和/或组分，但并不排除存在或者增添一个或多个其他特征、整数、步骤、操作、元件、组分和/或其组合。如本文所用，术语“和/或”包括一个或多个相关列出项目的任何和所有组合。

[0625] 除非特别说明或从上下文中显而易见，如本文所用，术语“约”指数字或数字范围应理解为表示所述数字和数字+/-其10％，或对于列出范围值低于列出的下限值的10％和高于列出的上限值的10％。

[0626] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用并且包括动物界的任何成员,包括人类。

[0627] 本公开的方法可以在受试者中进行。本公开的组合物可以施用于受试者。受试者可以是人类。受试者可以是哺乳动物(例如大鼠、小鼠、牛、狗、猪、绵羊、马)。受试者可以是脊椎动物或无脊椎动物。受试者可以是实验动物。受试者可以是患者。受试者可以患有疾病。受试者可以表现出疾病的症状。受试者可以不表现疾病的症状,但仍然患有疾病。受试者可以在护理人员的医疗护理下(例如,受试者住院并由医师治疗)。受试者可以是植物或作物。

[0628] 本公开的方法可以在细胞中进行。细胞可以在体外。细胞可以在体内。细胞可以离体。细胞可以是分离的细胞。细胞可以是生物体内的细胞。细胞可以是生物体。细胞可以是细胞培养物中的细胞。细胞可以是细胞集合中的一个。细胞可以是哺乳动物细胞或来源于哺乳动物细胞。细胞可以是啮齿动物细胞或来源于啮齿动物细胞。细胞可以是人类细胞或来源于人类细胞。细胞可以是原核细胞或来源于原核细胞。细胞可以是细菌细胞或可以来源于细菌细胞。细胞可以是古细菌细胞或来源于古细菌细胞。细胞可以是真核细胞或来源于真核细胞。细胞可以是多能干细胞。细胞可以是植物细胞或来源于植物细胞。细胞可以是动物细胞或来源于动物细胞。细胞可以是无脊椎动物细胞或来源于无脊椎动物细胞。细胞可以是脊椎动物细胞或来源于脊椎动物细胞。细胞可以是微生物细胞或来源于微生物细胞。细胞可以是真菌细胞或来源于真菌细胞。细胞可以来自特定的器官或组织。

[0629] 本公开的方法可以在真核细胞或细胞系中进行。在一些实施方案中,真核细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人胚肾293细胞(也称为HEK或HEK293)细胞。在一些实施方案中,真核细胞是K562细胞。

[0630] 可用于本公开的细胞系的非限制性实例包括:C8161、CCRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、CIR、Rat6、CV1、RPTE、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、Jurkat、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、Hep G2、HeLa B、HeLa T4、COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1猴肾上皮细胞、BALB/3T3小鼠胚胎成纤维细胞、3T3 Swiss、3T3-L1、132-d5人类胎儿成纤维细胞;10.1小鼠成纤维细胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1细胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1-6、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、Jurkat、JY细胞、K562细胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Mel 1-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC 6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN/OPCT细胞系、Peer、PNT-1A/PNT 2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2细胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1细胞系、U373、U87、U937、VCaP、Vero细胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1和YAR。可用于本公开的其他细胞的非限制性实例包括免疫细胞,诸如CART、T细胞、B细胞、

NK细胞、粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、抗原呈递细胞(APC)或适应性细胞。可用于本公开的细胞的非限制性实例还包括植物细胞，诸如薄壁组织、厚壁组织、厚角组织、木质部、韧皮部、种系(例如，花粉)。细胞来自于石松类植物、蕨类植物、裸子植物、被子植物、苔藓植物、轮藻植物、绿藻、红藻或灰藻。可用于本公开的细胞的非限制性实例还包括干细胞，诸如人类干细胞、动物干细胞、非来源于人类胚胎干细胞的干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞、多能干细胞细胞、诱导多能干细胞(iPS)、成体干细胞、成体干细胞、造血干细胞、组织特异性干细胞。

[0631] 本文所述的方法可用于创建包含至少一种本文所述的细胞的细胞群体。在一些情况下，细胞群体包含本文所述的非天然存在的组合物。

[0632] 本公开的组合物包含细胞群体或其任何子代，其包含本文所述的其他组合物或已经通过本文所述的方法修饰的组合物。

[0633] 本文所述的方法可包括从本文所述的细胞或细胞群体产生蛋白质。在一些情况下，方法包括使用已通过本文所述的任何方法修饰的本文提供的细胞产生蛋白质和工业蛋白质或大规模的蛋白质。在一些情况下，啮齿动物细胞或CHO细胞被本文所述的核酸酶或cas酶修饰，随后被使用、扩增或培养用于蛋白质生产。在一些情况下，如本文所述，经修饰的CHO细胞的衍生物或子代被使用、扩增或培养用于蛋白质生产。蛋白质生产方法还可包括供体模板、其他指导RNA、缓冲液、蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂或去垢剂。

[0634] 实施例

[0635] 以下实施例被包括以进一步描述本公开的一些方面，而不应用于限制本发明的范围。

[0636] 实施例1

[0637] 人类密码子优化的CasΦ多肽

[0638] 制备了说明性CasΦ多肽的人类密码子优化核苷酸序列。表4提供了适用于本公开内容的方法和组合物的示例性CasΦ多肽的人类密码子优化核苷酸序列。

[0639] 表4.人类密码子优化的核苷酸序列

[0640]

名称	内源性氨基酸序列	人类密码子优化的核苷酸序列
CasΦ.2	MPKPAVESEFSKVLK KHFPGERFRSSYMK RGGKILAAQGEEAV VAYLQGKSEEEPPNF QPPAKCHVVTKSRD FAEWPIMKASEAIQR YIYALSTTERAACKP GKSSESHAAWFAAT GVSNHGYSHVQGL NLIFDHTLGRYDGV LKKVQLRNEKARAR LESINASRADEGLPE IKAEEEEVATNETGH LLQPPGINPSFYVYQ TISPQAYRPRDEIVLP PEYAGYVRDPNAPIP LGVVRNRCDIQKGC PGYIPEWQREAGTAI SPKTGKAVTVPGLSP KKNKRMRRYWRSE KEKAQDALLVTVRI GTDWVVIDVRGLLR NARWRTIAPKDISLN ALLDLFTGDPVIDVR RNIVTFTYTLDACGT YARKWTLKGKQTK ATLDKLTATQTVALV AIDLGQTNPISAGISR VTQENGALQCEPLD RFTLPDDLLKDISAY RIAWDRNEEELRAR SVEALPEAQQAEVR ALDGVSKETARTQL CADFGLDPKRLPWD KMSSNTTFISEALLS NSVSRDQVFFTPAPK KGAKKKAPVEVMR KDRTWARAYKPRLS VEAQKLKNEALWAL KRTSPEYLKLSRRKE ELCRRSINYVIEKTR	ATGCCTAAGCCTGCCGTGGAAAGCG AGTTCAGCAAGGTGCTGAAGAAGC ACTTCCCCGGCGAGCGGTTCAGATC CAGCTACATGAAGAGAGGCGGCAAG ATCCTGGCCGCTCAAGGCGAAGAAG CCGTGGTCGCATATCTGCAGGGCAA GAGCGAGGAAGAACCTCCTAACTTC CAGCCTCCTGCCAAGTGCCACGTGG TCACCAAGAGCAGAGATTTCGCCGA GTGGCCCATCATGAAGGCCTCTGAA GCCATCCAGCGGTACATCTACGCCCT GAGCACAACAGAAAGAGCCGCCTG CAAGCCTGGCAAGAGCAGCGAATCT CACGCCGCTTGGTTTGCCGCTACCG GCGTGTCCAATCACGGCTACTCTCAT GTGCAGGGCCTGAACCTGATCTTCG ATCACACCCTGGGCAGATACGACGG CGTGCTGAAAAAGGTGCAGCTGCGG AACGAGAAGGCCAGAGCCAGACTG GAATCCATCAACGCCAGCAGAGCCG ATGAGGGCCTGCCTGAGATTAAGGC CGAAGAGGAAGAGGTGGCCACAAA CGAAACCGGCCATCTGCTGCAGCCA CCTGGCATCAACCCTAGCTTCTACGT GTACCAGACAATCAGCCCTCAGGCC TACAGACCCAGGGACGAGATTGTGC TGCCTCCTGAGTATGCCGGCTACGTG CGGGATCCCAACGCTCCTATTCCTCT GGGCGTCGTGCGGAACAGATGCGAC ATCCAGAAAGGCTGCCCCGGCTACA TTCCCGAGTGGCAGAGAGAAGCCG GCACCGCCATTTCTCCAAAGACAGG CAAAGCCGTGACCGTGCCTGGCCTG TCTCCTAAGAAAAACAAGCGGATGC GGCGGTACTGGCGGAGCGAGAAAG AAAAAGCCCAGGACGCCCTGCTGGT CACAGTGCGGATTGGCACAGATTGG GTCGTGATCGATGTGCGCGGCCTGC TGAGAAATGCCAGATGGCGGACAAT CGCCCCTAAGGACATCAGCCTGAAC GCACTGCTGGACCTGTTCACCGGCG

[0641]

	RRTQCQIVIPVIEDL NVRFFHGSGKRLPG WDNFFTAKKENRWF IQGLHKAFSDLRTHR SFYVFEVRPERTSIT CPKCGHCEVGNRDG EAFQCLSCGKTCNA DLDVATHNLTQVALT GKTMPKREEPRDAQ GTAPARKTKKASKS KAPPAEREDQTPAQ EPSQTS (SEQ ID NO: 2)	ATCCTGTGATTGACGTGCGGCGGAA CATCGTGACCTTCACCTACACACTGG ACGCCTGCGGCACCTACGCCAGAAA GTGGACACTGAAGGGCAAGCAGAC CAAGGCCACTCTGGACAAGCTGACC GCCACACAGACAGTGGCCCTGGTGG CTATTGATCTGGGCCAGACAAACCCT ATCAGCGCCGGCATCAGCAGAGTGA CCCAAGAAAATGGCGCCCTGCAGTG CGAGCCCCTGGACAGATTCACACTG CCCGACGACCTGCTGAAGGACATCT CCGCCTATAGAATCGCCTGGGACCG CAATGAAGAGGAACTGAGAGCCAG AAGCGTGGAAGCCCTGCCTGAAGCA CAGCAGGCTGAAGTGCGAGCACTG GACGGGGTGTCCAAAGAGACAGCC AGAACTCAGCTGTGCGCCGACTTTG GACTGGACCCCAAAAGACTGCCCTG GGACAAGATGAGCAGCAACACCAC CTTCATCAGCGAGGCCCTGCTGAGC AATAGCGTGTCCAGAGATCAGGTGT TCTTCACCCCTGCTCCAAAGAAGGG CGCCAAGAAGAAAGCCCCTGTCGA AGTGATGCGGAAGGACCGGACATGG GCCAGAGCTTACAAGCCCAGACTGT CCGTGGAAGCTCAGAAGCTGAAGA ACGAAGCCCTGTGGGCCCTGAAGAG AACAAGCCCCGAGTACCTGAAGCTG AGCCGGCGGAAAGAAGAACTCTGC CGGCGGAGCATCAACTACGTGATCG AGAAAACCCGGCGGAGAACCCAGT GCCAGATCGTGATTCCTGTGATCGAG GACCTGAACGTGCGGTTCTTTCACG GCAGCGGCAAGAGACTGCCCGGCT GGGATAATTTCTTCACCGCCAAAAA AGAAAACCGGTGGTTCATCCAGGGC CTGCACAAGGCCTTCAGCGACCTGA GAACCCACCGGTCCTTTTACGTGTTC GAAGTGCGGCCCGAGCGGACCAGC ATCACCTGTCCTAAATGCGGCCACTG CGAAGTGGGCAACAGAGATGGCGA GGCCTTCCAGTGTCTGAGCTGTGGC AAGACCTGCAACGCCGACCTGGATG TGGCCACTCACAATCTGACACAGGT GGCCCTGACCGGCAAGACCATGCCT AAGAGAGAGGAACCTAGGGACGCC CAGGGTACAGCCCCTGCCAGAAAGA CAAAGAAAGCCAGCAAGAGCAAGG CCCCTCCTGCCGAGAGAGAAGATCA GACCCCAGCTCAAGAGCCCAGCCAG

[0642]

		ACATCT (SEQ ID NO: 1405)
CasΦ.4	MEKEITELTKIRREFP	ATGGAAAAAGAGATCACCGAGCTGA
	NKKFSSTDMKKAG	CCAAGATCCGCAGAGAGTTCCCCAA
	KLLKAEGPDAVRDF	CAAGAAGTTCAGCAGCACCGACATG
	LNSCQEIIGDFKPPV	AAGAAGGCCGGCAAGCTGCTGAAG
	KTNIVSISRPFEEWP	GCCGAAGGACCTGATGCCGTGCGGG
	VSMVGRAIQEYYFS	ACTTCCTGAACAGCTGCCAAGAGAT
	LTKEELESVHPGTSS	CATCGGCGACTTCAAGCCTCCAGTC
	EDHKSFFNITGLSNY	AAGACCAACATCGTGTCCATCAGCA
	NYTSVQGLNLIFKN	GACCCTTCGAGGAATGGCCCGTGTC
	AKAIYDGTLVKANN	CATGGTTGGACGGGCCATCCAAGAG
	KNKKLEKKFNEINH	TACTACTTCAGCCTGACCAAAGAGG
	KRSLEGLPIITPDFEE	AACTGGAAAGCGTTCACCCCGGCAC
	PFDENGHLNNPPGIN	CAGCAGCGAGGACCACAAGAGCTTT
	RNIYGYQGCAAKVF	TTCAACATCACCGGCCTGAGCAACT
	VPSKHKMVSLPKEY	ACAACTACACCAGCGTGCAGGGCCT
	EGYNRDPNLSLAGF	GAACCTGATCTTCAAGAACGCCAAG
	RNRLEIPEGEPGHVP	GCCATCTACGACGGCACCCTGGTCA
	WFQRMDIPEGQIGH	AGGCCAACAACAAGAACAAGAAGC
	VNKIQRFNFVHGKN	TCGAGAAGAAGTTTAACGAGATCAA
	SGKVKFSDKTGRVK	CCACAAGCGGAGCCTGGAAGGCCT
	RYHHSKYKDATKPY	GCCTATCATCACCCCTGATTTCGAGG
	KFLEESKKVSALDSI	AACCCTTCGACGAGAACGGCCACCT
	LAIITIGDDWVVFDI	GAACAACCCTCCAGGCATCAACCGG
	RGLYRNVFYRELAQ	AACATCTACGGCTATCAGGGCTGCG
	KGLTAVQLLDLFTG	CCGCCAAGGTGTTCGTGCCTTCTAA
	DPVIDPKKGVVTFS	GCACAAGATGGTGTCCCTGCCTAAA
	YKEGVVPVFSQKIV	GAGTACGAGGGCTACAACAGGGACC
	PRFKSRDTLEKLTSQ	CCAACCTGTCTCTGGCCGGCTTCAG
	GPVALLSVDLGQNE	AAACAGACTGGAAATCCCTGAGGGC
	PVAARVCSLKNIND	GAGCCTGGCCATGTGCCATGGTTCC
	KITLDNSCRISFLDD	AGAGAATGGATATCCCCGAGGGCCA
	YKKQIKDYRDSLDE	GATCGGACACGTGAACAAGATCCAG
	LEIKIRLEAINSLETN	CGGTTCAACTTCGTGCACGGCAAGA
	QQVEIRDLDVFSAD	ACAGCGGCAAAGTGAAGTTCTCCGA
	RAKANTVDMFDIDP	CAAGACCGGCAGAGTGAAGAGATAC
	NLISWDSMSDARVS	CACCACAGCAAGTACAAGGACGCTA
	TQISDLYLKNGGDES	CCAAGCCTTACAAGTTCCTGGAAGA
	RVYFEINNKRIKRSD	GTCCAAGAAGGTGTCAGCCCTGGAC
	YNISQLVRPKLSDST	AGCATCCTGGCCATCATCACAATCGG
	RKNLNDSIWKLKRT	CGACGACTGGGTCGTGTTCGACATC
	SEEYLKLSKRKLELS	AGAGGCCTGTACCGGAACGTGTTCT
	RAVVNYTIRQSKLLS	ACAGAGAGCTGGCCCAGAAAGGCC
	GINDIVIILEDLDVK	TGACAGCTGTGCAACTGCTGGACCT
	KKFNGRGIRDIGWD	GTTTACCGGCGATCCCGTGATCGACC
	NFFSSRKENRWFIPA	CCAAGAAAGGCGTGGTCACCTTCAG
	FHKAFSELSSNRGLC	CTACAAAGAGGGCGTCGTCCCCGTC
	VIEVNPAWTSATCPD	TTTAGCCAGAAAATCGTGCCCCGGT
	CGFCSKENRDGINFT	TCAAGAGCCGGGACACCCTGGAAA

[0643]

	CRKCGVSYHADIDV ATLNIARVAVLGKPM SGPADRERLGDTKK PRVARSRKTMKRKD ISNSTVEAMVTA (SEQ ID NO: 4)	AGCTGACCTCTCAGGGACCTGTGGC TCTGCTGTCTGTGGACCTGGGACAG AATGAACCTGTGGCCGCCAGAGTGT GCAGCCTGAAGAACATCAACGACAA GATCACCCTGGACAACTCTTGCCGG ATCAGCTTCCTGGACGACTACAAGA AGCAGATCAAGGACTACAGAGACAG CCTGGACGAGCTGGAAATCAAGATC CGGCTGGAAGCCATCAACTCCCTCG AGACAAACCAGCAGGTCGAGATCA GAGATCTGGACGTGTTCAGCGCCGA CCGGGCCAAAGCCAATACCGTGGAC ATGTTTGACATCGACCCTAACCTGAT CAGCTGGGACTCCATGAGCGACGCC AGAGTCAGCACCCAGATCAGCGACC TGTACCTGAAGAATGGCGGCGACGA GAGCCGGGTGTACTTTGAGATTAAC AACAAACGGATTAAGCGGAGCGACT ACAACATCAGCCAGCTCGTGCGGCC CAAGCTGAGCGATAGCACCAGAAAG AACCTGAACGACAGCATCTGGAAGC TGAAGCGGACCAGCGAGGAATACCT GAAGCTGAGCAAGCGGAAGCTGGA ACTGAGCAGAGCCGTCGTGAATTAC ACCATCCGGCAGAGCAAACTGCTGA GCGGCATCAATGACATCGTGATCATT CTCGAGGACCTGGACGTGAAGAAG AAATTCAACGGCAGAGGCATCCGCG ATATCGGCTGGGACAACTTCTTCAGC TCCCGGAAAGAAAACCGGTGGTTCA TCCCCGCCTTCCACAAGGCCTTTAGC GAGCTGAGCAGCAACAGGGGCCTG TGCGTGATCGAAGTGAATCCTGCCT GGACCAGCGCCACCTGTCCTGATTG TGGCTTCTGCAGCAAAGAAAACAGA GATGGCATCAACTTCACGTGCCGGA AGTGCGGCGTGTCCTACCACGCCGA TATTGACGTGGCCACACTGAATATTG CCAGAGTGGCCGTGCTGGGCAAGCC TATGTCTGGACCTGCCGACAGAGAG AGACTGGGCGACACCAAGAAACCTA GAGTGGCCCGCAGCAGAAAGACCAT GAAGCGGAAGGACATCAGCAACAG CACCGTCGAGGCCATGGTTACAGCT (SEQ ID NO: 1406)
CasΦ.11	MSNTAVSTREHMSN KTTPPSPLSLLLRAH FPGLKFESQDYKIAG KKLRDGGPEAVISYL TGKGQAKLKDVKPP	ATGAGCAACACCGCCGTGTCCACCA GAGAACACATGTCCAACAAGACAAC CCCTCCATCTCCTCTGAGCCTGCTGC TGAGAGCCCACTTTCCTGGCCTGAA GTTCGAGAGCCAGGACTACAAGATC

[0644]

AKAFVIAQSRPFIEW	GCCGGCAAGAAACTGAGAGATGGC
DLVRVSRQIQEKIFGI	GGACCTGAGGCCGTGATCAGCTACC
PATKGRPKQDGLSET	TGACTGGAAAAGGCCAGGCCAAGC
AFNEAVASLEVDGK	TGAAGGACGTGAAGCCTCCTGCCAA
SKLNEETRAAFYEV	GGCCTTTGTGATCGCCCAGAGCAGA
LGLDAPSLHAQAQN	CCCTTCATCGAGTGGGACCTCGTCA
ALIKSAISIREGVLK	GAGTGTCCCGGCAGATCCAAGAGAA
KVENRNEKNLSKTK	GATCTTTGGCATCCCCGCCACCAAG
RRKEAGEEATFVEE	GGCAGACCTAAGCAAGATGGCCTGA
KAHDERGYLIHPPG	GCGAGACAGCCTTCAACGAAGCCGT
VNQTIPGYQAVVIKS	GGCCAGCCTGGAAGTGGACGGCAA
CPSDFIGLPSGCLAK	GAGCAAGCTGAACGAGGAAACCAG
ESAEALTDYLPHDR	AGCCGCCTTCTACGAGGTGCTGGGA
MTIPKGQPGYVPEW	CTTGATGCCCCAAGCCTGCATGCTCA
QHPLLNRRKNRRRR	GGCCCAGAATGCCCTGATCAAGAGC
DWYSASLNKPKATC	GCCATCAGCATCAGAGAAGGCGTGC
SKRSGTPNRKNSRT	TGAAGAAGGTGGAAAACCGGAACG
DQIQSGRFKGAIPVL	AGAAGAACCTGAGCAAGACCAAGC
MRFQDEWVIIDIRGL	GGCGGAAAGAGGCTGGCGAAGAGG
LRNARYRKLLKEKS	CCACCTTTGTGGAAGAGAAGGCCCA
TIPDLLSLFTGDPSID	CGACGAGCGGGGCTATCTGATTCATC
MRQGVCTFIYKAGQ	CTCCTGGCGTGAACCAGACAATCCC
ACSAKMVKTKNAP	CGGCTATCAGGCCGTGGTCATCAAG
EILSELTKSGPVVLVS	AGCTGCCCCAGCGATTTCATCGGCCT
IDLGQTNPIAAKVSR	GCCTAGTGGCTGTCTGGCCAAAGAG
VTQLSDGQLSHETL	TCTGCCGAGGCTCTGACCGATTACCT
LRELLSNDSSDGKEI	GCCTCACGACCGGATGACTATCCCC
ARYRVASDRLRDKL	AAGGGACAGCCTGGCTATGTGCCCG
ANLAVERLSPEHKSE	AATGGCAGCACCCTCTGCTGAACAG
ILRAKNDTPALCKAR	AAGAAAGAACCGGCGCAGAAGAGA
VCAALGLNPEMIAW	CTGGTACAGCGCCAGCCTGAACAAG
DKMTPYTEFLATAY	CCCAAGGCCACCTGTAGCAAGAGAT
LEKGGDRKVATLKP	CCGGCACACCCAACCGGAAGAACA
KNRPEMLRRDIKFK	GCAGAACCGACCAGATCCAGAGCG
GTEGVRIEVSPEAAE	GCAGATTCAAGGGCGCCATTCCTGT
AYREAQWDLQRTSP	GCTGATGCGGTTCCAGGATGAGTGG
EYLRLSTWKQELTK	GTCATCATCGACATCCGGGGCCTGCT
RILNQLRHKAAKSS	GAGAAACGCCCGGTATCGGAAGCTG
QCEVVVMAFEDLNI	CTGAAAGAGAAGTCCACCATTCCTG
KMMHGNGKWADG	ACCTGCTGAGCCTGTTCACCGGCGA
GWDAFFIKKRENRW	TCCCAGCATCGATATGAGACAGGGC
FMQAFHKSLTELGA	GTGTGCACCTTCATCTACAAGGCCG
HKGVPTIEVTPHRTS	GCCAGGCCTGTAGCGCCAAGATGGT
ITCTKCGHCDKANR	CAAGACAAAGAACGCCCCTGAGATC
DGERFACQKCGFVA	CTGTCCGAGCTGACCAAGTCTGGAC
HADLEIATDNIERVA	CTGTGGTGCTGGTGTCCATCGACCT
LTGKPMPKPESERSG	GGGCCAGACAAATCCTATCGCCGCC
DAKKSVGARKAAF	AAGGTGTCCAGAGTGACCCAGCTGT
KPEEDAEAAE (SEQ ID NO: 2468)	CTGATGGCCAGCTGAGCCACGAGAC ACTGCTGAGGGAACTGCTGAGCAAC

[0645]

		GATAGCAGCGACGGCAAAGAGATCG CCCGGTACAGAGTGGCCAGCGACAG ACTGAGAGACAAGCTGGCCAATCTG GCCGTGGAAAGACTGAGCCCTGAGC ACAAGAGCGAGATCCTGAGAGCCA AGAACGACACCCCTGCTCTGTGCAA GGCCAGAGTGTGTGCTGCCCTGGGA CTGAACCCTGAAATGATCGCCTGGG ACAAGATGACCCCTTACACCGAGTT TCTGGCCACCGCCTACCTGGAAAAA GGCGGCGACAGAAAAGTGGCCACA CTGAAGCCCAAGAACAGACCCGAG ATGCTGCGGCGGGACATCAAGTTCA AGGGAACCGAGGGCGTCAGAATCG AGGTGTCACCTGAAGCCGCCGAGGC CTATAGAGAAGCCCAGTGGGATCTG CAGAGGACAAGCCCCGAGTACCTGA GACTGTCCACCTGGAAGCAAGAGCT GACAAAGAGAATCCTGAACCAGCTG CGGCACAAGGCCGCCAAAAGCAGC CAGTGTGAAGTGGTGGTCATGGCCT TCGAGGACCTGAACATCAAGATGAT GCACGGCAACGGCAAGTGGGCCGAT GGTGGATGGGATGCCTTCTTCATCAA GAAACGCGAGAACCGGTGGTTCATG CAGGCCTTCCACAAGAGCCTGACAG AGCTGGGAGCACACAAGGGCGTGC CAACCATCGAAGTGACCCCTCACAG AACCAGCATCACCTGTACCAAGTGC GGCCACTGCGACAAGGCCAACAGA GATGGGGAGAGATTCGCCTGCCAGA AATGCGGCTTTGTGGCCCACGCCGA TCTGGAAATCGCCACCGACAACATC GAGAGAGTGGCCCTGACAGGCAAG CCCATGCCTAAGCCTGAGAGCGAGA GAAGCGGCGACGCCAAGAAATCTGT GGGAGCCAGAAAGGCCGCCTTCAA GCCTGAGGAAGATGCCGAAGCTGCC GAG (SEQ ID NO: 1407)
CasΦ.12	MIKPTVSQFLTPGFK LIRNHSRTAGLKLKN EGEEACKKFVRENEI PKDECPNFQGGPAIA NIIAKSREFTEWEIY QSSLAIQEVIFTLPK DKLPEPILKEEWRA QWLSEHGLDTVPYK EAAGLNLIIKNAVNT YKGVQVKVDNKNK NNLAKINRKNEIAK	ATGATCAAGCCTACCGTCAGCCAGTT TCTGACCCCTGGCTTCAAGCTGATCC GGAACCACTCTAGAACAGCCGGCCT GAAGCTGAAGAACGAGGGCGAAGA GGCCTGCAAGAAATTCGTGCGCGAG AACGAGATCCCCAAGGACGAGTGCC CCAACTTTCAAGGCGGACCCGCCAT TGCCAACATCATTGCCAAGAGCCGC GAGTTCACCGAGTGGGAGATCTACC AGTCTAGCCTGGCCATCCAAGAAGT GATCTTCACCCTGCCTAAGGACAAG

[0646]

	LNGEQEISFEEIKAF	CTGCCCGAGCCTATCCTGAAAGAGG
	DDKGYLLQKPSPNK	AATGGCGAGCCCAGTGGCTGTCTGA
	SIYCYQSVSPKPFITS	GCACGGACTGGATACCGTGCCTTAC
	KYHNVNLPEEYIGY	AAAGAAGCCGCCGGACTGAACCTGA
	YRKSNEPIVSPYQFD	TCATCAAGAACGCCGTGAACACCTA
	RLRIPIGEPGYVPKW	CAAGGGCGTGCAAGTGAAGGTGGA
	QYTFLSKKENKRRK	CAACAAGAACAAAAACAACCTGGC
	LSKRIKNVSPILGIICI	CAAGATCAACCGGAAGAATGAGATC
	KKDWCVFDMRGLL	GCCAAGCTGAACGGCGAGCAAGAG
	RTNHWKKYHKPTD	ATCAGCTTCGAGGAAATCAAGGCCT
	SINDLFDYFTGDPVI	TCGACGACAAGGGCTACCTGCTGCA
	DTKANVVRFRYKM	GAAGCCCTCTCCAAACAAGAGCATC
	ENGIVNYKPVREKK	TACTGCTACCAGAGCGTGTCCCCTA
	GKELLENICDQNGS	AGCCTTTCATCACCAGCAAGTACCA
	CKLATVDVGQNNPV	CAACGTGAACCTGCCTGAAGAGTAC
	AIGLFELKKVNGELT	ATCGGCTACTACCGGAAGTCCAACG
	KTLISRHPTPIDFCN	AGCCCATCGTGTCCCCATACCAGTTC
	KITAYRERYDKLESS	GACAGACTGCGGATCCCTATCGGCG
	IKLDAIKQLTSEQKIE	AGCCTGGCTATGTGCCTAAGTGGCA
	VDNYNNNFTPQNTK	GTACACCTTCCTGAGCAAGAAAGAG
	QIVCSKLNINPNDLP	AACAAGCGGCGGAAGCTGAGCAAG
	WDKMISGTHFISEK	CGGATCAAGAATGTGTCCCCAATCCT
	AQVSNKSEIYFTSTD	GGGCATCATCTGCATCAAGAAAGAT
	KGKTKDVMKSDYK	TGGTGCGTGTTCGACATGCGGGGCC
	WFQDYKPKLSKEVR	TGCTGAGAACAAACCACTGGAAGA
	DALSDIEWRLRRESL	AGTATCACAAGCCCACCGACAGCAT
	EFNKLSKSREQDAR	CAACGACCTGTTCGACTACTTCACC
	QLANWISSMCDVIGI	GGCGATCCCGTGATCGACACCAAGG
	ENLVKKNNFFGGSG	CCAATGTCGTGCGGTTCCGGTACAA
	KREPGWDNFYKPK	GATGGAAAACGGCATCGTGAACTAC
	KENRWWINAIHKAL	AAGCCCGTGCGGGAAAAGAAGGGC
	TELSQNKGKRVILLP	AAAGAGCTGCTGGAAAACATCTGCG
	AMRTSITCPKCKYC	ACCAGAACGGCAGCTGCAAGCTGG
	DSKNRNGEKFNCLK	CCACAGTGGATGTGGGCCAGAACAA
	CGIELNADIDVATEN	CCCTGTGGCCATCGGCCTGTTCGAG
	LATVAITAQSMPKPT	CTGAAAAAAGTGAACGGGGAGCTG
	CERSGDAKKPVRAR	ACCAAGACACTGATCAGCAGACACC
	KAKAPEFHDKLAPS	CCACACCTATCGATTTCTGCAACAAG
	YTVVLREAV (SEQ ID NO: 12)	ATCACCGCCTACCGCGAGAGATACG
		ACAAGCTGGAAAGCAGCATCAAGCT
		GGACGCCATCAAGCAGCTGACCAGC
		GAGCAGAAAATCGAAGTGGACAACT
		ACAACAACAACTTCACGCCCCAGAA
		CACCAAGCAGATCGTGTGCAGCAAG
		CTGAATATCAACCCCAACGATCTGCC
		CTGGGACAAGATGATCAGCGGCACC
		CACTTCATCAGCGAGAAGGCCCAGG
		TGTCCAACAAGAGCGAGATCTACTT
		TACCAGCACCGATAAGGGCAAGACC
		AAGGACGTGATGAAGTCCGACTACA

[0647]

		AGTGGTTCCAGGACTATAAGCCCAA GCTGTCCAAAGAAGTGCGGGACGCC CTGAGCGATATTGAGTGGCGGCTGA GAAGAGAGAGCCTGGAATTCAACA AGCTCAGCAAGAGCAGAGAGCAGG ACGCCAGACAGCTGGCCAATTGGAT CAGCAGCATGTGCGACGTGATCGGC ATCGAGAACCTGGTCAAGAAGAACA ACTTCTTCGGCGGCAGCGGCAAGAG AGAACCCGGCTGGGACAACTTCTAC AAGCCGAAGAAAGAAAACCGGTGG TGGATCAACGCCATCCACAAGGCCC TGACAGAGCTGTCCCAGAACAAGG GAAAGAGAGTGATCCTGCTGCCTGC CATGCGGACCAGCATCACCTGTCCTA AGTGCAAGTACTGCGACAGCAAGAA CCGCAACGGCGAGAAGTTCAATTGC CTGAAGTGTGGCATTGAGCTGAACG CCGACATCGACGTGGCCACCGAAAA TCTGGCTACCGTGGCCATCACAGCC CAGAGCATGCCTAAGCCAACCTGCG AGAGAAGCGGCGACGCCAAGAAAC CTGTGCGGGCCAGAAAAGCCAAGG CTCCCGAGTTCCACGATAAGCTGGC CCCTAGCTACACCGTGGTGCTGAGA GAAGCTGTG (SEQ ID NO: 1408)
CasΦ.17	MYSLEMADLKSEPS LLAKLLRDRFPGKY WLPKYWKLAEKKR LTGGEEAACEYMAD KQLDSPPPNFRPPAR CVILAKSRPFEDWP VHRVASKAQSFVIGL SEQGFAALRAAPPST ADARRDWLRSHGA SEDDLMALEAQLLE TIMGNAISLHGGVL KKIDNANVKAAKRL SGRNEARLNKGLQE LPPEQEGSAYGADG LLVNPPGLNLNIYCR KSCCPKPVKNTARF VGHYPGYLRDSDSI LISGTMDRLTIIEGM PGHIPAWQREQGLV KPGGRRRRLSGSES NMRQKVDPSTGPRR STRSGTVNRSNQRT GRNGDPLLVEIRMK EDWVLLDARGLLR	ATGTACAGCCTGGAAATGGCCGACC TGAAGTCCGAGCCTTCTCTGCTGGCT AAGCTGCTGAGAGACAGATTCCCCG GCAAGTACTGGCTGCCTAAGTACTG GAAGCTGGCCGAGAAGAAGAGACT GACAGGCGGAGAAGAAGCCGCCTG CGAGTACATGGCTGACAAGCAGCTG GATAGCCCTCCACCTAACTTCCGGCC TCCAGCCAGATGTGTGATCCTGGCC AAGAGCAGACCCTTCGAGGATTGGC CAGTGCACAGAGTGGCCAGCAAGG CCCAGTCTTTTGTGATCGGCCTGAGC GAGCAGGGCTTCGCTGCTCTTAGAG CTGCCCCTCCTAGCACAGCCGACGC CAGAAGAGATTGGCTGAGAAGCCAT GGCGCCAGCGAGGATGATCTGATGG CTCTGGAAGCCCAGCTGCTGGAAAC CATCATGGGCAACGCCATTTCTCTGC ACGGCGGCGTGCTGAAGAAGATCGA CAACGCCAACGTGAAGGCCGCCAA GAGACTGTCCGGAAGAAACGAGGC CAGACTGAACAAGGGCCTGCAAGA GCTGCCTCCTGAGCAAGAGGGATCT GCCTATGGCGCCGATGGCCTGCTGGT

[0648]

	NLRWRESKRGLSCD HEDLSLSGLLALFSG DPVIDPVRNEVVFLY GEGIIPVRSTKPVGT RQSKKLLERQASMG PLTLISCDLGQTNLIA GRASAISLTHGSLGV RSSVRIELDPEIIKSF ERLRKDADRLETEIL TAAKETLSDEQRGE VNSHEKDSPQTAKA SLCRELGLHPPSLPW GQMGPSTTFIADMLI SHGRDDDAFLSHGE FPTLEKRKKFDKRF CLESRPLLSSETRKA LNESLWEVKRTSSEY ARLSQRKKEMARRA VNFVVEISRRKTGLS NVIVNIEDLNVRIFH GGGKQAPGWDGFF RPKSENRWFIQAIHK AFSDLAAHHGIPVIE SDPQRTSMTCPECG HCDSKNRNGVRFLC KGCGASMDADFDA ACRNLERVALTGKP MPKPSTSCERLLSAT TGKVCSDHSLSHDA IEKAS (SEQ ID NO: 17)	TAATCCTCCTGGCCTGAACCTGAACA TCTACTGCAGAAAGAGCTGCTGCCC CAAGCCTGTGAAGAACACCGCCAGA TTCGTGGGACACTACCCCGGCTACC TGAGAGACTCCGACAGCATCCTGAT CAGCGGCACCATGGACCGGCTGACA ATCATCGAGGGAATGCCCGGACACA TCCCCGCCTGGCAACGAGAACAGGG ACTTGTGAAACCTGGCGGCAGAAGG CGGAGACTGTCTGGCAGCGAGAGC AACATGAGACAGAAGGTGGACCCC AGCACAGGCCCCAGAAGAAGCACA AGATCCGGCACCGTGAACAGAAGCA ACCAGCGGACAGGCAGAAACGGCG ATCCTCTGCTGGTGGAAATCCGGATG AAGGAAGATTGGGTCCTGCTGGACG CCAGAGGCCTGCTGAGAAATCTGAG ATGGCGCGAGTCCAAGAGAGGCCTG AGCTGCGATCACGAGGATCTGAGCC TGTCTGGACTGCTGGCCCTGTTTTCT GGCGACCCCGTGATCGATCCTGTGC GGAATGAGGTGGTGTTCCTGTACGG CGAGGGCATCATTCCAGTGCGGAGC ACAAAGCCTGTGGGCACCAGACAG AGCAAGAAACTGCTGGAACGGCAG GCCAGCATGGGCCCTCTGACACTGA TCTCTTGTGACCTGGGCCAGACCAA CCTGATTGCCGGCAGAGCCTCTGCTA TCAGCCTGACACATGGATCTCTGGG CGTCAGATCCAGCGTGCGGATTGAG CTGGACCCCGAGATCATCAAGAGCT TCGAGCGGCTGAGAAAGGACGCCG ACAGACTGGAAACCGAGATCCTGAC CGCCGCCAAAGAAACCCTGAGCGA CGAACAGAGGGGCGAAGTGAACAG CCACGAGAAGGATAGCCCACAGACA GCCAAGGCCAGCCTGTGTAGAGAGC TGGGACTGCACCCTCCATCTCTGCCT TGGGGACAGATGGGCCCTAGCACCA CCTTTATCGCCGACATGCTGATCTCC CACGGCAGGGACGATGATGCCTTTC TGAGCCACGGCGAGTTCCCCACACT GGAAAAGCGGAAGAAGTTCGATAA GCGGTTCTGCCTGGAAAGCAGACCC CTGCTGAGCAGCGAGACAAGAAAG GCCCTGAACGAGTCCCTGTGGGAAG TGAAGAGAACCAGCAGCGAGTACG CCCGGCTGAGCCAGAGAAAGAAAG AGATGGCTAGACGGGCCGTGAACTT CGTGGTCGAGATCTCCAGAAGAAAG

[0649]

		ACCGGCCTGTCCAACGTGATCGTGA ACATCGAGGACCTGAACGTGCGGAT CTTTCACGGCGGAGGAAAACAGGCT CCTGGCTGGGATGGCTTCTTCAGAC CCAAGTCCGAGAACCGGTGGTTCAT CCAGGCCATCCACAAGGCCTTCAGC GATCTGGCCGCTCACCACGGAATCC CTGTGATCGAGAGCGACCCTCAGCG GACCAGCATGACCTGTCCTGAGTGT GGCCACTGCGACAGCAAGAACCGG AATGGCGTTCGGTTCCTGTGCAAAG GCTGTGGCGCCTCCATGGACGCCGA TTTTGATGCCGCCTGCCGGAACCTG GAAAGAGTGGCTCTGACAGGCAAG CCCATGCCTAAGCCTAGCACCTCCTG TGAAAGACTGCTGAGCGCCACCACC GGCAAAGTGTGCTCTGATCACTCCC TGTCTCACGACGCCATCGAGAAGGC TTCTTAA (SEQ ID NO: 1409)
CasΦ.18	MEKEITELTKIRREFP NKKFSSTDMKKAG KLLKAEGPDAVRDF LNSCQEIIGDFKPPV KTNIVSISRPFEEWP VSMVGRAIQEYYFS LTKEELESVHPGTSS EDHKSFFNITGLSNY NYTSVQGLNLIFKN AKAIYDGTLVKANN KNKKLEKKFNEINH KRSLEGLPIITPDFEE PFDENGHLNNPPGIN RNIYGYQGCAAKVF VPSKHKMVSLPKEY EGYNRDPNLSLAGF RNRLEIPEGEPGHVP WFQRMDIPEGQIGH VNKIQRFNFVHGKN SGKVKFSDKTGRVK RYHHSKYKDATKPY KFLEESKKVSALDSI LAIITIGDDWVVFDI RGLYRNVFYRELAQ KGLTAVQLLDLFTG DPVIDPKKGVVTFS YKEGVVPVFSQKIV PRFKSRDTLEKLTSQ GPVALLSVDLGQNE PVAARVCSLKNIND KITLDNSCRISFLDD	ATGGAAAAAGAGATCACCGAGCTGA CCAAGATCCGCAGAGAGTTCCCCAA CAAGAAGTTCAGCAGCACCGACATG AAGAAGGCCGGCAAGCTGCTGAAG GCCGAAGGACCTGATGCCGTGCGGG ACTTCCTGAACAGCTGCCAAGAGAT CATCGGCGACTTCAAGCCTCCAGTC AAGACCAACATCGTGTCCATCAGCA GACCCTTCGAGGAATGGCCCGTGTC CATGGTTGGACGGGCCATCCAAGAG TACTACTTCAGCCTGACCAAAGAGG AACTGGAAAGCGTTCACCCCGGCAC CAGCAGCGAGGACCACAAGAGCTTT TTCAACATCACCGGCCTGAGCAACT ACAACTACACCAGCGTGCAGGGCCT GAACCTGATCTTCAAGAACGCCAAG GCCATCTACGACGGCACCCTGGTCA AGGCCAACAACAAGAACAAGAAGC TCGAGAAGAAGTTTAACGAGATCAA CCACAAGCGGAGCCTGGAAGGCCT GCCTATCATCACCCCTGATTTCGAGG AACCCTTCGACGAGAACGGCCACCT GAACAACCCTCCAGGCATCAACCGG AACATCTACGGCTATCAGGGCTGCG CCGCCAAGGTGTTCGTGCCTTCTAA GCACAAGATGGTGTCCCTGCCTAAA GAGTACGAGGGCTACAACAGGGACC CCAACCTGTCTCTGGCCGGCTTCAG AAACAGACTGGAAATCCCTGAGGGC GAGCCTGGCCATGTGCCATGGTTCC AGAGAATGGATATCCCCGAGGGCCA

[0650]

	YKKQIKDYRDSLDE LEIKIRLEAINSLETN QQVEIRDLDVFSAD RAKANTVDMFDIDP NLISWDSMSDARVS TQISDLYLKNGGDES RVYFEINNKRIKRSD YNISQLVRPKLSDST RKNLNDSIWKLKRT SEEYLKLSKRKLELS RAVVNYTIRQSKLLS GINDIVIILEDLDVK KKFNGRGIRDIGWD NFFSSRKENRWFIPA FHKTFSELSSNRGLC VIEVNPAWTSATCPD CGFCSKENRDGINFT CRKCGVSYHADIDV ATLNIARVAVLGKPM SGPADRERLGDTKK PRVARSRKTMKRKD ISNSTVEAMVTA (SEQ ID NO: 18)	GATCGGACACGTGAACAAGATCCAG CGGTTCAACTTCGTGCACGGCAAGA ACAGCGGCAAAGTGAAGTTCTCCGA CAAGACCGGCAGAGTGAAGAGATAC CACCACAGCAAGTACAAGGACGCTA CCAAGCCTTACAAGTTCCTGGAAGA GTCCAAGAAGGTGTCAGCCCTGGAC AGCATCCTGGCCATCATCACAATCGG CGACGACTGGGTCGTGTTCGACATC AGAGGCCTGTACCGGAACGTGTTCT ACAGAGAGCTGGCCCAGAAAGGCC TGACAGCTGTGCAACTGCTGGACCT GTTTACCGGCGATCCCGTGATCGACC CCAAGAAAGGCGTGGTCACCTTCAG CTACAAAGAGGGCGTCGTCCCCGTC TTTAGCCAGAAAATCGTGCCCCGGT TCAAGAGCCGGGACACCCTGGAAA AGCTGACCTCTCAGGGACCTGTGGC TCTGCTGTCTGTGGACCTGGGACAG AATGAACCTGTGGCCGCCAGAGTGT GCAGCCTGAAGAACATCAACGACAA GATCACCCTGGACAACTCTTGCCGG ATCAGCTTCCTGGACGACTACAAGA AGCAGATCAAGGACTACAGAGACAG CCTGGACGAGCTGGAAATCAAGATC CGGCTGGAAGCCATCAACTCCCTCG AGACAAACCAGCAGGTCGAGATCA GAGATCTGGACGTGTTCAGCGCCGA CCGGGCCAAAGCCAATACCGTGGAC ATGTTTGACATCGACCCTAACCTGAT CAGCTGGGACTCCATGAGCGACGCC AGAGTCAGCACCCAGATCAGCGACC TGTACCTGAAGAATGGCGGCGACGA GAGCCGGGTGTACTTTGAGATTAAC AACAAACGGATTAAGCGGAGCGACT ACAACATCAGCCAGCTCGTGCGGCC CAAGCTGAGCGATAGCACCAGAAAG AACCTGAACGACAGCATCTGGAAGC TGAAGCGGACCAGCGAGGAATACCT GAAGCTGAGCAAGCGGAAGCTGGA ACTGAGCAGAGCCGTCGTGAATTAC ACCATCCGGCAGAGCAAACTGCTGA GCGGCATCAATGACATCGTGATCATT CTCGAGGACCTGGACGTGAAGAAG AAATTCAACGGCAGAGGCATCCGCG ATATCGGCTGGGACAACTTCTTCAGC TCCCGGAAAGAAAACCGGTGGTTCA TCCCCGCCTTCCACAAGACCTTTAGC GAGCTGAGCAGCAACAGGGGCCTG TGCGTGATCGAAGTGAATCCTGCCT

[0651]

		GGACCAGCGCCACCTGTCCTGATTG TGGCTTCTGCAGCAAAGAAAACAGA GATGGCATCAACTTCACGTGCCGGA AGTGCGGCGTGTCCTACCACGCCGA TATTGACGTGGCCACACTGAATATTG CCAGAGTGGCCGTGCTGGGCAAGCC TATGTCTGGACCTGCCGACAGAGAG AGACTGGGCGACACCAAGAAACCTA GAGTGGCCCGCAGCAGAAAGACCAT GAAGCGGAAGGACATCAGCAACAG CACCGTCGAGGCCATGGTTACAGCT TAA (SEQ ID NO: 1410)

[0652] 实施例2

[0653] 示例性CasΦ指导RNA序列

[0654] 制备了用于与本公开的CasΦ多肽复合的指导RNA序列。表5提供了靶向靶核酸序列TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:1411)的示例性指导RNA序列。本公开的指导核酸可以包含表5中提供的任何指导RNA的序列或其部分。

[0655] 表5.示例性CasΦ指导RNA序列

[0656]

名称	RNA类型	重复区长度	间隔区长度	RNA序列(5'-->3')，示为DNA粗体=间隔区
CasΦ.2	crRNA	36	30	GTCGGAACGCTCAACGATTGCCCCTCA CGAGGGGAC (SEQ ID NO: 49)
CasΦ.7	crRNA	36	30	GGATCCAATCCTTTTTGATTGCCCAATT CGTTGGGAC (SEQ ID NO: 51)
CasΦ.10	crRNA	36	30	GGATCTGAGGATCATTATTGCTCGTTAC GACGAGAC (SEQ ID NO: 52)
CasΦ.18	crRNA	36	30	ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTA CGCTGGGAC (SEQ ID NO: 57)

[0657] 实施例3

[0658] CasΦ充当可编程切口酶

[0659] 本实施例显示CasΦ多肽可以具有可编程切口酶活性。图1示出了来自分析CasΦ直向同源蛋白切口能力的实验的数据。对于此实验，分析了五种不同的CasΦ多肽：在图1中指定为CasΦ.2、CasΦ.11、CasΦ.17、CasΦ.18和CasΦ.12。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表4。

[0660] 所有反应均使用包含crRNA序列的指导RNA进行，所述crRN A序列包含CasΦ.18重复序列(ACCAAAACGACTATTGATTGCCCA GTACGCTGGGAC(SEQ ID NO:57))。在室温下将CasΦ多肽与指导RNA进行复合20分钟以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。RNP复合物与靶DNA在37℃下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20m M Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA，25℃时pH为7.9)中温育60分钟。用于反应的靶核酸是包含靶序列TATTAAATACTCG TATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:116)的超螺旋质粒DNA，其紧接在TTTN PAM序列的下游。下

面提供了质粒DNA序列,靶序列为粗体:

[0661] gtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccc
acgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaact
ttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgca
acgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttccca
acgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtc
agaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccg
taagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctc
ttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttct
tcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgat
cttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaat
aagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgt
ctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaag
tgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcg
tctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgcca
tggacat gtttaTATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTATgaccgaattccctgtcgtgccagctgcattaat
gaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcg
ctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggat
aacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttt
tccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggact
ataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatac
ctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtagg
tcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcg
tcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagg
tatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatct
gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtag
cggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttct
acggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttca
cctagatcctttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagtta
ccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtc
(SEQ ID NO:1412)

[0662] 如图1所示,到60分钟时,CasΦ.17和CasΦ.18仅产生切口产物(即单链断裂;“切口”)。相比之下,CasΦ.12几乎完全生成了显示出双链断裂的线性化产物,而CasΦ.2和CasΦ.11生成了一些线性化产物(即双链断裂),但主要产生切口中间体。此数据显示CasΦ直向同源物可以具有可编程切口酶活性。

[0663] 实施例4

[0664] crRNA重复序列和RNP复合温度对CasΦ切口酶活性的影响

[0665] 本实施例显示crRNA重复序列和RNP复合温度会可以影响CasΦ的切口酶活性。图2A和图2B说明了顺式切割实验的结果,示出了在37℃反应60分钟后被在室温下(图2A)或在

37℃下(图2B)组装的CasΦRNP复合物切口的输入质粒DNA的百分比。图2C说明了CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.10和CasΦ.18重复序列的比对,示出了保守(以黑色突出显示)和分歧的核苷酸。

[0666] 对于这项研究,测试了三种CasΦ多肽(图2A和2B中的CasΦ.11、CasΦ.17和CasΦ.18)中的每一种在与包含CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.10和CasΦ.18的重复序列的四种crRNA之一复合时对输入质粒DNA进行切口的能力(在图2A和图2B中分别缩写为j2、j7、j10和j18)。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表4。对应于j2、j7、j10和j18的指导RNA序列提供于表5。输入质粒是包含紧接在TTTN PAM下游的靶序列TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108)的超螺旋质粒(示于实施例3中的序列)。形成RNP复合物的温育反应在室温或在37℃下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中进行60分钟。RNP复合物与输入质粒在37℃下温育60分钟。用1mg/ml蛋白酶K、0.08% SDS和15mM EDTA淬灭反应。图2A和图2B所示的数据来自体外顺式切割实验的单个重复。

[0667] 如图2A所示,当CasΦ多肽在室温下与指导核酸组装成RNP复合物时,包含来自任何蛋白质的重复区序列的crRNA支持CasΦ.11、CasΦ.17和CasΦ.18的切口酶活性,除了CasΦ.17/CasΦ.2重复区配对。如图2B所示,当CasΦ多肽在37℃下与指导核酸组装成RNP复合物时,与在室温下相反,当与包含来自CasΦ.2或CasΦ.10的重复序列的crRNA复合时,每种蛋白质的活性都被完全消除。

[0668] 此实施例显示CasΦ的切口酶活性可以受到crRNA重复区序列的影响。数据还显示,CasΦ的切口酶活性可以受到RNP复合温度的影响。

[0669] 图2D提供了受RNP复合温度影响的CasΦ切口酶活性的更多实例。如上所述评估CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.6、CasΦ.9、CasΦ.10、CasΦ.12和CasΦ.13的切口酶活性。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。

[0670] 还如上所述评估了复合温度对CasΦ多肽双链切割活性的影响。如图2D所示,通常CasΦ多肽,特别是CasΦ.2、CasΦ.4和CasΦ.12的双链切割活性不受RNP复合温度的影响。尽管一些具有较低双链切割活性的系统(诸如本实施例中的CasΦ.10、CasΦ.11和CasΦ.13)对RNP复合温度敏感。

[0671] 实施例5

[0672] CasΦ切口酶切割非靶链

[0673] 本实施例示出了CasΦ切口酶切割非靶DNA链。此研究的结果示于图3。对于这项研究,使用顺式切割测定分析了四种不同的CasΦ多肽(如图1所示的CasΦ.12、CasΦ.2、CasΦ.11和CasΦ.18)。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表4。CasΦ多肽与指导RNA复合以形成RNP复合物。所有反应均使用包含crRNA序列的指导RNA进行,所述crRNA序列包含CasΦ.18重复序列(ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTACGCTGGGAC(SEQ ID NO:57))。在室温下将CasΦ多肽与指导RNA进行复合20分钟以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。RNP复合物与靶DNA在37℃下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中温育60分钟。用于反应的靶核酸是包含靶序列TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:116)的超螺旋质粒DNA(示于实施例3的序列),其紧接在TTTN PAM序列的下游。用1mg/ml蛋白酶K、0.08% SDS和15mM EDTA淬灭反应。

使用正向和反向引物对反应所得的切割DNA进行Sanger测序。正向引物提供了靶链(TS)序列,而反向引物提供了非靶链(NTS)序列。如果一条链已被CasΦ多肽切割,则测序信号将从测序数据中的切割位点消失。图3说明了Sanger测序的结果。

[0674] 图3图A示出了未添加CasΦ多肽的对照反应。结果,靶DNA未被切割并导致靶和非靶链的完整测序。图3图B说明了CasΦ.12的切割模式,其具有双链DNA切割活性。测序信号从靶链和非靶链减少(如箭头所示),表明靶DNA的双良切割。图3图C说明了CasΦ.2的切割模式,其主要对DNA进行切口(如图1所示)。数据示出测序信号仅在非靶链(底部箭头)上减少,从而表明非靶链的切割。图3图D说明了CasΦ.11的切割模式,其具有强切口酶活性(如图1所示)。数据示出了测序信号仅在非靶链上(底部箭头)减少,从而表明非靶链的切割。图3图E说明了CasΦ.18的切割模式,其具有强切口酶活性(如图1所示)。数据示出了测序信号仅在非靶链上(底部箭头)减少,从而表明非靶链的切割。因此,此实施例显示具有切口酶活性的CasΦ多肽切割靶DNA的非靶链。

[0675] 实施例6

[0676] 编辑靶核酸

[0677] 此实施例描述了用本公开的可编程CasΦ核酸酶(例如,SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任何一个)对靶核酸进行的遗传修饰。可编程CasΦ核酸酶与能够与核糖核蛋白复合物中的目标靶核酸序列片段杂交的指导核酸一起施用,或作为编码每个组分的单独核酸施用。施用所述组合物的受试者是人类或非人类哺乳动物。在指导核酸与靶核酸片段结合后,可编程CasΦ核酸酶会在靶标中产生切口或诱导双链断裂。靶标经历NHEJ或HDR。可以共施用供体核酸。供体核酸可以替换或修复靶核酸的突变片段。受试者可能患有疾病。在对靶核酸进行基因修饰后,可以减轻疾病或疾病的症状,或者可以治愈疾病。

[0678] 实施例7

[0679] 编辑植物或作物靶核酸

[0680] 此实施例描述了用本公开的可编程CasΦ核酸酶(例如,SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ I DNO:105或SEQ ID NO:107中的任何一个)对植物或作物靶核酸进行的遗传修饰。可编程CasΦ核酸酶与能够与核糖核蛋白复合物中的目标靶核酸序列片段杂交的指导核酸一起施用,或作为编码每个组分的单独核酸施用。施用所述组合物的受试者是植物或作物细胞。在指导核酸与靶核酸片段结合后,可编程CasΦ核酸酶会在靶标中产生切口或诱导双链断裂。靶标经历NHEJ或HDR。可以共施用供体核酸。供体核酸可以替换或修复靶核酸的突变片段。结果是工程化改造的植物或作物细胞。

[0681] 实施例8

[0682] 遗传修饰靶核酸

[0683] 此实施例描述了用本公开的死的可编程CasΦ核酸酶(例如,具有使其催化失活的突变的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任何一个)对靶核酸进行的遗传修饰。可编程CasΦ核酸酶于转录调节因子连接。可编程CasΦ核酸酶、转录调节因子和能够与目标靶核酸序列片段杂交的指导核酸作为核糖核蛋白复合物或作为编码每个组分的单独核酸施用。施用所述组合物的受试者是人类或非人类哺乳动物。在指导核酸与靶核酸片段结合后,死的可编程CasΦ核酸酶上调或下调转录。受试者可能患有疾

病。在对靶核酸进行基因修饰后，可以减轻疾病或疾病的症状，或者可以治愈疾病。

[0684] 实施例9

[0685] 遗传修饰植物或作物靶核酸

[0686] 此实施例描述了用本公开的死的可编程CasΦ核酸酶(例如，具有使其催化失活的突变的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任何一个)对植物或作物靶核酸进行的遗传修饰。可编程CasΦ核酸酶于转录调节因子连接。可编程CasΦ核酸酶、转录调节因子和能够与目标靶核酸序列片段杂交的指导核酸作为核糖核蛋白复合物或作为编码每个组分的单独核酸施用。施用所述组合物的受试者是人类或非人类哺乳动物。在指导核酸与靶核酸片段结合后，死的可编程CasΦ核酸酶上调或下调转录。结果是工程化改造的植物或作物细胞。

[0687] 实施例10

[0688] 检测靶核酸

[0689] 此实施例描述了用本公开的可编程CasΦ核酸酶(例如，SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107中的任何一个)对靶核酸进行的检测。可编程CasΦ核酸酶、能够与目标靶核酸序列片段杂交的指导核酸和标记的ssDNA报告基因与样品接触。在样品中存在靶核酸的情况下，指导核酸与其靶标结合，从而激活可编程的CasΦ核酸酶以切割标记的ssDNA报告基因并释放可检测标记。可检测标记发出可检测信号，所述信号任选地被量化。在样品中不存在靶核酸的情况下，指导核酸不与其靶标结合，标记的ssDNA报告基因不被切割，并且检测到低信号或无信号。

[0690] 实施例11

[0691] 对靶DNA进行切口或双链切割的偏好是CasΦ酶的特性，与crRNA

[0692] 重复区或靶序列无关

[0693] 此实施例描述了CasΦ多肽切割双链靶DNA的单链或双链的偏好如何独立于crRNA重复区或靶序列。对于此研究，12种CasΦ多肽(CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.3、CasΦ.4、CasΦ.6、CasΦ.9、CasΦ.10、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、CasΦ.17和CasΦ.18)与包含CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.7、CasΦ.10、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、CasΦ.17和CasΦ.18重复区序列的crRNA之一复合。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1，并且crRNA序列提供于表2。输入质粒是两个超螺旋质粒之一，其含有紧接在TTTN PAM下游的靶序列(TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108)或CACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCATATG(SEQ ID NO:109))。形成RNP复合物的温育反应在室温下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA，25℃时pH为7.9)中进行20分钟。RNP复合物与输入质粒在37℃下温育60分钟。用1mg/ml蛋白酶K、0.08％ SDS和15mM EDTA淬灭反应。

[0694] 如图4A所示，CasΦ多肽偏好切口或线性化(即切割两条链)双链质粒DNA靶标，并且此偏好不受crRNA重复区或靶DNA序列的影响。

[0695] 用于生成图4A中热图子集的原始数据示于图4B。这些数据显示CasΦ.12主要是质粒DNA的线性化剂，即CasΦ.12主要切割双链靶DNA的两条链。而CasΦ.18主要是切口酶，并且主要切割双链靶DNA的一条链。

[0696] 此实施例显示了CasΦ多肽切割双链靶DNA的单链或双链的偏好独立于crRNA重复

区或靶序列。

[0697] 实施例12

[0698] 跨CasΦ重复区的结构保守性

[0699] 此实施例描述了跨CasΦ重复区的结构保守型。特别地，图5A示出了CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.7、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、CasΦ.18和CasΦ.32的crRNA重复区结构。crRNA序列提供于表2。CasΦ重复区的3'半部分具有高度序列和结构保守性。LocARNA比对工具用于确认CasΦ重复区的共有结构，其示于图5B。共有是基于以下crRNA重复区确定的：CasΦ.1、CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.7、CasΦ.10、CasΦ.11、CasΦ.12、CasΦ.13、Cas12Φ.17、CasΦ.18、CasΦ.19、CasΦ.21、CasΦ.22、CasΦ.23、CasΦ.24、CasΦ.25、CasΦ.26、CasΦ.27、CasΦ.28、CasΦ.29、CasΦ.30、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.33、CasΦ.35、CasΦ.41。这些重复区的序列提供于表5。如图5B所示，CasΦ重复区具有高度保守的3'发夹，其包含双链茎部分和单链环部分。茎的一条链包含序列CYC，并且另一条链包含序列GRG，其中Y和R互补。环部分通常包含四个核苷酸。CasΦ重复区的3'端包含序列GAC，并且此序列的G位于发夹的茎。

[0700] 此实施例示出了CasΦcrRNA重复区的保守结构。

[0701] 实施例13

[0702] CasΦPAM对线性靶标的偏好

[0703] 此实施例示出了PAM对线性双链DNA靶标上CasΦ多肽的偏好。对于这项研究，使用顺式切割测定分析了五种不同的CasΦ多肽(CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11、CasΦ.12和CasΦ.18)。使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。CasΦ多肽与它们的天然crRNA (即相应的CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11、CasΦ.12和CasΦ.18重复区)在室温下复合20分钟以形成RNP复合物。RNP复合物与靶DNA在37℃下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA，25℃时pH为7.9)中温育60分钟。靶DNA是1.1kb的PCR的扩增DNA产物。从TTTAPAM开始，除了亲本TTTA PAM以外，每个位置一个接一个地变化为其他3个核苷酸，总共12个变体。线性片段用于不利于切割以提高PAM偏好确定的灵敏度。图6A说明了双链切割(或CasΦ.18的切口)的绝对水平。图6B说明了在归一化为100％的亲本TTTAPAM之后的来自图6A的数据。图6C提供了来自图6A和图6B中的数据的最佳PAM偏好的总结。CasΦ.2识别GTTK PAM，其中K是G或T。CasΦ.4识别VTTK PAM，其中V是A、C或G，并且K是G或T。CasΦ.11识别VTTS PAM，其中V是A、C或G，并且S是C或G。CasΦ.12识别TTTS PAM，其中S是C或G。CasΦ.18识别VTTN PAM，其中V是A、C或G，并且N是A、C、G或T。

[0704] 此实施例显示了一些CasΦ多肽的最佳PAM偏好。

[0705] 实施例14

[0706] CasΦ多肽对超螺旋DNA进行快速切口

[0707] 此实施例显示CasΦ多肽对超螺旋DNA进行快速切口，但它们提供第二条链切割的能力不同。对于这项研究，使用顺式切割测定分析了五种不同的CasΦ多肽(CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11、CasΦ.12和CasΦ.18)。使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。CasΦ多肽与其天然crRNA在室温下在30μl体积的NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA，25℃时pH为7.9)中复合20分钟以形成200nM RNP复合物。靶质粒是含有靶序列(TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108)或

CACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCATATG(SEQ ID NO:109),指导RNA靶向下划线序列)的两个2.2kb的超螺旋质粒之一,紧接在GTTG或TTTG PAM下游。在时间"0"时,将30μl的20nM靶质粒与RNP混合,总体积为60μl。温育温度为37℃。在1、3、6、15、30和60分钟时,取出9μl反应物部分并用反应淬灭(1mg/ml蛋白酶K、0.08% SDS和15mM EDTA)停止,并允许在琼脂糖凝胶分析之前在37℃下脱蛋白30分钟。切割被量化为切口或线性。图7示出了CasΦ多肽对超螺旋靶DNA的快速切口。随着时间的推移,切口产物的减少是由于CasΦ多肽切割靶DNA的第二条链时形成线性产物。CasΦ.12快速切割超螺旋DNA的两条链。

[0708] 此实施例显示了CasΦ多肽对超螺旋DNA进行快速切口。

[0709] 实施例15

[0710] CasΦ多肽偏好16-20个核苷酸的全长重复区和间隔区

[0711] 此实施例显示了CasΦ多肽偏好16至20个核苷酸的全长重复区和间隔区。对于这项研究,测试了五种CasΦ多肽(图8A和8B中的CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11、CasΦ.12和CasΦ.18)中的每一种在与包含CasΦ.2或CasΦ.18(在图8A和图8B中分别缩写为j2和j18)的重复区序列的crRNA中的任一种复合时切割输入质粒DNA的能力。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。对应于j2和j18的指导RNA序列提供于表2。CasΦ多肽与crRNA在室温下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中复合20分钟。评估了CasΦ多肽切割含有靶序列的2.2kb质粒的能力(FUT8_1:ACGCGTTTTAGAAGAGCAGCTTGTTAAGGCCAAAGAACAGATT GA(SEQ ID NO:1413)和DNMT_1:AAAGATTTGTCCTTGGAGAACGGTGCTCATGCTTACAACCGGG A(SEQ ID NO:1414),PAM有下划线)。针对这些靶序列的间隔区从3'端缩短。在37℃下切割温育,并且在10分钟后用1mg/ml蛋白酶K、0.08% SDS和15mM EDTA淬灭反应。为评估缩短crRNA重复区的效果,重复区从5'端缩短。

[0712] 如图8A所示,长度为19至37个核苷酸的crRNA重复区支持CasΦ多肽的切割活性。

[0713] 如图8B所示,在测试的间隔区长度范围内(16至35个核苷酸)观察到切割活性。在此体外系统中支持CasΦ多肽切割活性的最佳间隔区长度为16至20个核苷酸。

[0714] 此实施例显示CasΦ多肽在体外偏好长度为19至37个核苷酸的crRNA重复区和长度为16至20个核苷酸的间隔区。

[0715] 实施例16

[0716] HEK293T细胞中CasΦ.12间隔区长度优化

[0717] 此实施例是示出了CasΦ.12在HEK293T细胞中作为基因编辑工具的用途以及改变间隔区长度的效果。如图9A中的示意图所示,建立了表达AcGFP的稳定HEK293T细胞系。将在U6启动子控制下表达crRNA并在EF1a启动子控制下表达CasΦ.12的质粒转染到AcGFP表达HEK293T细胞系中。CasΦ.12表达为FLAGtag-SV40NLS-Cas12j.12-NLS-T2A-PuroR。在第5、7和10天通过流式细胞术评估GFP表达。30个核苷酸的间隔子序列是5'-TTGCCCAGGATGTTGCCATCCTCCTTGAAA-3'(SEQ ID NO:1415)。为了评估不同间隔区长度的影响,间隔区从其3'端缩短。如图9B所示,15至30个核苷酸的间隔区长度支持HEK293T细胞中的CasΦ.12切割活性,但用15和16个核苷酸的间隔区检测到的切割较少。CasΦ.12偏好具有17至22个核苷酸的间隔区长度,但测试的较长间隔区仍支持切割活性。

[0718] 实施例17

[0719] CasΦ核酸酶是一类新的蛋白质

[0720] 此实施例说明本文鉴定的CasΦ核酸酶是一类新的Cas蛋白。SEQ ID NO:1至47和SEQ ID NO.105在InterPro数据库中搜索,但未鉴定为属于一类蛋白质。作为实例,SEQ ID NO:2的结果示于图10A。作为阳性对照,来自氨基酸球菌属物种的Cpf1序列(菌株BV3L6)也被搜索并被鉴定为CRISPR相关核酸内切酶Cas12a家族成员,如图10B所示。

[0721] 实施例18

[0722] CasΦ.19-CasΦ.48对DNA的切割

[0723] 此实施例说明了CasΦ.19至CasΦ.45的DNA切割活性。实验中使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。CasΦ多肽与其天然crRNA(或具有基于氨基酸序列同一性最近配对的CasΦ多肽的crRNA)在室温下在30μl体积的NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中复合20分钟以形成100nM RNP复合物。crRNA序列提供于表2。靶质粒是含有靶序列TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108)的2.1kb质粒。切割温育温育在37℃下进行,并且反应在60分钟后淬灭。然后通过凝胶电泳分析切割产物,如图13A所示。此分析将CasΦ.20、CasΦ.22、CasΦ.24、CasΦ.25、CasΦ.28、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.37、CasΦ.43和CasΦ.45鉴定为主要线性化质粒DNA的酶,即它们主要切割双链靶DNA的两条链。而CasΦ.21的DNA切割导致混合的切口和线性产物,表明CasΦ.21作为切口酶以及质粒DNA的线性化剂起作用,在本研究的条件下偏好切口酶活性。在CasΦ.26、CasΦ.29、CasΦ.33、CasΦ.34、CasΦ.38和CasΦ.44切割后,还鉴定了混合的切口和线性化的切割产物。“SC”代表“超螺旋”未切割靶质粒。

[0724] 此实施例显示了CasΦ多肽对DNA的稳健切割。

[0725] 发明人继续展示了在被CasΦ.12、CasΦ.20、CasΦ.21、CasΦ.22、CasΦ.25、CasΦ.28、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.33、CasΦ.34、CasΦ.37、CasΦ.43和CasΦ.45靶向后插入缺失的稳健生成。建立了表达AcGFP的稳定HEK293T细胞系。在第0天使用脂质转染胺用crRNA和CasΦ表达质粒转染HEK293T-AcGFP细胞。靶序列提供于表6。在第3天通过胰蛋白酶消化收获细胞用于TIDE分析。通过PCR扩增靶基因座,然后使用Sanger测序对扩增产物进行测序。TIDE分析提供了插入缺失突变的频率(https://tide.nki.nl/#about)。如图13B所示,将CasΦ.12、CasΦ.20、CasΦ.21、CasΦ.22、CasΦ.25、CasΦ.28、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.33、CasΦ.34、CasΦ.37、CasΦ.43和CasΦ.45靶向AcGFP导致了插入缺失突变的稳健生成。图13C提供了图13B中CasΦ.12、CasΦ.28、CasΦ.31、CasΦ.32和CasΦ.33所示数据的替代表示。这些数据进一步表明了CasΦ.20、CasΦ.21、CasΦ.22、CasΦ.25、CasΦ.28、CasΦ.31、CasΦ.32、CasΦ.33、CasΦ.34、CasΦ.37、CasΦ.43和CasΦ.45的基因组编辑能力。

[0726] 表6

[0727]

	靶序列	PAM eGFP	PAM acGFP	SEQ ID NO
KT_eGFP	TTAAGGCCAAAGAACAGATT	CTTG	CTTG	1416
OT_eGFP	CGTGATGGTCTCGATTGAGT	无	无	1417
T1_eGFP	AAGAAGTCGTGCTGCTTCAT	CTTG	CTTG	1418
T2_eGFP	ATCTGCACCACCGGCAAGCT	GTTC	GTTC	1419
T3_eGFP	TGGCGGATCTTGAAGTTCAC	GTTG	GTTG	1420
T4_eGFP	CCGTAGGTGGCATCGCCCTC	GTTC	CTTC	1421
T5_eGFP	ACGTCGCCGTCCAGCTCGAC	GTTT	无	1422
T6_eGFP	AAGAAGATGGTGCGCTCCTG	CTTG	CTCG	1423

[0728] 实施例19

[0729] 通过体外富集确定的CasΦ的PAM要求

[0730] 此实施例说明了CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11和CasΦ.12的NTTN PAM要求。进行了体外富集(IVE)分析。CasΦ多肽与crRNA在室温下在25μl体积的NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、30mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中复合20分钟以形成500nM RNP复合物。crRNA序列提供于表2。切割温育温育在37℃下进行,并且反应在30分钟后淬灭。用于切割温育的底物是包含不同PAM序列的混合质粒文库。淬火后,使Beckman SPRi珠粒清除切割反应。对样品进行测序以鉴定哪些PAM序列能够使CasΦ多肽进行靶标切割。如图14A所示,此分析揭示了CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11和CasΦ.12的NTTN PAM要求。

[0731] 发明人继续评估CasΦ.20、CasΦ.26、CasΦ.32、CasΦ.38和CasΦ.45的PAM要求。使用上述方案对CasΦ.2、CasΦ.4、CasΦ.11和CasΦ.12进行IVE分析。如图14B所示,Sanger测序揭示了CasΦ.20的NTNN PAM要求、CasΦ.26的NTTG PAM要求、CasΦ.32和CasΦ.38的GTTN PAM要求,以及CasΦ.45的NTTN PAM要求。

[0732] 发明人还确定了CasΦ.20、CasΦ.24和CasΦ.25的单碱基PAM要求。使用的蛋白质的氨基酸序列示于表1。CasΦ多肽与其天然crRNA在室温下复合20分钟以形成RNP复合物。crRNA序列提供于表2。RNP复合物与靶DNA在37℃下在NEB CutSmart缓冲液(50mM乙酸钾、20mM Tris-乙酸盐、10mM乙酸镁、100ug/ml BSA,25℃时pH为7.9)中温育60分钟。然后将RNP用于与包含靶序列和PAM的质粒DNA的切割反应。以TTTg PAM为例,将PAM突变为图14C所示的每个序列以评估PAM要求。如图14C所示,通过凝胶电泳分析切割反应的产物。图14D提供了图14C所示凝胶的量化。图14C和图14D中的数据一起展示了CasΦ.20、CasΦ.24和CasΦ.25的DNA切割的NTNN PAM。

[0733] 此实施例展示了能够使CasΦ多肽靶向靶序列的PAM序列。

[0734] 实施例20

[0735] HEK293T细胞中CasΦ介导的基因组编辑

[0736] 此实施例说明了CasΦ多肽在HEK293T细胞(广泛用于生物学研究的细胞系)中介导基因组编辑的能力。在此研究中,CasΦ.12质粒(包括CasΦ多肽序列和gRNA序列,有时被称为一体化)经由脂质体转染递送。间隔区靶向Fut8基因的外显子4。间隔区序列提供于表7。在第0天转染细胞并在第5天收获用于分析。如图15所示,靶基因座在递送CasΦ.12和gRNA2后被修饰。Cas9被递送至HEK293T细胞以提供阳性对照,并且当使用非靶向(NT)gRNA

时未检测到修饰。下一代序列分析确认了插入缺失的存在。CasΦ.12和gRNA2靶向的样品示于图15。下一代序列分析揭示了插入缺失的不同模式。最常见的突变是4至18个碱基对的缺失突变。突变的频率被量化并说明为“%经修饰”,其被定义为与未编辑的细胞比对时DNA序列中修饰的百分比。修饰可以是缺失、插入和取代。

[0737] 此实施例证明了CasΦ.12作为稳健的基因组编辑工具的用途。

[0738] 表7

[0739]

名称	靶标	间隔区序列(5'-->3') [SEQ ID NO]
Fut8_1	CasPhi 靶标	GAAGAGCAGCTTGTTAAGGC (SEQ ID NO: 1424)
Fut8_2	CasPhi 靶标	GCCTTAACAAGCTGCTCTTC (SEQ ID NO: 1425)
Fut8_3	Cas9 靶标(对照)	ATTGATCAGGGGCCAgctat (SEQ ID NO: 1426)
Fut8_4	Cas9 靶标(对照)	Acgcgtactcttcctatagc (SEQ ID NO: 1427)
NT	非靶标	CGTGATGGTCTCGATTGAGT (SEQ ID NO: 1428)

[0740] 实施例21

[0741] CHO细胞中CasΦ介导的基因组编辑

[0742] 此实施例说明了CasΦ多肽在CHO细胞(通常用于生物学和医学研究的上皮细胞系)中介导基因组编辑的能力。为了测试CasΦ.12在CHO细胞中的功能,将40pmol CasΦ.12与其天然crRNA复合(crRNA:CasΦ为2.5:1)。为了制备CasΦ.12RNP的主混合物,将3μl crRNA(100nM)添加到1.6μl CasΦ.12(75μM)中。间隔区序列提供于表8。RNP复合物在37℃下温育30分钟。CHO细胞以1.2x10^6个细胞/ml重悬在SF溶液(Lonza)中。将40μl细胞悬液添加到RNP复合物中,然后将20μl所得悬浮液转移到单独的试管中进行核转染。使用Lonza设置FF-137以核转染CHO细胞。然后在第5天收获细胞用于分析。如图16A所示,CasΦ.12在每个测试的内源性基因(Bak1、Bax和Fut8)中诱导生成插入缺失。CasΦ.12在这些基因中的每一个中诱导插入缺失突变的能力进一步示于图16F(Bak1)、图16G(Bax)、图16H(Fut8)。图16F、图16G和图16H的间隔区序列分别提供于表F、G和H。图16F-H中所示的数据是用每次转染200,000个CHO细胞、与250pmol CasΦ.12复合的RNP和相对于CasΦ.12摩尔过量的全长未经修饰指导RNA产生的,使用与描述的相同Lonza试剂产生图16A至E中呈现的数据。

[0743] 表8

[0744]

名称	间隔区序列(5'-->3')	重复区+间隔区序列(5'-->3'),示为 DNA
Bak1_1	GAAGCTATGTTTTCCATCTC (SEQ ID NO: 443)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAGCTATGTTTTCCATCTC (SEQ ID NO: 1197)
Bak1_2	GCAGGGGCAGCCGCCCCCTG (SEQ ID NO: 444)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGCAGGGGCAGCCGCCCCCTG (SEQ ID NO: 1198)
Bak1_3	CTCCTAGAACCCAACAGGTA (SEQ ID NO: 445)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCCTAGAACCCAACAGGTA (SEQ ID NO: 1199)
Bak1_4	GAAAGACCTCCTCTGTGTCC (SEQ ID NO: 446)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAAAGACCTCCTCTGTGTCC (SEQ ID NO: 1200)
Bak1_5	TCCATCTCGGGGTTGGCAGG (SEQ ID NO: 447)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCATCTCGGGGTTGGCAGG (SEQ ID NO: 1201)
Bak1_6	TTCCTGATGGTGGAGATGGA (SEQ ID NO: 448)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCTGATGGTGGAGATGGA (SEQ ID NO: 1202)
Bax_1	CTAATGTGGATACTAACTCC (SEQ ID NO: 479)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTAATGTGGATACTAACTCC (SEQ ID NO: 1269)
Bax_2	TTCCGTGTGGCAGCTGACAT (SEQ ID NO: 480)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTCCGTGTGGCAGCTGACAT (SEQ ID NO: 1270)
Bax_3	CTGATGGCAACTTCAACTGG (SEQ ID NO: 481)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGATGGCAACTTCAACTGG (SEQ ID NO: 1271)
Bax_4	TACTTTGCTAGCAAACTGGT (SEQ ID NO: 482)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTACTTTGCTAGCAAACTGGT (SEQ ID NO: 1272)
Bax_5	AGCACCAGTTTGCTAGCAAA (SEQ ID NO: 483)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAGCACCAGTTTGCTAGCAAA (SEQ ID NO: 1273)
Bax_6	AACTGGGGCCGGGTTGTTGC (SEQ ID NO: 484)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAACTGGGGCCGGGTTGTTGC (SEQ ID NO: 1274)
Fut8_1	CCACTTTGTCAGTGCGTCTG (SEQ ID NO: 507)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCACTTTGTCAGTGCGTCTG (SEQ ID NO: 1325)
Fut8_2	CTCAATGGGATGGAAGGCTG (SEQ ID NO: 508)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTCAATGGGATGGAAGGCTG (SEQ ID NO: 1326)
Fut8_3	AGGAATACATGGTACACGTT (SEQ ID NO: 509)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAGGAATACATGGTACACGTT (SEQ ID NO: 1327)

[0745]

Fut8_4	AAGAACATTTTCAGCTTCTC (SEQ ID NO: 510)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACAAGAACATTTTCAGCTTCTC (SEQ ID NO: 1328)
Fut8_5	ATCCACTTTCATTCTGCGTT (SEQ ID NO: 511)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACATCCACTTTCATTCTGCGTT (SEQ ID NO: 1329)
Fut8_6	TTTGTTAAAGGAGGCAAAGA (SEQ ID NO: 512)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTTGTTAAAGGAGGCAAAGA (SEQ ID NO: 1330)

[0746] 发明人继续证明了CasΦ.12经由同源定向修复途径介导基因编辑的能力。发明人测试了具有25bp、50bp或90bp同源臂(HA)的DNA供体寡核苷酸,如图16B所示。将供体寡核苷酸递送至有或没有CasΦ.12和crRNA的CHO细胞。如图16C所示,在不存在CasΦ.12的情况下未检测到插入缺失。然而,在存在CasΦ.12的情况下检测到插入缺失,并通过对内源性靶向基因座进行测序来确认(图16D)。测序分析还示出了DNA供体寡核苷酸成功并入内源性靶向基因座(图16E)。

[0747] 发明人进一步证明了CasΦ.12经由同源定向修复途径介导Bax和Fut8基因的基因编辑的能力。在此附加研究中,使用具有20bp、25bp、30bp或40bp、90bp HA的DNA供体寡核苷酸,如图16I所示。这些DNA供体寡核苷酸未经修饰或在第一个5'和最后两个3'碱基之间用硫代磷酸酯(PS)键修饰。如图16J所示,CasΦ.12介导了DNA供体寡核苷酸成功并入内源性靶向基因座。最后,发明人使用AAV6递送DNA供体进一步优化了CasΦ.12介导的Fut8基因组编辑。在此研究中,使用Lonza核转染方案用Fut8靶向RNP(500pmol)转染CHO细胞。转染后立即将不同MOI的AAV6供体添加到细胞中。通过NGS分析插入缺失和HDR的频率。如图16K和图16L所示,CasΦ.12诱导生成插入缺失和HDR。

[0748] 这些数据进一步证明了CasΦ多肽作为基因组编辑工具的实用性。

[0749] 实施例22

[0750] K562细胞中CasΦ介导的基因组编辑

[0751] 此实施例说明了CasΦ多肽在K562细胞(骨髓性白血病细胞系,由于其适合通过电穿孔进行核转染而特别适用于生物学和医学研究)中介导基因组编辑的能力。在此研究中,用Cas9或CasΦ.12对K562细胞进行了核转染。为了对细胞进行核转染,将SF溶液(SF细胞系96Amaxa)中的150,000个细胞添加至图17中指示的质粒量(表达靶向Fut8基因和Cas9或CasΦ.12的gRNA)。使用Amaxa程序96-FF-120以核转染细胞。核转染两天后收获细胞并测定插入缺失突变的频率。如图17所示,随着CasΦ.12质粒数量的增加,内源性Fut8基因中检测到的插入缺失数量也随之增加。

[0752] 实施例23

[0753] 原代细胞中CasΦ介导的基因组编辑

[0754] 此实施例说明了CasΦ多肽在原代细胞(诸如T细胞)中介导基因组编辑的能力。在此研究中,CasΦ.12被递送至人类T细胞。CasΦ.12与其包含间隔区序列5'-GGGCCGAGAUGUCUCGCUCC-3'(SEQ ID NO:1429)的天然crRNA复合。复合物形成为3:1的crRNA:蛋白质比率。为进行核转染,将50pmol RNP与每孔320,000个细胞混合,并使用Amaxa EH115程序。核转染后立即将80μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中

15分钟，然后转移到培养板。在第3天和第5天从细胞中提取基因组DNA。在第5天进行流式细胞术分析。如图18A所示，当CasΦ.12与靶向内源性β2微球蛋白(B2M)基因的gRNA一起递送时，通过流式细胞术分析检测到不同的B2M阴性细胞群体，证明了CasΦ.12介导的内源性B2M基因敲除。在不存在B2M靶向gRNA的情况下，通过流式细胞术未观察到B2M阴性细胞群体。如图18C所示，通过下一代测序分析确认插入缺失，并如图18B所示对其进行定量。

[0755] 发明人继续使用CasΦ.12以靶向T细胞受体α常数(TRAC)基因。敲除TRAC基因会阻止T细胞受体的表达。因此，因为TRAC敲除T细胞在体内具有更长的半衰期，TRAC敲除T细胞有利于T细胞治疗(例如CAR-T细胞治疗)，因为T细胞具有较小的攻击受体正常细胞的可能性。在此研究中，将靶向TRAC基因(CasPhi1或CasPhi7)的CasΦ.12和gRNA递送至T细胞。如图18D所示，递送CasΦ.12和gRNA产生了TRAC阴性细胞群，其通过流式细胞术被检测到。发明人继续通过对靶基因座进行测序来确认存在插入缺失突变。如图18E所示，序列分析揭示了内源性靶向基因座处的插入、缺失和取代突变。如图18F所示，对插入缺失突变的频率进行了量化。

[0756] 这些数据证明了CasΦ多肽在原代人类细胞中作为稳健的基因组编辑工具的实用性。

[0757] 实施例24

[0758] CasΦ核酸酶的可分离DNA链切割反应

[0759] 此实施例进一步说明了CasΦ多肽切割DNA链的机制。在此研究中，CasΦ.4、CasΦ.12和CasΦ.18与其天然crRNA复合。通过在室温下温育20分钟形成RNP复合物。靶质粒是含有靶序列TATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTAT(SEQ ID NO:108)的2.1kb质粒。切割反应在37℃下进行并持续30分钟。然后通过凝胶电泳分析切割产物。如图19所示，CasΦ多肽通过切割非靶DNA链来对超螺旋(sc)DNA进行切口。然后一些CasΦ多肽诸如CasΦ.4和CasΦ.12继续切割第二条(靶)链以从质粒靶标生成线性产物。而一些CasΦ多肽诸如CasΦ.18起切口酶的作用，并且不会继续切割第二条链。CasΦ切割活性取决于金属阳离子，诸如Mg^{2+}。改变Mg^{2+}的浓度使得CasΦ.4和CasΦ.12对第一条链和第二条链的切割可视化。随着Mg^{2+}浓度增加，检测到的线性化产物的量增加，表明第二条链已在CasΦ.4和CasΦ.12反应中被切割。

[0760] 实施例25

[0761] 通过CasΦ多肽检测靶核酸

[0762] 此实施例说明了CasΦ.4和CasΦ.18凭借ssDNA的反式切割活性在核酸检测测定中的用途。在此研究中，制备了100nM RNP并将其用于检测测定。在检测测定中，靶dsDNA的浓度为10nM，并且ssDNA报告分子的浓度为100nM。靶dsDNA包含5个靶序列，其被5个gRNA的库靶向，7个碱基对位于5'和3'侧的20个核苷酸的靶序列的侧翼，如图20所示。检测测定在37℃下进行。表9中提供的缓冲液条件在检测测定中进行了测试。所有缓冲液均补充有0.1mg/ml BSA和1mM TCEP。如图20所示，当gRNA(与CasΦ多肽复合)与靶核酸杂交时，CasΦ的反式切割活性被激活，使得标记的ssDNA报告基因被降解。ssDNA报告基因的降解被检测为荧光，从而使测定中使用的CasΦ多肽实现对样品中靶核酸分子的快速和高保真检测。如图20所示，高pH(例如8-9)和高Mg^{2+}浓度(例如12-15mM)为检测测定提供了优选条件。

[0763] 表9

[0764]

缓冲液 ID #	pH	1X NaCl (mM)	1X $MgCl_2$ (mM)
1	9	150	15
2	9	150	3
3	7.5	0	3
4	9	0	3
5	9	0	15
6	7.5	150	3
7	7.5	150	15
8	8	37.5	3
9	8.5	150	12
10	7.5	0	15
11	8.5	0	6
12	9	150	3
13	9	0	3
14	9	150	15
15	8	150	6
16	7.5	150	15
17	8	112.5	15
18	9	0	15

[0765]

19	7.5	150	3
20	8.5	112.5	3
21	8.5	37.5	12
22	7.5	0	3
23	8.5	112.5	6
24	7.5	37.5	6
25	8	0	12
26	7.5	112.5	6
27	8.5	37.5	15
28	9	37.5	6
29	9	112.5	12
30	7.5	37.5	12
31	7.5	0	15
32	7.5	112.5	12

[0766] 这些数据证明了CasΦ多肽在核酸检测测定中的实用性。

[0767] 实施例26

[0768] 原代细胞中CasΦ多肽介导的基因组编辑的高效率

[0769] 本实施例示出了CasΦ.12介导与Cas9介导的编辑效率相当的高基因组编辑效率。研究结果如图21所示。在此研究中,CasΦ.12mRNA(SEQ ID NO:107)与gRNA(CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGCCGAGAUGUCUCGCUCC(SEQ ID NO:1430);间隔区序列以粗体和下划线表示)或Cas9 mRNA与gRNA(GGCCGAGATGTCTCGCTCCG(SEQ ID NO:1431))被递送至T细胞。此研究中使用的gRNA靶向B2M基因。为进行核转染,将T细胞重悬于BTXpress电穿孔培

养基(每孔5x10^{5}个细胞)中,并与CasΦ.12或Cas9 mRNA和500pmol gRNA混合。在第2天收集细胞用于提取基因组DNA,并确定插入缺失突变的频率。如图21A所示,当将20μg CasΦ.12mRNA与gRNA一起递送至T细胞时,实现了高基因组编辑效率,并且这与使用Cas9实现的基因组编辑水平类似。还在第2天收集细胞用于流式细胞术以确定B2M敲除的频率。如图21B所示并如图21A中量化,在递送CasΦ.12或Cas9 mRNA后检测到类似百分比的B2M阴性细胞。因此,此实施例证明了原代细胞中CasΦ多肽介导的基因组效率的高效率。

[0770] 实施例27

[0771] CHO细胞中CasΦ多肽介导的基因组编辑

[0772] 本实施例描述了CHO细胞中用于CasΦ.12介导的基因组编辑的优化gRNA的鉴定。在此研究中,CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)与表10中所示的gRNA复合。将CHO细胞重悬于SF溶液中,并使用Lonza设置FF-137以用250pmol RNP核转染细胞(每孔200,000个细胞)。提取基因组DNA并通过下一代序列分析确认插入缺失的存在。图22A示出了由与2'氟修饰的gRNA复合的CasΦ.12多肽诱导的插入缺失突变的频率。如图22B所示,具有约20%或更高的编辑效率的gRNA被确定。

[0773] 表10

[0774]

名称	间隔区序列(5'-->3')	RNA 序列(5'-->3'),示为 DNA
R2849_Bak1_nsd_sg1	CTGACTCCCAGCTCTGACCC (SEQ ID NO:449)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTGACTCCCAGCTCTGACCC (SEQ ID NO:1203)
R2855_Bak1_nsd_sg7	CCATCTCCACCATCAGGAAC (SEQ ID NO:455)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCATCTCCACCATCAGGAAC (SEQ ID NO:1209)
R3977 Bak1_外显子 1_sg1	TCCAGACGCCATCTTTCAGG (SEQ ID NO:465)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTCCAGACGCCATCTTTCAGG (SEQ ID NO:1219)
R3978 Bak1_外显子 1_sg2	TGGTAAGAGTCCTCCTGCCC (SEQ ID NO:466)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGTAAGAGTCCTCCTGCCC (SEQ ID NO:1220)
R3979 Bak1_外显子 3_sg1	TTACAGCATCTTGGGTCAGG (SEQ ID NO:467)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTTACAGCATCTTGGGTCAGG (SEQ ID NO:1221)
R3980 Bak1_外显子 3_sg2	GGTCAGGTGGGCCGGCAGCT	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGGTCAGG

[0775]

	(SEQ ID NO:468)	TGGGCCGGCAGCT (SEQ ID NO: 1222)
R3981 Bak1_外显子 3_sg3	CTATCATTGGAGATGACATT (SEQ ID NO:469)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCTATCATTGGAGATGACATT (SEQ ID NO: 1223)
R3982 Bak1_外显子 3_sg4	GAGATGACATTAACCGGAGA (SEQ ID NO:470)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGAGATGACATTAACCGGAGA (SEQ ID NO: 1224)
R3983 Bak1_外显子 3_sg5	TGGAACTCTGTGTCGTATCT (SEQ ID NO:471)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACTGGAACTCTGTGTCGTATCT (SEQ ID NO: 1225)
R3984 Bak1_外显子 3_sg6	CAGAATTTACTGGAGCAGCT (SEQ ID NO:472)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCAGAATTTACTGGAGCAGCT (SEQ ID NO: 1226)
R3985 Bak1_外显子 3_sg7	ACTGGAGCAGCTGCAGCCCA (SEQ ID NO:473)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACACTGGAGCAGCTGCAGCCCA (SEQ ID NO: 1227)
R3986 Bak1_外显子 3_sg8	CCAGCTGTGGGCTGCAGCTG (SEQ ID NO:474)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCAGCTGTGGGCTGCAGCTG (SEQ ID NO: 1228)
R3987 Bak1_外显子 3_sg9	GTAGGCATTCCCAGCTGTGG (SEQ ID NO:475)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGTAGGCATTCCCAGCTGTGG (SEQ ID NO: 1229)
R3988 Bak1_外显子 3_sg10	GTGAAGAGTTCGTAGGCATT (SEQ ID NO:476)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGTGAAGAGTTCGTAGGCATT (SEQ ID NO: 1230)
R3989 Bak1_外显子 3_sg11	ACCAAGATTGCCTCCAGGTA (SEQ ID NO:477)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACACCAAGATTGCCTCCAGGTA (SEQ ID NO: 1231)
R3990 Bak1_外显子 3_sg12	CCTCCAGGTACCCACCACCA (SEQ ID NO:478)	CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACCCTCCAGGTACCCACCACCA (SEQ ID NO: 1232)

[0776] 实施例28

[0777] CasΦ多肽的最小脱靶效应此实施例说明了CasΦ.12和Cas9的脱靶概况。CRISPR/Cas9翻译技术进入临床的主要挑战已经成为克服脱靶效应。当gRNA容忍gRNA和靶序列的互补性错配时，出现脱靶效应，因此gRNA会与不是靶序列的序列杂交。脱靶效应是主要问题的来源，因为避免产生可能有害的非必要突变非常重要。在此研究中，进行CIRCLE-seq以检测

脱靶位点(Tsai等人2017Nature Methods)。对从CHO细胞中提取的基因组DNA进行测序,所述细胞已经用CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)和靶向Fut8的gRNA、CasΦ.12多肽和靶向BAX的gRNA或Cas9多肽和靶向BAX的gRNA进行了转染。如图23A所示,靶向Fut8的CasΦ.12诱导最小的脱靶突变。图23D示出了由靶向Fut8的Cas9编辑诱导的脱靶突变。类似地,如图23B所示,靶向BAX的CasΦ.12诱导最小的脱靶突变。如图23C所示,与CasΦ.12相比,靶向BAX的Cas9诱导更高百分比的脱靶突变。如图23E所示,与如图23F所示的Casφ.12相比,靶向Bak1的Cas9诱导更高百分比的脱靶突变。

[0778] 在进一步的研究中,进行GUIDE-Seq以检测脱靶位点(Tsai等人2015Nature Biotechnology)。在递送CasΦ.12多肽或Cas9多肽和靶向人类Fut8的gRNA后,对从HEK293细胞中提取的基因组DNA进行测序。如图23G所示,在CasΦ.12多肽样品中未检测到脱靶突变。然而,如图23H所示,在Cas9多肽样品中检测到若干脱靶突变。因此,此实施例证明CasΦ多肽比Cas9具有更少的脱靶效应。

[0779] 实施例29

[0780] CasΦ多肽介导的经由同源定向修复(HDR)的基因组编辑

[0781] 本实施例说明了CasΦ.12介导HDR的能力。在此研究中,CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)与靶向TRAC基因的gRNA(CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUCUCUCAGCUGGUACAC(SEQ ID NO:1432))复合并递送至T细胞。通过在室温下温育10分钟形成RNP复合物。T细胞以5x 10^5个细胞/20μL重悬在电穿孔溶液中(Lonza)。使用Amaxa P3试剂盒和脉冲代码为EH115的Amaxa 4D核转染仪对T细胞进行核转染。核转染后立即将80μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中10分钟,然后转移到培养板。收获细胞并提取基因组DNA。确定插入缺失突变HDR的频率并示于图24A。结合插入缺失突变和HDR的频率来确定修饰频率。还进行了流式细胞术以确定TRAC敲除的频率,如通过细胞表面CD3的损失评估的那样。图24A示出了经由HDR途径进行的CasΦ.12介导的基因编辑。图24B示出了供体寡核苷酸的示意图。因此,此实施例证明了CasΦ多肽作为稳健的基因组编辑工具的用途。

[0782] 实施例30

[0783] 用CasΦ多肽进行多重基因组编辑

[0784] 此实施例说明了CasΦRNP复合物同时靶向多个基因的能力。在此研究中,靶向B2M或TRAC的gRNA与CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)在室温下温育10分钟以形成RNP复合物。RNP复合物由具有不同修饰(未经修饰、crRNA(1me)最后一个的3'核苷酸上的2'-O-甲基、crRNA最后两个3'核苷酸上的2'-O-甲基(2me)和crRNA最后三个3'核苷酸上的2'-O-甲基(3me))并具有不同的重复区和间隔区序列(20-20,其对应于20个核苷酸的重复区和20个核苷酸的间隔区,以及20-17,其对应于20个核苷酸的重复区和17个核苷酸的间隔区)的各种gRNA形成,如表11所示。将B2M靶向RNP、TRAC靶向RNP或B2M靶向RNP和TRAC靶向RNP添加到T细胞中。T细胞以5x 10^5个细胞/20μL重悬于核转染P3溶液中,并且使用脉冲代码为EH115的Amaxa 4D 96孔电穿孔系统对细胞进行核转染。核转染后立即将85μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中10分钟,然后转移到培养板。在第3天,提取基因组DNA。在第5天,收获细胞用于流式细胞术。B2M阴性和CD3阴性细胞百分比的定量示于图25A(对于具有20个核苷酸的重复区长度和20个核苷酸的间隔区长度的gRNA)和图25B(对于具有20个

核苷酸的重复区长度和17个核苷酸的间隔区长度的gRNA)。对于不同重复区和间隔区长度以及具有不同修饰的gRNA,对应的流式细胞术图可以参见图25C。

[0785] 在进一步的研究中,RNP复合物是使用CasΦ.12和具有不同长度靶向TRAC的间隔区序列(如上20-20和20-17)的经修饰的gRNA(未经修饰的、1me、2me、3me、crRNA最后一个3'核苷酸上的2'-氟(1F)、crRNA最后两个3'核苷酸上的2'-氟(2F)和crRNA最后三个3'核苷酸上的2'-氟(3F))形成的。使用P3原代细胞核转染试剂盒和脉冲代码为EH115的Amaxa 4D 96孔电穿孔系统,用RNP复合物(125pmol)对T细胞进行核转染。如图25D所示,使用CasΦ.12和经修饰的gRNA实现了约90%的编辑效率。图25E示出了流式细胞术图,说明了递送CasΦ.12和经修饰的gRNA后T细胞中约90%的TRAC敲除。此数据进一步证明了CasΦ介导高效基因组编辑的能力。

[0786] 表11

[0787]

名称	靶标	修饰	重复区序列(5'-->3')	间隔区序列(5'-->3')	crRNA 序列(5'-->3')
R315020-20	B2M外显子2	未经修饰、最后一个3'碱基处的2'OMe (1me) 最后两个3'碱基处的2'OMe (2me) 最后三个3'碱基处的2'OMe (3me)	AUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUG (SEQ ID NO: 1434)	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGUGGGGGUGAAUUCAGUG (SEQ ID NO: 1435)
R304220-20	TRAC外显子1	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	GAGUCUCUCAGCUGGUACAC (SEQ ID NO: 1436)	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUCUCUCAGCUGGUACAC (SEQ ID NO: 1437)

[0788]

R315020-17	B2M外显子2	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	CAGUGGGGGUGAAUUCA (SEQ ID NO: 1438)	AUUGCUCCUUACGAGGAGACCAGUGGGGGUGAAUUCA (SEQ ID NO: 1439)
R304220-17	TRAC外显子1	未经修饰 1me 2me 3me	AUUGCUCCUUACGAGGAGAC (SEQ ID NO: 1433)	CAGUGGGGGUGAAUUCA (SEQ ID NO: 1440)	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUCUCUCAGCUGGUA (SEQ ID NO: 1441)

[0789] 实施例31

[0790] CasΦ多肽具有扩展的种子区域

[0791] 此实施例显示,与Cas9相比,CasΦ.12具有扩展的种子区域,并且CasΦ.12不能容忍间隔区序列5'的前1-16个核苷酸内间隔区和靶序列的互补性错配。在此研究中,CasΦ.12(SEQ ID NO:107)与靶向TRAC基因的gRNA复合并递送至T细胞。间隔区序列在图26A所示的位置含有单个错配或在图26B所示的两个位置中的每一个含有错配。错配通过将嘌呤取代为嘌呤(即A到G,反之亦然)和将嘧啶取代为嘧啶(即U到C,反之亦然)而生成。通过在室温下温育10分钟形成RNP复合物。T细胞以5x 10^5个细胞/20μL重悬在电穿孔溶液中(Lonza)。将Amaxa P3试剂盒和Amaxa 4D核转染仪用于对T细胞进行核转染。核转染后立即将80μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中10分钟,然后转移到培养板。收获细胞用于提取基因组DNA以确定插入缺失突变的频率,并用于流式细胞术以确定CD3敲除细胞的百分比。如图26A所示,当在距间隔区序列5'端的位置1-16处间隔区和靶序列的互补存在单个错配时,未检测到插入缺失突变或CD3敲除。类似地,如图26B所示,当在距间隔区序列5'端的位置1-16处间隔区和靶序列的互补存在两个错配时,未检测到插入缺失突变或CD3敲除细胞。图26A和图26B所示的数据证明CasΦ多肽不能容忍间隔区5'位置16处间隔区序列和靶序列之间的互补性错配。这个不容忍错配的区域被称为"种子区域"。因此,CasΦ.12的种子区域是距间隔区5'端的前16个碱基。相比之下,Cas9的种子区域要短得多,并且据报道仅有5个核苷酸长(Wu等人,Quant Biol.2014年6月;2(2):59-70)。较短的种子区域导致脱靶效应的可能性增加,因为间隔区和靶标之间在种子区域外发生错配的可能性增加。因此,较长的种子区域导致脱靶效应的可能性降低。因此,CasΦ.12的长种子区域优于Cas9的短种子区域,并且有助于减少CasΦ.12的脱靶效应。图26C和图26D提供了具有错配的gRNA的示意图。

[0792] 实施例32

[0793] 经修饰的指导RNA与CasΦ多肽的用途

[0794] 此实施例说明了CasΦ.12在具有经修饰的gRNA的CHO细胞中介导基因组编辑的能力。在此研究中,使用CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)和表12所示的经修饰的gRNA形成RNP复合物。为进行核转染,每孔将200pmol RNP与200,000个细胞混合。将CHO细胞重悬于SF溶液中,并使用Lonza设置FF-137以对细胞进行核转染。转染后48小时提取基因组DNA,并确定插入缺失突变的频率。如图27A所示,鉴定了几种具有约10%的编辑效率的经修饰的gRNA。在进一步的研究中,测试了其他经修饰的gRNA。如图27B所示,鉴定了具有高达40-50%的编辑效率的经修饰的gRNA。

[0795] 已知具有硫代磷酸酯(PS)骨架修饰、2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'OMe)糖修饰的gRNA提高代谢稳定性和对RNA的结合亲和力,并且用DNA替换RNA核苷酸生成与天然crRNA相比具有高效基因编辑活性的gRNA(Rahdar等人,2015,PNA;McMahon等人2017,Molecular Therapy第26卷第5期)。

[0796] 表12

[0797]

SEQ ID NO.	名称(图27A)	修饰	位置	经全长修饰的指导(重复区和间隔区)	名称(图27A、B)

[0798]

1442	R2466_Mo1	2'-O-甲基(2'OMe)、3'硫代磷酸(PS)键	在前3个(5')和最后一个(3')碱基处的2'OMe、在前3个(5')和最后2个(3')碱基之间的3' PS键	mC*mU*mU*UCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACmG*mU*mU*	Synthego_Mod
1443	R2466_Mo2	2'OMe，3'，25个核苷酸的重复区	在前3个(5')和最后一个(3')碱基处的2'OMe、在前3个(5')和最后2个(3')碱基之间的3' PS键	mA*mA*mU*AGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACmG*mU*mU	
1444	R2466_Mo3	2'-O-甲氧基-乙基碱基	在前2个(5')和最后一个(3')碱基处的2'-O甲氧基乙基碱基、在前2个(5')和最后2个(3')碱基之间的3' PS键	**/52MOErA*/i2MOErA*/**UAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACG/**i2MOErT/32MOErT**	
1445	R2466_Mo4	2'-氟(2'-F)	第一个(5')和最后一个(3')碱基	/52FC/UUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGU/32FU/	
1446	R2466_Mo5	2'-F、25个核苷酸的重复区	第一个(5')和最后一个(3')碱基	/52FA/AUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGU/32FU/	1F, 45F (25nt R)
1447	R2466_Mo6	2'-F, PS, 2'OMe	第一个(5')碱基2'OMe、前两个(5')碱基之间的PS、最后4个(3')碱基2'-F	**mC***U*UUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA/i2FC/i2FG/i2FU/32FU/	1, 2 OMe-PS, 54, 55, 56 'F
1448	R2466_Mo7	2'-F, PS, 2'OMe，25个核苷酸的重复区	第一个(5')碱基2'OMe、前两个(5')碱基之间的PS、最后4个(3')碱基2'-F	mA*A*UAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA/i2FC/i2FG/i2FU/32FU	1, 2 OMe-PS, 54, 55, 56 'F (25nt R)

[0799]

1449	R2466_Mo8	2'-F	最后 4 个(3')碱基 2'-F	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA/i2FC/i2FG/i2FU/32FU	54, 55, 56 2'F
1450	R2466_Mo9	2'-F 、 25 个核苷酸的重复区	最后 4 个(3')碱基 2'-F	AAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA/i2FC/i2FG/i2FU/32FU	54, 55, 56 2'F (25 nt R)
1451	R2466_Mo10	C3 间隔区、21 个核苷酸的间隔区	第一个(5')和最后一个(3')碱基	**C**UUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUU**G**	
1452	R2466_Mo11	C3 间隔区、21 个核苷酸的间隔区、25 个核苷酸的间隔区	第一个(5')和最后一个(3')碱基	**A**AUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUU**G**	
1453	R2466_Mo12	DNA 碱基 + 2'OMe、PS	在前 3 个(5')碱基处的 2'OMe、最后 4 个(3')碱基 DNA	mC*mU*mU*UCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA**CGTT**	1, 2, 3 Ome-PS 54, 55, 56 DNA
1454	R2466_Mo13	DNA 核苷	最后(3')4 个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACA**CGTT**	
1455	R2466_Mo14	DNA 核苷	间隔区的核苷 1 和最后(3')4 个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC**A**GGAAUACAUGGUACA**CGTT**	1, 54, 55, 56 DNA
1456	R2466_Mo15	DNA 核苷	间隔区的核苷 8 和最后(3')4 个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUA**C**AUGGUACA**CGTT**	
1457	R2466_Mo16	DNA 核苷	间隔区的核苷 9 和最后(3')4 个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUAC**A**UGGUACA**CGTT**	
1458	R2466_Mo17	DNA 核苷	间隔区的核苷 1 和 8 和最后(3')4 个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC**A**GGAAUA**C**AUGGUACA**CGTT**	1, 8, 54, 55, 56 DNA

[0800]

1459	R2466_Mo18	DNA核苷	间隔区的核苷1和9和最后(3')4个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC**A**GGAAUAC**A**UGGUACA**CGTT**	
1460	R2466_Mo19	DNA核苷	间隔区的核苷1、8和9和最后(3')4个核苷	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC**A**GGAAU**CA**UGGUACA**CGTT**	1, 8, 9, 54, 55, 56 DNA
1461	R2466_Mo20	DNA碱基，25个核苷酸的重复区	间隔区的核苷1、8和9和最后(3')4个核苷	AAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGAC**A**GGAAUA**CA**UGGUACA**CGTT**	
1462	R2466_Mo21	多聚A-尾、25个核苷酸的重复区		AAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUUAAAAAAA	
1463	R2466_Mo22	DNA碱基、2'OMe、PS	在前3个(5')碱基处的2'OMe和PS、在间隔区1、8和9处的DNA碱基、在最后4个(3')碱基处的PS	mC*mU*mU*UCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUA**CA**UGGUACA**CGTT**	1,2,3 OMe, 1, 8, 9, 54, 55, 56 DNA
1464	R2466_Mo23	未经修饰、25个核苷酸的重复区		AAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUU	
1465	R2466 (未经修饰)	未经修饰	未经修饰	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGGAAUACAUGGUACACGUU	

[0801] 实施例33

[0802] 优化CHO细胞中指导RNA重复区和间隔区长度

[0803] 此实施例描述了在CHO细胞中用于基因组编辑的gRNA的重复区和间隔区长度的优化。在此研究中，RNP复合物是通过将CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)与表13中所示的靶向Fut8基因的gRNA一起温育形成的。gRNA具有不同的重复区长度(20至36个核苷酸)或间隔区长度(15至30个核苷酸)。提取基因组DNA并确定插入缺失突变的频率。为进行核转染，每孔将250pmol RNP与200,000个细胞混合。2天后，收集细胞并提取基因组DNA以确定插入缺失突变的频率。图28A示出了由CasΦ.12与含有不同长度重复区序列的gRNA生成的插入缺失。图28B示出了由CasΦ.12与含有不同长度间隔区序列的gRNA生成的插入缺失。发现CHO细胞中CasΦ.12介导的基因组编辑的最佳gRNA具有20个核苷酸的重复区长度和17个核苷酸的间隔区长度。

[0804] 表13

[0805]

名称	重复区长度	间隔区长度	重复区序列 (5'-->3')	间隔区序列 (5'-->3')	crRNA 序列 (5'-->3')
R3582	36	30	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG AACAUU (SEQ ID NO: 1482)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAGAACAUU (SEQ ID NO:1499)
R3583	36	29	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG AACAU (SEQ ID NO: 1483)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAGAACAU (SEQ ID NO:1500)
R3584	36	28	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG AACA (SEQ ID NO: 1484)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAGAACA (SEQ ID NO:1501)
R3585	36	27	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG AAC (SEQ ID NO: 1485)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAGAAC (SEQ ID NO:1502)
R3586	36	26	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG AA (SEQ ID NO: 1486)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU

[0806]

			ID NO: 54)		UGAAGAA (SEQ ID NO:1503)
R3587	36	25	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG A (SEQ ID NO: 1487)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAGA (SEQ ID NO:1504)
R3588	36	24	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAAG (SEQ ID NO: 1488)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAAG (SEQ ID NO:1505)
R3589	36	23	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGAA (SEQ ID NO: 1489)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGAA (SEQ ID NO:1506)
R3590	36	22	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUGA (SEQ ID NO: 1490)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UGA (SEQ ID NO:1507)
R3591	36	21	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUUG (SEQ ID NO: 1491)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU UG (SEQ ID NO:1508)
R3592	36	20	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1492)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU U (SEQ ID NO:1509)
R3593	36	19	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CGU (SEQ ID NO: 1493)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU (SEQ ID NO:1510)

R3594	36	18	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA CG (SEQ ID NO: 1494)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACG (SEQ ID NO:1511)
R3595	36	17	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA C (SEQ ID NO: 1495)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACAC (SEQ ID NO:1512)
R3596	36	16	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUACA (SEQ ID NO: 1496)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACA (SEQ ID NO:1513)
R3597	36	15	CUUUCAAG ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 54)	AGGAAUAC AUGGUAC (SEQ ID NO: 1497)	CUUUCAAGACU AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUAC (SEQ ID NO:1514)
R3598	35	20	UUUCAAGA CUAAUAGA UUGCUCCU UACGAGGA GAC (SEQ ID NO: 1466)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UUUCAAGACUA AUAGAUUGCUC CUUACGAGGAG ACAGGAAUACA UGGUACACGUU (SEQ ID NO:1515)
R3599	34	20	UUCAAGAC UAAUAGAU UGCUCCUU ACGAGGAG AC (SEQ ID NO: 1467)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UUCAAGACUAA UAGAUUGCUCC UUACGAGGAGA CAGGAAUACAU GGUACACGUU (SEQ ID NO:1516)
R3600	33	20	UCAAGACU AAUAGAUU GCUCCUUAC GAGGAGAC (SEQ ID NO: 1468)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UCAAGACUAAU AGAUUGCUCCU UACGAGGAGAC AGGAAUACAUG GUACACGUU (SEQ ID NO:1517)
R3601	32	20	CAAGACUA AUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGAC (SEQ ID NO: 1469)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	CAAGACUAAUA GAUUGCUCCUU ACGAGGAGACA GGAAUACAUGG UACACGUU (SEQ ID NO:1518)
R3602	31	20	AAGACUAA UAGAUUGC	AGGAAUAC AUGGUACA	AAGACUAAUAG AUUGCUCCUUA

[0807]

[0808]

			UCCUUACG AGGAGAC (SEQ ID NO: 1470)	CGUU (SEQ ID NO: 1498)	CGAGGAGACAG GAAUACAUGGU ACACGUU (SEQ ID NO:1519)
R3603	30	20	AGACUAAU AGAUUGCU CCUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1471)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	AGACUAAUAGA UUGCUCCUUAC GAGGAGACAGG AAUACAUGGUA CACGUU (SEQ ID NO:1520)
R3604	29	20	GACUAAUA GAUUGCUC CUUACGAG GAGAC (SEQ ID NO: 1472)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	GACUAAUAGAU UGCUCCUUACG AGGAGACAGGA AUACAUGGUAC ACGUU (SEQ ID NO:1521)
R3605	28	20	ACUAAUAG AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 1473)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	ACUAAUAGAUU GCUCCUUACGA GGAGACAGGAA UACAUGGUACA CGUU (SEQ ID NO:1522)
R3606	27	20	CUAAUAGA UUGCUCCU UACGAGGA GAC (SEQ ID NO: 1474)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	CUAAUAGAUUG CUCCUUACGAG GAGACAGGAAU ACAUGGUACAC GUU (SEQ ID NO:1523)
R3607	26	20	UAAUAGAU UGCUCCUU ACGAGGAG AC (SEQ ID NO: 1475)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 1498)	UAAUAGAUUGC UCCUUACGAGG AGACAGGAAUA CAUGGUACACG UU (SEQ ID NO:1524)
R3608	25	20	AAUAGAUU GCUCCUUAC GAGGAGAC (SEQ ID NO: 1476)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AAUAGAUUGCU CCUUACGAGGA GACAGGAAUAC AUGGUACACGU U (SEQ ID NO:1525)
R3609	24	20	AUAGAUUG CUCCUUACG AGGAGAC (SEQ ID NO: 1477)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AUAGAUUGCUC CUUACGAGGAG ACAGGAAUACA UGGUACACGUU (SEQ ID NO:1526)
R3610	23	20	UAGAUUGC UCCUUACG	AGGAAUAC AUGGUACA	UAGAUUGCUCC UUACGAGGAGA

[0809]

			AGGAGAC (SEQ ID NO: 1478)	CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	CAGGAAUACAU GGUACACGUU (SEQ ID NO:1527)
R3611	22	20	AGAUUGCU CCUUACGA GGAGAC (SEQ ID NO: 1479)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AGAUUGCUCCU UACGAGGAGAC AGGAAUACAUG GUACACGUU (SEQ ID NO:1528)
R3612	21	20	GAUUGCUC CUUACGAG GAGAC (SEQ ID NO: 1480)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	GAUUGCUCCUU ACGAGGAGACA GGAAUACAUGG UACACGUU (SEQ ID NO:1529)
R3613	20	20	AUUGCUCC UUACGAGG AGAC (SEQ ID NO: 1481)	AGGAAUAC AUGGUACA CGUU AGGAAUAC AUGGUACA CGUU (SEQ ID NO: 2487)	AUUGCUCCUUA CGAGGAGACAG GAAUACAUGGU ACACGUU (SEQ ID NO:1530)

[0810] 实施例34

[0811] 鉴定原代细胞中CasΦ多肽介导的基因组编辑的最佳指导RNA

[0812] 本实施例显示了靶向T细胞中的TRAC、B2M和程序性细胞死亡蛋白1(PD1)的最佳性能gRNA的鉴定。在此研究中,CasΦ.12多肽(SEQ ID NO:107)与不同的gRNA(示于表14)在室温下温育10分钟以形成RNP复合物。T细胞以5x 10^5个细胞/20μL重悬于电穿孔溶液(Lonza)中,并且使用脉冲代码为EH115的Amaxa 4D核转染仪对细胞进行核转染。核转染后立即将80μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中10分钟,然后转移到培养板。48小时后,从一半细胞中提取DNA,并且进行PCR以检测插入缺失的频率。其余细胞培养至第5天,然后收集用于流式细胞术以检测TRAC或B2M敲除的频率。图29A和图29B示出了用于靶向TRAC的示例性gRNA。图29B和图29C示出了用于靶向B2M的示例性gRNA。图29E示出了用于靶向PD1的示例性gRNA。此外,此实施例证明了靶向非编码区域的指导RNA可以介导基因敲除。例如,R3007、R2995、R2992和R3014靶向PD1基因的非编码区域。靶向TRAC的gRNA的筛选示于图29F,并且靶向B2M的gRNA的筛选示于图29H。靶向TRAC的示例性gRNA的流式细胞术图示于图29G,并且靶向B2M的示例性gRNA的流式细胞术图示于图29I中。

[0813] 表14

[0814]

名称	靶标	间隔区序列(5'-->3')
R3041	TRAC	UCCCACAGAUAUCCAGAACC(SEQ ID NO:2470)
R3042	TRAC	GAGUCUCUCAGCUGGUACAC(SEQ ID NO:1436)

R3043	TRAC	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA(SEQ ID NO:2471)
R3061	TRAC	AAGUCCAUAGACCUCAUGUC(SEQ ID NO:2472)
R3063	TRAC	AAGAGCAACAGUGCUGUGGC(SEQ ID NO:2473)
R3066	TRAC	GUUGCUCCAGGCCACAGCAC(SEQ ID NO:2474)
R3068	TRAC	GCACAUGCAAAGUCAGAUUU(SEQ ID NO:2475)
R3069	TRAC	GCAUGUGCAAACGCCUUCAA(SEQ ID NO:2476)
R3081	TRAC	CUAAAAGGAAAAACAGACAU(SEQ ID NO:2477)
R3141	TRAC	CUCGACCAGCUUGACAUCAC(SEQ ID NO:2478)
R3088	B2M	AUAUAAGUGGAGGCGUCGCG(SEQ ID NO:2479)
R3091	B2M	GGGCCGAGAUGUCUCGCUCC(SEQ ID NO:1429)
R3094	B2M	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGC(SEQ ID NO:2480)
R3119	B2M	AAGUUGACUUACUGAAGAAU(SEQ ID NO:2481)
R3132	B2M	AGCAAGGACUGGUCUUUCUA(SEQ ID NO:2482)
R3149	B2M	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGU(SEQ ID NO:2483)
R3150	B2M	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUG(SEQ ID NO:1434)
R3155	B2M	GGCUGUGACAAAGUCACAUG(SEQ ID NO:2484)
R3156	B2M	GUCACAGCCCAAGAUAGUUA(SEQ ID NO:2485)
R3157	B2M	UCACAGCCCAAGAUAGUUAA(SEQ ID NO:2486)
R2946	PD1	UGUGACACGGAAGCGGCAGU(SEQ ID NO:263)
R2992	PD1	GGGGCUGGUUGGAGAUGGCC(SEQ ID NO:309)
R2995	PD1	GAGCAGCCAAGGUGCCCCUG(SEQ ID NO:312)
R3007	PD1	ACACAUGCCCAGGCAGCACC(SEQ ID NO:324)
R3014	PD1	AGGCCCAGCCAGCACUCUGG(SEQ ID NO:331)

[0815] 实施例35

[0816] CasΦ多肽的RNP和mRNA递送

[0817] 此实施例说明了CasΦ.12可以作为mRNA或作为RNP复合物递送至原代细胞。在一项研究中，使用CasΦ.12蛋白(0、100、200或400pmol)(SEQ ID NO:107)和靶向B2M或TRAC的gRNA(0、400或800pmol)形成RNP复合物。RNP复合物被添加到T细胞中。使用Amaxa P3试剂盒和脉冲代码为EH115的Amaxa 4D 96孔电穿孔系统对T细胞进行核转染。收获细胞用于流式细胞术以确定B2M或TRAC敲除细胞的百分比，并提取基因组DNA以检测插入缺失突变的频率。如图30A所示，在用靶向B2M的CasΦ.12RNP复合物转染的T细胞中检测到不同的B2M阴性细胞群体。如图30B所示，在用靶向TRAC的CasΦ.12RNP复合物转染的T细胞中检测到不同的TRAC阴性细胞群体。B2M敲除细胞百分比的量化示于图30C，并且TRAC敲除细胞百分比的量化示于图30D。在递送RNP复合物后也观察到高频率的插入缺失突变。如图30E所示，当使用400pmol蛋白质和800pmol指导RNA形成靶向B2M的RNP复合物时，检测到约55％的插入缺失突变。当使用相同条件形成靶向TRAC的RNP复合物时，检测到类似频率的插入缺失突变，如图30F所示。

[0818] 在第二项研究中，将CasΦ.12mRNA递送至具有靶向B2M基因的gRNA的T细胞。为进行核转染，将T细胞重悬于BTXpress电穿孔培养基(每孔5x 10^5个细胞)中，并与CasΦ

.12mRNA和500pmol gRNA混合。在第2天收集细胞用于提取基因组DNA,并确定插入缺失突变的频率。如图30G所示,递送CasΦ.12mRNA和gRNA导致高频率的插入缺失突变。这与递送Cas9 mRNA进行基因组编辑的水平相当。来自此研究的进一步数据示于图30I和图30J中。图30I示出了插入缺失突变和功能性敲除的频率,如通过流式细胞术评估的那样,由靶向相同位点的CasΦ.12或Cas9诱导的B2M基因的频率。图30J示出了通过NGS分析确定的由CasΦ.12或Cas9诱导的插入缺失突变的尺寸分布。CasΦ.12主要诱导较大的缺失突变,而Cas9主要诱导小的1bp插入缺失。此数据进一步确认了CasΦ.12在B2M基因座介导基因组编辑的能力。

[0819] 实施例36

[0820] 哺乳动物细胞中CasΦ多肽对gRNA的加工

[0821] 此实施例说明了CasΦ多肽在哺乳动物细胞中加工gRNA的能力。在此研究中,在第0天使用脂质转染胺用crRNA和编码CasΦ.12(SEQ ID NO:107)的表达质粒转染HEK293T细胞。crRNA具有重复区序列(与CasΦ.12结合的区域)CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGAC(SEQ ID NO:54)。为确定HEK293T细胞中表达的crRNA的性质,通过下一代测序分析了HEK293T细胞中的微小RNA种类。2天后,使用mirVANA试剂盒提取miRNA。用重组虾碱性磷酸酶(rSAP)处理RNA,以去除RNA5'和3'端的所有磷酸盐。然后进行PNK磷酸化以将磷酸盐添加回5'端,为衔接子连接至RNA做准备。然后将RNA与的3'SR衔接子混合,然后是3'连接酶混合物,并在热循环仪中在25℃下温育1小时。然后将逆转录引物杂交以防止衔接子-二聚体形成。SR RT引物与过量的3'SR衔接子(在3'连接反应后保持游离)杂交,并将单链DNA衔接子转化为双链DNA分子。双链DNA不是由T4 RNA连接酶1介导的连接底物,因此不会连接至5SR。将前一步的RNA连接混合物与Illumina的SR RT引物混合,并置于热循环仪中进行以下程序:75℃5分钟、37℃15分钟、25℃15分钟、保持在4℃。然后将RNA连接混合物与5'SR衔接子在热循环仪中在25℃下温育1小时。最后,使用ProtoScript II逆转录酶逆转录RNA并扩增用于PCR。然后通过下一代测序分析样品。

[0822] 如图31所示,通过序列分析检测到的主要crRNA分子长24个核苷酸(ATAGATTGCTCCTTACGAGGAGAC(SEQ ID NO:1531),比全长重复序列(CTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGAC(SED ID NO:54)短12个核苷酸),被递送至HEK293T细胞。这展示了CasΦ.12如何在哺乳动物细胞中处理其crRNA的重复区域。

[0823] 实施例37

[0824] CasΦ多肽切割生成5'悬突

[0825] 此实施例说明了不同CasΦ多肽诱导的切割模式。在此研究中,CasΦ多肽(CasΦ.12、CasΦ.45、CasΦ.43、CasΦ.39、CasΦ.37、CasΦ.33、CasΦ.32、CasΦ.30、CasΦ.28、CasΦ.25、CasΦ.24、CasΦ.22、CasΦ.20、CasΦ.18)与crRNA复合以形成RNP。然后将RNP用于与包含靶序列和PAM(GTTG)的质粒DNA的切割反应。切割反应在37℃下进行并持续15分钟。然后通过凝胶电泳分析切割产物。如图32A所示,大多数CasΦ多肽从质粒靶标生成线性产物,而一些CasΦ多肽将切口引入质粒DNA。

[0826] 图32B示出了双链靶核酸的靶链和非靶链上的切割位点的示意图。如图32C所示和图32D所表示的,通过序列分析研究了由靶链和非靶链上的切割位点的位置产生的切割模式的性质。这些数据显示,CasΦ多肽介导的靶核酸切割后的切割模式是包含5'悬突的交错

切割。图32E示出了不同CasΦ多肽的切割位点和悬突的表格。“#bp重叠”对应于每个CasΦ多肽的5’悬突的长度。为了进行比较，Cpf1引入了具有4或5个核苷酸的5’悬突的交错双链DNA断裂(Zetsche等人2015Cell)。

[0827] 实施例38

[0828] 用CasΦ多肽进行多重基因组编辑

[0829] 此实施例说明了CasΦRNP复合物同时敲除多个基因的能力。在此研究中，靶向B2M、TRAC和PDCD1的gRNA(提供于表15)与CasΦ.12(SEQ ID NO:12)在室温下温育10分钟以分别形成B2M、TRAC和PDC1靶向RNP。将B2M靶向RNP、TRAC靶向RNP、PDCD1靶向RNP及其组合添加到T细胞中。T细胞以5x 10^5个细胞/20μL重悬于核转染P3溶液中，并且将脉冲代码为EH115的Amaxa 4D 96孔电穿孔系统用于核转染细胞。核转染后立即将85μl预热培养基添加到每个孔中。然后将细胞留在比色皿板中10分钟，然后转移到培养板。在第3天，提取基因组DNA并送去进行NGS测序，并且测量插入缺失％，阳性插入缺失％表示敲除％。在第5天，收获细胞用于流式细胞术，并且用荧光标记的针对TRAC和B2M的抗体(无针对PDCD1的抗体)测量敲除％。插入缺失％结果呈现于表16，并且流式细胞术数据呈现于表17。对应的流式细胞术图示于图33。

[0830] 表15

[0831]

说明	SEQ ID	序列
B2M gRNA (R3132)	1532	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCAAGGACUGGUCUUUCUA
TRAC gRNA (R3042)	1432	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGAGUCUCUCAGCUGGUACAC
PDCD1 gRNA (R2925)	791	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACUAGCACCGCCCAGACGACUG

[0832] 表16

[0833]

说明	RNP指导ID	扩增子	插入缺失％
TRAC单KO	R3042	TRAC	77.6％
B2M单KO	R3132	B2M	85.5％
PDCD1单KO	R2925	PDCD1	44.6％
TRAC、B2M双KO	R3132和R3042	TRAC	58.8％
TRAC、B2M双KO	R3132和R3042	B2M	61.2％

TRAC、B2M、PDCD1三KO	R3132、R3042、R2925	TRAC	59.2%
TRAC、B2M、PDCD1三KO	R3132、R3042、R2925	B2M	69.4%
TRAC、B2M、PDCD1三KO	R3132、R3042、R2925	PDCD1	42.1%

[0834] 表17

[0835]

gRNA	B2M+ CD3-	B2M+、CD3+	B2M-、CD3+	B2M-、CD3-
TRAC	94	5.91	0.00418	0.1
B2M	0.051	8.65	90.7	0.59
TRAC + B2M	4.2	4.89	4.01	86.9
TRAC + B2M + PDCD1	4.74	14.1	4.33	76.8

[0836] 实施例39

[0837] 用CasΦ多肽进行基因组编辑介导小鼠肝癌细胞中PCSK9的有效编辑

[0838] 此实施例显示CasΦ.12RNP复合物在介导编辑PCSK9基因方面是高效的。在此研究中,将95个靶向PCSK9的CasΦgRNA(序列示于表E和Q)与CasΦ.12(SEQ ID NO:12)一起温育以形成RNP复合物。还使用Cas9和gRNA形成了阳性对照RNP复合物。将Hepa1-6小鼠肝癌细胞(100,000个细胞)重悬于SF溶液(Lonza)中,并使用程序CM-137或CM-148(Amaxa核转染仪)用CasΦRNP(250pmole)或对照Cas9 RNP(60pmole)进行核转染。48小时后收集细胞,提取基因组DNA,并使用NGS确定插入缺失突变的频率。图34示出了CasΦ.12是高效的基因组编辑工具,CasΦ.12RNP复合物诱导的插入缺失频率高达48%。而Cas9诱导的最大插入缺失频率仅为约22%。

[0839] 实施例40

[0840] 编码CasΦ.12的腺相关病毒促进基因组编辑

[0841] 此实施例显示a CasΦ.12质粒(包括CasΦ多肽序列和gRNA序列,有时被称为一体化)可用于促进基因组编辑。在此研究中,从最初的RNP筛选中选择了crRNA(示于表E和Q的序列),并且生成了这些crRNA的截短,36、25、20或19个核苷酸的重复区长度结合20、17或16个核苷酸的间隔区长度。然后将每个crRNA克隆到AAV载体中,所示载体由驱动crRNA表达的U6启动子、驱动CasΦ表达的无内含子EF1α短(EFS)启动子、多聚A信号和1kb填充序列基因组组成。用10μg的每种AAV质粒对Hepa1-6小鼠肝癌细胞进行核转染。72小时后,提取基因组DNA,并使用NGS确定插入缺失突变的频率。图35A示出了编码CasΦ多肽序列和gRNA序列的腺相关病毒(AAV)的质粒图谱。图35D显示示出了在用10μg的每种AAV质粒转导的Hepa1-6细胞中CasΦ.12诱导的插入缺失突变的频率。在此研究中使用了含有19、20、25或36个核苷酸的重复区序列和16、17或20个核苷酸的间隔区序列的gRNA。在图表图例中,重复区和间隔区长度表示为重复区中的核苷酸数,后跟间隔区中的核苷酸数,例如20-17具有20个核苷酸的重复区长度和17个核苷酸的间隔区长度。插入缺失突变的频率与Cas9的频率相当。图35E和图35F示出了CasΦ.12诱导的插入缺失突变的频率,不同的gRNA含有不同长度的重复区序列和间隔区序列(如图35F所示,重复区长度后跟间隔区长度)。此研究表明,CasΦ.12介导的基因组编辑的一体化载体方法在不同的gRNA序列间和不同重复区和间隔区长度的gRNA中是稳健的。

[0842] AAV载体是提供用于治疗人类疾病的基因治疗的领先平台(Wang等人,(2019)Nature Reviews Drug Discovery)。病毒载体递送CRISPR/Cas9的局限性之一是Cas9的尺寸。AAV大约为20nm,允许将4.5kb的基因组材料包装在其内。这使得包装Cas9和gRNA(约4.2kB)与任何其他元素,诸如多个gRNA或用于HDR的供体多核苷酸具有挑战性(Lino等人,(2018),Drug Delivery)。而CasΦ要小得多,允许将CRISPR系统的所有组分包装在一个病毒载体中。

[0843] 实施例41

[0844] 优化CasΦ的脂质纳米颗粒递送

[0845] 此实施例描述了CasΦmRNA和gRNA的脂质纳米颗粒(LNP)递送的优化。在此研究中,通过测试含有CasΦmRNA和gRNA的LNP的不同胺基与磷酸基的比率(N/P)来优化LNP的包封效率。使用来自Precision Nanosystems(GenVoy-ILM^{TM})的LNP试剂盒生成具有不同N/P比率的LNP。然后将LNP滴入HEK293T细胞中。提取基因组DNA并使用NGS确定插入缺失突变的频率。此研究中使用的gRNA是R2470,在前三个5'核苷酸和最后三个3'核苷酸上具有2'O-甲基,并且在前三个5'核苷酸之间和在最后两个3'核苷酸之间具有硫代磷酸键。R2470从5'到3'的序列是42256-779_601_SL。使用T7信使mRNA IVT试剂盒生成mRNA。如图36所示,在使用一系列N/P比率后,检测到插入缺失突变。

[0846] LNP是用于基因治疗的临床上最先进的非病毒递送系统之一。LNP具有许多使其成为用于递送核酸的理想候选者的特性,包括易于制造、低细胞毒性和免疫原性、高效的核酸包封和细胞转染、多剂量能力和设计灵活性(Kulkarni等人,(2018)Nucleic Acid Therapeutics)。

[0847] 实施例42

[0848] 造血干细胞中用CasΦ多肽的基因组编辑

[0849] 此实施例展示了CD34^{+}造血干细胞(HSC)的CasΦ介导基因组编辑。HSC是干细胞,其分化产生血细胞,诸如T和B淋巴细胞、红细胞、单核细胞和巨噬细胞。HSC是未来干细胞治疗的重要细胞,因为它们有潜力用于治疗遗传性血细胞疾病(Morgan等人(2017),Cell Stem Cell)。

[0850] 在此研究中,人类CD34^{+}细胞在XVIVO10培养基中生长(+5%FBS,+1X CC110)三天。在第三天,使用Lonza P3试剂盒用含有与B2M靶向指导R3132复合的CasΦ.12多肽(42256-779_601_SL),或CasΦ.12mRNA与B2M靶向指导的混合物的RNP对细胞进行核转染。3天后收集细胞,纯化基因组DNA,并通过NGS分析B2M基因座处插入缺失突变的频率。如图37所示,当CasΦ.12以CasΦ.12RNP复合物或CasΦ.12mRNA递送至细胞时,CasΦ.12是用于基因组编辑的有效工具。

[0851] 此实施例说明了CasΦ多肽在干细胞(诸如HSC)中作为基因组编辑工具的实用性。

[0852] 实施例43

[0853] 诱导多能干细胞中用CasΦ多肽的基因组编辑

[0854] 此示实施例展示了诱导多能干细胞(iPSC)的CasΦ介导基因组编辑。iPSC是由体细胞生成的多能干细胞。它们可以无限繁殖并在体内产生任何细胞类型。这些特性使iPSC成为用于研究人类疾病的有力工具,并为一系列医学病症的细胞治疗提供了有希望的前景。iPSC可以以患者特异性方式生成并用于自体移植,从而克服宿主免疫系统的排斥的并

发症(Moradi等人(2019),Stem Cell Research&Therapy)。

[0855] 在此研究中,使用Accutase处理5分钟,将高质量的WTC-11iPSC作为单细胞收获。使用CasΦ.12多肽和靶向B2M基因座或靶向CIITA基因座的gRNA形成RNP复合物(示于表19的序列)。使用2:1的gRNA:CasΦ.12RNP(1000pmol gRNA+500pmol Cas12Φ.12)形成RNP复合物,并且在室温下温育大约15分钟。每次反应将WTC-11iPSC(200,000个细胞)重悬于20uL的P3核转染溶液中,并将40uL细胞悬液添加到每个RNP管中。将每个RNP/细胞悬液混合物体积的一半添加到Lonza 96孔shuttle中,并使用程序CD118进行核转染。为回收转染细胞,将80μL补充有2μM Thiazovivin的温热StemFlex培养基添加到shuttle的孔中。将shuttle孔的全部体积转移到预先涂有含有100μL的2μM Thiazovivin的0.337mg/mL基质胶的96孔板中。允许细胞在具有湿度控制的37℃培养箱中恢复24小时。转染后48小时汇合细胞,并使用Accutase进行单细胞传代。使用KingFisher组织和DNA试剂盒提取基因组DNA。使用内部方案进行NGS库制备,并使用Crispresso量化插入缺失突变的频率。如图38所示,在iPSC中用CasΦ.12RNP复合物实现了B2M和CIITA基因座处的有效基因组编辑。

[0856] 此实施例证明了CasΦ在iPSC中作为基因组编辑工具的实用性。

[0857] 表19

[0858]

名称	靶标	序列	SEQ ID NO
R3132	B2M	AUUGCUCCUUACGAGGAGACAGCAAGGACUGGUCUUU	2488
R4504_CasPhi12_S	CIITA	AUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGCUCUGACAGGUAGG	1722
R5406_CasPhi12	CIITA	CUUUCAAGACUAAUAGAUUGCUCCUUACGAGGAGACGGGUCAAUGCUAGGUACUGC	2222

[0859] 实施例44

[0860] 用CasΦ多肽进行基因组编辑介导CIITA基因座的有效编辑

[0861] 此实施例证明了CasΦ介导的CIITA基因座的基因组编辑。在此研究中,使用CasΦ多肽和靶向CIITA的gRNA(示于表D和O的序列)形成RNP复合物。使用Lonza核转染方案用RNP复合物(250pmol)对K562细胞进行核转染。48小时后收获细胞,分离基因组DNA并使用NGS分析(MiSeq,Illumina)评估插入缺失突变的频率。如图39所示,使用CasΦRNP复合物实现了CIITA基因座的有效基因组编辑。

[0862] 尽管本文已显示和描述本发明的优选实施方案,但将为本领域技术人员显而易知的是此类实施方案仅通过举例方式来提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替代。应理解的是,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。这意味着以下权利要求书限定本发明的范围并且因此涵盖这些权利要求及其等效物范围内的方法和结构。

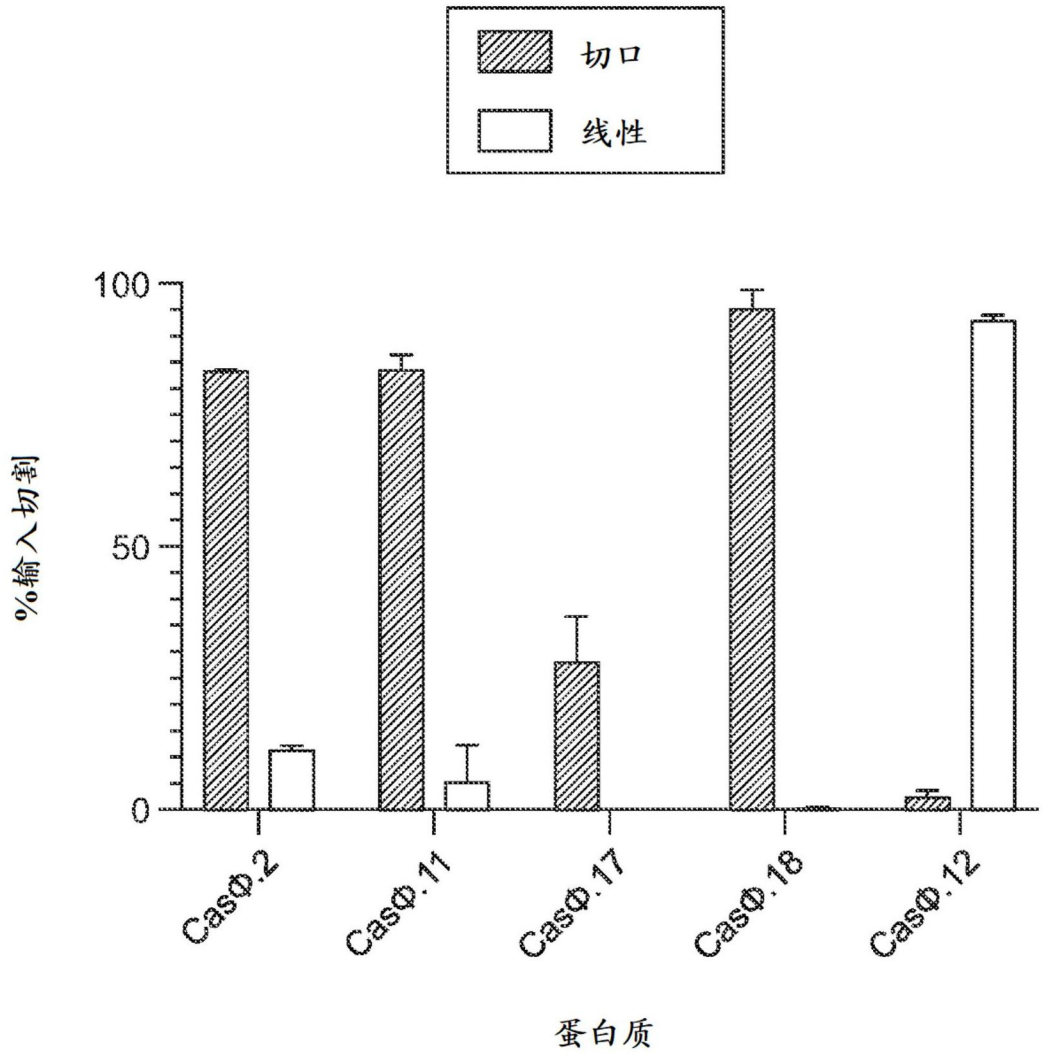


图1

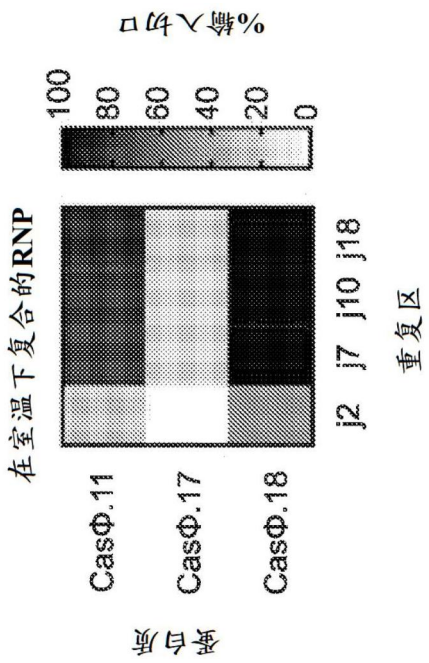

%输入切口
100
80
60
40
20
0
在室温下复合的RNP
CasΦ.11
CasΦ.17
CasΦ.18
蛋白质
j2
j7
j10
j18
重复区

图2A

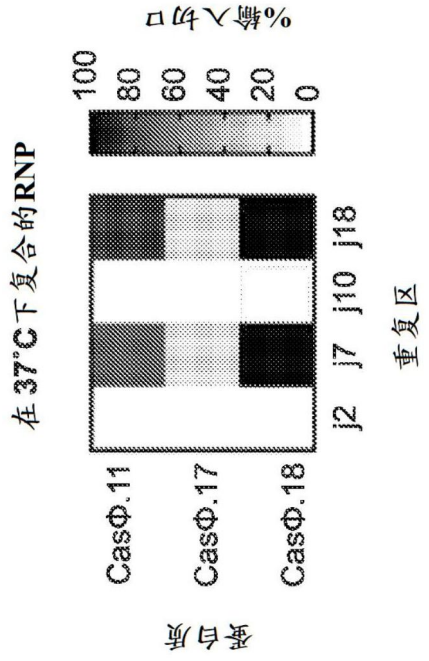

%输入切口
100
80
60
40
20
0
在37°C下复合的RNP
CasΦ.11
CasΦ.17
CasΦ.18
蛋白质
j2
j7
j10
j18
重复区

图2B

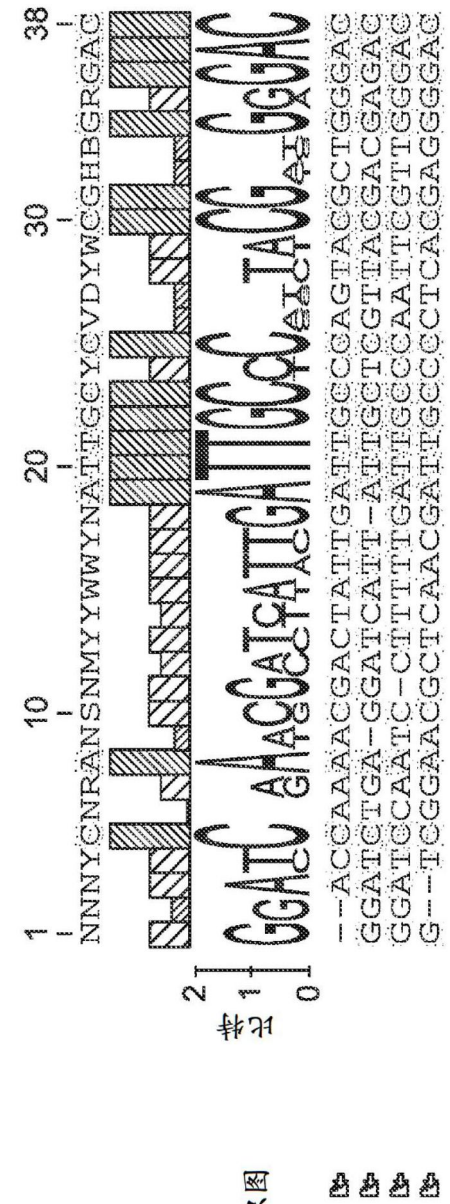

比特
2
1
0
1
10
20
30
38
NNNYCNRANSNMYYWWYNATTGCYCVDYWCGHBGRGAC
--ACCAAAACGACTATTGATTGCCCAGTACGCTGGGAC
GGATCTGA-GGATCATTT-ATTGCTCGTTACGACGAC
GGATGCAATC-CTTTTTGATTGCCCAATTCGTTGGGAC
G--TCGGAACGCTCAACGATTGCCCCTCACGAGGGAC
共有
同一性
序列标识图

图2C

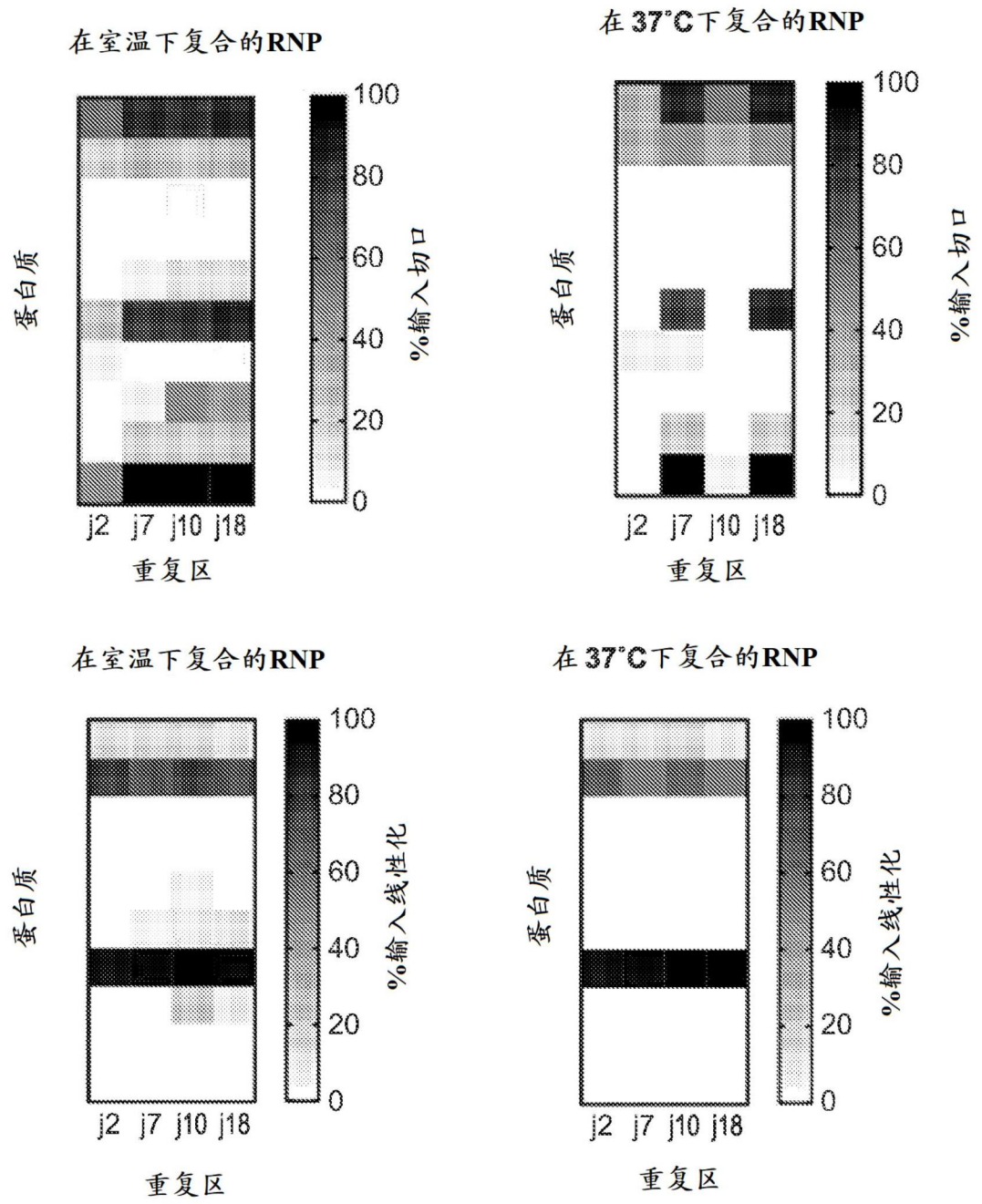

在室温下复合的RNP
在37°C下复合的RNP
蛋白质
%输入切口
100
80
60
40
20
0
j2 j7 j10 j18
重复区
在室温下复合的RNP
在37°C下复合的RNP
蛋白质
%输入线性化
100
80
60
40
20
0
j2 j7 j10 j18
重复区

图2D

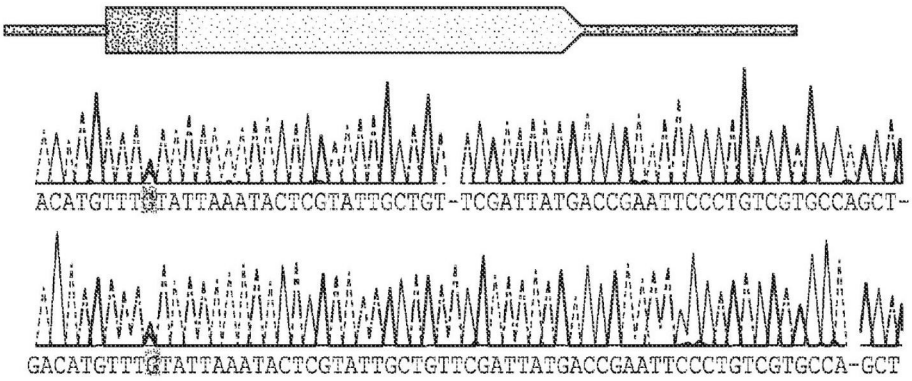

ACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGT-TCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCAGCT-
GACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCA-GCT

图3A

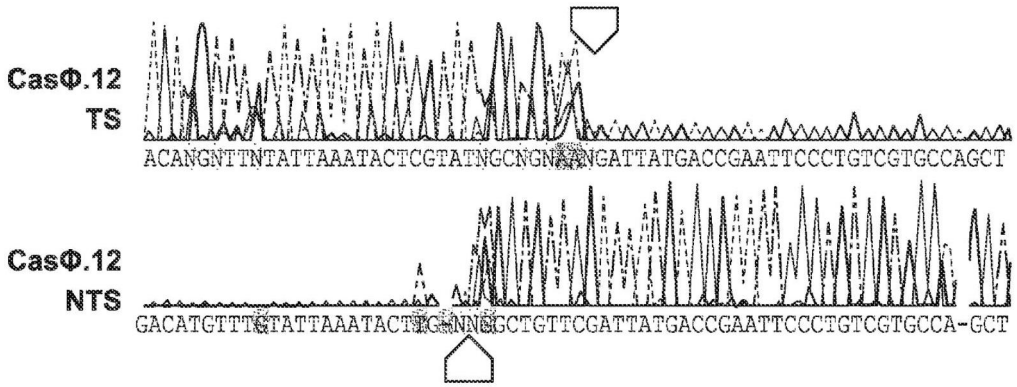

CasΦ.12
TS
ACANGNTTNTATTAAATACTCGTATNGCNGNAANGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCAGCT
CasΦ.12
NTS
GACATGTTTGTATTAAATACTNG-NNNGCTGTTCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCA-GCT

图3B

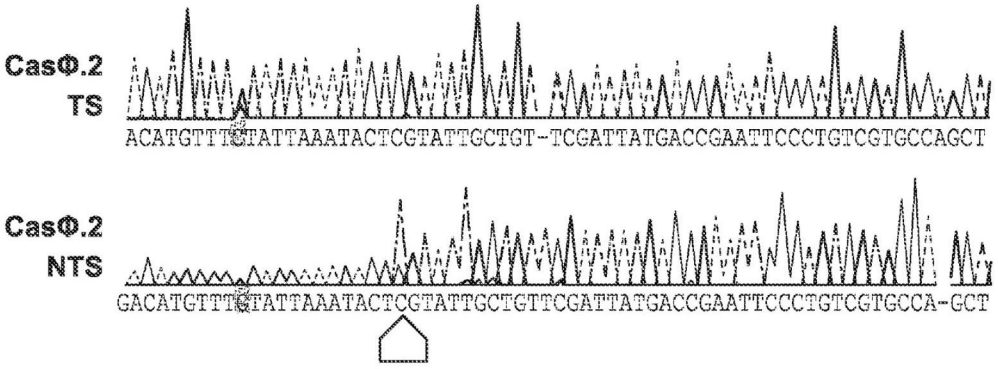

CasΦ.2
TS
ACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGT-TCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCAGCT
CasΦ.2
NTS
GACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCA-GCT

图3C

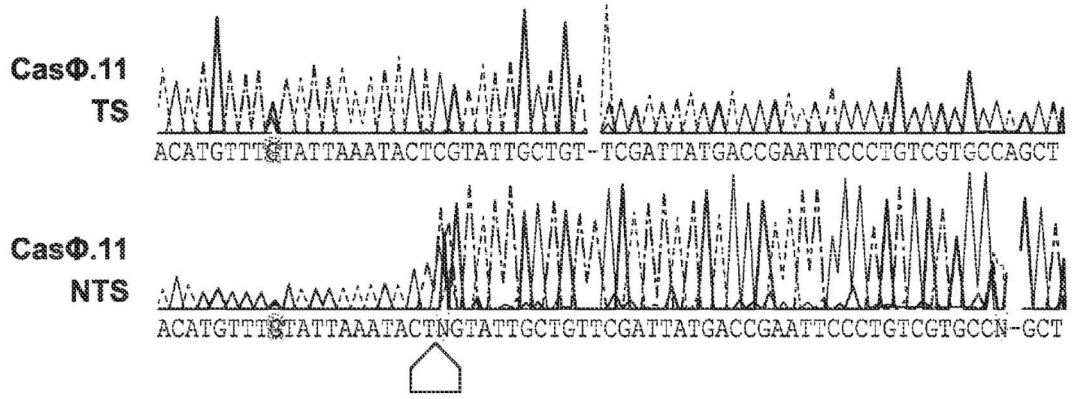

CasΦ.11
TS
ACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGT-TCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCAGCT
CasΦ.11
NTS
ACATGTTTGTATTAAATACTNGTATTGCTGTTCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCN-GCT

图3D

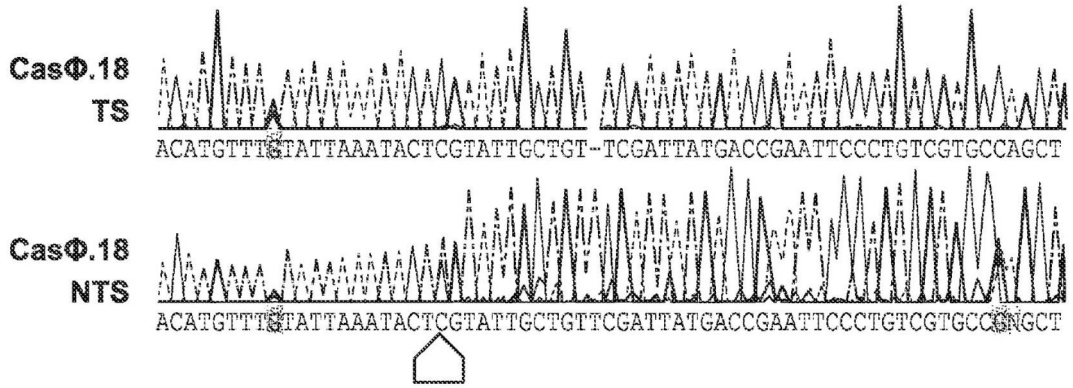

CasΦ.18
TS
ACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGT-TCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCAGCT
CasΦ.18
NTS
ACATGTTTGTATTAAATACTCGTATTGCTGTTCGATTATGACCGAATTCCCTGTCGTGCCNGCT

图3E

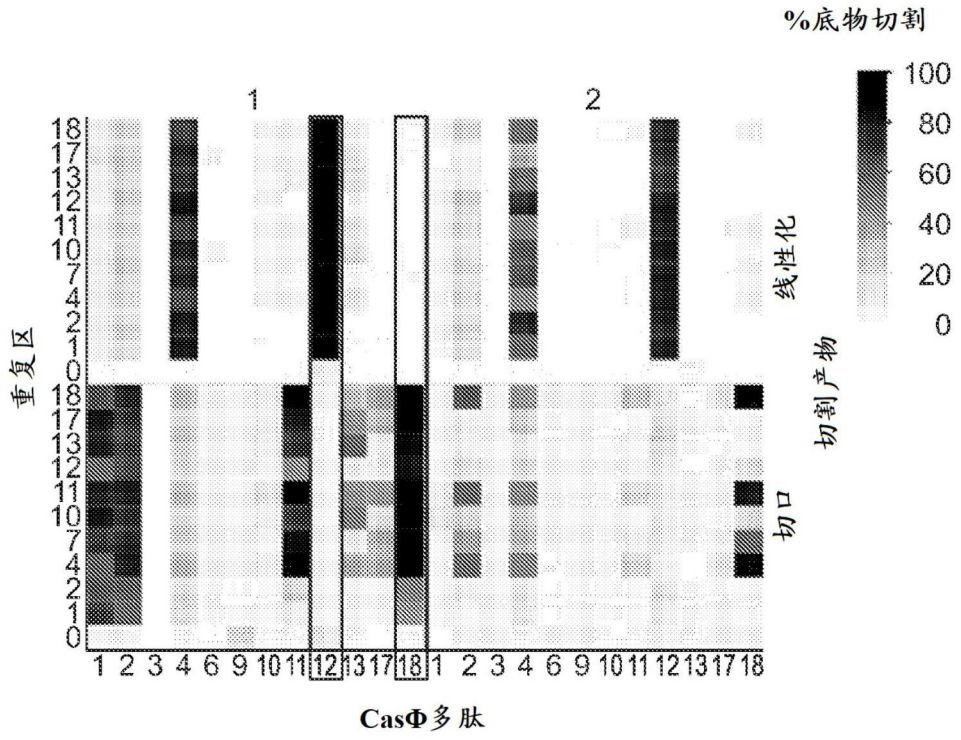

%底物切割
100
80
60
40
20
0
1
2
重复区
线性化
切割产物
切口
1 2 3 4 6 9 10 11 12 13 17 18 1 2 3 4 6 9 10 11 12 13 17 18
CasΦ多肽

图4A

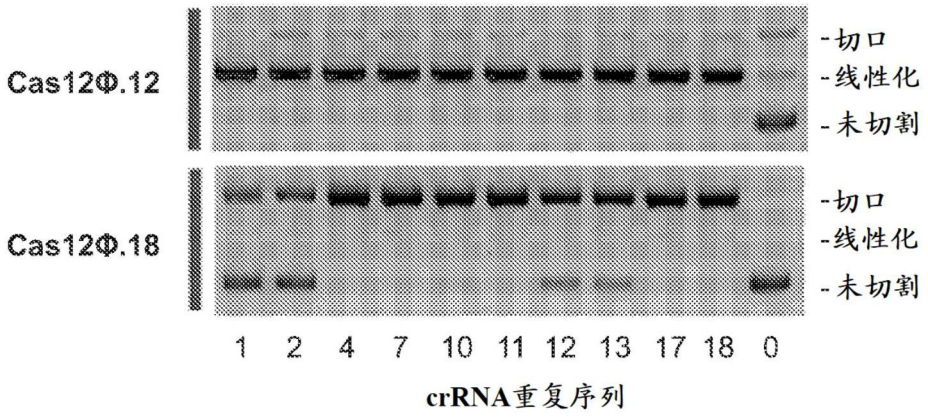

Cas12Φ.12
Cas12Φ.18
-切口
-线性化
-未切割
-切口
-线性化
-未切割
1 2 4 7 10 11 12 13 17 18 0
crRNA重复序列

图4B

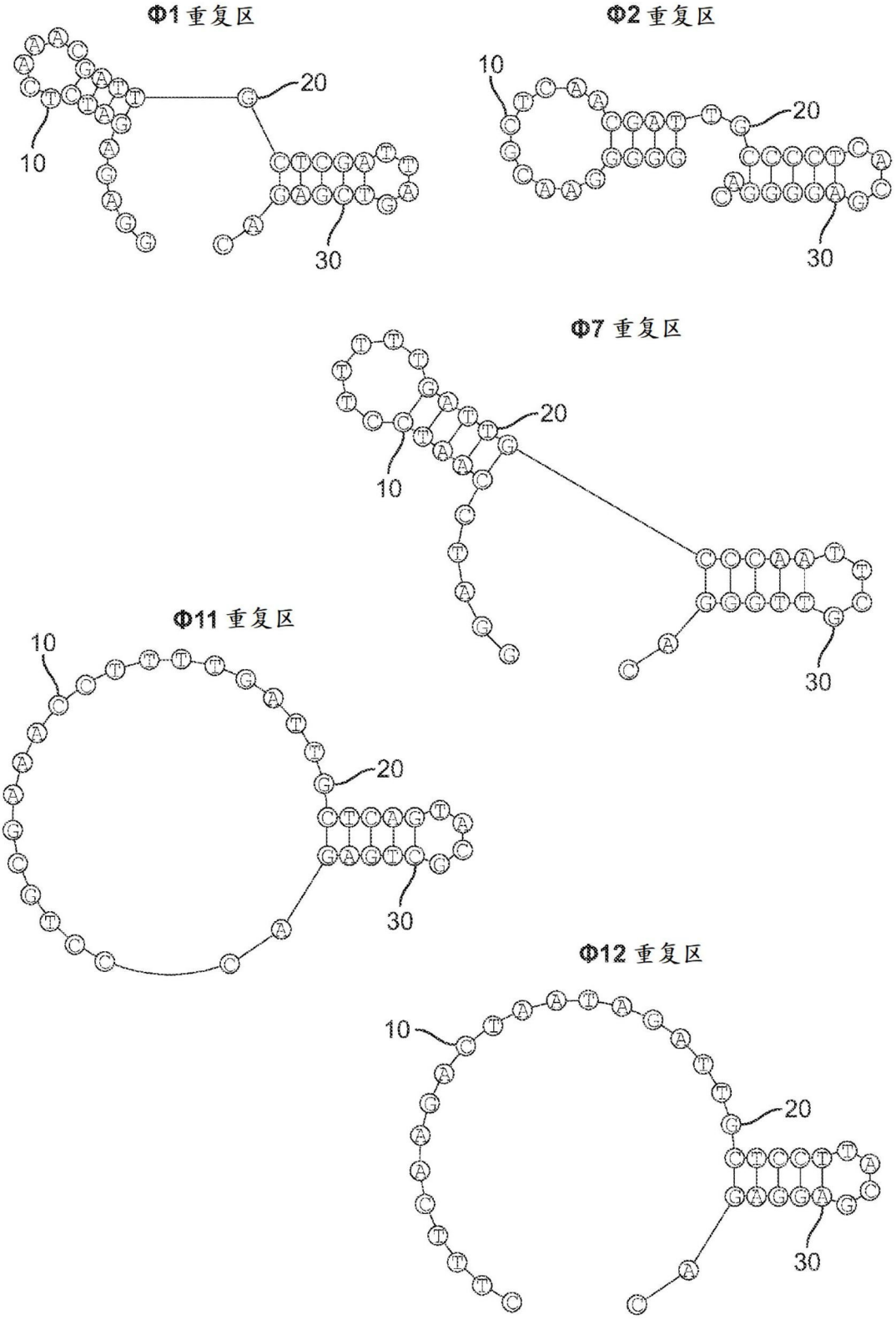
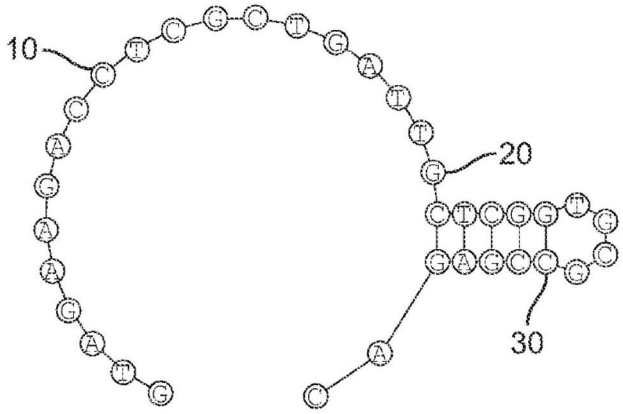
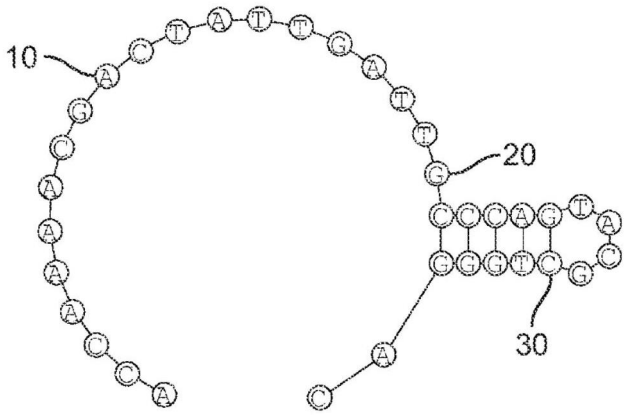

Φ1 重复区
10
20
30
Φ2 重复区
10
20
30
Φ7 重复区
10
20
30
Φ11 重复区
10
20
30
Φ12 重复区
10
20
30

图5A

Φ13 重复区



Φ18 重复区



Φ32 重复区

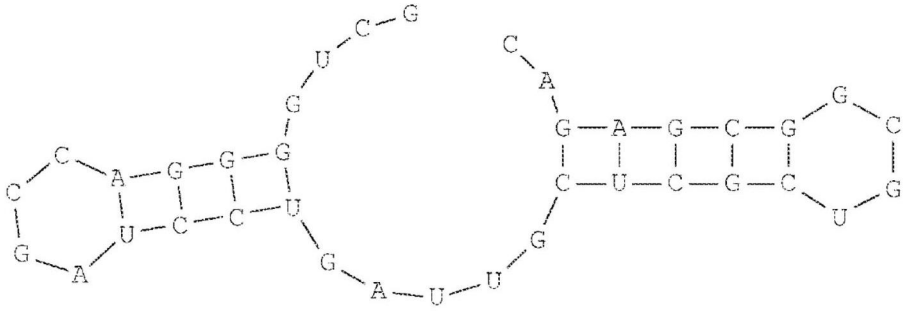


图5A(续)

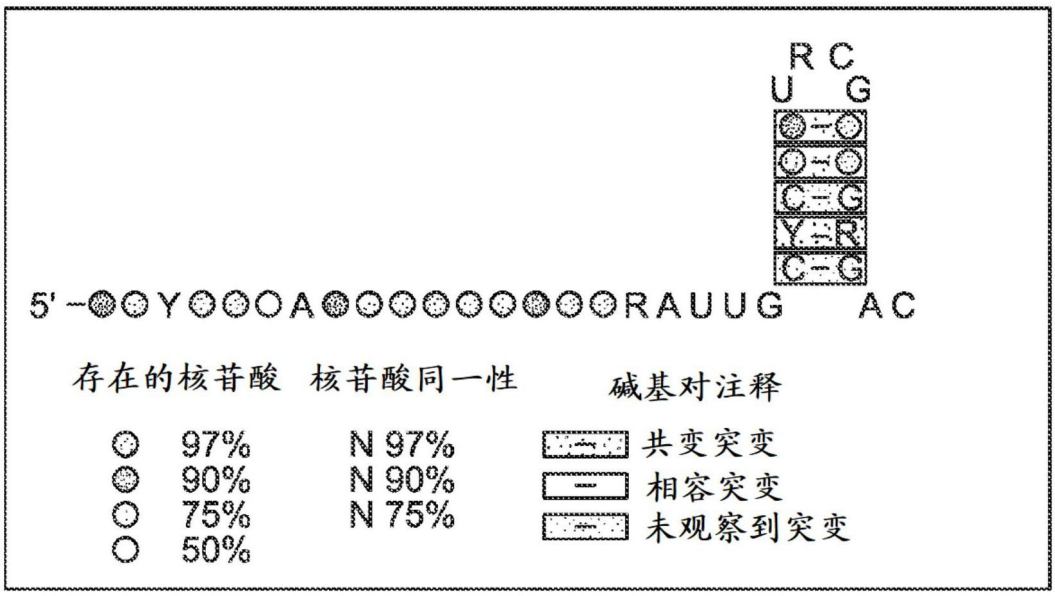

R C
U G
C—G
Y—R
C—G
5'-Y A RAUUG AC
存在的核苷酸
核苷酸同一性
碱基对注释
97%
90%
75%
50%
N 97%
N 90%
N 75%
共变突变
相容突变
未观察到突变

图5B

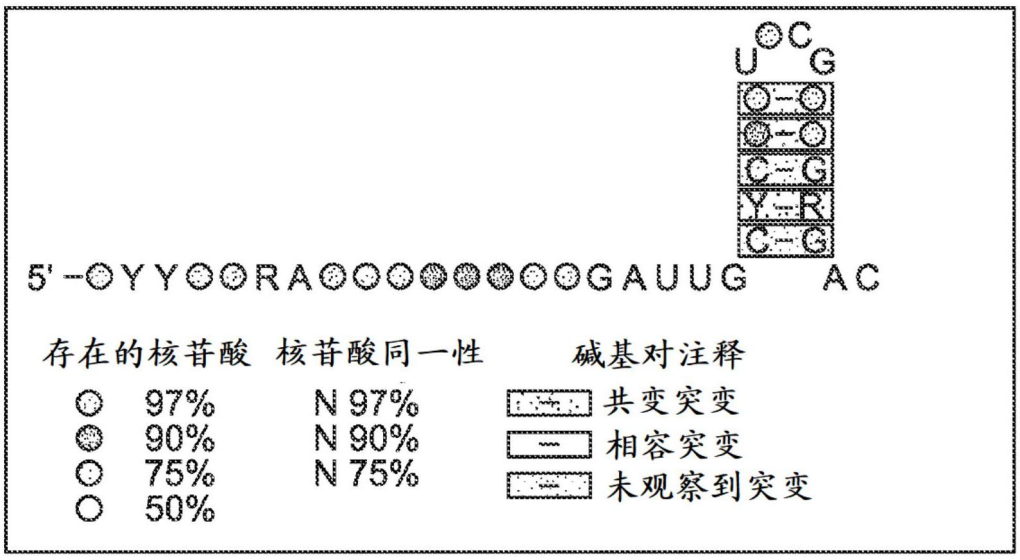

C
U G
C—G
Y—R
C—G
5'-Y Y RA GAUUG AC
存在的核苷酸
核苷酸同一性
碱基对注释
97%
90%
75%
50%
N 97%
N 90%
N 75%
共变突变
相容突变
未观察到突变

图5C

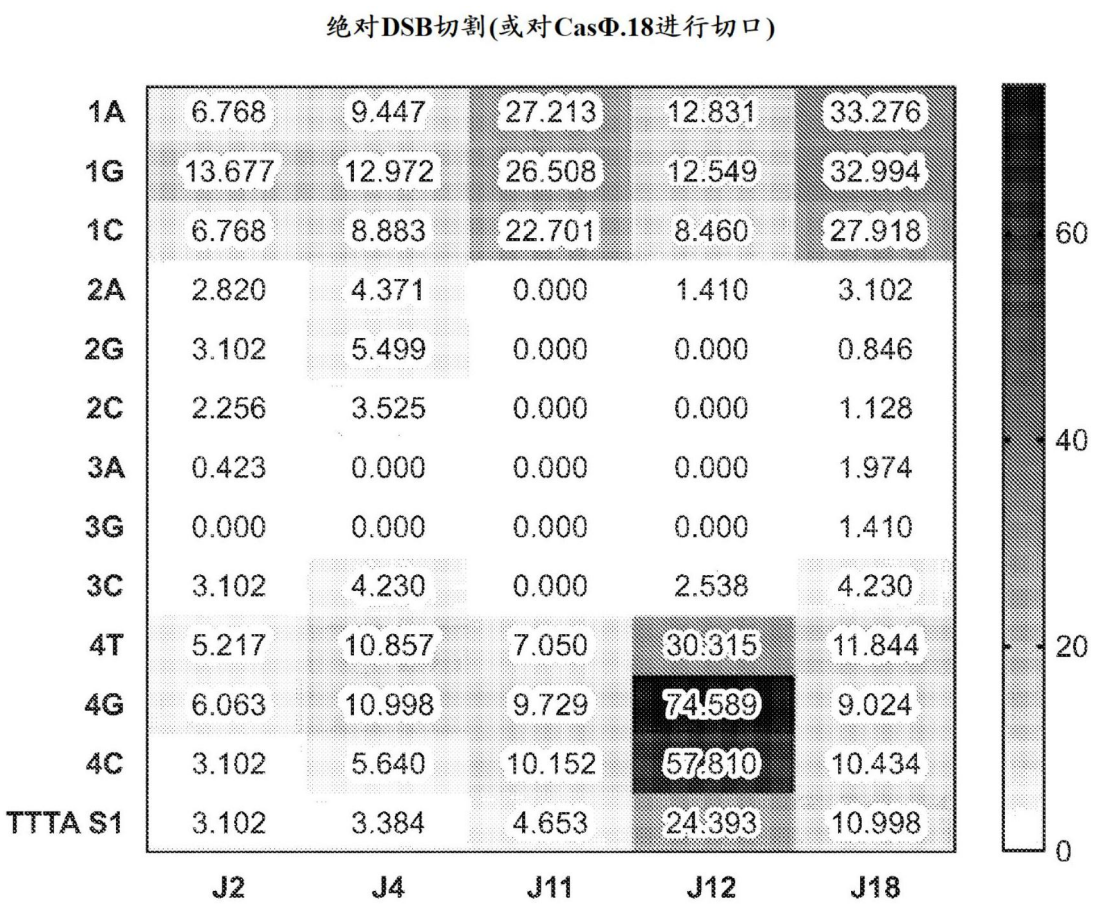
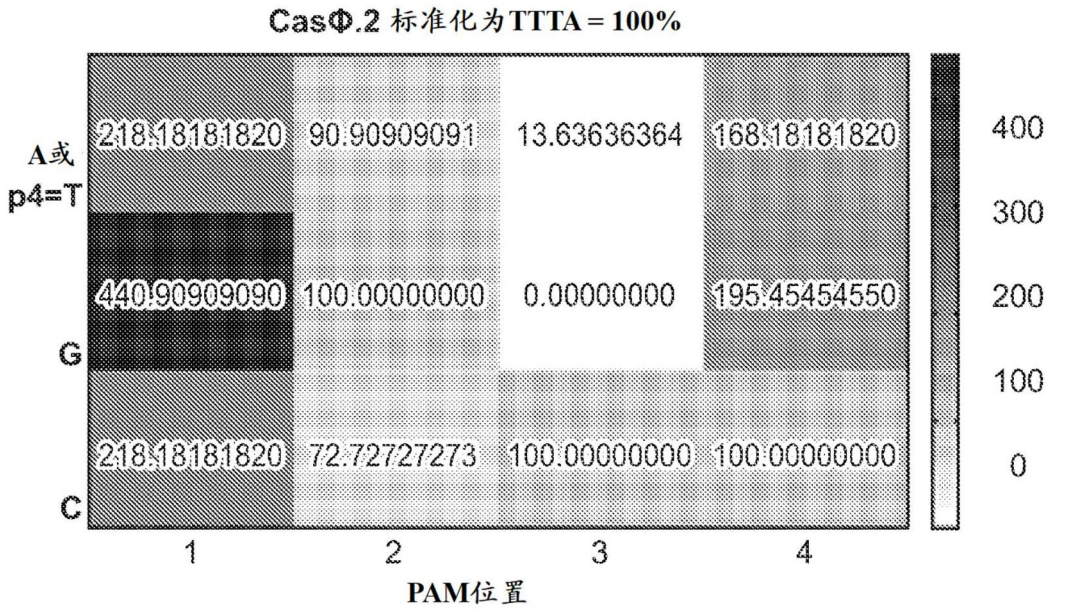

绝对DSB切割(或对CasΦ.18进行切口)
1A 6.768 9.447 27.213 12.831 33.276
1G 13.677 12.972 26.508 12.549 32.994
1C 6.768 8.883 22.701 8.460 27.918
2A 2.820 4.371 0.000 1.410 3.102
2G 3.102 5.499 0.000 0.000 0.846
2C 2.256 3.525 0.000 0.000 1.128
3A 0.423 0.000 0.000 0.000 1.974
3G 0.000 0.000 0.000 0.000 1.410
3C 3.102 4.230 0.000 2.538 4.230
4T 5.217 10.857 7.050 30.315 11.844
4G 6.063 10.998 9.729 74.589 9.024
4C 3.102 5.640 10.152 57.810 10.434
TTTA S1 3.102 3.384 4.653 24.393 10.998
J2 J4 J11 J12 J18
60
40
20
0

图6A


CasΦ.2 标准化为TTTA = 100%
A或
p4=T
G
C
218.18181820
90.90909091
13.63636364
168.18181820
440.90909090
100.00000000
0.00000000
195.45454550
218.18181820
72.72727273
100.00000000
100.00000000
400
300
200
100
0
1
2
3
4
PAM位置

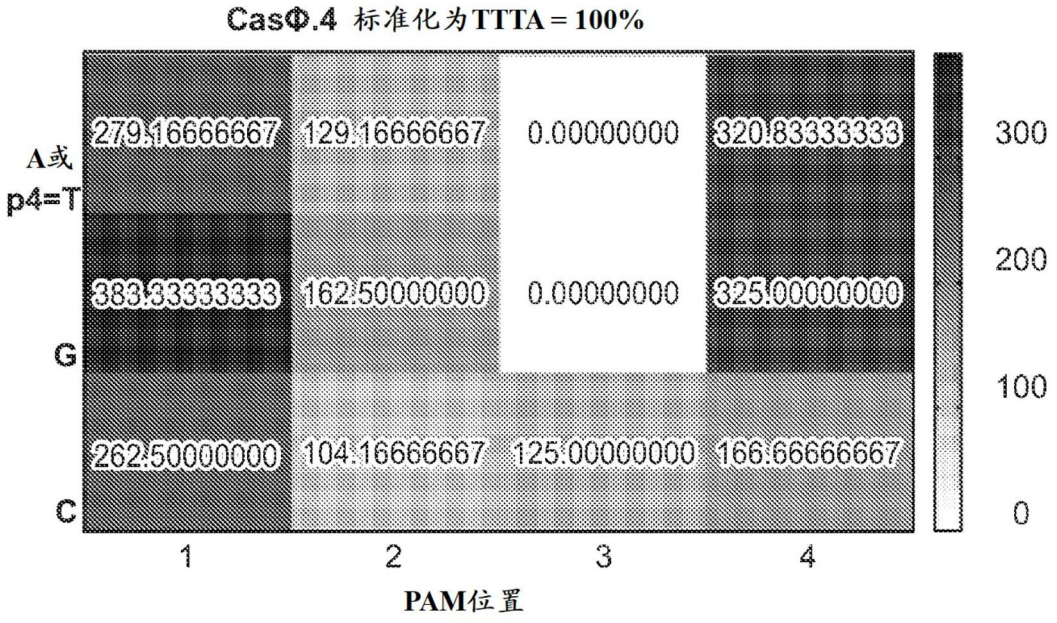
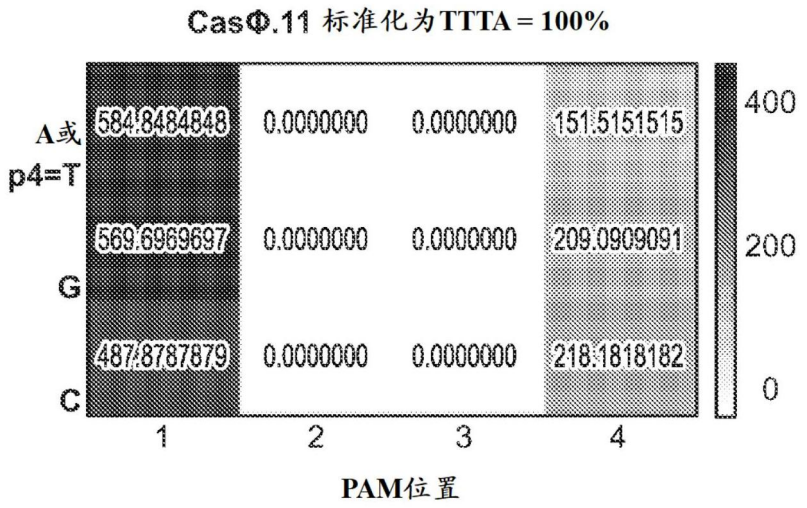
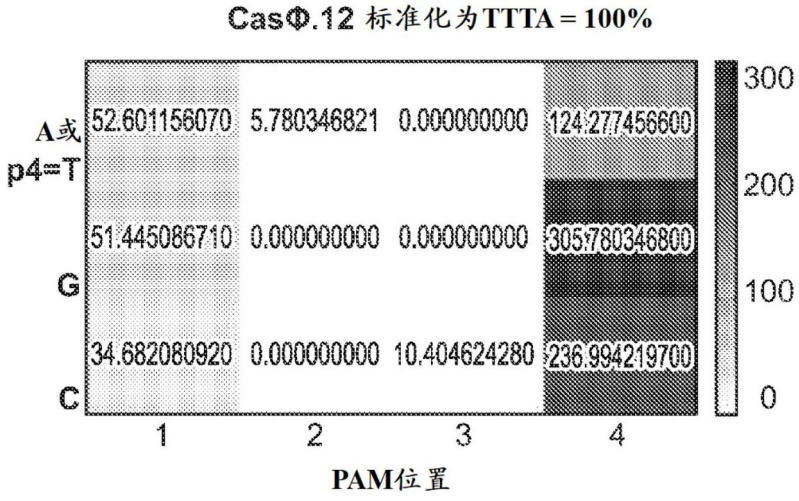

CasΦ.4 标准化为TTTA = 100%
A或
p4=T
G
C
279.16666667
129.16666667
0.00000000
320.83333333
383.33333333
162.50000000
0.00000000
325.00000000
262.50000000
104.16666667
125.00000000
166.66666667
300
200
100
0
1
2
3
4
PAM位置

图6B


CasΦ.11 标准化为TTTA = 100%
A或
p4=T
G
C
584.8484848
0.0000000
0.0000000
151.5151515
569.6969697
0.0000000
0.0000000
209.0909091
487.8787879
0.0000000
0.0000000
218.1818182
400
200
0
1
2
3
4
PAM位置


CasΦ.12 标准化为TTTA = 100%
A或
p4=T
G
C
52.601156070
5.780346821
0.000000000
124.277456600
51.445086710
0.000000000
0.000000000
305.780346800
34.682080920
0.000000000
10.404624280
236.994219700
300
200
100
0
1
2
3
4
PAM位置

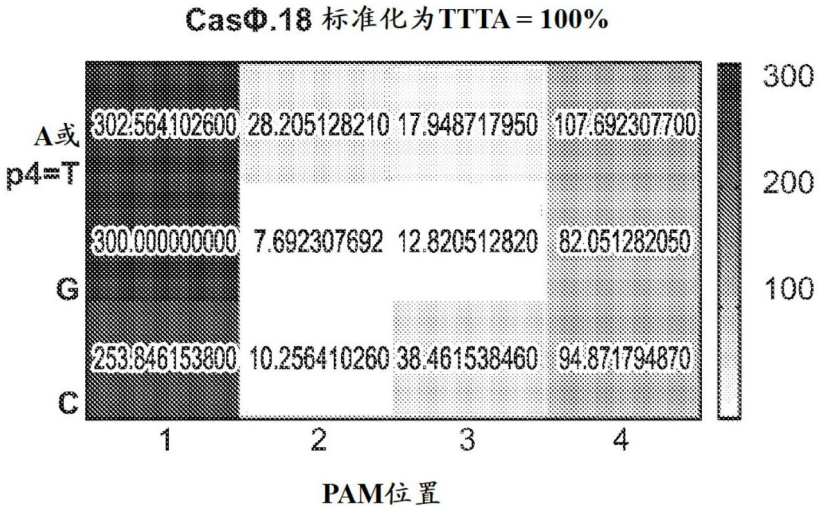

CasΦ.18 标准化为TTTA = 100%
A或
p4=T
G
C
302.564102600
28.205128210
17.948717950
107.692307700
300.000000000
7.692307692
12.820512820
82.051282050
253.846153800
10.256410260
38.461538460
94.871794870
300
200
100
1
2
3
4
PAM位置

图6B(续)

蛋白质	最佳PAM
CasΦ_2	GTTK
CasΦ_4	VTTK
CasΦ_11	VTTS
CasΦ_12	TTTS
CasΦ_18	VTTN

K = G、T
S = C、G
V = A、C、G
N = A、C、G、T

图6C

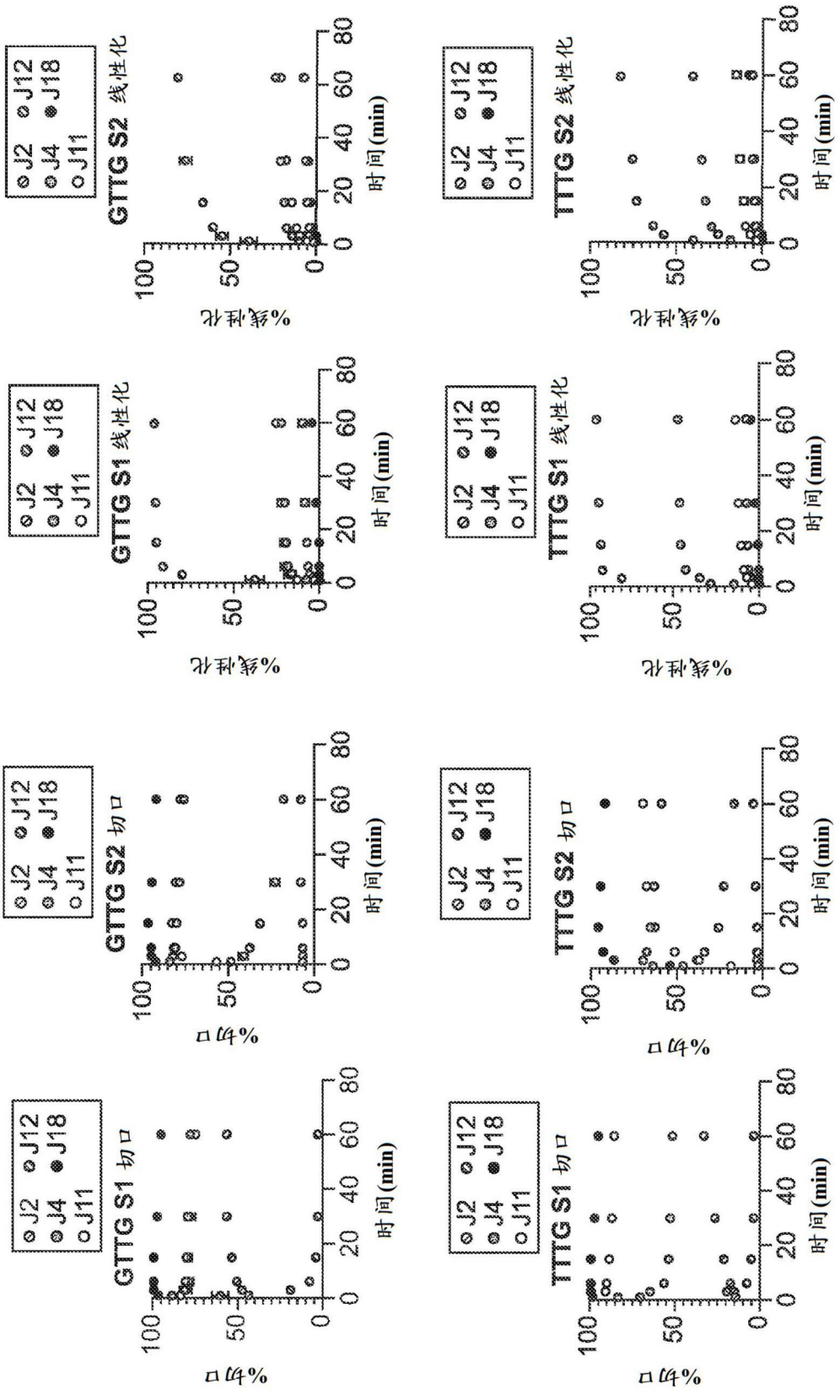

GTTG S1 切口
GTTG S2 切口
TTTG S1 切口
TTTG S2 切口
GTTG S1 线性化
GTTG S2 线性化
TTTG S1 线性化
TTTG S2 线性化
J2 J12
J4 J18
J11
%切口
%线性化
时间(min)
0 20 40 60 80
0 50 100

图7

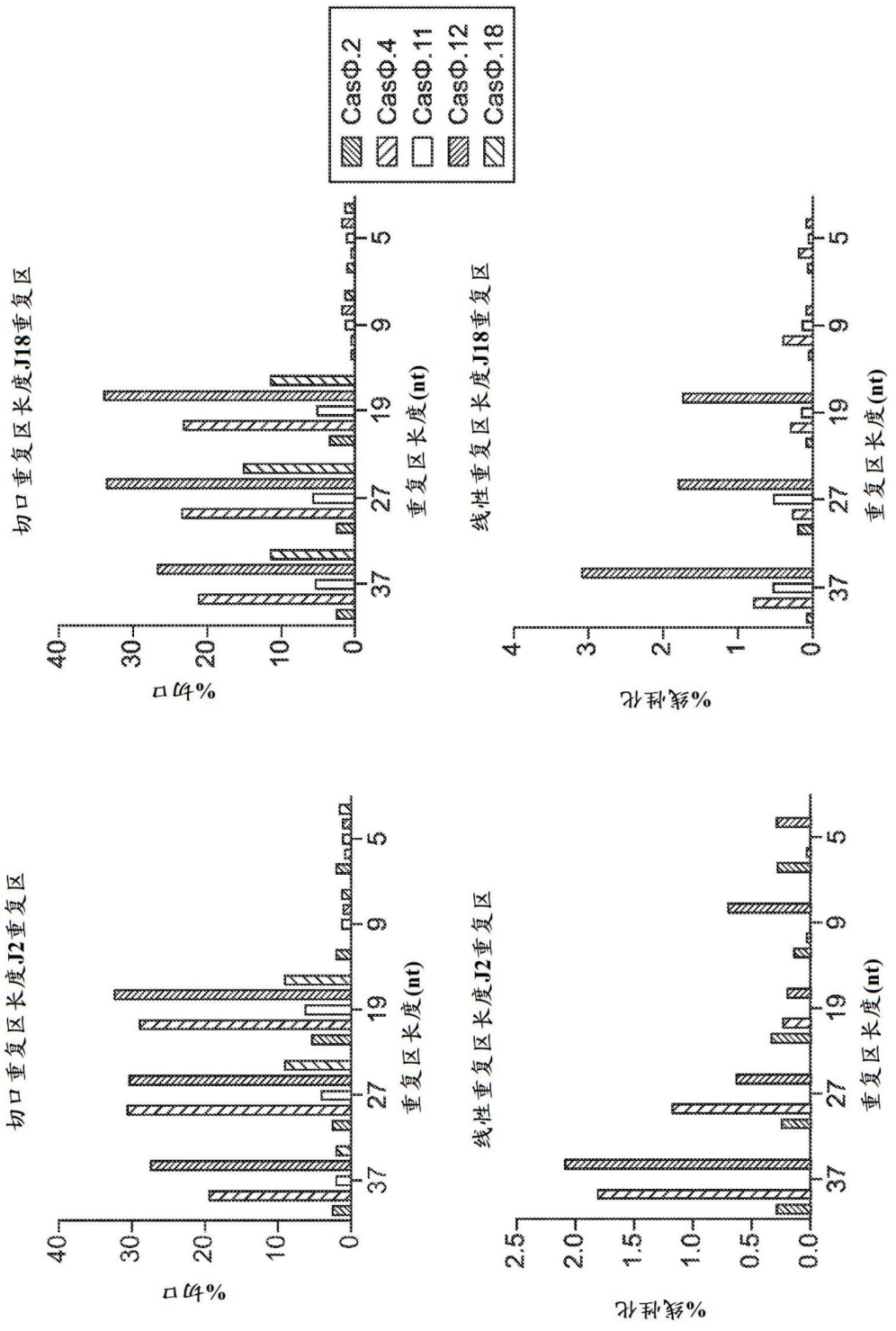

CasΦ.2
CasΦ.4
CasΦ.11
CasΦ.12
CasΦ.18
切口重复区长度J18重复区
%切口
重复区长度(nt)
线性重复区长度J18重复区
%线性化
重复区长度(nt)
切口重复区长度J2重复区
%切口
重复区长度(nt)
线性重复区长度J2重复区
%线性化
重复区长度(nt)

图8A

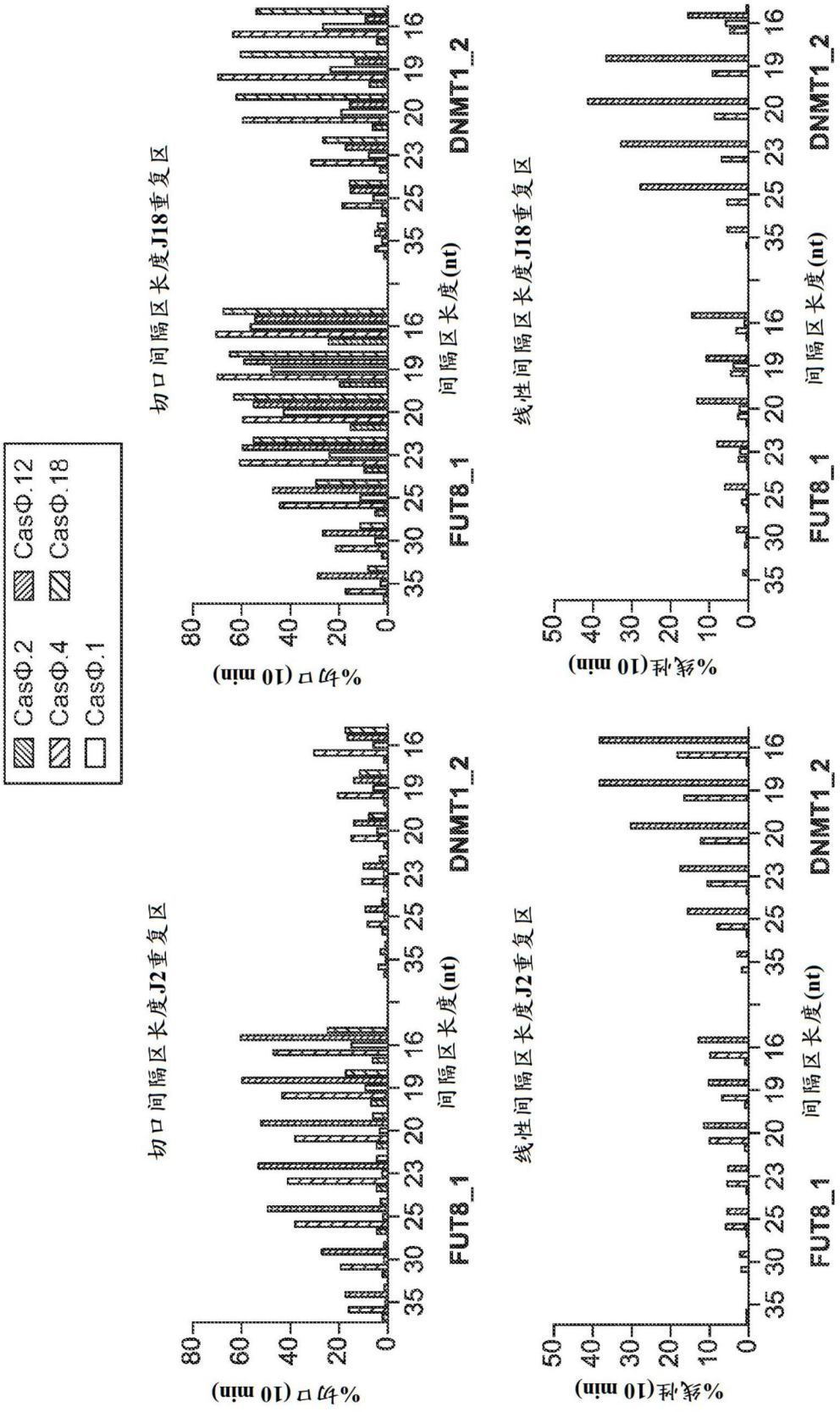

CasΦ.2
CasΦ.12
CasΦ.4
CasΦ.18
CasΦ.1
切口间隔区长度J18重复区
线性间隔区长度J18重复区
切口间隔区长度J2重复区
线性间隔区长度J2重复区
%切口 (10 min)
%线性(10 min)
间隔区长度(nt)
FUT8_1
DNMT1_2

图8B

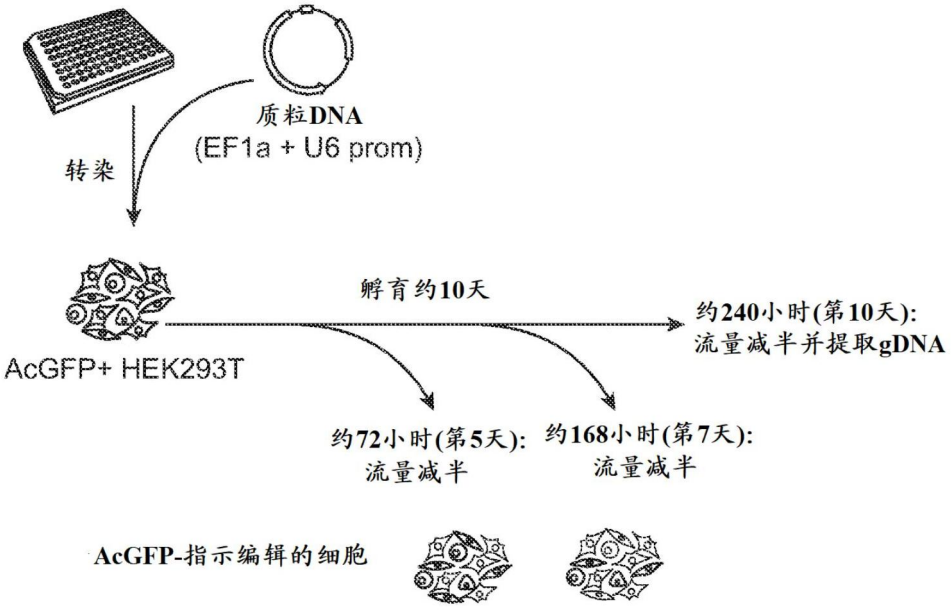

质粒DNA
(EF1a + U6 prom)
转染
AcGFP+ HEK293T
孵育约10天
约240小时(第10天):
流量减半并提取gDNA
约72小时(第5天):
流量减半
约168小时(第7天):
流量减半
AcGFP-指示编辑的细胞

图9A

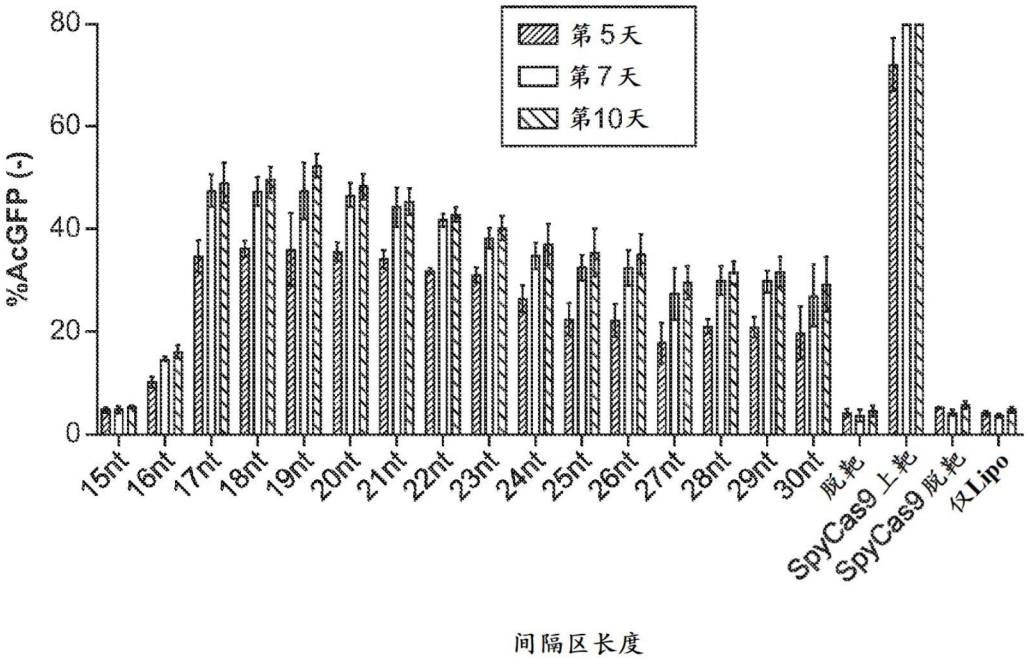

第5天
第7天
第10天
%AcGFP (-)
0
20
40
60
80
15nt
16nt
17nt
18nt
19nt
20nt
21nt
22nt
23nt
24nt
25nt
26nt
27nt
28nt
29nt
30nt
脱靶
SpyCas9 上靶
SpyCas9 脱靶
仅Lipo
间隔区长度

图9B

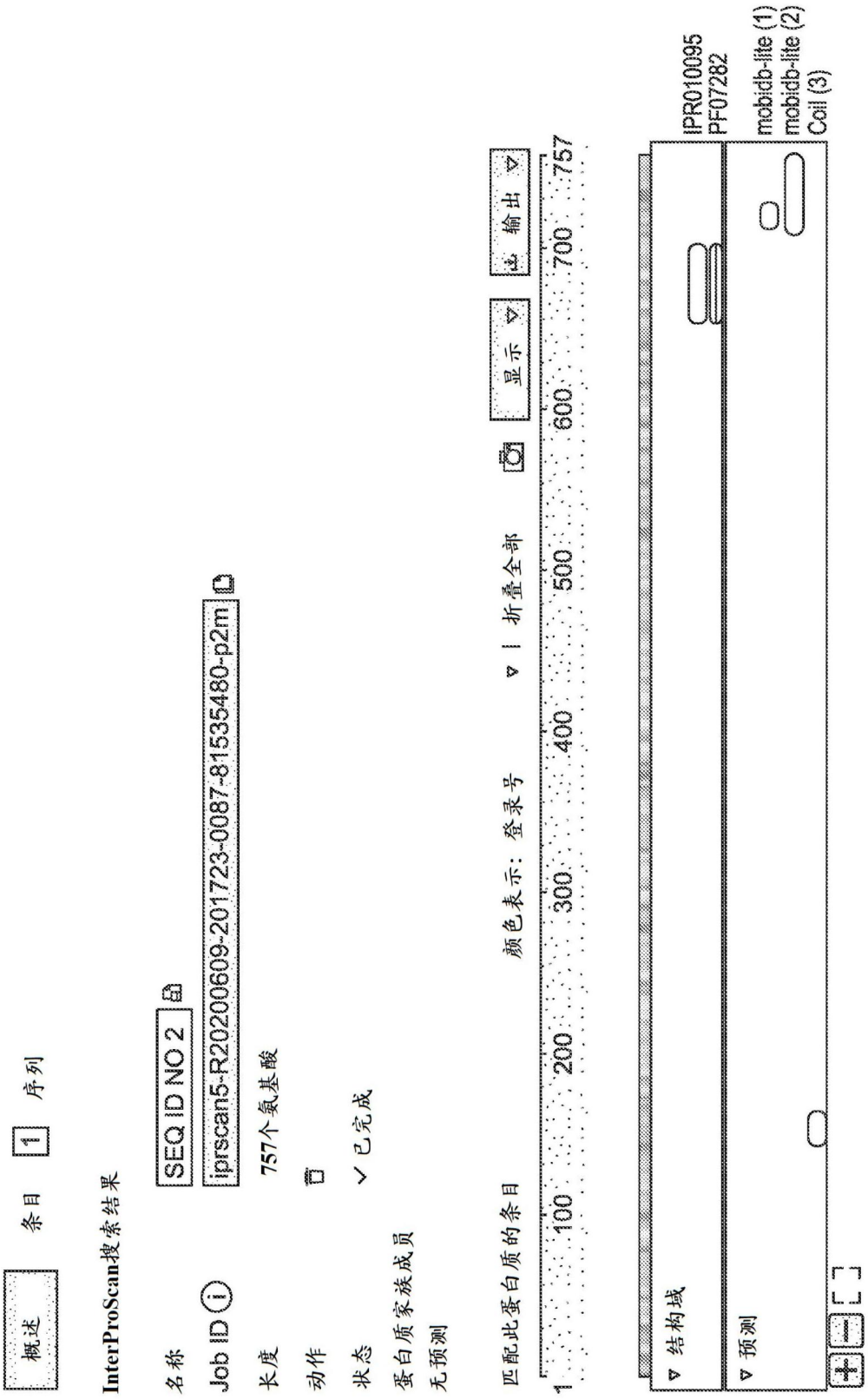

概述
条目 1 序列
InterProScan搜索结果
名称 SEQ ID NO 2
Job ID iprscan5-R20200609-201723-0087-81535480-p2m
长度 757个氨基酸
动作
状态 已完成
蛋白质家族成员
无预测
匹配此蛋白质的条目
颜色表示：登录号
折叠全部
显示
输出
1 100 200 300 400 500 600 700 757
结构域
预测
IPR010095
PF07282
mobidb-lite (1)
mobidb-lite (2)
Coil (3)

图10A

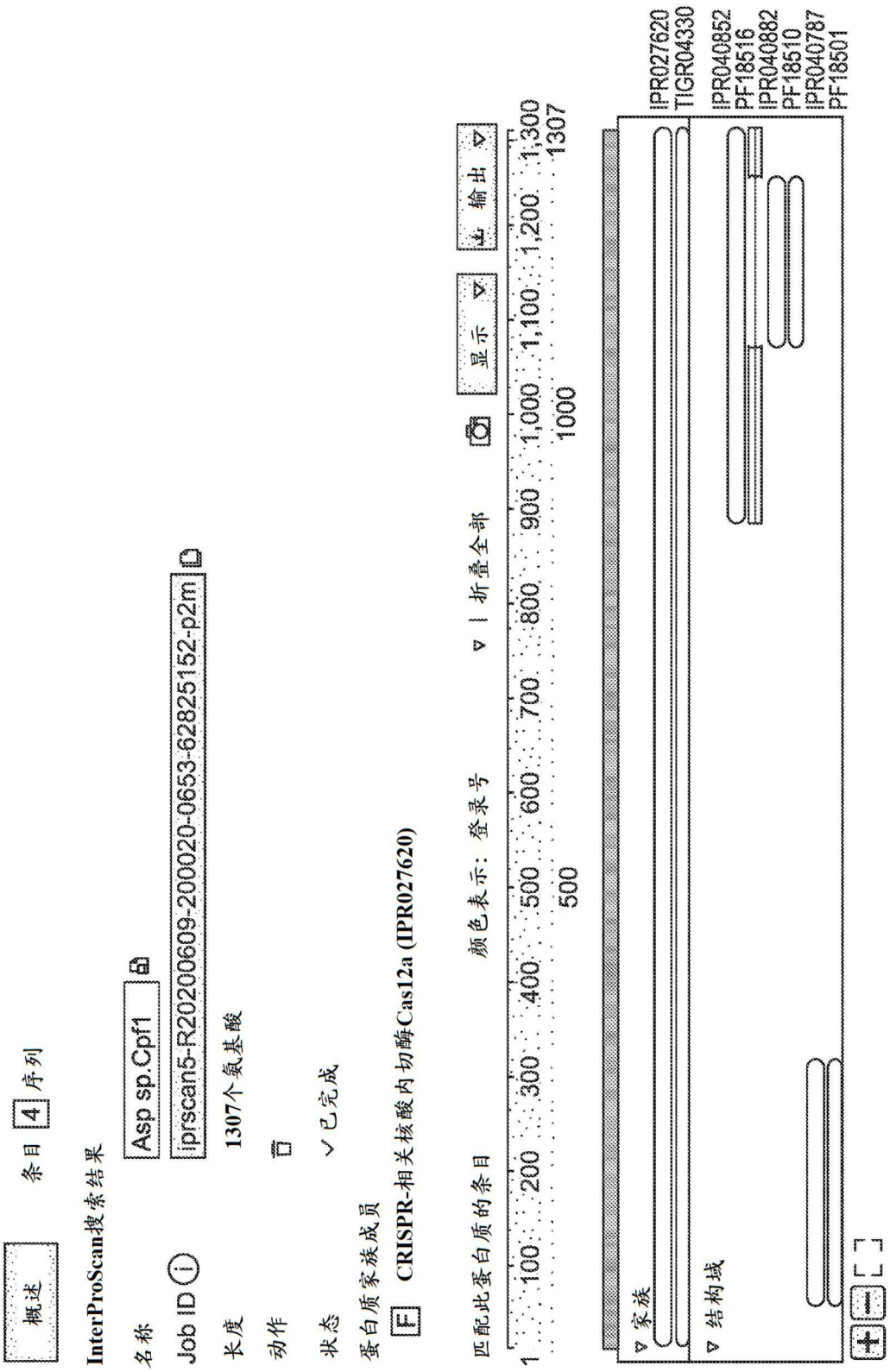

概述
条目 4 序列
InterProScan搜索结果
名称
Asp sp.Cpf1
Job ID
iprscan5-R20200609-200020-0653-62825152-p2m
长度
1307个氨基酸
动作
状态
已完成
蛋白质家族成员
F CRISPR-相关核酸内切酶Cas12a (IPR027620)
匹配此蛋白质的条目
颜色表示：登录号
折叠全部
显示
输出
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1,000
1,100
1,200
1,300
1307
500
1000
家族
结构域
IPR027620
TIGR04330
IPR040852
PF18516
IPR040882
PF18510
IPR040787
PF18501

图10B

```
HMMER3/f  [3.1b2 I 2015年2月]
名称      OrfB_Zn_ribbon
ACC       PF07282.12
DESC      假定转座酶DNA结合结构域
LENG      69
ALPH      氨基
RF        否
MM        否
CONS      是
CS        否
MAP       是
日期      2020年4月22日星期三
NSEQ      54
EFFN      4.670288
CKSUM     986868954
GA        26.30 26.30 ;
TC        26.30 26.30 ;
NC        26.20 26.20 ;
BM        hmmbuild HMM.ann SEED.ann
SM        hmmsearch -z 47079205 -E 1000 --cpu 4 HMM pfamseq
STATS     LOCAL MSV       -9.1774   0.71875
STATS     LOCAL VITERBI   -9.2725   0.71875
STATS     LOCAL FORWARD   -4.2633   0.71875
HMM          A        C        D        E        F        G        H        I        K        L        M        N        P        Q        R        S        T        V        W        Y
           m->m     m->i     m->d     i->m     i->i     d->m     d->d
COMPO   2.51685  3.05041  3.00924  2.67502  3.40385  2.89097  3.66927  2.98268  2.57262  2.69875  3.96709  2.90797  3.64145  3.14274  2.76568  2.59594  2.86953  2.76494  4.51641  3.37755
        2.68618  4.42225  2.77519  2.73123  3.46354  2.40513  3.72494  3.29354  2.67741  2.69355  4.24690  2.90347  2.73139  3.18146  2.89801  2.37887  2.77519  2.98518  4.58477  3.61503
        0.01739  5.26646  4.40710  0.61958  0.77255  0.00000        *
1       2.59421  5.43676  5.62081  5.23623  1.06218  5.11093  2.59667  3.95914  5.04271  2.77635  4.58762  4.93760  5.42808  4.98845  5.60714  4.45252  1.49339  3.60774  1.74892  1.94727  1  f  -  -  .
        2.68618  4.42225  2.77519  2.73123  3.46354  2.40513  3.72494  3.29354  2.67741  2.69355  4.24690  2.90347  2.73739  3.18146  2.89801  2.37887  2.77519  2.98518  4.58477  3.61503
        0.00760  5.27666  6.00102  0.61958  0.77255  0.46390  0.99169
```

图11

```
2  2.34855 5.49449 2.91304 2.70751 3.75662 2.26817 3.45327 4.30986 2.18998 3.79564 4.53759 2.80120 4.17641 3.07053 2.13565 2.22500 2.94085 3.88018 5.93272 3.28328 2  r  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 3.58471 3.61503
   0.00753 5.26646 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
3  2.75943 5.51157 3.13164 2.06697 4.85478 3.47646 3.96709 3.94817 1.68329 3.44021 4.17473 3.03392 4.17331 2.56410 2.25438 2.31506 2.77362 3.90121 5.94535 3.66462 3  k  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26646 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
4  3.59275 4.91710 5.56423 4.95986 1.30444 4.82609 5.15870 2.32706 4.76708 1.19220 2.98351 4.99047 5.10526 4.82667 4.75819 4.15582 3.03756 2.11200 5.51674 4.46627 4  l  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26646 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
5  2.90988 5.17770 3.44270 2.51257 4.40485 3.57719 3.35914 2.52800 2.15119 2.44260 3.42963 3.39690 4.24650 2.24465 2.46620 3.06240 2.67322 3.08132 4.49416 3.93115 5  k  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
6  2.56424 5.50936 3.02009 1.95369 3.95812 2.88052 3.37131 3.93380 2.44202 3.47691 3.52559 2.51325 4.17357 2.41510 2.34207 2.86908 2.64094 3.89850 5.94373 3. 95501 6  e  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
7  2.62483 4.05956 4.07864 3.08563 2.52878 4.06126 4.32936 2.75794 2.61177 2.68453 2.87971 3.85588 4.43761 2.34347 2.52116 3.00013 3.27465 2.72128 3.34240 2.55429 7  q  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
8  4.29426 5.47911 6.34784 5.80324 3.98232 5.80272 6.22401 1.30628 5.69818 0.82107 2.81794 5.98170 5.84917 5.61019 5.66793 5.2 1738 4.51437 1.93965 6.22312 5.24562 8  1  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.96518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
9  2.50444 5.50403 3.07553 1.37663 4.84391 3.78163 3.96914 3.45620 1.99739 3.80703 3.80611 3.25112 4.17498 2.60522 2.77943 2.52974 3.08509 3.66851 5.93977 4.53212 9  e  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
10 2.87793 4.06620 2.90983 2.49665 3.93498 3. 51811 4.10987 3.34443 2.96305 3.60211 4.14293 2.70611 4.28056 3.13278 3.18796 3.10606 3.25311 3.36707 3.94746 1.31311 10 y  -  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.26846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图11(续1)

```
11 3.03566 5.15446 3.49110 2.80668 3.72582 3.88327 4.08615 3.49085 0.93271 3.15428 4.23096 3.43604 4.27076 2.83864 3.33395 3.09329 3.01665 2.92657 5.66822 3.86192 11 k - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 1.58177 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01061 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
12 0.96876 2.54237 4.23999 3.68508 3.94950 2.98042 4.48372 3.10057 3.61660 2.69845 3.93373 3.98226 4.47968 3.53764 3.90996 2.69134 2.96146 3.07050 5.41821 4.26701 12 a - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
13 2.67743 5.49487 3.14846 1.93627 4.83094 3.78296 3.65042 3.83839 1.67719 2.80020 4.06118 3.13067 3.77061 2.41958 2.72879 2.86667 2.86801 3.16101 5.93297 4.05753 13 k - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.04584 5.28846 3.22496 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
14 2.85278 5.38695 2.90563 1.53478 4.20177 3.78266 3.97501 3.84335 2.32864 2.68823 3.50044 3.11021 4.17494 2.99757 2.37949 2.85297 3.22139 3.52761 2.92577 4.46498 14 e - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00782 5.25045 5.97279 0.61958 0.77255 0.61711 0.77544
15 2.33025 4.45495 3.33409 2.65448 2.40540 3.88291 3.66494 3.59562 2.55167 2.79029 4.10009 3.31088 4.26946 3.17022 2.43803 3.09831 3.23512 3.31970 4.40518 1.87947 15 y - - -
   2.68619 4.42226 2.77521 2.73124 3.46355 2.40514 3.72496 3.29355 2.67742 2.69356 4.24691 2.90348 2.73741 3.18147 2.89802 2.37888 2.77521 2.98519 4.58478 3.61460
   0.03070 3.58681 5.97279 0.39588 1.11806 0.61711 0.77544
16 3.12789 5.67204 3.28025 2.76211 5.43893 0.50455 4.66675 4.90924 3.55977 4.45907 5.29100 3.32482 4.60767 3.84731 3.47259 3.13331 3.83520 4.42112 6.63363 5.26243 17 G - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00782 5.25045 5.97279 0.61958 0.77255 0.49813 0.93565
17 3.04534 4.54622 4.42423 3.83968 3.65300 3.50663 4.42847 1.41051 2.74209 2.39094 2.88391 3.55119 4.50358 3.96408 2.79792 3.17534 3.27722 1.82821 5.15504 3.95935 18 i - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 1.58477 3.61503
   0.00766 5.27168 5.99403 0.61958 0.77255 0.54651 0.86504
18 2.87230 5.49318 2.95364 2.61695 4.15343 3.77359 3.63936 3.98773 1.83813 2.69207 4.53549 3.10618 2.43480 2.59305 3.03928 2.58919 2.89656 3.37303 5.92963 4.52249 19 k - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00766 5.27168 5.99403 0.61958 0.77255 0.49857 1.01585
19 3.09100 4.46612 5.03010 4.41867 3.15857 4.26415 4.59956 2.33477 4.21152 2.24257 3.14608 4.41157 4.62581 4.34655 4.23064 3.20686 2.54647 0.97597 5.09892 3.08142 20 v - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
20 3.01638 5.18607 3.09263 1.89649 3.70297 3.85496 3.63569 2.06106 2.49467 3.03278 4.25931 3.39411 4.24427 2.85666 2.99421 2.96229 2.79668 2.10878 5.69487 4.36689 21 e - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图11(续2)

```
21 2.60118 5.02242 3.57194 1.97818 3.43219 3.58669 3.76722 3.21471 2.31941 2.28885 4.10853 3.49998 4.29233 3.00840 3.26572 3.12231 2.66717 2.61617 5.56225 2.39107 22 e - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
22 2.40155 4.56403 4.45463 3.87490 3.67957 3.04389 4.45950 2.02204 3.75918 2.76645 3.68584 4.10794 3.85862 3.36458 3.47571 3.43235 3.29836 1.07273 5.18328 3.98821 23 v - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67711 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
23 3.00896 4.55311 1.80936 2.59496 4.84566 3.20857 3.97221 4.32798 2.58483 3.80946 4.54901 1.77200 3.42849 3.07061 3.03600 2.09979 3.03612 3.42158 5.94275 4.53496 24 n - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
24 2.79798 5.49014 3.29740 1.75718 4.81952 3.81551 4.66629 3.93265 2.52531 3.78760 4.54305 3.29563 1.36840 3.11231 2.68778 2.78443 3.11669 3.87399 5.93574 4.54520 25 p - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
25 1.50542 3.77739 3.66760 2.61957 3.17147 3.93972 3.48483 3.47900 3.08199 3.15863 4.02470 3.13230 4.32402 3.40878 2.66468 2.63877 3.25959 3.22436 3.28971 2.51084 26 a - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
26 3.04676 4.97415 3.21007 2.96503 2.66992 3.13549 3.58691 3.52993 3.07516 3.01463 4.06559 2.48718 4.33257 3.40449 3.29236 3.17106 3.27821 3.27105 4.17777 1.29748 27 y - - -
   2.68599 4.42235 2.77530 2.73133 3.46364 2.40523 3.72505 3.29364 2.67751 2.69365 4.24700 2.90357 2.73658 3.18156 2.89811 2.37897 2.77491 2.98528 4.58487 3.61513
   0.21638 1.64963 6.01081 0.10645 2.29266 0.48576 0.95510
27 3.14716 5.10103 4.48841 4.31633 5.57769 3.84275 5.40780 5.05927 4.45805 4.72093 5.50469 3.32330 4.65244 4.69761 4.72766 1.45784 0.59423 4.32898 6.89303 5.71885 29 T - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
28 3.25075 5.17378 4.88271 4.88901 5.93563 2.79144 5.87421 5.52695 5.14089 5.18695 5.94740 4.65466 4.78410 5.26462 5.25851 0.23205 3.83615 4.59695 7.21569 6.16123 30 S - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
29 3.04439 5.37069 3.37716 2.81463 4.65566 3.84369 4.02732 2.94092 1.46956 3.66527 4.43061 3.34409 4.23343 1.77045 2.92252 2.65564 2.77030 2.76399 5.83746 4.47927 31 k - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46351 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图11(续3)

30 3.00747 5.43830 2.70974 2.10734 4.75135 3.79417 3.99487 2.90708 2.37961 2.92723 4.14062 2.97921 4.18683 2.85784 2.75581 2.61689 1.83458 3.08093 5.89064 3.75773 32 t - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
31 3.26535 0.25198 5.58899 5.57276 5.70674 3.96294 6.04137 5.21916 5.39383 5.00409 5.84078 4.88032 4.83145 5.55459 5.36441 2.62458 3.85544 4.45501 7 .06727 5.97763 33 C - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
32 2.43519 5.32884 3.42185 2.90211 4.74015 3.28703 2.96586 4.18538 2.91810 3.47001 4.52811 3.06155 1.62149 3.26836 3.38980 1.49946 3.31401 3.79284 5.94081 4.58182 34 s - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
33 2.61078 3.35079 3.23449 2.19394 4.56376 3.29554 3.71661 2.91187 2.51018 3.33962 3.88749 2.44731 4.21602 3.04792 2.48477 2.78455 2.96230 2.25992 5.78464 3.71618 35 e - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
34 3.65788 0.47624 3.98655 2.82069 4.74288 4.26728 2.70257 4.43727 3.68875 4.68661 5.01017 4.17009 4.87343 4.19297 3.95531 3.79192 4.00847 4.12089 6.12585 4.77667 36 C - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
35 2.97805 5.18783 3.14635 3.17765 4.47189 0.69383 4.33865 3.91092 3.18962 3.26416 4.41360 3.64580 4.43597 3.55200 3.28738 3.27290 3.45476 3.66671 4.46388 4.56728 37 g - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
36 2.39341 3.97392 3.38026 2.35103 3.54015 3.29371 2.36669 3.95173 2.60637 3.53630 4.33637 3.34999 4.22289 2.73394 2.87111 2.16682 2.97759 3.09069 4.50967 2.63268 38 s - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
37 2.87624 5.20494 3.42470 2.56669 4.43970 3.85052 4.65489 2.35000 1.91053 3.17554 3.95459 3.10561 3.79808 3.07869 2.15555 3.05411 2.49382 2.35762 5.70983 4.62721 39 k - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
38 2.78686 4.33285 2.90613 2.84412 4.48071 2.60065 3.07373 3.14623 2.37215 2.31764 3.49084 2.28840 4.23115 3.01692 3.14262 2.58401 3.24558 2.56091 5.73498 4.39476 40 n - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
39 3.00535 5.51120 2.85275 1.97441 4.85425 3.06905 3.96713 3.51572 1.80752 3.81562 4.55239 3.00845 3.54511 2.91052 2.57707 2.33719 2.81395 3.07210 5.94509 3.31924 41 k - - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.69801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

图11(续4)

```
40 2.79461 5.51679 2.78555 1.87270 4.86227 3.48679 3.54080 4.34853 2.15763 3.48334 4.55735 3.09403 3.02458 2.60123 2.14734 2.74315 2.65797 3.58974 5.94922 3.45566 42 e - -
   2.68624 4.42289 2.77494 2.73103 3.46418 2.40540 3.72559 3.29418 2.67710 2.69236 4.24754 2.90337 2.73746 3.18182 2.89763 2.37951 2.77586 2.98538 4.58541 3.61362
   1.32716 0.90186 1.11281 1.04708 0.43226 0.48576 0.95510
41 2.14549 5.29641 2.74530 2.54532 4.13981 2.92965 3.80413 4.09470 2.45530 3.26892 4.34259 2.68262 2.97204 2.90711 2.34597 2.19643 2.69569 3.67678 5.74126 4.34240 51 a - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.01120 4.89367 5.61602 0.61958 0.77255 0.60842 0.78573
42 2.78895 5.02703 2.85851 2.84197 3.76011 3.41921 3.99830 3.38549 2.73637 1.66668 4.10605 3.03596 2.88030 2.97473 2.48037 2.76102 3.16184 2.58848 5.54967 4.23825 52 l - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00905 5.10589 5.82744 0.61958 0.77255 0.26919 1.44393
43 2.41703 5.51166 2.61678 2.29243 4.85492 3.37853 3.22639 3.76865 2.37606 3.34870 4.55279 2.69047 3.15111 2.72796 2.99009 1.92472 2.69710 3.01190 5.94543 4.53557 53 s - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
44 3.00576 5.49556 2.74803 2.56141 4.83184 2.23449 3.73329 3.52233 2.24774 3.57063 4.53846 3.03923 3.00131 2.35765 2.58756 2.54292 2.76968 2.91429 4.36571 3.95973 54 g - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
45 2.59384 5.53215 2.87161 2.44987 4.87671 2.70363 3.98031 4.36160 2.31962 3.63621 4.57396 3.03533 3.82619 2.91333 1.25026 2.76559 3.25319 3.92272 5.96382 4.55391 55 r - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
46 2.91739 5.34660 3.16251 2.20229 4.62597 2.88148 4.00970 4.06808 2.49801 2.26903 3.79794 3.03554 4.20569 2.99135 2.44311 2.91068 2.09646 2.56280 4.46325 4.45336 56 t - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
47 3.07484 4.45967 4.96404 4.35568 1.54143 3.20252 3.19334 2.89354 4.15600 2.10912 2.80888 4.37040 4.59854 4.29864 4.18851 3.19956 3.30692 2.30735 2.67545 2.56780 57 f - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
48 2.70371 5.32180 3.04046 2.49323 3.44716 3.81985 3.50849 3.16594 2.05956 3.31159 4.38279 3.13993 4.21111 2.89553 2.31619 3.01684 2.59689 2.21734 5.80159 3.03769 58 k - - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图11(续5)

```
49 3.43228 0.35397 4.93218 4.57677 5.23780 4.12022 5.24832 4.76158 3.85479 4.43261 5.32121 3.41861 4.85781 4.56634 2.85610 3.63431 3.91437 4.27343 6.51772 5.33189 59  C  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29358 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37881 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
50 2.90235 5.49119 2.79978 2.21367 3.11628 3.52721 3.97181 3.81893 2.49862 3.79195 4.53464 3.10548 1.92793 2.66275 2.82236 2.53353 2.34154 3.43065 5.93025 4.52517 60  p  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29358 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37881 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.15876 5.28846 1.95371 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
51 2.42137 5.44418 2.64787 2.45597 4.78837 3.34231 3.11703 4.27312 2.21543 3.74936 4.48510 2.01541 3.52159 2.99339 2.42819 2.36051 3.06531 2.99604 5.67737 4.46693 61  n  -  -
   2.68611 4.42234 2.77439 2.73097 3.46363 2.40521 3.72503 3.29363 2.67749 2.69364 4.24690 2.90355 2.73748 3.18155 2.89809 2.37895 2.77528 2.98527 4.58486 3.61512
   0.10781 2.30853 5.86081 0.67459 0.71205 0.29096 1.37652
52 3.12714 0.51171 5.26215 4.93130 4.73210 2.84875 5.40988 3.95106 4.74065 2.51964 4.72705 4.61813 4.69769 4.94392 4.81333 3.40061 2.94398 3.59675 6.23451 5.08178 64  C  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37881 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
53 3.02864 5.22702 3.24416 2.87007 4.46645 1.15780 3.81090 3.66246 2.51169 2.79176 4.29803 3.08949 4.24266 3.05520 3.61257 3.06284 3.25918 3.17603 3.48227 4.39417 65  g  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29358 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37881 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
54 2.49365 4.66049 4.11497 2.73912 1.99022 3.19575 3.02364 2.97871 3.04860 2.32962 3.39617 3.23425 4.44610 3.75342 3.77696 3.14743 2.78217 2.37042 4.63637 2.84025 66  f  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
55 2.87226 5.40375 3.12694 2.10029 3.48700 3.45001 3.05224 3.40157 2.17907 3.68954 4.45661 3.28896 4.19366 2.89654 2.77197 2.58416 2.36149 2.31846 5.86446 3.24460 67  e  -  -
   2.68622 4.42229 2.77524 2.73099 3.46358 2.40511 3.72499 3.29356 2.67745 2.69359 4.24694 2.90351 2.73744 3.18116 2.89805 2.37891 2.77524 2.98501 4.58481 3.61507
   0.09213 2.45854 6.01081 0.20065 1.70393 0.48576 0.95510
56 1.92398 3.61677 3.15008 3.27007 2.69745 3.56706 2.73192 2.56330 3.56923 2.17657 3.26149 3.32916 4.46930 3.56678 3.83643 2.98321 3.27866 2.88023 3.49247 2.87097 68  a  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29358 2.67741 2.69355 4.24690 2.90341 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
57 3.26479 4.36049 1.25687 2.76658 5.09728 3.88340 1.83435 4.59558 2.99414 4.07950 4.84599 2.02585 4.35583 2.80468 3.50667 3.20760 3.51018 4.16444 6.21720 4.78378 70  d  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
58 1.23853 5.29374 4.56249 4.01115 5.45569 4.01738 4.88734 4.86441 3.31439 4.43320 5.25952 4.21073 4.69469 4.07668 0.79443 2.96054 3.75959 4.31075 6.54618 5.38597 71  r  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
59 4.23844 6.90487 0.26040 3.07112 6.19796 4.19894 4.94642 5.94950 4.20174 5.34626 6.33855 3.68062 4.92578 3.11787 4.94287 4.04612 4.58985 5.43769 7.36664 5.78034 72  D  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29358 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37881 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图11(续6)

```
60 2.93945 4.48654 4.71529 3.83327 3.17614 2.99810 3.66840 1.94060 3.36839 1.99214 3.60335 4.24473 4.55597 3.70054 3.13856 3.48570 2.67283 1.70881 3.61192 3.08309 73  v  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
61 3.05529 4.93693 3.35640 3.14649 4.10597 3.96319 3.70433 3.19792 3.12971 2.93067 4.03701 1.20424 4.35471 3.45639 3.53504 3.20081 3.02427 1.76674 5.50259 4.23456 74  n  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
62 0.66653 5.04829 4.74593 4.48579 5.56793 1.44837 5.45202 5.04059 4.49890 4.69352 5.47100 4.41412 4.63532 4.74114 3.79579 2.41637 3.64520 4.29564 6.88210 5.73877 75  A  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
63 1.22811 2.79256 4.63608 4.06360 3.74414 4.14349 4.57733 2.83369 3.93924 2.44450 3.75090 4.22387 4.56892 4.15266 4.10711 1.80257 3.14338 2.37335 5.25148 4.06859 76  s  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
64 2.84218 4.47424 4.78141 3.36613 2.49359 3.88625 4.51887 1.81894 2.99767 1.97340 3.28741 4.27841 4.56507 4.19153 2.62686 3.49594 3.29019 2.26288 4.42160 2.44681 77  i  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                  78
65 3.24098 5.22877 4.05555 3.93311 5.51602 3.89082 5.20175 4.95733 4.18540 4.64613 5.46412 0.36554 4.66730 4.45718 4.51557 2.97042 3.17609 3.54434 6.82127 5.57035  N  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
66 4.36648 5.53779 6.41524 5.87613 3.34469 5.89675 6.29833 0.74710 5.77945 1.12347 3.70298 6.07426 5.98719 5.65972 5.73964 5.32369 4.58410 2.54442 6.24393 5.26425 79  i  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
67 1.77383 4.51595 4.56619 3.99635 3.13870 3.46254 4.47329 2.41413 3.02892 1.45875 3.22243 3.68276 4.53513 4.06735 2.94148 3.26910 3.28669 2.68668 4.07643 3.56501 80  l  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00753 5.28846 6.01081 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
68 2.74054 5.50211 2.90007 2.49939 4.84120 3.42564 3.28407 4.32288 1.56965 2.60197 4.54436 2.74884 4.17522 2.83528 2.23727 2.97101 2.96556 3.33612 4.17207 4.53114 81  k  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.09234 5.28846 2.48704 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
69 2.79150 5.19360 3.44199 2.87423 4.43324 4.03522 3.52681 1.74699 3.12499 3.84765 3.19641 4.23545 3.16909 1.35441 3.05949 3.24778 3.17337 5.60846 3.24148 82  r  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.00552 5.20165      * 0.61958 0.77255 0.00000      *
```

图11(续7)

```
HMMER3/f [3.1b2 I 2015年2月]
名称  RuvC_1
ACC   PF18516.2
DESC  RuvC核酸酶结构域
LENG  244
ALPH  氨基
RF    是
MM    否
CONS  是
CS    否
MAP   是
日期  2020年4月22日星期三16:45:27
NSEQ  10
EFFN  6.893555
CKSUM 1712232851
GA    26.20 26.20 ;
TC    33.30 108.10 ;
NC    26.10 24.00 ;
BM    hmmbuild --hand HMM.ann SEED.ann
SM    hmmsearch -Z 47079205 -E 1000 --cpu 4 HMM pfamseq
STATS LOCAL MSV       -10.8985   0.70314
STATS LOCAL VITERBI   -11.7760   0.70314
STATS LOCAL FORWARD    -5.3232   0.70314
HMM     A      C      D      E      F      G      H      I      K      L      M      N      P      Q      R      S      T      V      W      Y
        m->m   m->i   m->d   i->m   i->i   d->m   d->d
COMPO 2.61196 4.58549 2.88726 2.63091 3.35172 2.81203 3.77793 2.82099 2.55752 2.48803 3.74028 2.89868 3.43302 3.00266 2.94492 2.65921 2.89515 2.70318 4.61036 3.36995
      2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46313 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
      0.02416 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.00000      *
    1 1.17964 4.20743 3.69450 3.30076 4.08077 3.10800 4.25604 3.28756 3.26624 3.13101 4.02115 3.44534 3.81345 3.56234 3.56465 2.08158 2.78226 2.42975 5.49377 4.28849     1 a x - -
      2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46313 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
      0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12

```
2 2.61338 4.76339 3.03582 2.35283 3.99657 3.44570 3.64687 3.06553 2.43076 3.01712 3.84155 2.75850 3.83658 2.63371 2.52070 2.66041 2.24062 2.88411 5.27120 3.95254 2 t x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
3 2.21665 4.53168 3.10038 2.69084 4.18810 1.89003 3.88295 3.60371 2.74016 3.23467 4.05719 3.18740 3.80465 2.70371 3.15670 2.32621 2.32509 3.19738 5.48163 4.19015 3 g x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
4 2.63243 4.64749 3.01584 2.45510 4.10295 2.89526 3.62801 3.18693 2.11366 2.67736 3.91821 2.62724 3.83413 2.60153 2.56835 2.65895 2.85984 3.19003 5.33136 4.03347 4 k x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
5 2.60791 4.94309 2.54097 2.36145 3.66130 3.10574 3.60815 3.67356 2.25315 3.22894 4.01276 2.66013 3.36049 2.73349 2.86324 2.36293 2.52066 3.30509 5.42647 4.05725 5 k x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
6 2.76032 4.88657 2.91332 2.52137 3.84125 3.47085 3.69464 3.55282 2.23226 3.14619 4.00632 1.77890 3.91621 2.90792 2.87288 2.79227 3.88050 3.24722 5.19429 2.64657 6 n x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
7 3.19121 4.48415 4.95588 4.40495 3.36883 4.54836 4.96244 1.32087 4.29273 1.56042 2.76714 4.60788 4.78057 4.44476 4.42269 3.90171 3.42735 1.56612 5.35179 4.23466 7 i x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
8 2.96076 4.95199 2.88656 2.80222 4.35872 3.37616 4.16275 4.13369 3.09325 3.75289 4.71266 0.77153 4.04408 3.44256 3.45107 3.02220 3.35515 3.72910 5.63500 4.29369 8 n x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
9 2.75063 5.21636 2.07667 2.28073 4.53723 3.36420 3.65861 4.01175 2.09740 3.50944 4.29078 2.83645 3.83621 1.93968 2.91573 2.49471 2.93387 3.60052 5.65768 4.24801 9 q x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
10 2.62726 4.67269 2.62391 2.43668 4.13184 3.43386 3.62174 3.55265 2.03494 2.91672 2.80808 2.95116 3.80510 2.61063 2.63268 2.64609 2.85568 3.21664 5.35386 4.01524 10 k x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
11 3.01701 4.49722 4.47638 4.15497 3.75279 3.98410 4.91687 2.07467 4.02703 2.39951 3.68566 4.30155 4.53576 4.37166 4.21377 3.50986 3.37571 0.75204 5.57832 4.32290 11 v x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
12 2.60646 4.66709 3.08808 2.27534 3.87230 3.46447 3.67557 2.58561 2.37854 2.73189 3.74953 2.64358 3.85413 2.66244 2.92895 2.68481 2.83960 2.71323 5.19305 3.89239 12 e x - -
  2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
  0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续1)

```
13 2.50357 5.08649 2.46544 1.89989 4.40363 3.38370 3.59669 3.86929 2.19236 3.07858 4.13908 2.86032 3.79644 2.54470 2.65409 2.61378 2.87675 3.46262 5.53041 4.13662 13  e  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
14 2.60806 4.80280 2.59460 2.30492 3.20749 3.08742 3.30732 3.45328 2.30745 3.05826 3.87468 2.95672 3.82280 2.79332 2.90946 2.64218 2.84029 3.13273 5.29579 2.91353 14  e  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
15 2.68773 4.28327 4.47139 3.89826 2.83426 4.08526 4.42622 1.72819 3.77803 1.56781 3.14992 4.03997 4.40345 3.97076 3.93773 3.39682 2.52549 1.89635 4.98867 3.82286 15  l  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
16 2.46257 4.86245 3.10163 2.51832 4.12621 3.40816 3.63581 3.11830 1.97674 2.82660 3.93402 3.01768 3.86992 2.42967 2.25603 2.71382 2.90267 3.20791 5.32888 4.02513 16  k  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
17 2.49046 5.11276 2.10873 2.29316 4.42856 3.36386 3.62120 3.89701 2.26509 3.41104 4.18231 2.64044 3.80599 2.50669 2.90980 2.31664 2.71745 3.49182 5.57442 4.17104 17  d  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
18 2.55290 5.23598 2.10259 2.11174 4.56386 3.32556 3.70425 4.04437 2.56985 3.55806 4.35044 2.02836 3.83982 2.83963 3.09704 2.12842 3.03401 3.63106 5.72659 4.29469 18  n  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
19 2.63785 5.09756 2.46416 2.18844 4.42488 3.38520 3.58740 3.89467 2.10114 3.39683 4.14725 2.85930 3.11120 2.51326 2.46748 2.60533 2.69856 3.47951 5.53543 4.13996 19  k  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.12378 4.13012 2.29911 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
20 2.86792 5.39617 1.44492 1.99820 4.69413 2.79410 3.72513 4.19107 2.36047 3.69138 4.51116 2.72897 3.83830 2.87590 3.20907 2.77723 3.13843 3.77226 5.85525 4.38629 20  d  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03382 4.75536 0.61958 0.77255 0.42595 1.05886
21 2.50268 4.16392 4.35277 3.76917 2.85330 3.91816 4.24798 1.93946 3.63961 1.82764 2.58761 3.34449 4.25926 3.83283 3.78510 3.22101 2.73956 1.87772 4.83858 3.66642 21  l  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
22 2.33717 4.98033 2.84018 2.42071 4.27056 3.41781 2.25864 3.71667 2.21927 3.27872 4.09175 2.34917 3.85973 2.81176 2.80422 2.71502 2.95322 3.36636 5.46155 4.11349 22  k  x  -  -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续2)

```
23 3.21003 4.48351 5.00710 4.49017 3.56745 4.63166 5.15013 1.14391 4.38335 1.86764 3.35586 4.70186 4.88300 4.60444 4.55348 4.01183 3.46191 1.33368 5.57477 4.40062 23  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
24 3.23702 4.59462 4.68672 4.31863 3.56122 4.33356 5.00626 0.80564 4.15201 2.10269 3.46489 4.52917 4.78715 4.47860 4.32027 3.86073 3.53449 1.68845 5.49992 4.25552 24  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.12378 4.13012 2.29911 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
25 2.87641 4.63319 3.58205 3.50401 4.63619 0.51940 4.61199 4.27928 3.70696 3.91250 4.89143 3.74753 4.02934 4.01863 3.92297 3.05336 3.37016 3.77662 5.68838 4.74640 25  G  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02668 4.03382 4.75536 0.61958 0.77255 0.42595 1.05886
26 3.21994 4.49916 4.99254 4.47815 3.54954 4.62760 5.14426 1.05243 4.36339 1.86864 3.34032 4.69575 4.88155 4.58909 4.53596 4.01003 3.47232 1.46147 5.56778 4.39303 26  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
27 2.84130 5.13234 1.16743 2.33119 4.61251 3.27696 3.89116 4.01182 2.87173 3.65288 4.52675 2.87820 3.89895 3.07109 3.40373 2.81917 2.40137 3.61690 5.86277 4.43976 27  d  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
28 3.31989 5.12537 3.83907 3.30568 4.54668 3.74796 4.04471 4.11322 2.38651 3.58243 4.58251 3.64214 4.24405 3.25804 0.64748 3.39580 3.57210 3.62161 5.52863 4.42539 28  R  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
29 2.60320 4.63632 2.86675 2.74991 4.52763 1.13376 4.12695 4.07134 3.67711 3.69178 4.54267 2.26698 3.87241 3.36129 3.46898 2.70318 3.04064 3.55403 5.79194 4.49135 29  g  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
30 2.85837 4.98436 2.81209 1.30813 4.11124 3.47919 3.82687 3.42409 2.62220 2.42891 4.06096 3.05046 3.97245 3.01400 3.02578 2.88814 3.11607 3.18269 5.46792 4.11535 30  e  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
31 3.18998 5.25166 3.64930 2.94657 4.73459 3.77275 3.69658 4.07151 1.63813 3.49742 4.38409 3.31980 4.13935 2.82434 1.68956 3.18835 3.34531 3.76276 5.51611 4.37690 31  r  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续3)

```
32 2.83245 5.28996 2.08737 2.24643 4.51612 3.33543 2.36769 4.07934 2.60076 3.59061 4.40389 1.80556 3.86560 2.87374 3.11681 2.76903 3.09281 3.67605 5.71360 4.26117 32 n x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
33 3.45721 4.68750 4.60246 4.25116 3.25455 4.36647 4.82696 2.48010 4.01669 0.61229 3.21857 4.50182 4.70236 4.32237 4.18742 3.91942 3.74239 2.58290 5.21913 3.99936 33 L x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
34 2.95176 4.38736 4.48715 3.92862 3.38364 4.16964 4.55847 1.72559 3.81521 1.49111 3.24620 4.16648 4.49135 4.04367 4.01062 3.49157 2.53941 1.69254 5.16438 3.99613 34 i x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
35 3.60057 5.02416 4.22926 4.01361 2.35214 4.13564 3.17069 3.61657 3.86458 3.00194 4.26579 4.05560 4.60859 4.10694 3.99216 3.74852 3.93027 3.50018 4.60336 0.62549 35 Y x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
36 2.85310 4.25513 4.42500 3.85134 3.19549 4.03416 4.33525 1.86648 3.71894 1.70915 3.16929 4.04149 4.36046 3.91957 3.87490 3.34307 3.09676 1.61161 4.89213 2.77756 36 v x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
37 1.99784 4.25916 3.57759 3.18036 3.92653 3.20021 4.08126 3.19551 3.06262 2.98197 3.85664 3.35840 3.82894 3.36681 3.40395 1.90283 1.92400 2.30601 5.33319 4.10743 37 s x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
38 3.15153 4.46660 4.85274 4.29770 3.35450 4.47370 4.87082 1.79377 4.16379 1.51650 2.71916 4.51289 4.72220 4.35194 4.32950 3.81784 3.38762 1.26798 5.36397 4.17825 38 v x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
39 3.18886 4.48026 4.96702 4.48112 3.63969 4.57444 5.18429 1.04579 4.36944 2.11490 3.43286 4.68306 4.81406 4.62590 4.55366 3.97581 3.45605 1.31985 5.64605 4.44466 39 i x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
40 3.02825 5.54267 1.05958 2.18654 4.86135 3.27434 3.88156 4.44244 2.94341 3.95303 4.82466 2.16129 3.92430 3.06256 3.54993 2.91954 3.34148 4.00103 6.07039 4.55436 40 d x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
41 2.72219 5.06962 2.87023 2.00329 4.42134 3.43316 3.62441 3.86246 2.28615 3.37323 4.16185 2.92359 3.85061 2.40034 2.17180 2.20042 2.94972 3.47996 5.52183 4.17011 41 e x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
42 2.69432 5.08737 2.69520 2.36733 4.41722 3.43385 2.68633 3.86547 1.77130 3.36182 4.14537 2.91626 3.83476 2.71770 2.35648 2.47655 2.91881 3.47444 5.55911 4.15099 41 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续4)

```
43 2.60320 4.63632 2.86675 2.74901 4.52763 1.13376 4.12695 4.07134 3.67711 3.69178 4.54267 2.26698 3.81241 3.36129 3.46898 2.70318 3.64064 3.55403 5.79194 4.49135 42  g  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
44 2.73861 5.12029 2.77875 2.28600 4.43774 3.41276 3.20229 3.88712 1.96551 3.39955 4.18813 2.01669 3.84651 2.75910 2.76201 2.76090 2.73897 3.50146 5.55274 4.18499 43  k  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
45 3.19043 4.49229 4.93936 4.45846 3.61455 4.55663 5.16130 0.98282 4.33769 2.08523 3.41389 4.66252 4.85942 4.59779 4.52175 3.95511 3.46047 1.44029 5.62503 4.42322 44  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
46 2.79263 4.30644 4.02478 3.45244 3.35452 3.89219 4.18824 1.98561 2.69642 1.61823 3.26962 3.76546 4.24054 3.61257 3.55746 3.18009 3.62672 1.80499 4.98944 3.79590 45  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
47 2.60011 4.97439 2.63965 1.87516 4.24664 3.40151 3.61767 3.69146 2.12167 2.78652 4.03695 2.89818 3.81167 2.74637 2.85265 2.63425 2.87287 3.32790 5.44024 3.47670 46  e  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
48 2.93522 5.26295 2.61495 2.00832 4.56736 3.42344 3.15576 4.03499 2.44648 3.54451 4.40400 2.93073 3.94294 1.39596 2.82173 2.88934 3.18443 3.67462 5.68575 4.32791 47  g  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
49 2.60715 3.92764 2.56987 2.29666 3.32281 3.41426 3.61776 3.55836 1.97866 3.13935 3.93942 2.92870 3.80934 2.57349 2.86319 2.62261 2.83871 3.21585 5.35994 4.00976 49  k  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
50 2.52829 4.62326 2.57793 2.66802 4.32081 3.20626 3.91006 3.73627 2.80390 3.37452 4.13993 3.05274 3.81548 3.09771 3.24687 1.38031 2.36013 3.30794 5.60476 4.28276 50  s  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
51 3.13503 4.58110 4.54075 4.62336 2.38650 4.26616 4.12037 2.55260 3.87876 1.01067 3.15554 4.16008 4.54771 4.01569 4.01518 3.58310 3.41839 2.59627 4.42653 2.48020 51  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.46513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续5)

```
52 2.96076 4.95199 2.88656 2.80222 4.35872 3.37616 4.16275 4.13369 3.09325 3.75289 4.71266 0.77153 4.04408 3.44258 3.45107 3.02220 3.35515 3.72910 5.63560 4.29369 52 n x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
53 2.65510 4.50241 3.29118 2.16943 3.68500 3.56775 3.81156 2.25454 2.52296 2.68015 3.59636 3.21798 3.95811 3.05699 3.07833 2.81957 2.88886 2.17009 5.18455 3.84227 53 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2 77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
54 3.29829 4.58640 4.94299 4.43543 3.36777 4.61462 5.04051 1.06250 4.26796 1.51195 3.19220 4.66673 4.85680 4.46767 4.41956 4.06545 3.53563 1.86577 5.41235 4.23739 54 i x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
55 2.48012 4.96377 2.26099 2.35272 4.25740 3.05175 3.65071 3.69600 2.45881 3.26339 4.06068 2.43046 3.81642 2.61161 2.94404 2.69714 2.89434 2.60876 5.47144 4.10024 55 d x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
56 2.80085 5.13475 2.22651 2.30064 4.63071 1.66490 3.83772 4.12827 2.78599 3.67268 4.49939 1.76394 3.86936 3.00505 3.31502 2.77184 3.11961 3.69119 5.84239 4.41668 56 n x - -
   2.68642 4.42249 2.77543 2.73077 3.46378 2.40513 3.72454 3.29359 2.67719 2.69379 4.24714 2.90332 2.73763 3.18131 2.89799 2.37911 2.77493 2.99542 4.58501 3.61391
   0.27438 1.46039 4.85247 1.62479 0.21934 0.48576 0.95510
57 2.63396 4.12803 4.00838 3.42971 2.84790 3.72694 4.01354 2.46248 3.32155 2.21833 2.90590 3.67180 4.09315 3.55546 3.53096 3.01172 2.35896 1.83869 4.71399 2.73430 65 v x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
58 2.31590 5.41705 1.32126 2.19789 4.76930 3.28431 3.80739 4.28912 2.78349 3.79476 4.62383 2.06095 3.21485 2.96680 3.35590 2.82972 3.28757 3.85401 5.95012 4.46832 66 d x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
59 3.64057 5.02418 4.22926 4.01381 2.35214 4.13864 3.77069 3.61657 3.86458 3.00194 4.26579 4.05560 4.60959 4.18694 3.99216 3.74852 3.93027 3.50018 4.06336 0.62549 67 y x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2 73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
60 2.39286 5.18478 3.36664 2.72396 4.55850 3.66209 2.17785 3.96102 1.71696 3.41861 4.26055 3.16468 4.02604 2.76990 1.67321 2.98219 3.16985 3.62743 5.47652 4.25160 60 r x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
61 2.34693 5.13345 2.52355 1.85416 4.44647 3.36589 3.62990 3.91497 2.09661 3.42606 4.13843 2.63524 3.81086 2.74690 2.90595 2.64818 2.72145 3.50931 5.58668 4.18220 69 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.99518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续6)

```
62 2.48544 4.57347 3.41224 2.88596 3.72927 3.60409 3.85159 2.95320 2.01994 1.69546 3.64259 3.30441 4.01782 3.69782 2.67595 2.91045 2.98780 2.75321 5.15357 3.91182 70 i x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
63 3.45721 4.84750 4.60246 4.25116 3.25455 4.30647 4.82696 2.48010 4.01669 0.61229 3.21657 4.50182 4.70238 4.32237 4.14742 3.91942 3.74239 2.58290 5.21913 3.99936 71 L x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
64 2.71333 5.17109 1.95200 2.13349 4.47775 3.35856 3.64618 3.94650 2.15524 3.45988 4.23714 2.41229 3.81965 2.76889 2.94778 2.66924 2.95579 3.04135 5.62159 4.20955 72 d x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
65 2.64887 5.01863 2.86833 2.00354 4.32062 3.40597 3.60693 3.76624 2.10660 3.29934 4.07969 2.71688 3.81225 2.39481 2.79121 2.63442 2.55274 3.04158 5.47369 4.10469 73 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
66 3.18538 5.27840 3.64933 2.92466 4.77435 3.77621 3.66931 4.10150 1.41176 3.51234 4.38981 3.30355 4.13091 2.80143 1.25731 3.17472 3.33463 3.78606 5.52412 4.38668 74 r x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
67 2.72457 4.98902 2.63570 1.40384 4.42297 3.32148 3.77028 3.83561 2.66513 3.43101 4.25741 2.91023 3.85895 2.92796 3.06780 2.45938 2.44349 3.45320 5.63973 4.26680 75 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3 46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
68 2.63595 4.75169 3.07014 2.51694 3.97258 2.91310 3.65791 2.83301 1.95436 2.99797 3.63179 3.01832 3.85632 2.46757 2.83150 2.69085 2.86405 3.07782 5.25192 3.39922 76 k x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
69 2.48316 4.96580 2.47701 2.03428 4.22313 3.39166 3.62517 2.99267 2.41566 3.22589 4.01824 2.72100 3.80727 2.75695 2.89717 2.46248 2.62169 3.29335 5.43267 4.06528 77 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
70 2.63491 5.01841 3.24083 2.62946 4.34972 3.57758 3.63816 3.73593 1.67901 3.26515 3.35887 2.75610 3.95072 2.77557 1.59593 2.84685 3.03599 3.41033 5.41177 4.15272 78 r x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24698 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续7)

```
71 2.47195 4.92870 2.57272 2.13761 4.20070 3.40317 3.61911 3.63770 2.13703 2.94014 3.99137 2.90585 3.80292 2.73912 2.85690 2.61571 2.68360 3.27929 5.40614 3.20686 79 k x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
72 2.62936 5.02097 2.63477 2.01559 4.31666 3.38983 2.97695 3.77225 2.16230 3.30373 4.07753 2.87621 3.79731 2.71888 2.83941 2.61186 2.52390 3.38631 5.47885 3.44834 80 e x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
73 1.51018 5.05907 2.12508 2.13253 4.43561 3.31485 3.78376 3.84993 2.69247 3.45428 4.28827 2.87609 3.86615 2.94848 3.20011 2.75484 3.05542 3.47835 5.67769 4.28493 81 a x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
74 3.18998 5.25168 3.64930 2.94657 4.73459 3.77275 3.68658 4.07151 1.63813 3.49742 4.38409 3.31980 4.13835 2.82434 1.08956 3.10035 3.34551 3.76276 5.51611 4.37890 82 r x - -
   2.68619 4.42226 2.77521 2.73125 3.46355 2.40514 3.72496 3.29355 2.67742 2.69356 4.24691 2.90348 2.73741 3.18148 2.89802 2.37888 2.77495 2.98520 4.58478 3.61504
   0.12378 2.21990 4.85247 0.35237 1.21409 0.48576 0.95510
75 2.96751 5.24359 3.27341 2.45035 4.67881 3.63078 3.62424 4.05228 1.54771 3.48207 4.30517 3.11944 3.99865 2.27677 1.72186 2.93866 3.14764 3.69231 5.53677 4.30540 83 k x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
76 2.65983 4.84262 2.85538 2.29186 4.12540 3.39615 3.69731 3.54490 2.50412 2.62980 3.98303 2.17704 3.84873 2.86059 2.94638 2.06383 2.91223 3.21540 5.39078 4.05187 85 s x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.71255 0.48576 0.95510
77 3.80005 5.07613 4.50824 4.28358 2.91921 4.03876 4.25947 3.84369 4.00523 3.19050 4.46404 4.38300 4.57939 4.37912 4.06544 4.00104 4.11526 3.74076 0.49457 2.96912 86 W x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
78 2.69945 5.05214 2.84111 2.38497 4.36603 2.82433 3.63485 3.82799 2.04158 3.35316 4.14297 2.65776 3.83997 2.02574 2.75617 2.68301 2.67024 3.44690 5.51667 4.15885 87 q x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
79 2.41084 4.48555 3.23829 2.68833 3.68617 3.47893 3.74851 3.05849 2.46511 2.74376 3.61128 3.14565 3.88394 2.98929 3.05144 2.37272 2.23158 2.61431 5.07052 3.64295 88 t x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0 02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.46576 0.95510
80 2.81494 4.41988 2.81254 3.24846 3.66613 3.83837 4.22216 1.38393 3.25342 2.41920 3.51273 3.64185 4.24185 3.55458 3.59447 3.15466 3.07197 1.91003 5.22905 3.97894 89 i x - -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续8)

```
81 2.67861 4.92245 2.78493 1.80954 4.21566 2.47933 3.68648 3.63203 2.49015 3.22590 4.04535 2.92569 3.84357 2.63495 2.94766 2.69044 2.92818 2.70406 5.45358 4.10160 90  e  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
82 2.61279 4.85681 2.85711 2.43384 4.28432 2.94002 3.70335 3.72181 2.30534 3.29276 4.09278 2.15865 3.81105 2.84740 2.94922 2.15535 2.45968 3.33678 5.49699 4.14643 91  s  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
83 2.72026 4.32170 3.97227 3.55293 3.56572 3.67678 4.34460 1.22176 3.43621 2.44405 3.54953 3.78378 4.26204 3.77012 3.67736 2.41508 3.04884 2.14900 5.19776 3.93997 92  i  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
84 3.15084 5.25853 3.55595 2.88414 4.73719 3.74369 3.67714 4.08104 1.04392 3.50469 4.38040 3.27775 4.11269 2.81168 1.80464 3.14137 3.31222 3.76128 5.52670 4.37212 93  k  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
85 2.84824 5.36455 2.18900 1.42495 4.67055 2.60445 3.72681 4.16205 2.35347 3.65850 4.45979 2.78682 3.86113 2.86645 3.14065 2.77080 3.10869 3.74218 5.81596 4.36455 94  e  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
86 3.42830 4.77740 4.87895 4.34347 3.16062 4.61572 4.96574 2.26299 4.12423 0.74697 2.51065 4.62139 4.86982 4.30182 4.25409 3.99323 3.65765 2.41757 5.21169 4.10939 95  l  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.77255 0.48576 0.95510
87 3.22788 5.18401 3.41982 3.00288 4.63017 3.68014 3.93039 4.07793 0.13236 3.59045 4.54550 3.41299 4.16843 3.11262 2.51722 3.25743 3.46557 3.77395 5.58409 4.43801 96  k  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
88 2.96513 5.26272 2.46301 0.98476 4.71386 2.73652 3.96943 4.20023 2.82657 3.75640 4.62464 2.92111 3.94900 3.09011 3.36861 2.92077 3.27384 3.79622 5.87054 4.49938 97  e  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
89 1.82005 4.27948 3.45173 3.28272 4.51394 1.04368 4.41426 3.89663 3.43922 3.63055 4.48197 3.42314 3.75936 3.70852 3.72642 2.52547 2.85655 3.32530 5.83785 4.65272 98  g  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61956 0.71255 0.48576 0.95510
90 3.64057 5.62418 4.22926 4.01381 2.35214 4.13864 3.77069 3.61657 3.86458 3.60194 4.26579 4.05560 4.60959 4.10694 3.99216 3.74852 3.93027 3.50018 4.00336 0.62549 99  Y  x  -  -
   2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
   0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续9)

```
91  3.26048 4.55476 4.98132 4.43696 3.32865 4.60730 5.01669 1.56552 4.31521 1.16477 3.11714 4.66091 4.82415 4.46353 4.44032 3.96942 3.49732 1.64634 5.37058 4.26383  100 l x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

92  2.70435 4.86029 2.60659 2.05417 4.41223 3.27788 3.87917 3.85569 2.73999 3.47039 4.32069 2.98663 3.87656 3.06509 3.17089 1.30017 3.04278 3.45555 5.66611 4.31377  101 s x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

93  2.70785 4.83318 3.04707 2.58263 4.08402 3.00628 3.67724 3.40426 2.20389 2.39101 3.92955 3.03698 3.89151 1.96089 2.73092 2.75186 2.93700 3.18032 5.32271 4.02271  102 q x
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

94  1.75280 4.28358 4.10723 3.70111 3.80526 3.54524 4.53206 2.30375 3.62033 2.59346 3.70250 3.83946 4.16126 3.91880 3.86422 2.96847 3.01604 1.24875 5.45691 4.24246  103 v x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

95  3.16191 4.46421 4.92041 4.43504 3.66860 4.53189 5.15158 1.45173 4.32478 2.16912 3.46661 4.63861 4.84790 4.59398 4.51903 3.93111 3.43223 0.95126 5.64948 4.43547  104 v x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

96  2.62518 4.66087 3.04673 2.66169 3.99695 3.35212 1.74262 3.52581 2.60670 3.15550 4.01299 3.10673 3.88031 3.02909 2.97644 2.43271 2.39493 3.18457 5.32601 3.98404  105 h x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

97  2.87140 5.25143 2.82355 1.91537 4.61776 3.47799 3.65568 4.04668 1.55608 3.51426 4.32260 2.95391 3.91873 2.33002 2.56682 2.82627 3.08932 3.66232 5.61826 4.29262  106 k x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

98  3.28331 4.56267 4.93375 4.42982 3.38012 4.60831 5.04065 1.03834 4.26030 1.55899 3.20806 4.66097 4.85601 4.48855 4.41522 4.00119 3.53242 1.85295 5.42051 4.23799  107 i x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

99  1.74403 4.25406 3.57784 3.11466 4.02133 3.14966 4.11072 3.32477 3.08128 3.08354 3.94442 3.35273 3.60482 3.38504 3.42342 1.92938 1.89266 2.58698 5.41039 4.18571  108 a x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

100 2.63939 5.06118 2.38329 2.23591 4.37935 3.39921 3.59000 3.83794 1.92022 3.34777 3.45485 2.87946 3.60010 2.52915 2.60239 2.61490 2.86901 3.43814 5.50235 4.12093  109 k x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

101 3.40802 4.75206 4.89281 4.34298 3.09177 4.61102 4.89555 2.26811 4.14666 0.85318 2.05087 4.61699 4.79472 4.29509 4.26957 3.97519 3.63132 2.42939 5.19732 4.11938  110 l x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续10)

```
102 1.89885 4.30479 4.08863 3.53760 3.36936 3.86455 4.26724 1.92989 3.43123 2.12834 2.25774 3.82080 4.25203 3.70155 3.67942 3.17603 3.04101 2.14595 5.03642 3.84892 111 a x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
103 2.72308 4.26125 3.94724 3.39522 3.40942 3.79713 4.15237 1.61713 3.28152 2.30371 3.34562 3.70089 4.18164 3.17071 3.54497 3.09505 2.48066 1.85998 4.98990 3.78386 112 i x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
104 2.78691 5.27524 2.38873 1.75496 4.60849 3.37038 3.66484 4.07620 1.78426 3.55875 4.34201 2.83444 3.84941 2.52700 2.89571 2.72687 3.02816 3.65948 5.69474 4.28420 113 e x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
105 2.99518 4.83562 3.25149 2.86851 2.80840 3.69476 3.10709 3.46453 2.83924 3.00471 3.57559 2.28372 4.11890 3.20111 3.19227 3.02273 3.19770 3.22028 4.39179 1.53747 114 y x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
106 2.89850 5.09000 2.64972 2.47954 4.06957 3.38789 3.14023 3.99114 2.65774 3.52679 4.41348 1.20563 3.95859 3.05189 3.04798 2.89122 3.19623 3.62289 5.41673 3.93716 115 n x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
107 0.69787 4.34149 3.74420 3.55689 4.32856 3.15741 4.54559 3.49415 3.58037 3.36310 4.37276 3.63494 3.92180 3.89092 3.80733 2.69277 2.98847 3.10285 5.72925 4.56130 116 n x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
108 3.18490 4.47059 4.98069 4.49245 3.66045 4.58535 5.19662 1.14616 4.38628 2.14260 3.45113 4.69243 4.88125 4.64269 4.57136 3.96503 3.45077 1.18358 5.66079 4.45711 117 i x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
109 2.66320 4.38734 4.74783 4.24023 3.66676 4.35336 4.94107 1.28306 4.14107 2.25966 3.48476 4.44336 4.70184 4.40469 4.34432 3.72618 3.31452 1.21271 5.53026 4.32527 118 v x -,
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
110 2.36642 4.34190 4.28900 3.91171 3.80190 3.74575 4.12579 2.09714 3.81466 2.49179 3.67494 4.04205 4.33346 4.12843 4.03632 3.18450 3.14165 0.95300 5.55542 4.33851 119 v x --
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
111 3.19377 4.56167 4.72807 4.16397 3.18453 4.41145 4.75444 2.17289 4.02120 1.34583 1.68281 4.41618 4.65581 4.18618 4.17256 3.74660 3.42456 1.87766 5.17277 4.07520 120 i x --
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72594 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
112 3.20025 5.34041 2.62970 0.70730 4.72300 3.45944 4.07932 4.22998 2.99463 3.80888 4.78014 3.11272 4.07885 3.29501 3.42421 3.16112 3.50923 3.89026 5.84535 4.57831 121 e x --
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续11)

113	2.95109	5.47729	1.24509	1.97712	4.80239	3.28413	3.81475	4.31066	2.81125	3.81961	4.65771	2.76049	3.89359	2.97724	3.39568	2.27336	3.24104	3.88255	5.98717	4.49495	122 d x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
114	3.42237	4.76594	4.89724	4.35106	3.09404	4.62295	4.90828	2.26495	4.14836	0.78958	2.27903	4.62855	4.80643	4.30396	4.27280	3.99197	3.64696	2.42634	5.20628	4.12282	123 l x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
115	2.62507	4.73296	2.75085	2.59164	4.42466	3.19969	3.97307	3.98260	2.86630	3.59231	4.43823	1.27557	3.85833	3.18078	3.27917	2.13438	3.01946	3.51149	5.70995	4.33742	124 n x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
116	2.63559	4.18394	3.83756	3.26023	2.28410	3.68093	3.29664	2.46598	3.17841	2.36294	3.00248	3.54956	4.05145	3.42979	3.43029	2.51489	2.86710	2.44694	4.58430	2.69932	125 f x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
117	2.36691	4.30415	3.42101	3.22074	4.45463	1.08162	4.34878	3.82969	3.33014	3.55988	4.41773	3.39733	3.80825	3.63121	3.62665	2.54279	2.11455	3.29410	5.78098	4.58033	126 g x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
118	3.60575	4.93493	4.59390	4.36420	0.66856	4.22651	4.01913	3.10592	4.26681	2.41943	3.80192	4.31977	4.67844	4.36513	4.32239	3.85744	3.90962	3.11441	4.20462	2.54461	127 f x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
119	2.76234	4.69607	3.36056	2.77515	3.83488	3.61590	3.77959	2.75143	1.53039	2.71446	2.95838	3.22770	3.99598	2.97938	2.76731	2.87934	2.96605	2.84641	5.21710	3.95895	128 k x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
120	2.47505	5.01033	2.37736	2.43489	4.38305	3.40130	3.69360	3.80967	2.39462	3.36487	4.17992	2.95244	3.86840	2.83451	1.62966	2.72874	2.96429	3.43887	5.53850	4.13375	129 r x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
121	2.57179	4.67187	2.98359	2.61699	4.28722	1.71403	3.83950	3.70189	2.10638	3.31110	4.13570	3.06493	3.83701	3.01580	3.00968	2.42676	2.58366	3.30008	5.53052	4.22941	130 g x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
122	2.90470	4.14616	3.56679	3.00806	2.55917	3.66600	3.80912	3.24881	2.55050	2.77975	3.82193	3.39420	4.10214	3.14308	1.33732	3.03612	3.14594	3.05680	4.89357	3.44616	131 r x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																
123	2.63652	4.61260	3.13383	2.62105	2.51562	3.48370	3.71686	3.20259	2.38940	2.85538	3.72060	3.09751	3.89075	2.41079	2.95514	2.23592	2.87383	2.93247	5.11759	3.89580	132 s x - -		
	2.68618	4.42225	2.77519	2.73123	3.46354	2.40513	3.72494	3.29354	2.67741	2.69355	4.24690	2.90347	2.73739	3.18146	2.89801	2.37887	2.77519	2.98518	4.58477	3.61503			
	0.62418	4.13012	4.85247	0.61958	0.77255	0.48576	0.95510																

图12(续12)

```
124  2.85013 4.81319 3.31279 2.80096 2.72429 3.61030 3.76439 3.33114 1.32289 2.91581 3.89913 3.24231 4.02826 3.02636 2.76643 2.93423 3.08605 3.10254 5.06553 3.65456 133 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

125  3.11383 4.43452 4.82078 4.26792 2.85121 4.42026 4.79192 1.80214 4.15577 1.63644 3.18465 4.46376 4.69405 4.32168 4.29650 3.76201 3.35120 1.21028 5.22734 4.05952 134 v x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

126  3.02809 5.58995 1.84716 1.07964 4.88268 3.29657 3.84415 4.40377 2.85823 3.90558 4.76263 2.76433 3.91962 3.01175 3.44835 2.91085 3.31767 3.97709 6.04097 4.55126 135 e x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

127  2.72353 4.99472 3.02905 2.19074 3.55494 3.48177 3.62391 3.71115 1.60258 3.25251 4.06178 2.98723 3.87311 2.75596 2.39620 2.72534 2.94219 3.36450 5.42185 4.16140 136 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

128  2.78649 4.92028 2.86444 2.59231 4.32712 3.37564 3.82933 3.86334 2.50566 3.42228 4.30295 3.05454 3.93187 1.27841 2.83798 2.48262 3.09585 3.49281 5.55033 4.20475 137 q x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

129  3.17363 4.46446 4.95869 4.47077 3.67111 4.56599 5.18073 1.33203 4.36467 2.16307 3.46493 4.67189 4.86924 4.62680 4.55422 3.96475 3.44088 1.02054 5.66067 4.45159 138 v x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

130  3.79040 5.00485 4.71402 4.42808 1.60446 4.49364 3.52625 3.47869 4.27039 2.78842 4.07242 4.15578 4.80367 4.22561 4.29484 3.87395 4.01326 3.40624 3.65813 0.83263 139 y x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

131  2.98369 5.19475 3.00977 2.61049 4.54963 3.55895 3.70882 3.98106 1.85575 3.46266 4.32904 3.08868 4.00532 1.38176 2.44138 2.96627 3.13866 3.64387 5.55812 4.28977 140 q x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

132  2.35313 5.07508 2.90856 2.29288 4.45823 3.47083 3.68706 3.83614 1.39939 3.38228 4.21155 3.09233 3.91968 2.82703 2.61255 2.81457 3.05469 3.48370 5.54001 4.23468 141 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

133  3.48255 4.81702 4.69398 4.31650 0.96679 4.39999 4.00100 2.71734 4.15295 1.83838 3.40349 4.29956 4.72492 4.24058 4.23749 3.81413 3.73492 2.76849 4.18338 2.54391 142 f x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

134  3.26025 5.34041 2.62970 0.70730 4.72300 3.45944 4.07932 4.22998 2.99463 3.80888 4.78014 3.11272 4.07885 3.29501 3.42421 3.16112 3.56923 3.89026 5.84535 4.57837 143 e x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续13)

```
135  2.33546 5.01980 2.81761 2.25278 4.35135 3.39631 3.64485 3.79210 1.82812 3.33139 4.12392 2.65377 3.83306 2.77430 2.81629 2.26930 2.92434 3.41481 5.50898 4.14732  144 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

136  2.78580 4.62550 3.48721 2.88519 3.79469 3.63272 3.77194 3.13539 2.20557 2.76012 1.83049 3.29121 4.01543 3.60339 2.25618 2.93084 3.00387 2.91350 5.13196 3.90653  145 m x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

137  3.45721 4.84750 4.60246 4.25116 3.25455 4.30647 4.82696 2.48010 4.01669 0.61229 3.21057 4.50182 4.70238 4.32237 4.14742 3.91942 3.74239 2.58290 5.21913 3.99338  146 L x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

138  2.93817 2.67069 4.68481 4.18313 3.53946 4.10046 4.75953 1.66937 4.02841 2.21923 3.43070 4.30780 4.53502 4.26368 4.18839 3.50339 3.23267 1.79605 5.33129 4.11734  147 i x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

139  2.29882 5.27119 1.52870 2.23954 4.66776 3.28592 3.79149 4.15252 2.73369 3.68680 4.50728 2.04448 3.86022 2.94733 3.28322 2.78198 3.13348 3.72717 5.85985 4.40757  148 d x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

140  3.15064 5.25820 3.55508 2.88396 4.73664 3.74338 3.67737 4.08071 1.04270 3.50477 4.38035 3.27766 4.11261 2.81137 1.80766 3.14123 3.31217 3.76096 5.52670 4.37198  149 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

141  3.40816 4.75217 4.85292 4.34311 3.09177 4.61117 4.89570 2.26808 4.14676 0.85259 2.05263 4.61715 4.79484 4.29520 4.26967 3.97537 3.63147 2.42939 5.19740 4.11945  150 l x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

142  2.55945 4.68963 2.78100 2.56828 4.48999 2.37674 3.94151 3.96792 2.83943 3.55732 4.37155 1.55241 3.81925 3.12580 3.28472 2.12940 2.94710 3.47910 5.73885 4.39661  151 n x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

143  2.99914 4.90791 2.30480 2.76983 3.00848 3.60972 3.75167 3.52536 3.01195 3.09501 4.09139 3.22969 4.10908 3.27543 3.41615 3.05013 3.26541 3.28148 4.58528 1.27355  152 y x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

144  3.29556 4.62665 4.90595 4.33096 2.59248 4.53341 4.79702 2.24923 4.20724 0.91780 2.52035 4.55917 4.72247 4.27733 4.30484 3.86848 3.51279 2.14765 5.09987 4.08236  153 l x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续14)

```
145 2.17096 4.21419 3.84787 3.43154 3.79650 3.33039 4.28864 2.69630 3.37015 2.76848 3.74222 3.59524 3.96586 3.66357 3.63549 2.20214 2.86866 1.31191 5.31213 4.10659 154 v x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
146 2.61873 4.56711 2.49746 2.62150 2.54151 3.48105 3.72676 3.12886 2.64418 2.44266 3.67062 2.87605 3.88802 2.96699 3.06722 2.50384 2.85697 2.86649 5.06674 3.74446 155 l x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
147 2.95423 5.17668 2.96388 2.59181 4.58584 3.52071 3.72228 4.02499 1.18162 3.51906 4.36953 2.41695 3.98977 2.86856 2.48507 2.93851 3.18628 3.66369 5.59027 4.31134 156 k x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
148 2.73726 5.22229 1.97298 2.08533 4.53610 3.35118 3.65602 4.01528 2.05145 3.51394 4.29017 2.59530 3.62528 2.77878 2.96801 2.69413 2.50700 3.59823 5.66699 4.24509 157 d x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
149 2.03309 4.62433 3.24659 2.71186 3.69367 3.50560 3.77919 2.58029 1.64218 2.87182 3.77503 3.16740 3.93039 2.98235 2.88438 2.78157 2.91657 2.84118 5.23942 3.96807 158 k x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
150 2.66436 5.05521 2.60574 2.32501 4.37480 3.05953 3.62231 3.83346 2.03664 3.38650 4.13392 2.86843 2.77613 2.57821 2.86968 2.26831 2.89393 3.43870 5.52887 4.14122 159 k x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
151 2.45516 4.65515 2.83251 2.27433 3.85749 3.45616 3.67372 2.74916 2.51886 2.89673 3.73760 3.02814 3.45744 2.69890 2.96217 2.67199 2.82671 2.56871 5.18488 3.44681 160 e x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
152 2.54095 5.22751 2.05657 2.09956 4.53900 2.72452 3.23685 4.02352 2.47061 3.51907 4.29107 2.42978 3.81873 2.54406 2.98671 2.67398 2.97396 3.60276 5.67128 4.24276 161 d x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
153 2.51942 5.11682 2.63318 1.62723 4.44834 3.36186 3.68488 3.90247 2.47948 3.43681 4.23572 2.86400 3.64374 2.35245 2.95156 2.31369 2.99051 3.51410 5.61415 4.22408 162 e x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
154 2.16985 4.61145 3.09632 2.40836 3.88792 3.41610 3.72368 3.27105 2.57488 2.54815 3.77386 3.06033 2.71256 2.91875 3.00480 2.47260 2.65145 2.97467 5.22034 3.92506 163 a x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
155 2.39475 2.97704 3.96472 3.69029 4.37241 0.84249 4.55555 3.75317 3.63702 3.52262 4.40740 3.66215 3.66165 3.92661 3.84678 2.60642 2.90713 3.24795 5.69952 4.57833 164 g x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续15)

```
156 2.35097 4.30977 3.31116 3.15916 4.52972 1.07068 4.38135 4.02206 3.36211 3.69210 4.51868 3.35191 3.78837 3.63052 3.67333 1.93335 2.85784 3.40671 5.84392 4.61899
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  165 g x - -

157 2.65545 4.41259 4.63599 4.08371 3.36969 4.29418 4.70034 1.63146 3.96649 1.32243 3.20362 4.31394 4.59335 4.17608 4.14456 3.62911 3.28863 1.76260 5.23685 4.08810
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  166 l x - -

158 2.71956 4.33890 3.73638 3.22868 3.16705 3.68619 3.94680 2.70117 3.09712 1.42761 3.38439 3.54582 4.09791 3.42579 3.36745 2.47016 2.97375 2.53951 4.74178 3.01118
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  167 l x - -

159 2.76768 5.12938 2.96240 2.46606 4.47331 3.47820 2.87086 3.90813 1.93578 3.39755 4.18948 2.07407 3.87874 2.51671 2.40370 2.74215 2.98362 3.52743 5.51969 4.19068
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  168 k x - -

160 1.37585 4.29292 3.39773 3.07118 4.34644 1.98110 4.18978 3.75830 3.14512 3.43045 4.25147 3.30470 2.56866 3.43442 3.49819 2.48834 2.78835 3.23771 5.67187 4.44252
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  169 a x - -

161 3.02229 4.40597 4.40912 3.87549 2.39874 4.07601 3.96792 2.13483 3.74136 1.81418 3.27223 3.98839 4.39754 3.89088 3.88141 3.38420 3.22936 2.49214 4.32256 1.64239
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  170 y x - -

162 3.11472 5.09110 3.10202 2.86933 4.29287 3.55534 4.02691 3.97194 2.67386 3.44747 4.47621 3.32828 4.11766 0.83657 2.94936 3.15533 3.41531 3.66785 5.52256 4.23682
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  171 q x - -

163 3.25990 4.63815 4.76095 4.25894 3.23718 4.43615 4.86912 2.13515 4.07832 0.90310 3.07228 4.50043 4.72826 4.29385 4.23416 3.82510 3.51080 1.81519 5.27504 4.12362
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  172 l x - -

164 1.85833 4.22873 3.57849 3.21306 4.23610 3.05494 4.23617 3.57026 3.20999 3.31182 4.15520 3.38055 3.77537 3.51029 3.52734 1.99244 1.38254 3.10000 5.60168 4.39007
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  173 t x - -

165 2.46320 4.89465 2.81374 2.25659 4.17168 3.07741 3.67031 3.60327 2.48486 3.19186 4.00181 1.97943 3.83093 2.82114 2.95375 2.50772 2.89837 3.26106 5.41776 3.35455
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  174 n x - -

166 2.64394 4.99445 2.89192 2.26253 4.28999 3.41096 3.19632 3.73287 1.95430 3.27279 4.05561 2.53671 3.02376 2.72996 2.78768 2.63460 2.87405 2.98815 5.45289 4.08923
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.62418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  175 k x - -
```

图12(续16)

```
167  2.61619 4.27971 3.58827 3.03798 2.15204 3.60238 3.86736 2.73193 2.97509 2.28298 3.38516 2.78936 3.31209 3.27035 3.29470 2.87128 2.85744 2.34413 4.79833 3.50872
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.12378 4.13012 2.29911 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                  176 f x - -

168  2.76656 5.22955 2.21192 1.54623 4.53271 3.30675 3.67705 4.00195 2.29710 3.51909 4.31842 2.77860 3.81717 2.80366 3.01753 2.70748 2.66795 3.60007 5.68703 4.26190
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                  177 e x - -

169  2.39752 4.41868 3.05615 2.75881 4.26806 3.09546 3.97498 3.69653 2.85800 3.34888 4.17768 2.57218 3.75565 3.16850 3.24128 1.38557 2.42461 3.23114 5.56961 4.28474
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                  178 s x - -

170  3.21280 4.56369 4.68234 4.15949 1.49609 4.36206 4.34286 2.01905 4.02122 1.53513 3.04677 4.31244 4.61643 4.13852 4.14414 3.70134 3.44132 2.32097 4.63408 3.18555
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                  179 f x - -

171  2.29340 4.93703 3.00985 2.46259 4.25390 3.44614 3.60446 3.66520 1.97124 3.21304 4.02390 2.96669 3.84400 2.25463 2.40817 2.69500 2.67801 3.31905 5.39230 4.07992
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                  180 k x - -

172  2.70076 5.03878 2.77348 2.13629 4.36942 3.38434 3.62158 3.80542 1.74969 3.33565 4.13478 2.57954 3.82526 2.75250 2.73197 2.45263 2.70338 3.43129 5.50223 4.14893
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                  181 k x - -

173  3.20385 4.57353 4.69567 4.13221 3.11738 4.41604 4.73409 2.15790 3.98775 1.68475 2.11667 4.40417 4.64324 4.14950 4.14370 3.75211 3.43178 2.01133 5.14347 4.05788
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.42595 1.05886                                                                                                                  182 l x - -

174  3.01803 4.75986 3.74392 3.67988 4.80222 0.42314 4.77677 4.47208 3.89576 4.09108 5.67443 3.90927 4.15863 4.20000 4.09622 3.19654 3.51923 3.95051 5.82154 4.91548
     2.68621 4.42228 2.77523 2.73126 3.46357 2.40516 3.72498 3.29357 2.67744 2.69358 4.24693 2.90320 2.73743 3.18149 2.89804 2.37873 2.77523 2.98521 4.58480 3.61506
     0.12378 2.21990 4.85247 0.65761 0.72999 0.48576 0.95510                                                                                                                  183 G x - -

175  2.91927 4.97761 3.25795 2.73829 3.86640 3.61768 3.69656 3.63737 1.24955 3.18655 4.09108 3.18554 4.02396 2.91085 2.52947 2.95482 3.13310 3.35563 5.16549 2.76824
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                  186 k x - -

176  3.11412 5.09110 3.10202 2.86933 4.29287 3.55534 4.02691 3.97194 2.67386 3.44747 4.47621 3.32828 4.11766 0.83657 2.94936 3.15533 3.41531 3.69785 5.52296 4.23682
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                  187 q x - -

177  2.55343 2.82729 2.54950 2.53969 4.05060 3.34563 3.73635 3.45954 2.57759 3.08717 3.91175 2.54436 3.81944 2.90991 3.02678 2.19598 2.59010 3.11795 5.34525 4.02985
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37687 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                  188 s x - -
```

图12(续17)

```
178 3.01803 4.75986 3.74392 3.67988 4.80222 0.42314 4.77677 4.47208 3.89576 4.69188 5.07443 3.90927 4.15863 4.20000 4.09622 3.19854 3.51923 3.95051 5.82154 4.91548 189 G x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

179 3.06155 4.39329 4.78365 4.23263 2.16021 4.33412 4.67246 1.62841 4.10828 1.90751 3.18890 4.39366 4.62034 4.26944 4.23350 3.67469 3.30113 1.43472 5.10032 3.86900 190 v x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

180 3.32382 4.61950 4.98332 4.45979 3.28753 4.64349 5.03155 1.26517 4.29749 1.21826 3.69768 4.69351 4.85713 4.47191 4.42929 4.02526 3.56291 1.96875 5.35776 4.22264 191 l x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

181 3.73549 4.95573 4.74114 4.44606 0.87363 4.48219 3.56098 3.36562 4.28496 2.67234 3.96179 4.17516 4.78968 4.23640 4.29912 3.86180 3.95914 3.31077 3.69366 1.60022 192 f x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.65247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

182 3.79040 5.00465 4.71402 4.42808 1.60446 4.49364 3.52625 3.47869 4.27039 2.78842 4.07242 4.15578 4.80367 4.22561 4.29484 3.87395 4.01326 3.40624 3.65813 0.83263 193 y x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

183 3.19145 4.47275 4.91126 4.44612 3.53672 4.59547 5.08862 1.46782 4.33971 1.73199 3.33223 4.65784 4.84848 4.55234 4.50677 3.96712 3.49373 1.13773 5.52283 4.35470 194 v x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

184 2.66032 4.70358 2.89201 2.71275 4.37649 3.24289 4.03083 3.31373 2.90724 3.53686 4.40607 2.30578 1.27476 3.25574 3.28575 2.74778 3.05511 3.47429 5.65434 4.33562 195 p x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89601 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

185 1.11177 4.43010 3.15158 2.91416 4.29503 3.13620 4.12215 3.66913 3.04358 3.39689 4.26035 2.38394 3.82843 3.36664 3.39932 2.59226 2.89066 3.22396 5.63577 4.35750 196 a x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

186 1.66707 4.23549 3.57254 3.09600 3.53286 2.93819 3.96973 3.02262 3.00832 2.73304 3.64079 3.39727 3.92560 3.34213 3.31374 2.74437 2.85584 2.75315 2.31534 3.70083 197 a x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

187 3.03636 4.67833 3.74088 3.27660 1.97138 3.88747 3.62560 3.22234 3.23320 2.77187 3.80630 2.01833 4.26594 3.48346 3.53813 3.18004 3.27114 3.62649 4.08829 1.71684 198 y x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

188 2.57368 4.41659 3.68150 3.45563 4.22088 3.24488 4.45012 3.38072 3.40378 3.23478 4.27482 3.61620 3.97187 3.78716 3.64444 2.77866 0.79961 3.04671 5.63505 4.43998 199 t x - -
    2.68962 4.42820 2.76946 2.72909 3.44175 2.41163 3.73534 3.28233 2.67108 2.69357 4.24270 2.90231 2.74776 3.18548 2.89789 2.38231 2.77429 2.98669 4.58393 3.60445
    0.77820 0.62931 4.85247 4.93718 0.00720 0.48576 0.95510

189 2.34772 4.94441 2.66757 2.37110 4.27936 3.37475 3.63060 3.72621 2.00200 3.27535 4.05913 2.93201 3.04389 2.75731 2.87717 2.32649 2.66578 3.34373 5.46649 4.09730 368 k x - -
    2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
    0.06522 4.13012 3.03667 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续18)

```
190  2.59936 4.86888 2.56716 2.23542 4.12945 3.39969 3.61039 2.96161 2.39491 3.13815 3.93771 2.76963 3.79678 2.74762 2.66034 2.33674 2.83172 2.98448 5.35908 4.00695 383 e x - -
     2.68604 4.42148 2.77528 2.73118 3.46362 2.40503 3.72503 3.29362 2.67734 2.69363 4.24698 2.96355 2.73748 3.18155 2.69793 2.37895 2.77502 2.96527 4.58485 3.61511
     0.33384 1.28645 4.81145 0.67416 0.71251 0.45781 1.00149
191  2.68036 4.31650 3.67103 2.81492 3.38068 3.68855 3.96643 2.60940 3.01245 1.67084 2.68879 3.46528 4.06363 3.33286 3.31726 2.96036 2.48217 2.44049 4.92329 3.73346 382 l x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
192  2.86758 5.00010 2.69683 2.00634 4.47213 3.36349 3.93367 2.91231 2.78366 3.51679 4.40492 3.04389 1.30471 3.12953 3.19614 2.86931 3.18621 3.54917 5.69636 4.37751 393 p x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
193  2.48816 4.46675 3.32226 2.75565 3.64955 3.54876 3.76598 2.15028 2.28234 2.67128 3.22530 3.26292 3.93135 2.55675 2.99465 2.79185 2.86433 2.73160 5.04781 3.79490 394 i x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
194  3.01930 5.54036 1.12507 2.18414 4.85788 3.27649 3.87196 4.43346 2.92425 3.94076 4.80680 2.02289 3.92019 3.05005 3.52811 2.91092 3.32909 3.99195 6.06203 4.54735 395 d x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
195  1.21680 4.20767 3.73048 3.32624 3.99876 3.15480 4.25646 3.12410 3.28210 3.02814 3.96184 3.47554 3.84451 3.57818 3.57362 2.25958 2.79889 2.18642 5.44342 4.23225 396 a x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
196  2.88311 5.23726 1.11531 2.27500 4.72078 3.25164 3.89736 4.24858 2.92274 3.61028 4.66908 2.83251 3.89745 3.08037 3.48665 2.21708 3.22114 3.89375 5.95727 4.49262 397 d x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
197  1.26905 4.60055 3.16350 2.86497 4.20035 3.31747 3.93453 3.49765 2.16375 3.21150 4.09859 3.26188 3.89981 3.14297 2.98828 2.72846 2.96313 3.15181 5.48900 4.22672 398 a x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
198  2.96076 4.95199 2.80656 2.60222 4.35872 3.37616 4.16775 4.13369 3.09325 3.75289 4.71266 0.77153 4.04408 3.44256 3.45107 3.02220 3.35515 3.72910 5.63500 4.29369 399 n x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
199  2.36691 4.30415 3.42101 3.22074 4.45463 1.08162 4.34878 3.82969 3.33914 3.55988 4.41773 3.39733 3.80625 3.63121 3.62665 2.54279 2.11455 3.29410 5.78088 4.58033 400 g x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
200  1.01231 4.21149 3.69437 3.39205 4.25560 3.06210 4.37555 3.39122 3.37438 3.27301 4.18698 3.46173 3.81120 3.67983 3.64597 2.52167 2.13480 2.97312 5.67226 4.47653 401 a x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
201  3.64057 5.02418 4.22926 4.01381 2.35214 4.13864 3.77069 3.61657 3.86458 3.00194 4.26579 4.05560 4.60959 4.10694 3.99216 3.74852 3.93027 3.50018 4.00336 0.62549 402 y x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.96347 2.73739 3.18146 2.89001 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510
```

图12(续19)

```
202  2.62993 3.52496 3.07354 2.59904 3.87091 3.41411 2.46101 3.42614 2.54719 3.05316 3.90265 1.95736 3.87304 2.93930 2.94760 2.70504 2.89868 3.11113 5.21456 3.85323
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  403 n x - -

203  3.21397 4.53943 4.82960 4.32329 2.42039 4.45252 4.69425 1.09496 4.19513 1.81950 3.17868 4.49220 4.72731 4.34887 4.32368 3.82245 3.45900 2.01124 5.03219 3.69984
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  404 i x - -

204  0.94185 4.23506 3.56526 3.33878 4.42626 2.18549 4.40088 3.78137 3.42743 3.53049 4.38019 3.44407 3.78668 3.70036 3.70886 2.56027 2.81745 3.23903 5.77230 4.58914
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  405 a x - -

205  2.85694 4.77935 3.46508 2.83873 3.97616 3.65384 3.72719 3.32276 1.84885 1.78242 3.84399 3.25604 4.02534 2.92215 2.17052 2.95660 3.06030 3.09576 5.22701 4.09132
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  406 l x - -

206  3.14028 5.23801 3.50077 2.87515 4.70334 3.72380 3.69471 4.06176 0.98585 3.49959 4.38085 3.27386 4.10904 2.83323 1.96379 3.13550 3.31219 3.74318 5.52822 4.36511
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  407 k x - -

207  2.67885 4.47227 3.58015 3.25655 2.39212 1.16523 4.12073 3.29709 3.29298 2.96097 3.96095 3.52945 4.02182 3.58712 3.59356 2.87133 3.05501 3.02217 5.00616 3.57046
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  408 g x - -

208  2.64729 4.23826 3.74810 2.86016 3.31643 3.68552 3.96290 2.37556 3.08388 1.68329 2.72124 3.51936 4.05544 3.37606 3.36860 2.72203 2.88008 2.39600 4.84572 3.63819
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  409 i x - -

209  2.88509 4.27476 4.44696 3.89929 2.10846 3.97358 3.92049 2.61294 3.74414 1.61599 2.87834 3.95097 4.30909 3.87098 3.83636 3.29211 3.11239 2.50277 2.65199 2.43894
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.12378 4.13012 2.29911 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                  410 l x - -

210  2.42592 3.64613 3.42248 2.60414 3.44651 3.53744 3.73551 2.59699 2.80627 2.37899 3.40537 3.26812 3.91994 2.83286 3.16409 2.78334 2.58673 2.25173 4.89111 3.63402
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                  411 v x - -

211  3.17764 4.50887 4.80002 4.23209 3.16618 4.45226 4.79088 1.78751 4.11385 1.26554 2.33995 4.47167 4.67006 4.24133 4.24664 3.78832 3.40376 1.86347 5.17360 4.09414
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                  412 l x - -

212  2.64523 5.02815 2.42652 2.09815 4.32939 3.37640 3.58960 3.77911 2.32216 2.92228 4.08849 2.86230 3.79336 2.54985 2.26075 2.62461 2.87684 3.39700 5.47593 4.18230
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                  413 e x - -
```

图12(续20)

```
213  2.30673 4.81816 3.04461 2.49501 4.08454 3.44943 3.62735 3.47609 1.93304 3.07805 3.32416 2.99355 3.84576 2.38092 2.68787 2.69182 2.88226 3.16310 5.30601 4.00145
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876                                                                                                                414 k x - -

214  3.19591 4.51559 4.81138 4.26499 3.27809 4.50469 4.88072 1.17895 4.11789 1.57119 2.71737 4.51549 4.73600 4.31505 4.27310 3.85900 3.43250 1.89082 5.29473 4.16204
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.42595 0.80876                                                                                                                415 i x - -

215  2.47118 5.05350 2.64260 2.34706 4.37713 3.39466 3.60997 3.83157 1.82834 3.35018 4.12420 2.70189 3.01055 2.72699 2.59653 2.33677 2.80985 3.43768 5.51192 4.13451
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                416 k x - -

216  2.71968 5.12949 2.40828 1.90371 4.52281 3.36913 3.63478 3.99830 2.01513 3.48905 4.25945 2.83710 3.82207 2.24433 2.87931 2.43146 2.95837 3.58113 5.63214 4.22307
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.12542 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                417 e x - -

217  2.70563 5.08280 2.72526 1.81733 4.40005 3.37674 3.61504 3.84456 2.04084 3.36499 4.15850 2.86396 3.81892 2.50173 2.75650 2.49850 2.70999 3.46333 5.52640 4.15933
     2.68621 4.42228 2.77523 2.73126 3.46357 2.40516 3.72498 3.29357 2.67744 2.69346 4.24693 2.90350 2.73743 3.18149 2.89804 2.37890 2.77523 2.98521 4.58480 3.61413
     0.48236 1.48149 1.86160 0.24325 1.53282 0.59106 0.86685                                                                                                                418 e x - -

218  2.59353 4.79690 2.67462 2.39960 4.03523 3.38615 3.57486 3.46673 2.18043 3.05450 3.87241 2.71239 3.78392 2.72563 2.37286 2.61976 2.82132 3.14179 3.78491 3.93793
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.03139 3.87271 4.59503 0.61958 0.77255 0.62882 0.76190                                                                                                                420 k x - -

219  2.52813 4.55478 3.02236 2.36450 3.27698 2.75979 3.67661 3.21874 2.54144 2.87223 3.71868 3.00594 3.25523 2.87609 2.97424 2.46189 2.52673 2.92315 5.16358 3.86760
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02940 3.95733 4.65968 0.61958 0.77255 0.38381 1.14338                                                                                                                421 e x - -

220  2.81850 5.32045 1.81142 1.80479 4.62843 3.32155 3.71734 4.11544 2.60206 3.62089 4.41791 2.50029 3.05095 2.85519 3.14055 2.74846 2.31278 3.69623 5.78456 4.33646
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                422 e x - -

221  2.48223 5.16696 2.08814 2.12032 4.49656 2.50746 3.66728 3.97234 2.49704 3.48585 4.26578 2.61630 3.23955 2.79405 3.01207 2.49575 2.96914 3.56038 5.65205 4.23362
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                423 d x - -

222  2.73413 5.21474 1.79968 2.10692 4.52863 2.90567 3.65542 4.00740 2.28828 3.50728 4.28372 2.82078 3.82451 2.77834 2.71209 2.50434 2.97898 3.59247 5.66161 4.24109
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                424 d x - -

223  2.59008 4.17721 3.75666 3.18631 2.49332 3.63941 3.92189 2.43396 3.10578 2.11880 3.28316 3.17384 4.01857 3.37495 3.38090 2.33561 2.83391 2.25094 4.76296 3.53175
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                425 l x - -

224  2.47785 4.87401 2.55453 2.27144 4.13407 3.41474 3.61507 3.19068 2.18624 2.72206 3.93966 2.92825 3.60786 2.75196 2.70025 2.61975 2.65098 3.21651 5.36096 4.01082
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510                                                                                                                426 k x
```

图12(续21)

225 2.61126 4.94527 2.57241 2.37286 3.71167 3.40653 3.59976 3.66836 1.97769 3.22094 4.00500 2.90555 3.37250 2.72400 2.44551 2.60961 2.84179 3.30230 5.41233 3.55985 427 k x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.18397 2.69285 2.29911 0.43489 1.04225 0.48576 0.95510

226 2.18405 4.38164 3.37577 2.81062 3.53544 3.54756 3.79314 2.67818 2.45131 2.41847 3.11038 2.90063 3.92988 3.08382 3.13404 2.78686 2.82814 2.34777 4.96377 3.71691 428 a x - -
2.68606 4.42226 2.77520 2.73124 3.46355 2.40513 3.72495 3.29355 2.67741 2.69356 4.24690 2.90347 2.73740 3.18147 2.89801 2.37888 2.77520 2.98519 4.58478 3.61504
0.18397 2.69285 2.29911 0.43489 1.04225 0.48576 0.95510

227 2.57019 3.69781 2.80661 2.47625 3.49110 3.41201 3.64072 3.31706 2.01030 2.94744 3.77805 2.98079 3.33001 2.81253 2.90900 2.49197 2.80698 3.01391 5.21612 3.90115 430 k x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

228 2.81510 4.36656 4.00610 3.47175 3.23340 3.64296 4.19674 2.40289 3.29514 1.24901 2.79858 3.77015 4.22661 3.61756 3.53563 2.82539 3.07208 2.33413 4.95414 3.73407 431 i x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.08766 4.03302 2.71491 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

229 1.88128 4.80310 2.80372 2.22522 4.13838 3.34167 3.66684 3.53844 2.21992 3.14696 3.97800 2.92546 3.30399 2.83016 2.86040 2.66273 2.88978 3.20322 5.38230 4.05664 432 a x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02833 3.97368 4.69603 0.61958 0.77255 0.54804 0.86294

230 3.19616 4.50286 4.86442 4.32672 3.32366 4.53213 4.94945 1.34551 4.20041 1.37100 3.12115 4.56623 4.76654 4.38591 4.35908 3.89430 3.43719 1.69436 5.35009 4.21795 433 i x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

231 2.51435 4.60512 3.01948 2.57219 4.11628 3.27251 3.75749 3.52378 2.32853 3.14618 3.97173 3.02765 3.09031 2.93367 2.96803 1.83219 2.35460 3.15447 5.38847 4.08634 434 s x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

232 2.81965 5.02540 2.66137 2.42816 3.97065 3.36788 2.54257 3.85565 2.53077 3.39462 4.26560 1.57684 3.89853 2.94122 2.92218 2.81332 3.09474 3.50124 5.31188 3.83925 435 n x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

233 2.46168 4.99954 3.01886 2.47397 4.33955 3.46290 3.60057 3.75117 1.65945 3.27553 4.08408 2.97450 3.32043 2.50538 2.36729 2.72481 2.94535 3.39639 5.42850 4.12348 436 k x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.58952 0.80876

234 2.49023 5.28394 2.04462 1.56446 4.58573 3.29199 3.68128 4.06467 2.33890 3.57462 4.37638 2.75902 3.82022 2.82053 3.07841 2.72239 3.04985 3.65464 5.73993 4.29860 437 e x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02668 4.03302 4.75536 0.61958 0.77255 0.42595 1.05886

235 3.61543 4.88773 4.69185 4.34603 1.69853 4.38489 3.63739 3.27255 4.14768 2.58034 3.86001 4.16132 4.71632 4.18449 4.19510 3.79028 3.84818 3.22423 1.17687 2.08425 438 w x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

236 3.44236 4.76578 4.90063 4.39881 2.22305 4.58884 4.61150 2.36138 4.25018 0.81644 2.97248 4.57671 4.79474 4.32575 4.34281 3.96640 3.66809 2.51693 4.83008 3.45127 439 l x - -
2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

图12(续22)

```
237  2.63160 5.06455 2.57753 1.99002 4.37430 3.37882 3.59680 3.44694 2.25291 3.35417 4.11835 2.51129 3.79111 2.56340 2.84777 2.44737 2.65383 3.43672 5.51681 4.12214   440 e x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46357 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

238  3.76831 4.97197 4.76815 4.48195 0.92834 4.56209 3.54206 3.41176 4.31842 2.71679 4.00275 4.18108 4.80514 4.25091 4.32077 3.88017 3.98943 3.35066 3.66965 1.45400   441 f x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

239  2.20908 4.38551 4.18048 3.62120 3.34372 3.92886 4.31557 2.63681 3.51530 2.07243 1.90374 3.69237 4.29696 3.76814 3.74852 3.23813 3.05757 1.98602 5.03631 3.85870   442 m x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

240  3.11472 5.09110 3.10202 2.86933 4.29287 3.55534 4.02691 3.97194 2.67386 3.44747 4.47621 3.32828 4.11766 0.83657 2.94936 3.15533 3.41531 3.68785 5.52206 4.23662   443 g x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

241  2.31978 4.92267 2.82856 2.13516 4.22950 3.38204 3.65440 3.66362 2.44724 3.23543 4.03605 2.63709 3.81932 2.61691 2.91664 2.45243 2.21674 3.30457 5.44694 4.08783   444 e x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

242  2.70209 4.96265 3.06674 2.49556 4.26277 3.08126 3.61768 3.67682 1.82627 2.94084 4.03017 2.99155 3.86524 2.39896 2.29187 2.70957 2.92053 3.04634 5.40245 4.08740   445 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

243  2.61458 5.00553 2.54503 2.34441 4.30786 3.07626 3.59030 3.76125 2.13203 3.29065 3.50711 2.88290 2.91215 2.56670 2.59515 2.59954 2.84571 3.37367 5.46373 4.08504   446 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.02418 4.13012 4.85247 0.61958 0.77255 0.48576 0.95510

244  2.59290 4.41084 2.99664 2.76200 2.91713 3.18688 3.76435 2.55316 2.40903 2.62745 3.50897 3.20445 3.91327 3.04861 3.11605 2.76595 2.82478 2.69289 4.95676 2.77598   447 k x - -
     2.68618 4.42225 2.77519 2.73123 3.46354 2.40513 3.72494 3.29354 2.67741 2.69355 4.24690 2.90347 2.73739 3.18146 2.89801 2.37887 2.77519 2.98518 4.58477 3.61503
     0.01634 4.12228     * 0.61958 0.77255 0.00000     *
```

图12(续23)

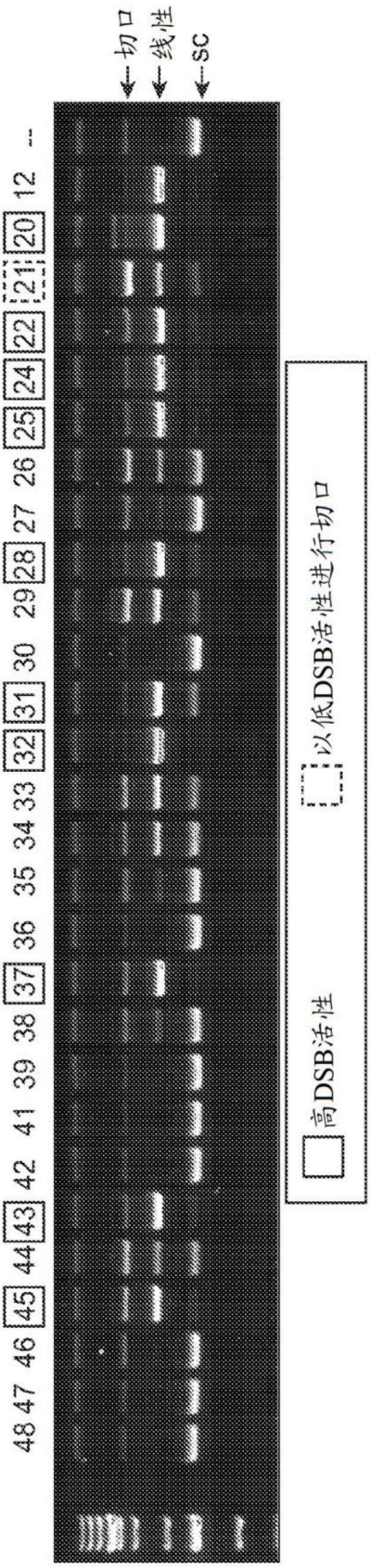

切口
线性
sc
12
20
21
22
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
41
42
43
44
45
46
47
48
高DSB活性
以低DSB活性进行切口

图13A

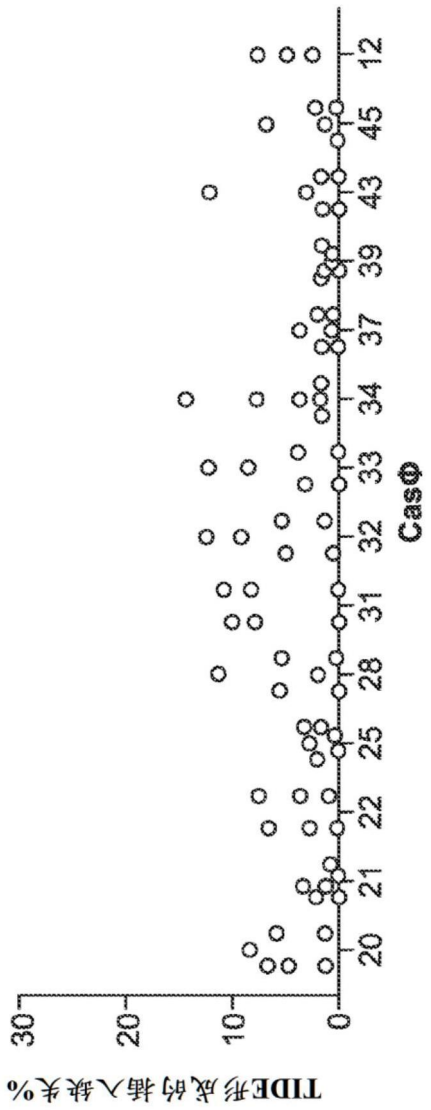

TIDE形成的插入缺失%
30
20
10
0
20
21
22
25
28
31
32
33
34
37
39
43
45
12
Case

图13B

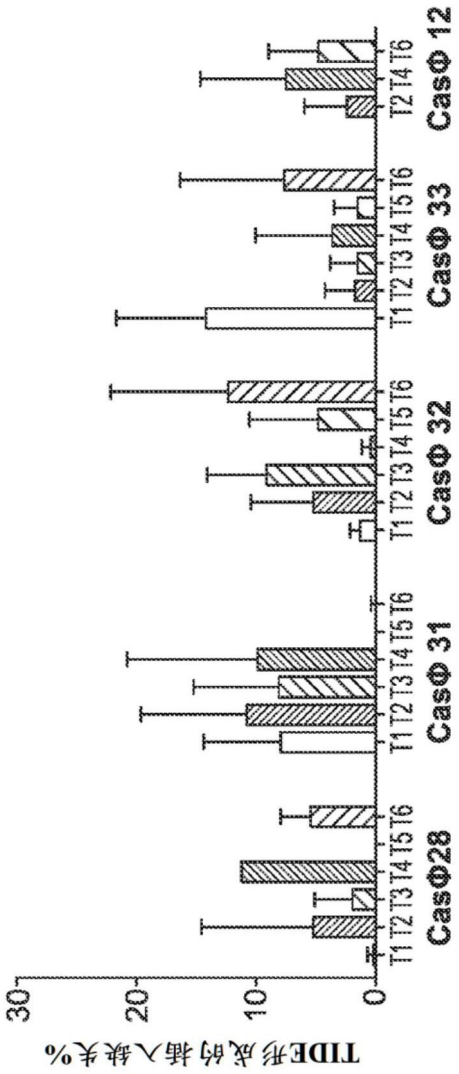

TIDE形成的插入缺失%
30
20
10
0
CasΦ28
CasΦ 31
CasΦ 32
CasΦ 33
CasΦ 12
T1 T2 T3 T4 T5 T6
T2 T4 T6

图13C

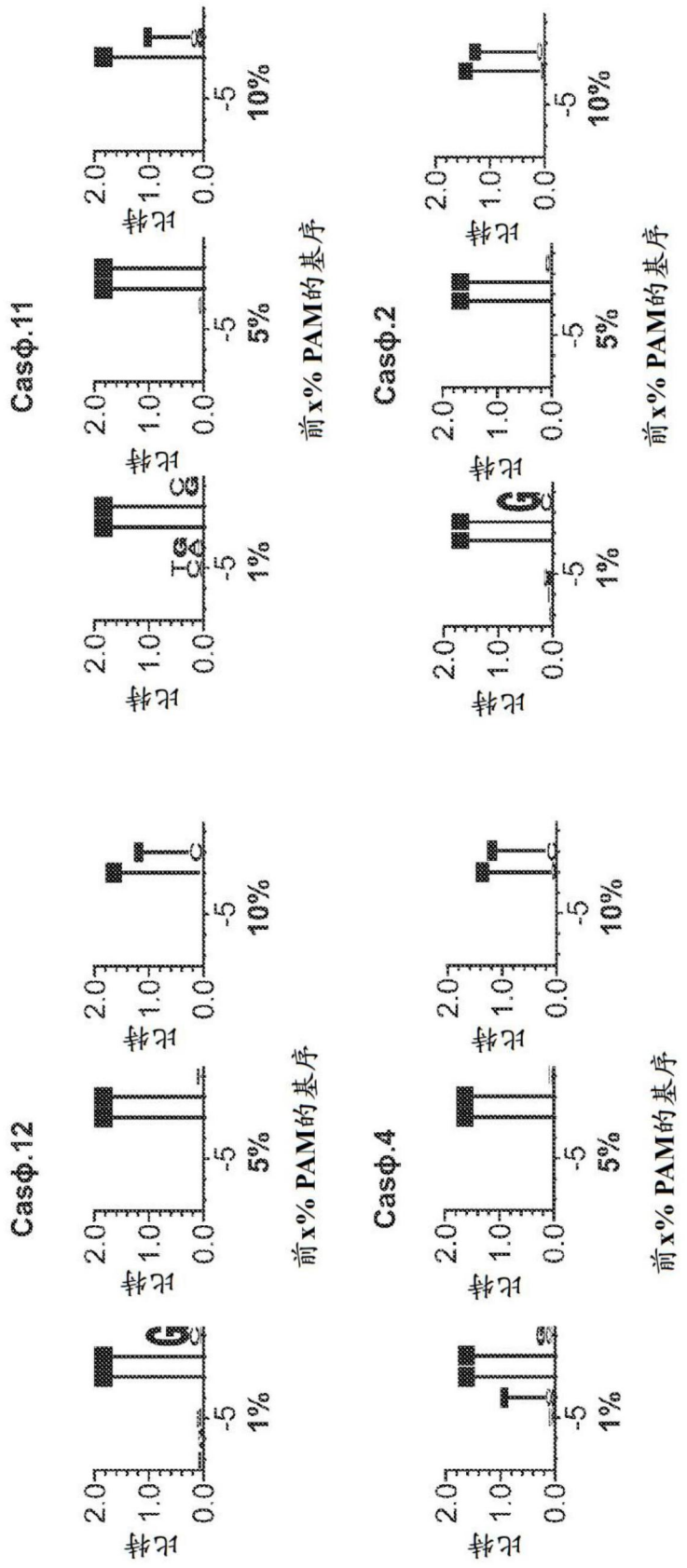


图14A

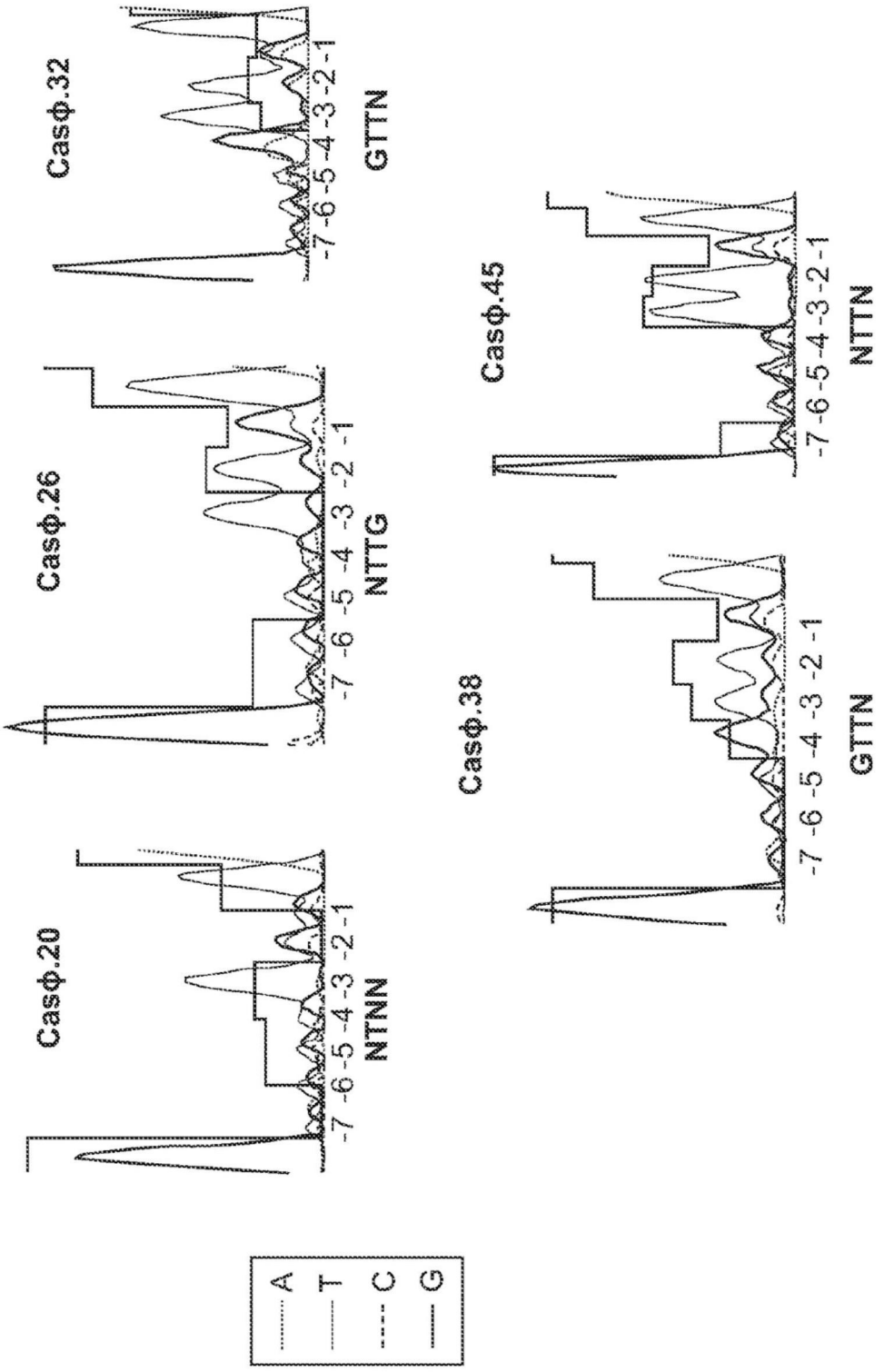

Casϕ.32
GTTN
Casϕ.26
NTTG
Casϕ.20
NTNN
Casϕ.45
NTTN
Casϕ.38
GTTN
-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1
A
T
C
G

图14B

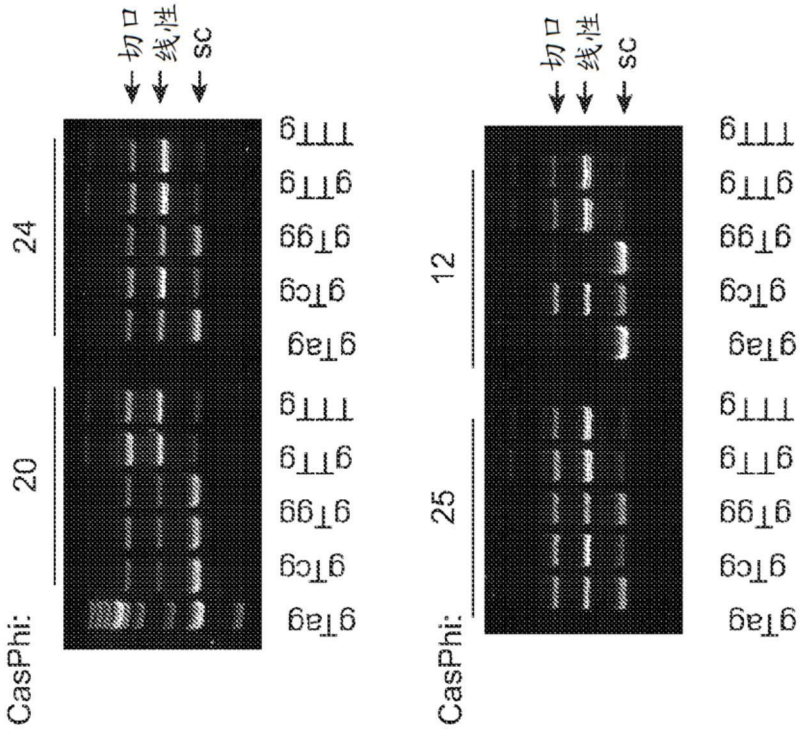

切口
线性
sc
24
20
CasPhi:
gTag
gTcg
gTgg
gTTg
TTTg
12
25
CasPhi:
gTag
gTcg
gTgg
gTTg
TTTg

图14C

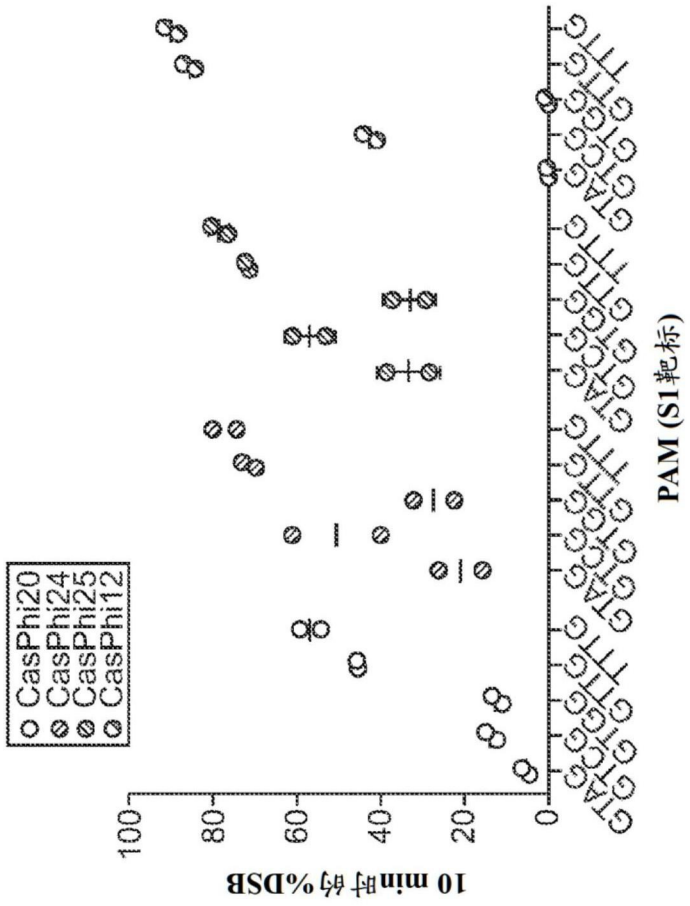

CasPhi20
CasPhi24
CasPhi25
CasPhi12
10 min时的%DSB
100
80
60
40
20
0
PAM (S1靶标)

图14D

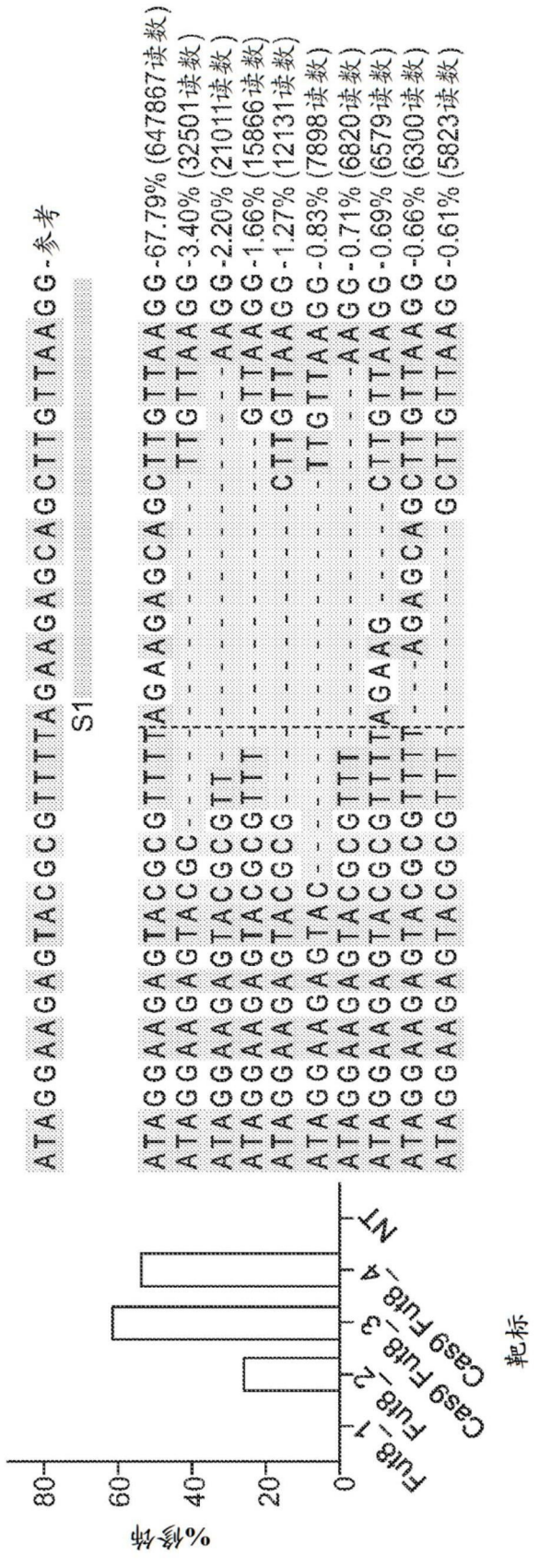

ATAGGAAGAGTACGCGTTTTAGAAGAGCAGCTTGTTAAGG-参考
S1
ATAGGAAGAGTACGTTTAGAAGAGCAGCTTGTTAAGG-67.79% (647867读数)
ATAGGAAGAGTACGC----------TTGTTAAGG-3.40% (32501读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTT----------AAGG-2.20% (21011读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTTT----------GTTAAGG-1.66% (15866读数)
ATAGGAAGAGTACGCG----------CTTGTTAAGG-1.27% (12131读数)
ATAGGAAGAGTAC----------TTGTTAAGG-0.83% (7898读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTTT----------AAGG-0.71% (6820读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTTTTAGAAG----------CTTGTTAAGG-0.69% (6579读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTTTT---AGAGCAGCTTGTTAAGG-0.66% (6300读数)
ATAGGAAGAGTACGCGTTT----------GCTTGTTAAGG-0.61% (5823读数)
%修饰
0
20
40
60
80
NT
Cas9 Fulb_4
Cas9 Fulb_3
Fulb_2
Fulb_1
靶标

图15

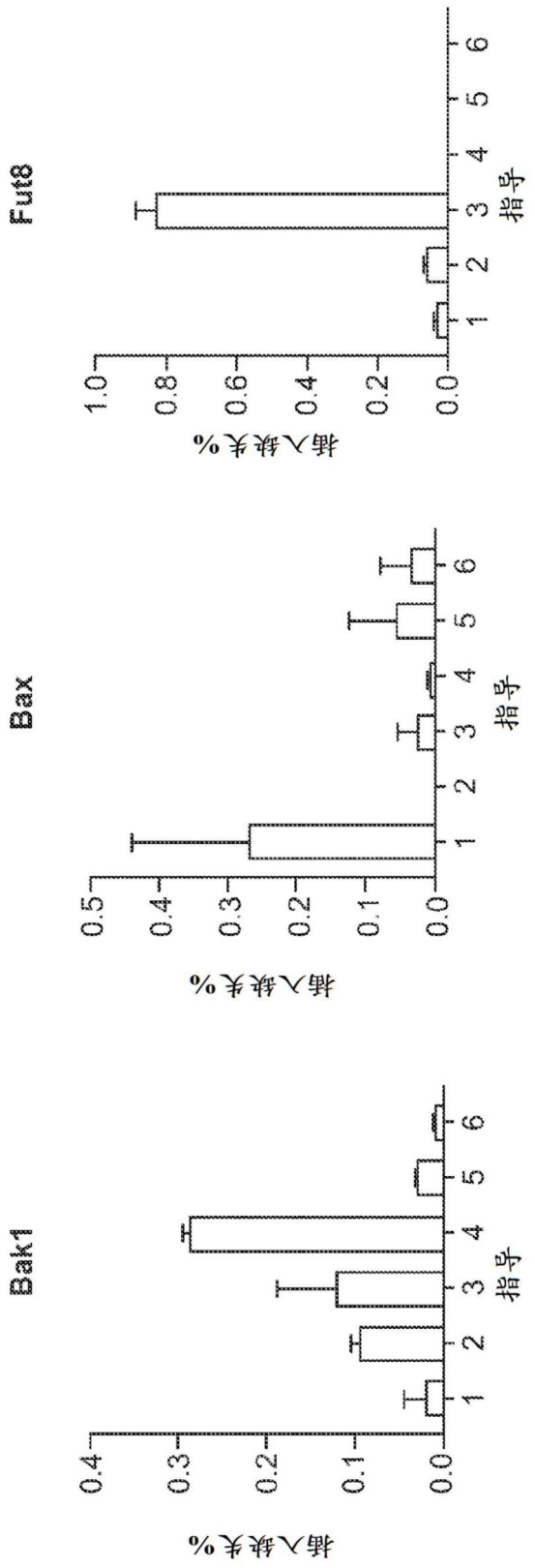

Fut8
插入缺失%
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 2 3 4 5 6
指导
Bax
插入缺失%
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1 2 3 4 5 6
指导
Bak1
插入缺失%
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1 2 3 4 5 6
指导

图16A

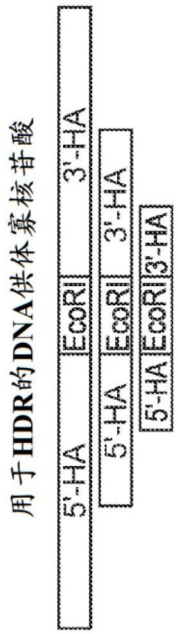

用于HDR的DNA供体寡核苷酸
5'-HA
EcoRI
3'-HA
5'-HA
EcoRI
3'-HA
5'-HA
EcoRI
3'-HA

图16B

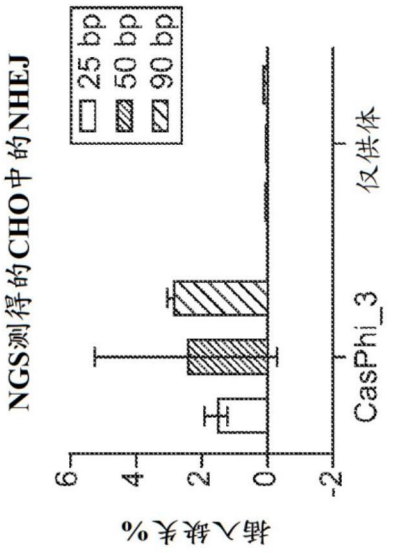

NGS测得的CHO中的NHEJ
25 bp
50 bp
90 bp
插入缺失%
6
4
2
0
-2
CasPhi_3
仅供体

图16C

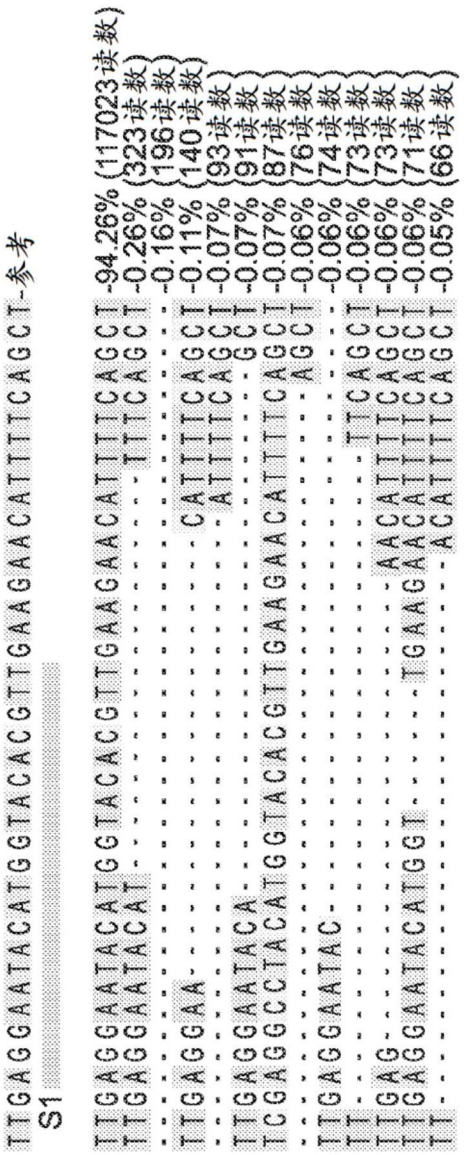

TTGAGGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTCAGCT-参考
S1
TTGAGGAATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTCAGCT -94.26% (117023读数)
TTGAGGAATACAT-----------TTTCAGCT -0.26% (323读数)
TTGAGGAA----------CATTTTCAGCT -0.16% (196读数)
----------ATTTTCAGCT -0.11% (140读数)
TTGAGGAATACA----------GCT -0.07% (93读数)
TCGAGGCCTACATGGTACACGTTGAAGAACATTTCAGCT -0.07% (91读数)
----------AGCT -0.07% (87读数)
TTGAGGAATAC----------TTCAGCT -0.06% (76读数)
TT----------AACATTTCAGCT -0.06% (74读数)
TTGAG----------AACATTTTCAGCT -0.06% (73读数)
TTGAGGAATACATGGT----TGAAGAACATTTCAGCT -0.06% (71读数)
TT----------ACATTTTCAGCT -0.05% (66读数)

图16D

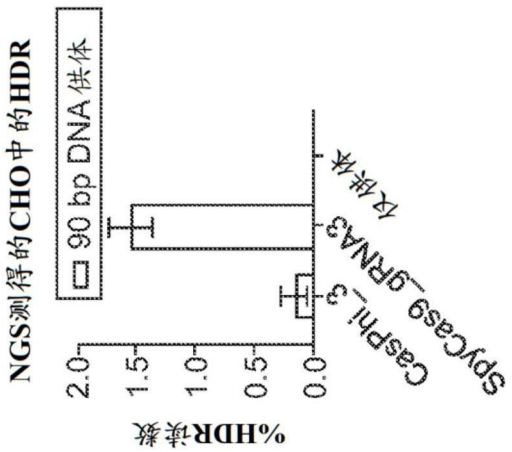

NGS测得的CHO中的HDR
90 bp DNA供体
%HDR读数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CasPhi_3
SpyCas9_gRNA3
仅供体

图16E

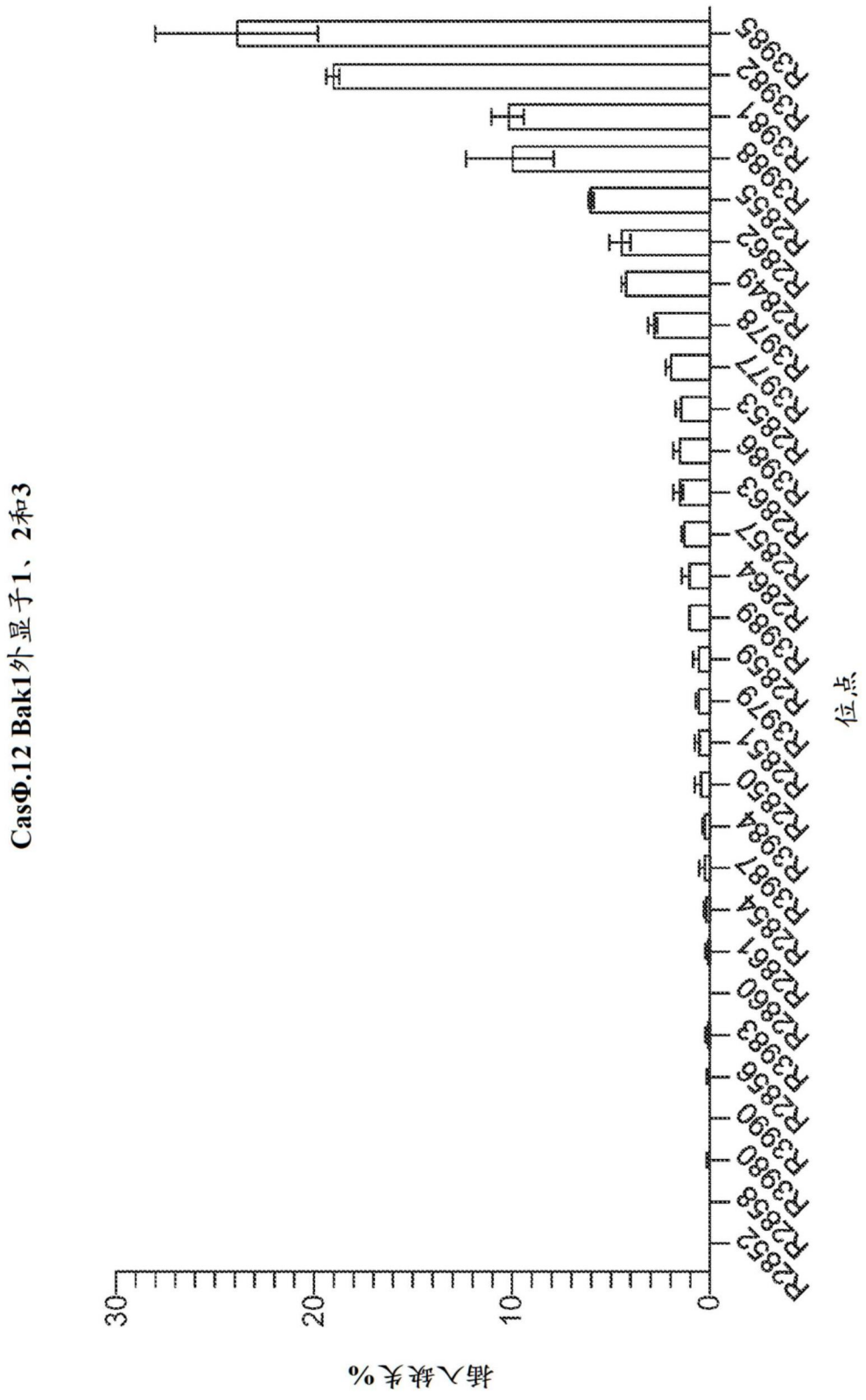

CasΦ.12 Bak1外显子1、2和3
插入缺失%
0
10
20
30
位点
R23985
R23982
R23981
R23988
R23855
R23862
R23849
R23978
R23977
R23853
R23986
R23863
R23857
R23864
R23989
R23859
R23979
R23851
R23850
R23984
R23987
R23854
R23861
R23860
R23983
R23856
R23990
R23980
R23858
R23852

图16F

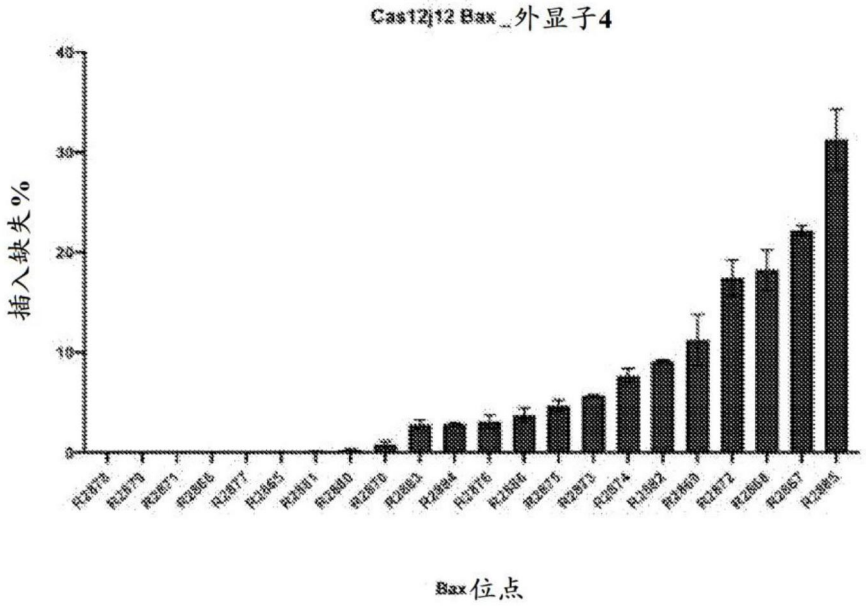


图16G

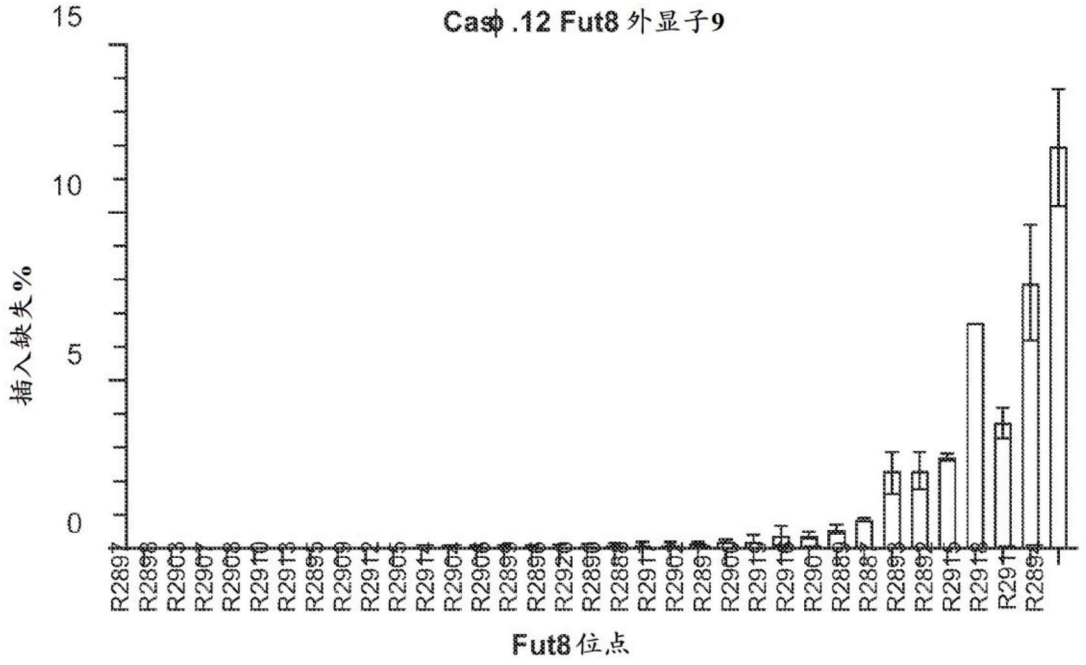


图16H



图16I

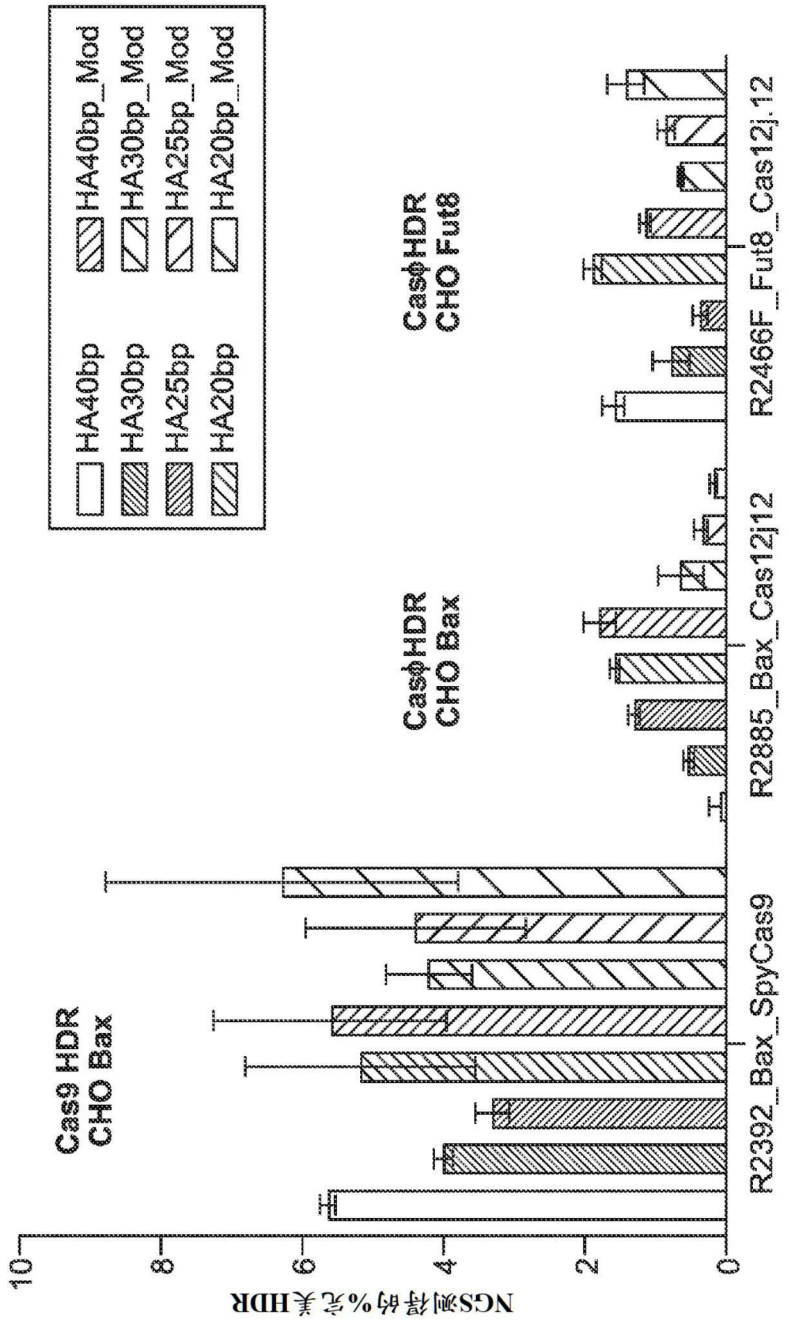

HA40bp
HA30bp
HA25bp
HA20bp
HA40bp_Mod
HA30bp_Mod
HA25bp_Mod
HA20bp_Mod
Cas9 HDR
CHO Bax
CasΦHDR
CHO Bax
CasΦHDR
CHO Fut8
NGS测得的%完美HDR
0
2
4
6
8
10
R2392_Bax_SpyCas9
R2885_Bax_Cas12j12
R2466F_Fut8_Cas12j.12

图16J

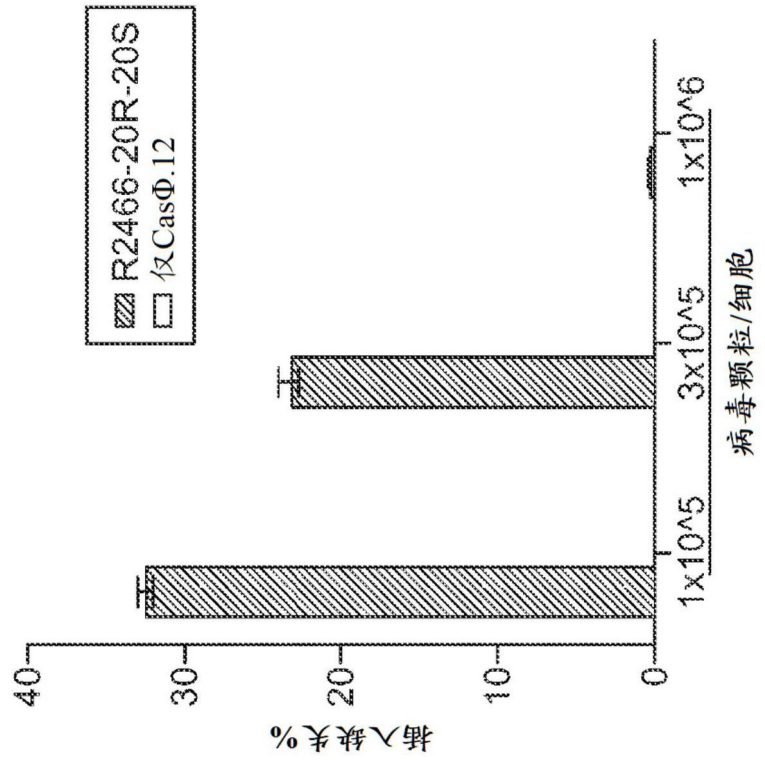

R2466-20R-20S
仅CasΦ.12
插入缺失%
0
10
20
30
40
1x10^5
3x10^5
1x10^6
病毒颗粒/细胞

图16K

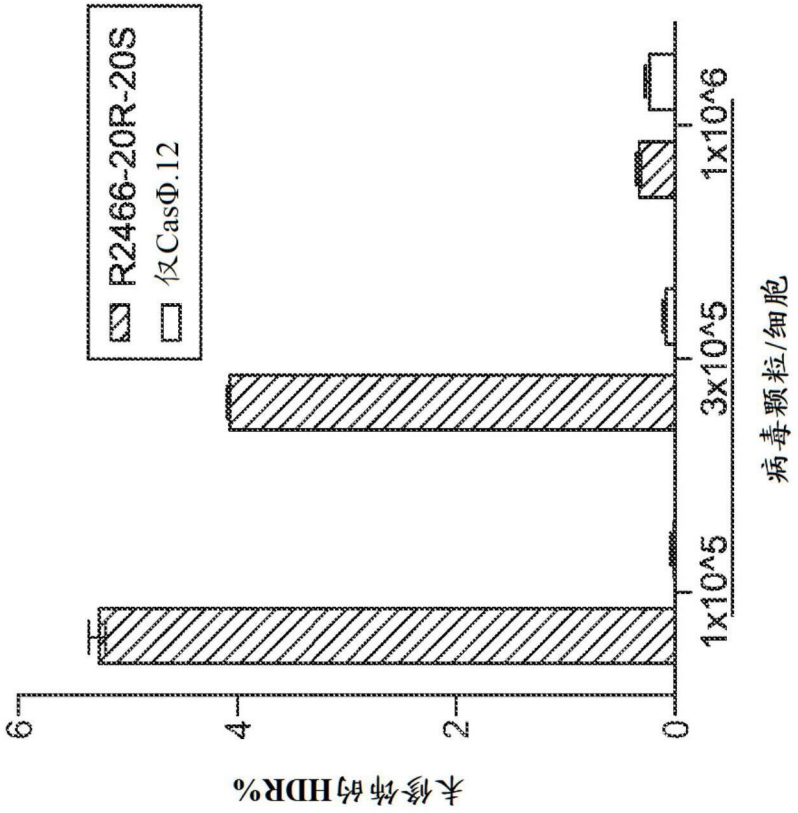

R2466-20R-20S
仅CasΦ.12
未修饰的HDR%
0
2
4
6
1x10^5
3x10^5
1x10^6
病毒颗粒/细胞

图16L

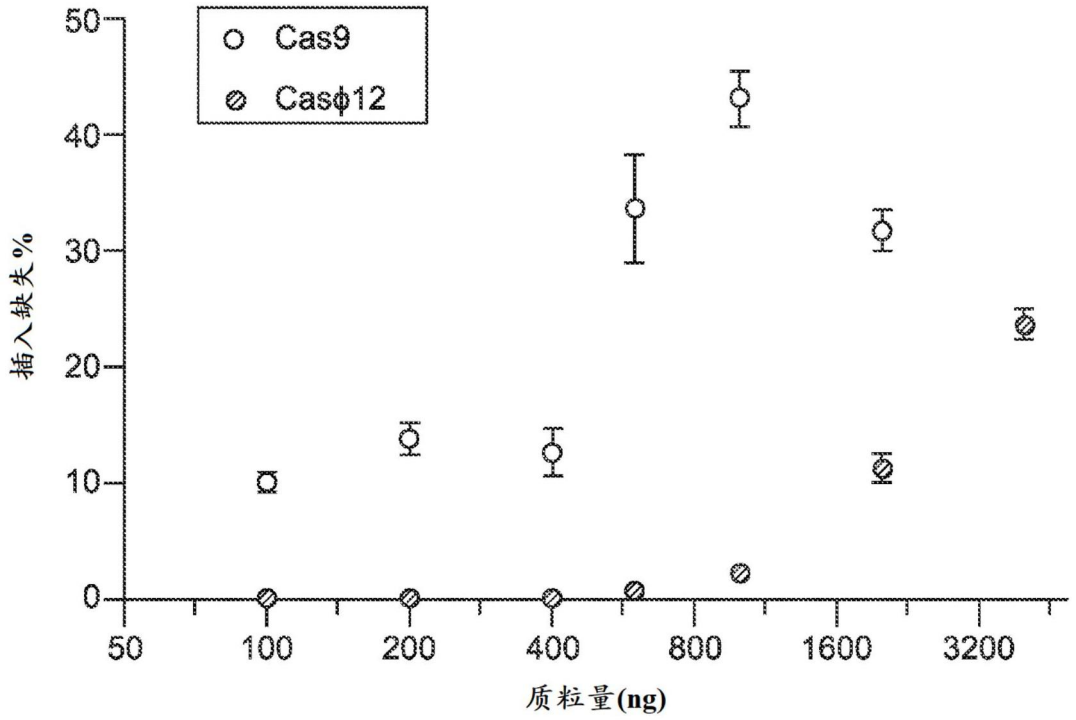

Cas9
Casϕ12
插入缺失%
质粒量(ng)
0
10
20
30
40
50
50
100
200
400
800
1600
3200

图17

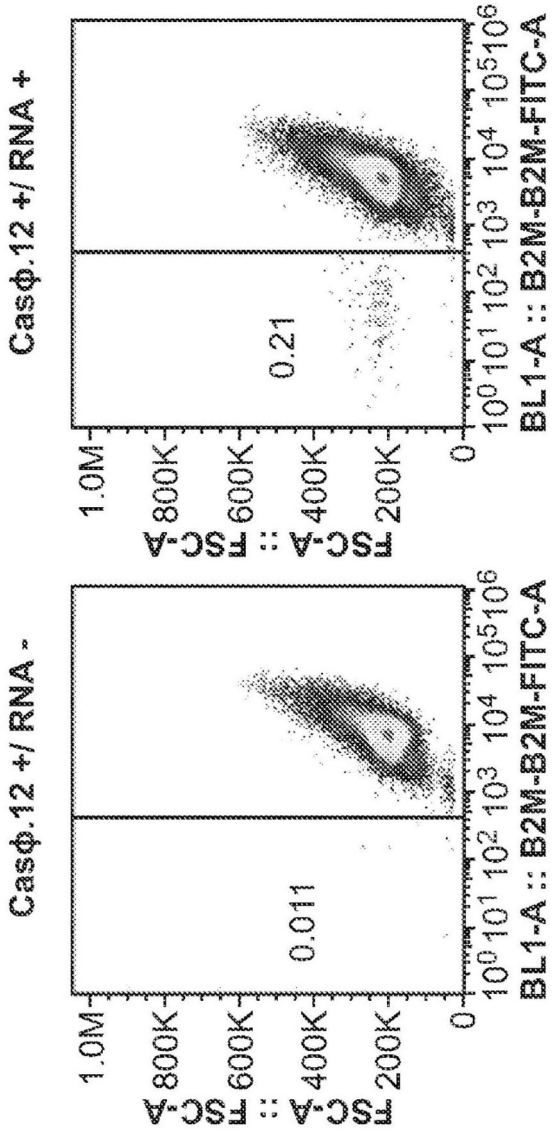

Casφ.12 +/ RNA +
Casφ.12 +/ RNA -
FSC-A :: FSC-A
BL1-A :: B2M-B2M-FITC-A
0.21
0.011
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6

图18A

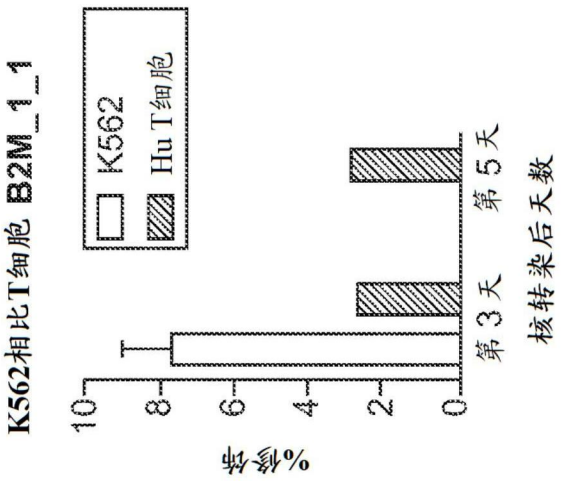


图18B

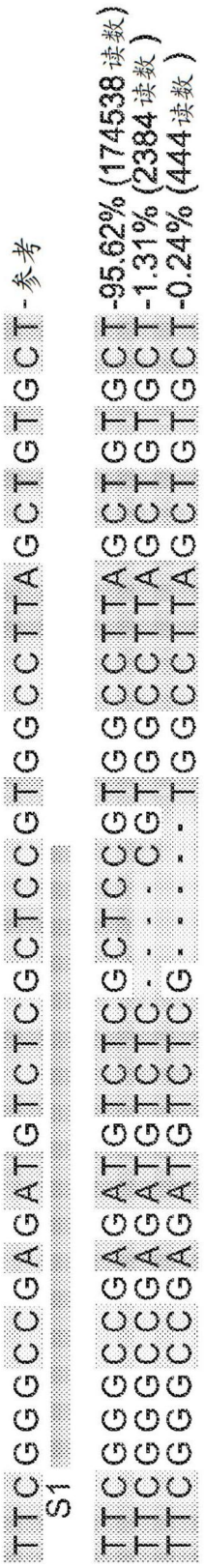

TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT-参考
S1
TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT -95.62% (174538读数)
TTCGGGCCGAGATGTCTC----CGTGGCCTTAGCTGTGCT -1.31% (2384读数)
TTCGGGCCGAGATGTCTCG----TGGCCTTAGCTGTGCT -0.24% (444读数)

图18C

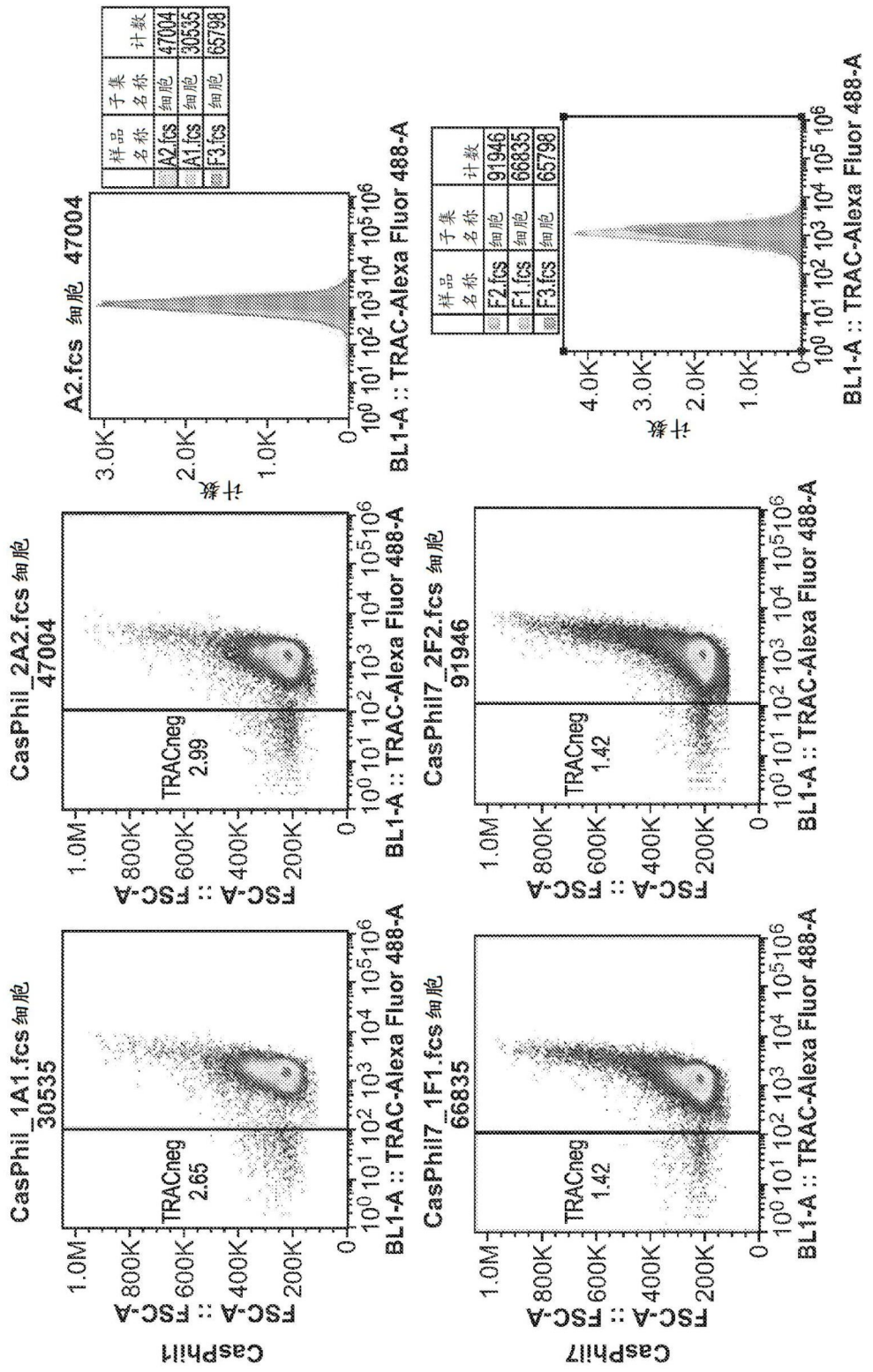

CasPhil1
CasPhil7
CasPhil_1A1.fcs 细胞
30535
CasPhil_2A2.fcs 细胞
47004
CasPhil7_1F1.fcs 细胞
66835
CasPhil7_2F2.fcs 细胞
91946
A2.fcs 细胞 47004
TRACneg
2.65
TRACneg
2.99
TRACneg
1.42
TRACneg
1.42
FSC-A :: FSC-A
BL1-A :: TRAC-Alexa Fluor 488-A
计数
样品名称
子集名称
计数
A2.fcs 细胞 47004
A1.fcs 细胞 30535
F3.fcs 细胞 65798
F2.fcs 细胞 91946
F1.fcs 细胞 66835
F3.fcs 细胞 65798

图18D

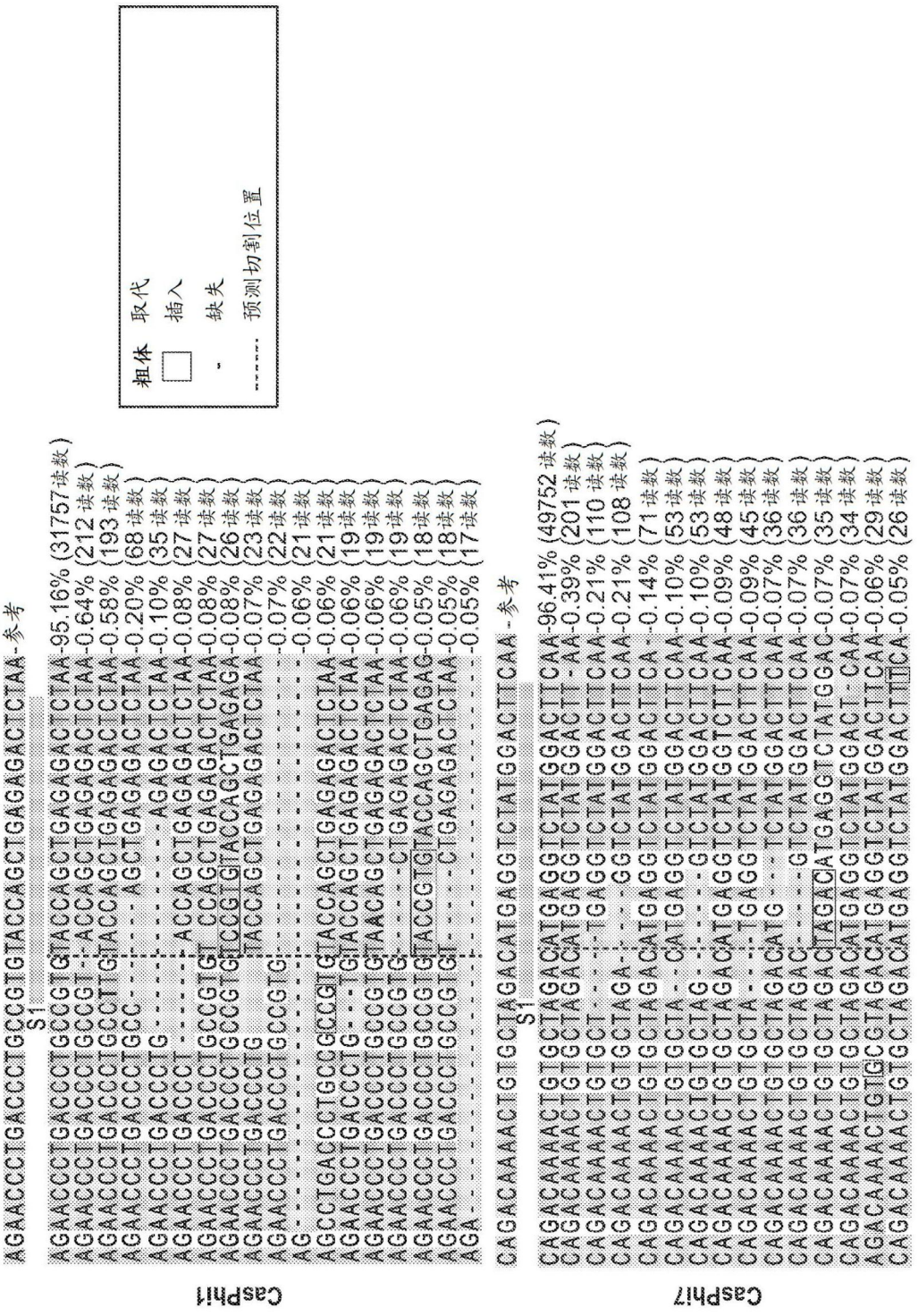


图18E

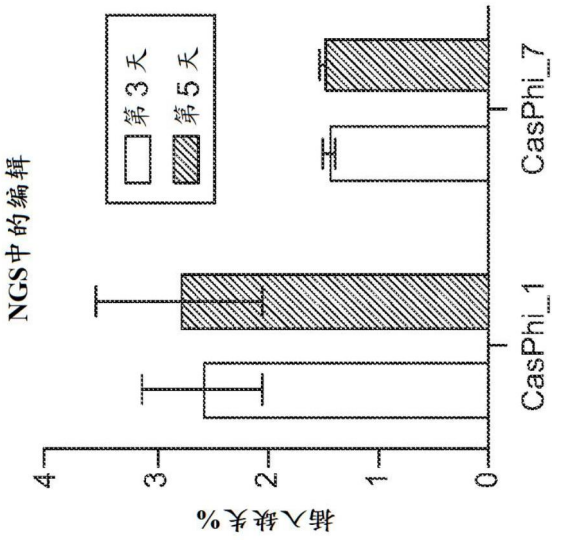


图18F

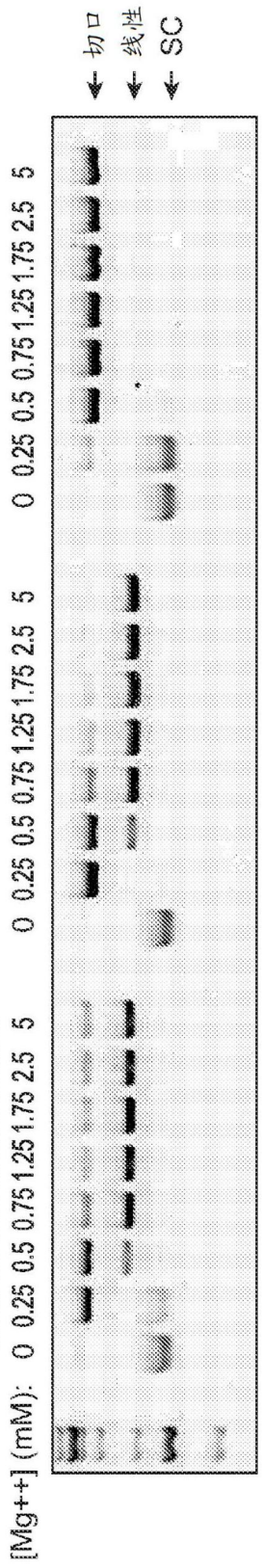

切口
线性
SC
Casϕ18
Casϕ12
Casϕ4
[Mg++] (mM): 0 0.25 0.5 0.75 1.25 1.75 2.5 5
0 0.25 0.5 0.75 1.25 1.75 2.5 5
0 0.25 0.5 0.75 1.25 1.75 2.5 5

图19

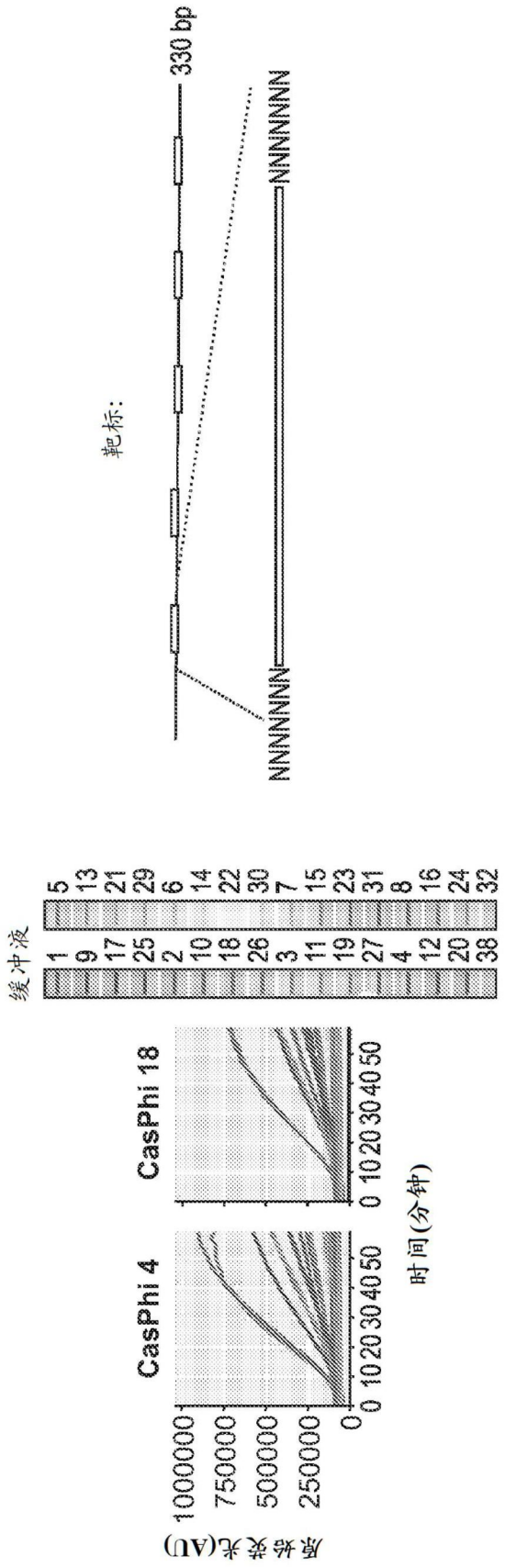

靶标:
330 bp
NNNNNNN
NNNNNNN
缓冲液
1 9 17 25 2 10 18 26 3 11 19 27 4 12 20 38
5 13 21 29 6 14 22 30 7 15 23 31 8 16 24 32
CasPhi 4
CasPhi 18
0 10 20 30 40 50
0 10 20 30 40 50
1000000
750000
500000
250000
0
原始荧光(AU)
时间(分钟)

图20

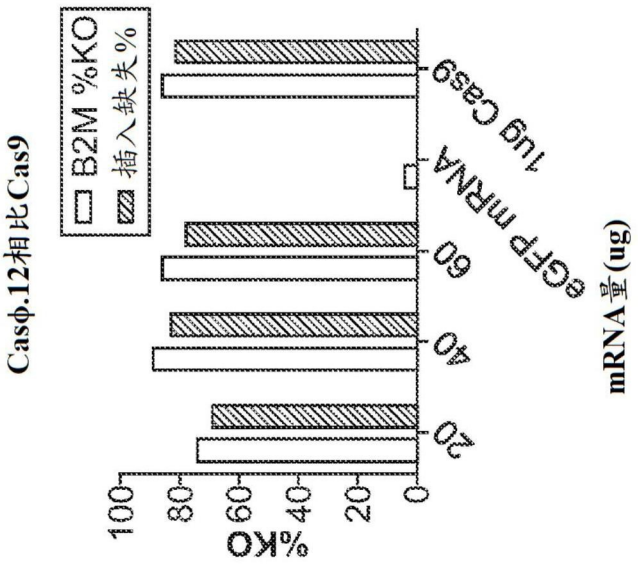

Casϕ.12相比Cas9
B2M %KO
插入缺失%
%KO
100
80
60
40
20
0
20
40
60
eGFP mRNA
1ug Cas9
mRNA量(ug)

图21A

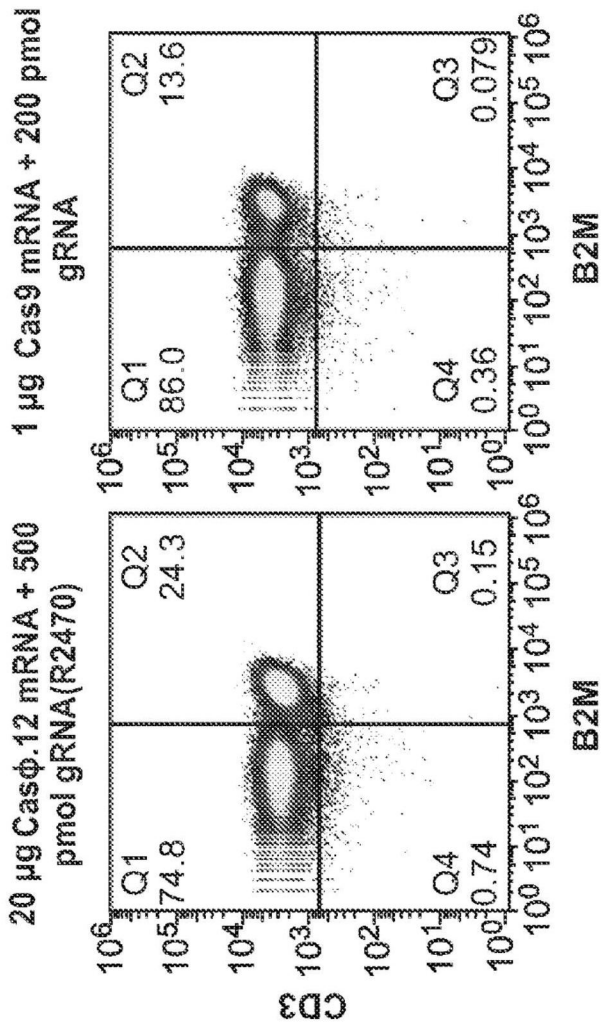

20 µg Casϕ.12 mRNA + 500 pmol gRNA(R2470)
1 µg Cas9 mRNA + 200 pmol gRNA
Q1 74.8
Q2 24.3
Q3 0.15
Q4 0.74
Q1 86.0
Q2 13.6
Q3 0.079
Q4 0.36
CD3
B2M
B2M

图21B

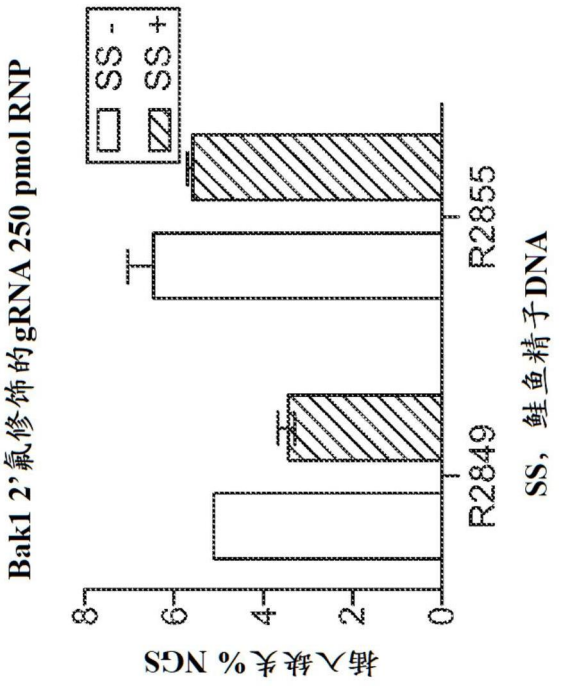

Bak1 2'氟修饰的gRNA 250 pmol RNP
SS -
SS +
R2855
R2849
SS，鲑鱼精子DNA
插入缺失% NGS
0
2
4
6
8

图22A

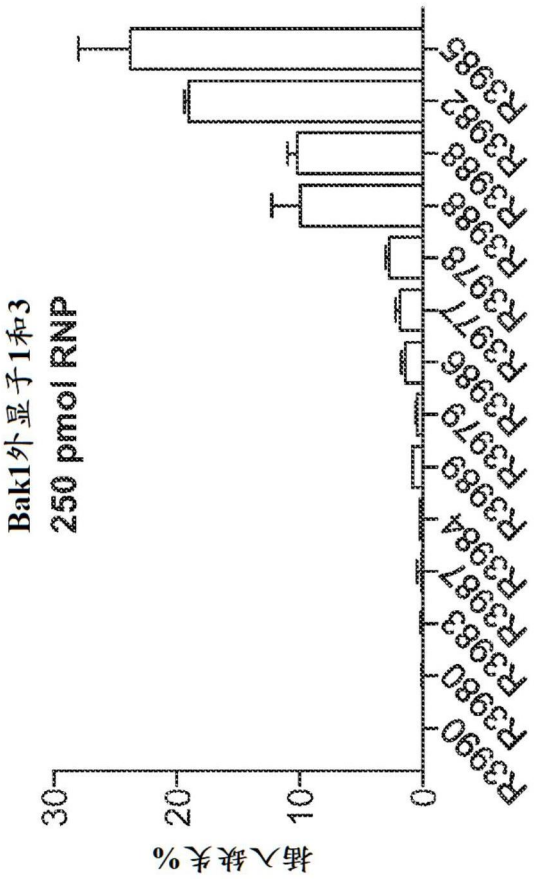

Bak1外显子1和3
250 pmol RNP
R23985
R23982
R23988
R23988
R23978
R23977
R23986
R23979
R23989
R23984
R23987
R23983
R23980
R23990
插入缺失%
0
10
20
30

图22B

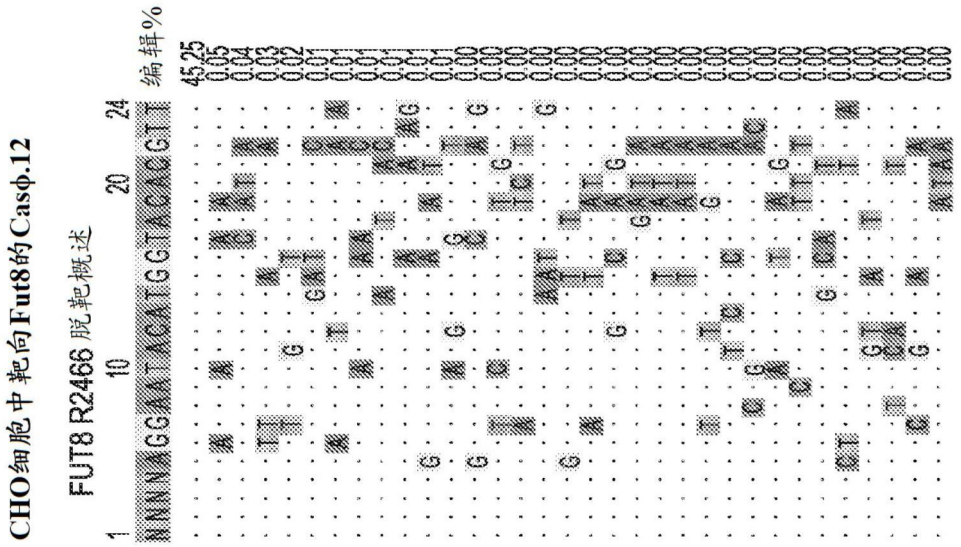

CHO细胞中靶向Fut8的Casϕ.12
FUT8 R2466 脱靶概述
编辑%

图23A

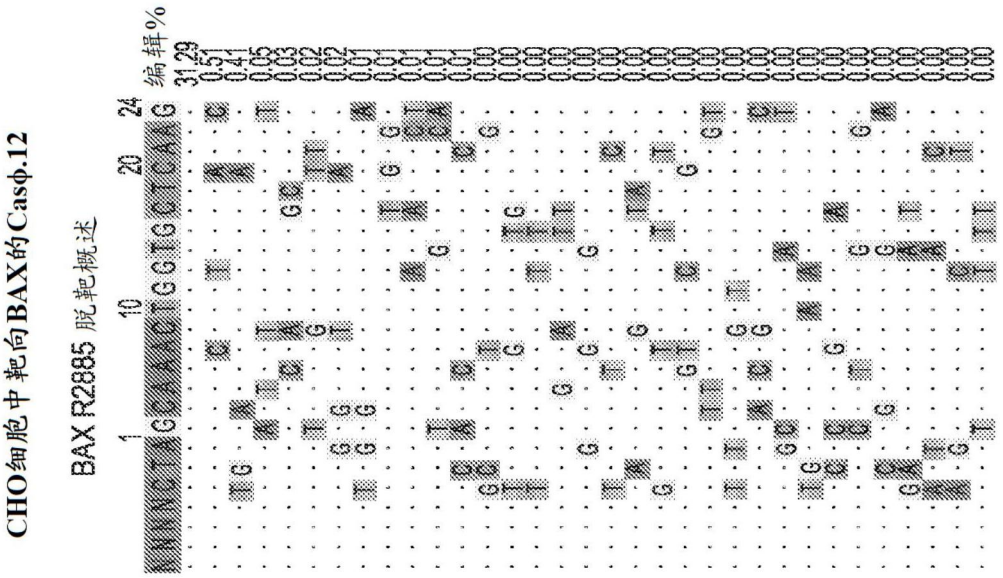

CHO细胞中靶向BAX的Casϕ.12
BAX R2885 脱靶概述
编辑%

图23B

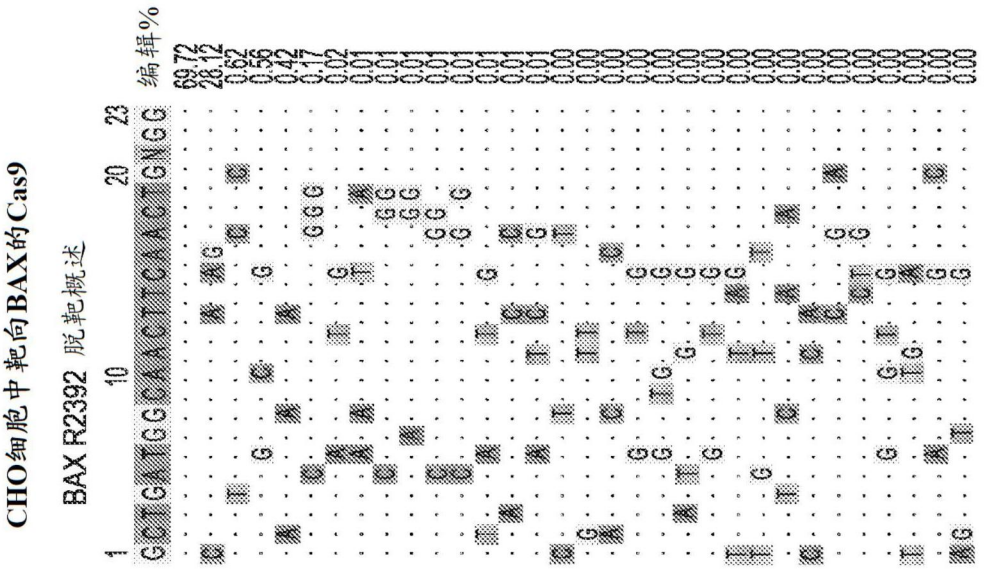

CHO细胞中靶向BAX的Cas9
BAX R2392 脱靶概述
编辑%

图23C

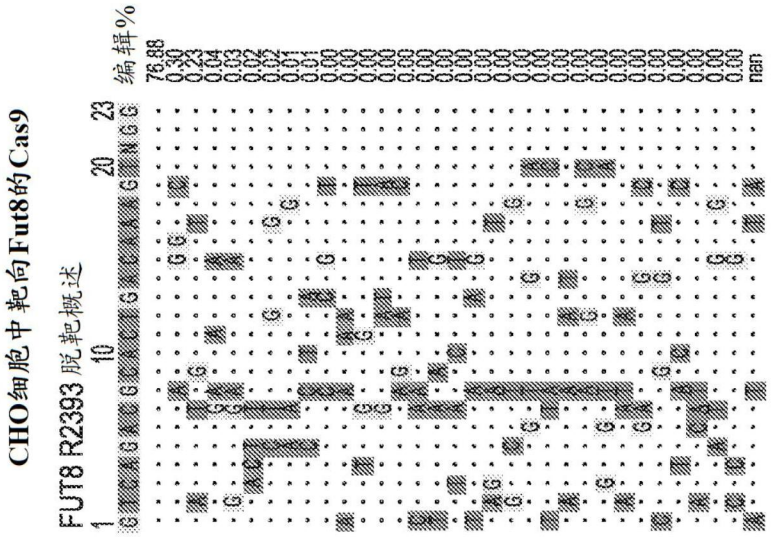

CHO细胞中靶向Fut8的Cas9
FUT8 R2393 脱靶概述
编辑%

图23D

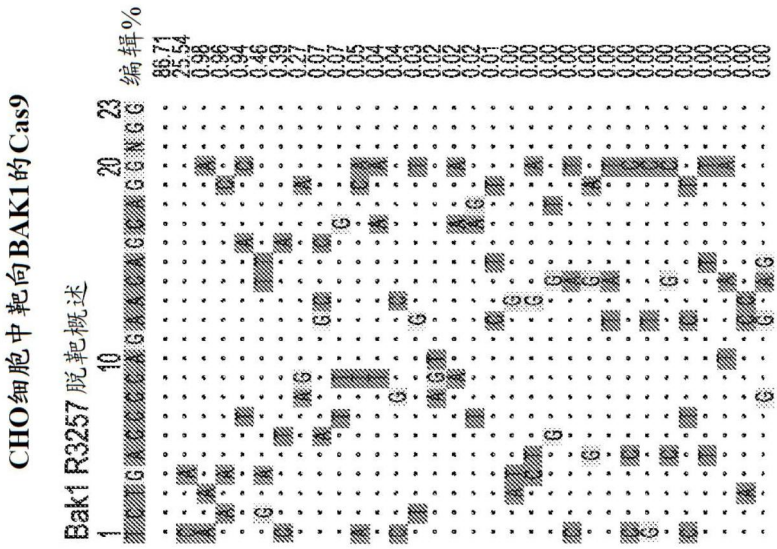

CHO细胞中靶向BAK1的Cas9
Bak1 R3257 脱靶概述
编辑%

图23E

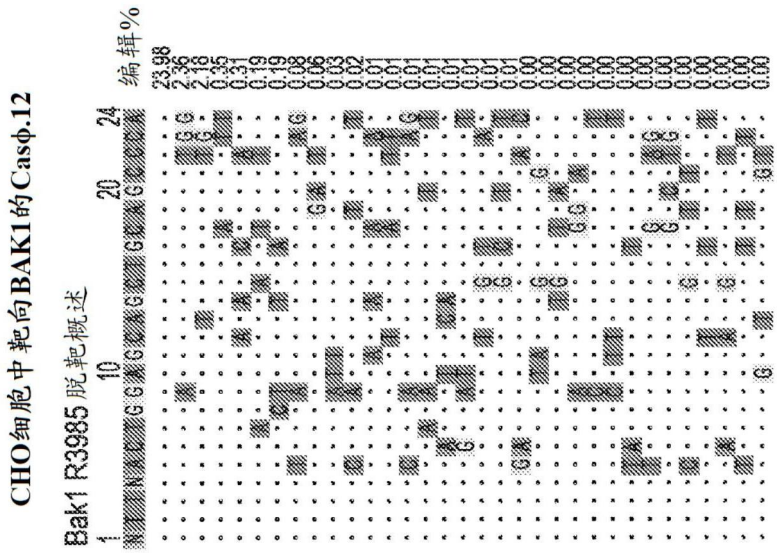

CHO细胞中靶向BAK1的Casϕ.12
Bak1 R3985 脱靶概述
编辑%

图23F

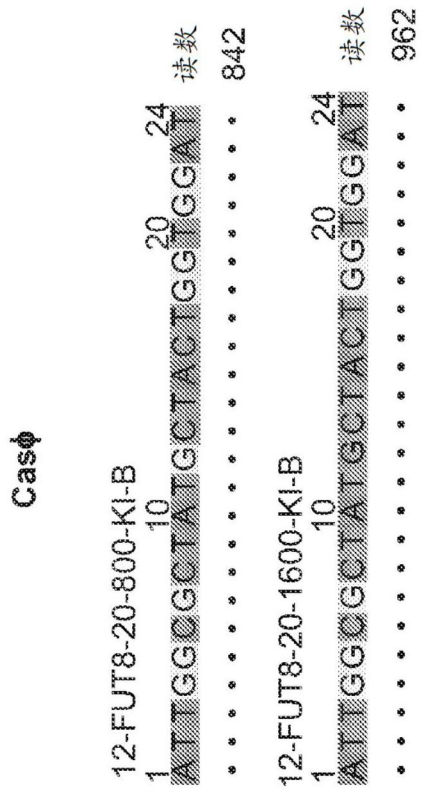

Casϕ
12-FUT8-20-800-KI-B
1 10 20 24
读数
842
12-FUT8-20-1600-KI-B
1 10 20 24
读数
962

图23G

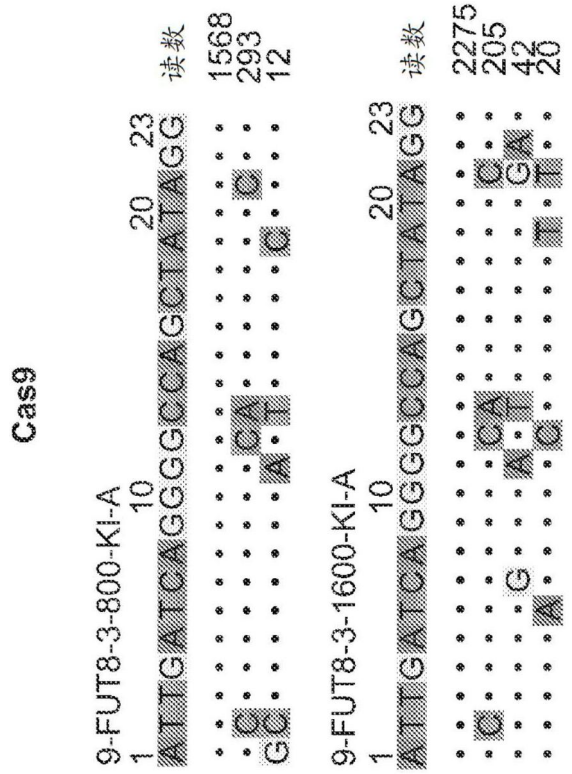

Cas9
9-FUT8-3-800-KI-A
1 10 20 23
读数
1568
293
12
9-FUT8-3-1600-KI-A
1 10 20 23
读数
2275
205
42
20

图23H

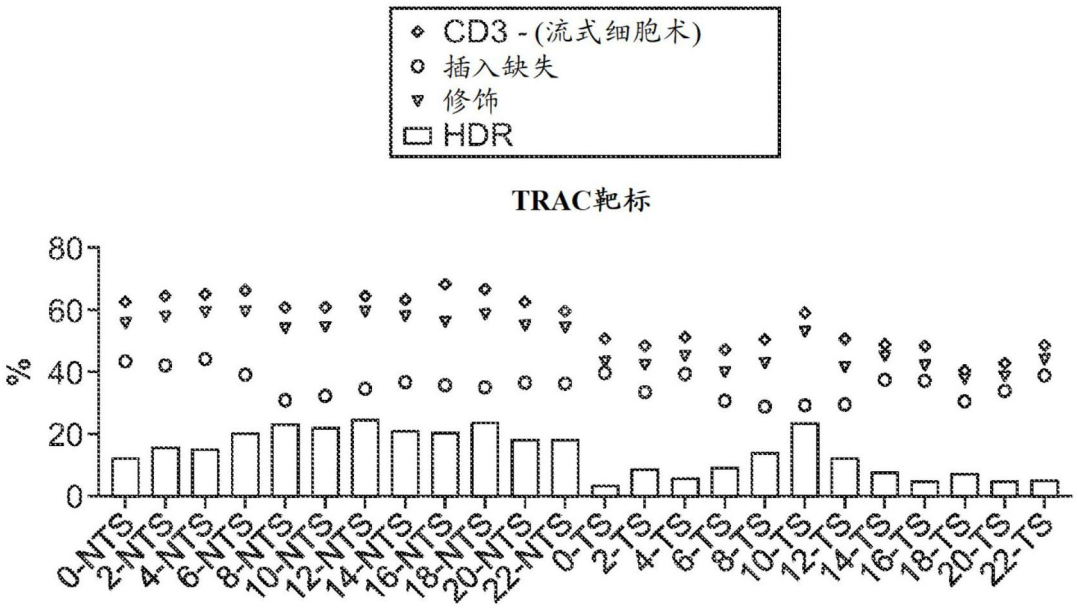

CD3 -(流式细胞术)
插入缺失
修饰
HDR
TRAC靶标
80
60
40
20
0
%
0-NTS
2-NTS
4-NTS
6-NTS
8-NTS
10-NTS
12-NTS
14-NTS
16-NTS
18-NTS
20-NTS
22-NTS
0-TS
2-TS
4-TS
6-TS
8-TS
10-TS
12-TS
14-TS
16-TS
18-TS
20-TS
22-TS
PAM远端位置- ssODN链

图24A

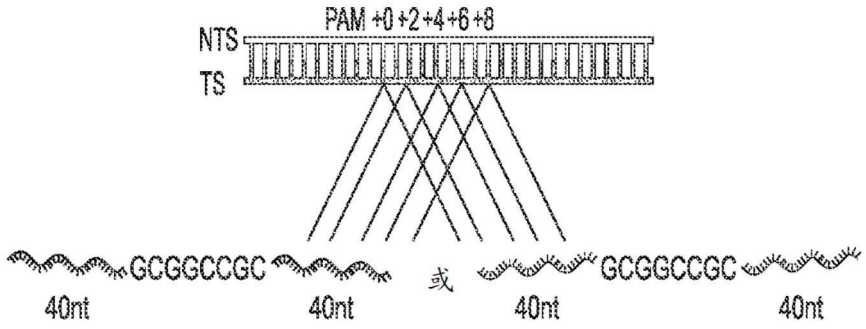

PAM +0 +2 +4 +6 +8
NTS
TS
GCGGCCGC
或
GCGGCCGC
40nt
40nt
40nt
40nt

图24B

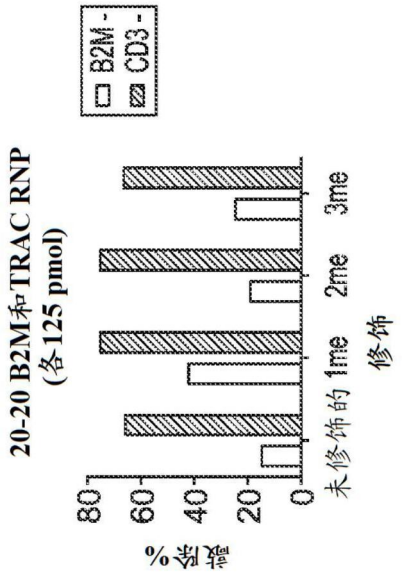

20-20 B2M和TRAC RNP
(各125 pmol)
B2M-
CD3-
80
60
40
20
0
敲除%
未修饰的
1me
2me
3me
修饰

图25A

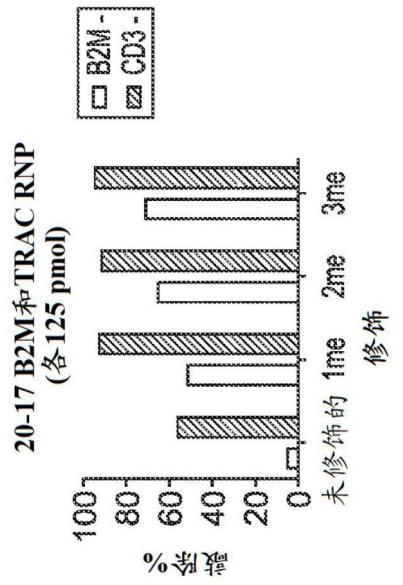

20-17 B2M和TRAC RNP
(各125 pmol)
B2M-
CD3-
100
80
60
40
20
0
敲除%
未修饰的
1me
2me
3me
修饰

图25B

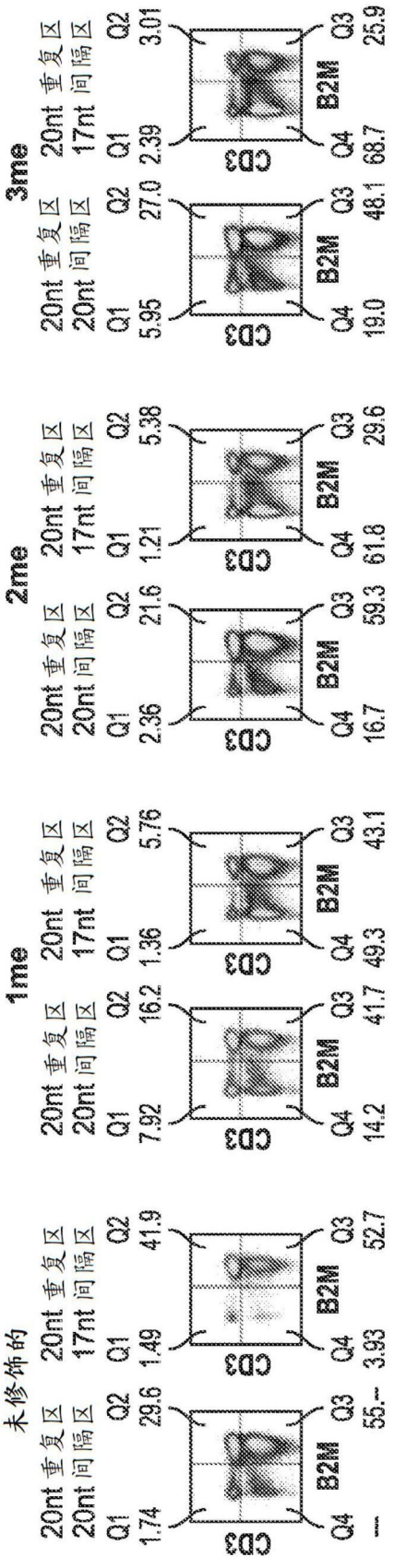

未修饰的
20nt 重复区 20nt 重复区
20nt 间隔区 17nt 间隔区
Q1 Q2 Q1 Q2
1.74 29.6 1.49 41.9
— 55.- 3.93 52.7
Q4 B2M Q3 Q4 B2M Q3
CD3 CD3
1me
20nt 重复区 20nt 重复区
20nt 间隔区 17nt 间隔区
Q1 Q2 Q1 Q2
7.92 16.2 1.36 5.76
14.2 41.7 49.3 43.1
Q4 B2M Q3 Q4 B2M Q3
CD3 CD3
2me
20nt 重复区 20nt 重复区
20nt 间隔区 17nt 间隔区
Q1 Q2 Q1 Q2
2.36 21.6 1.21 5.38
16.7 59.3 61.8 29.6
Q4 B2M Q3 Q4 B2M Q3
CD3 CD3
3me
20nt 重复区 20nt 重复区
20nt 间隔区 17nt 间隔区
Q1 Q2 Q1 Q2
5.95 27.0 2.39 3.01
19.0 48.1 68.7 25.9
Q4 B2M Q3 Q4 B2M Q3
CD3 CD3

图25C

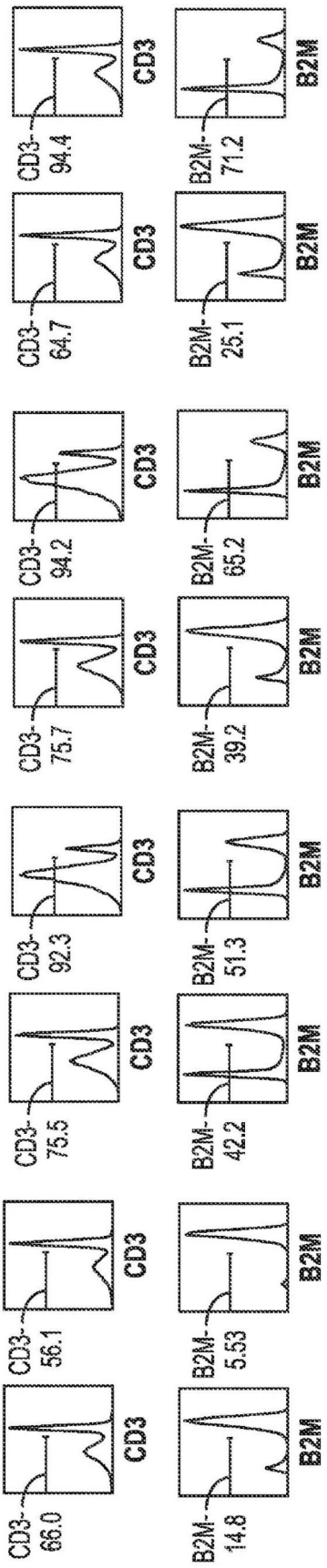

CD3-
66.0
CD3
B2M-
14.8
B2M
CD3-
56.1
CD3
B2M-
5.53
B2M
CD3-
75.5
CD3
B2M-
42.2
B2M
CD3-
92.3
CD3
B2M-
51.3
B2M
CD3-
75.7
CD3
B2M-
39.2
B2M
CD3-
94.2
CD3
B2M-
65.2
B2M
CD3-
64.7
CD3
B2M-
26.1
B2M
CD3-
94.4
CD3
B2M-
71.2
B2M

图25C(续)

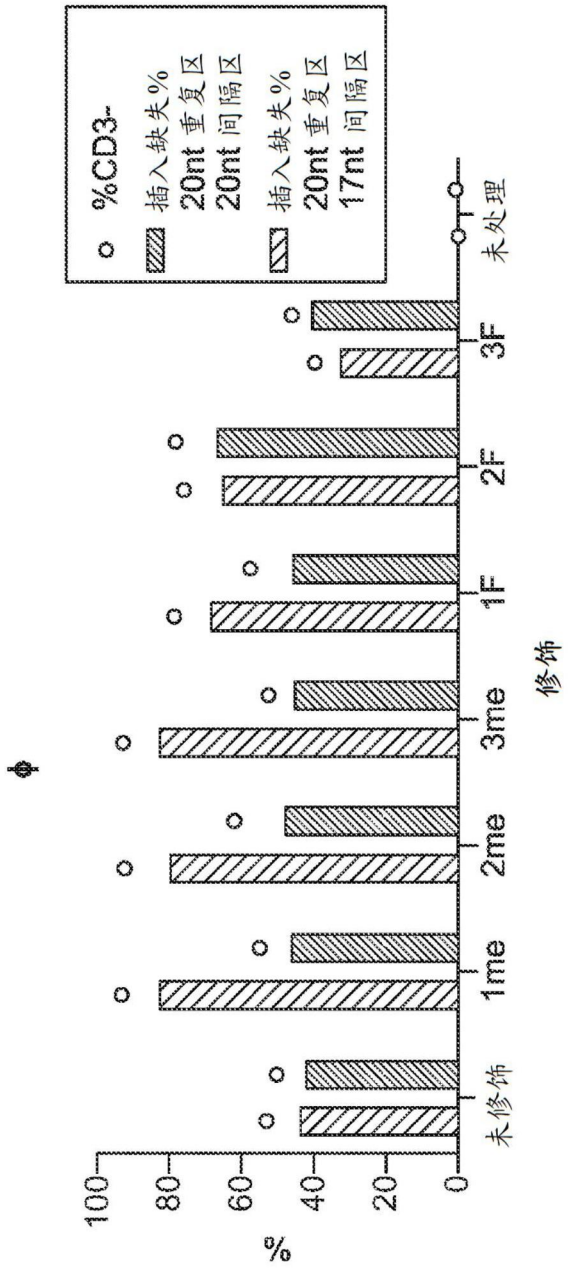

%CD3-
插入缺失%
20nt 重复区
20nt 间隔区
插入缺失%
20nt 重复区
17nt 间隔区
100
80
60
40
20
0
%
未修饰
1me
2me
3me
1F
2F
3F
未处理
修饰

图25D

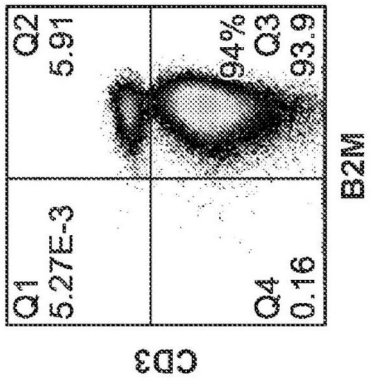


图25E

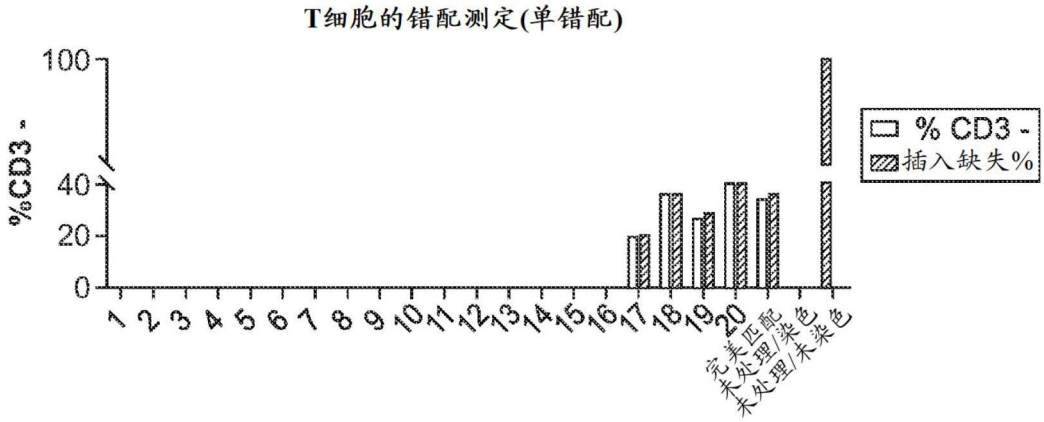


图26A

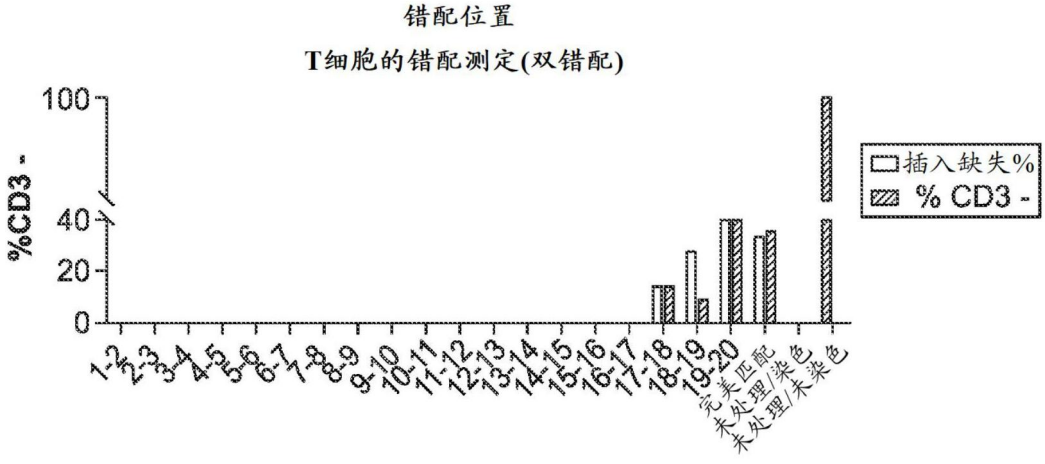


图26B

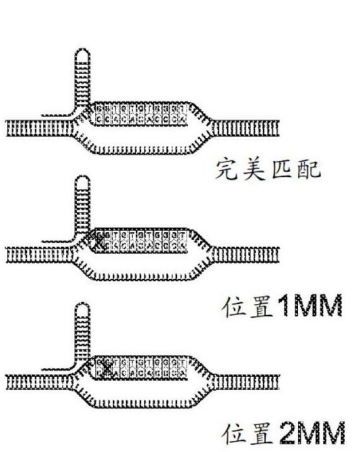


图 26C

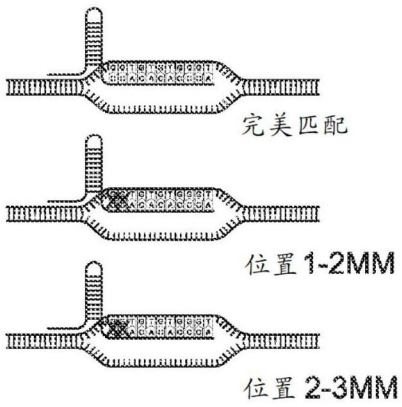


图 26D

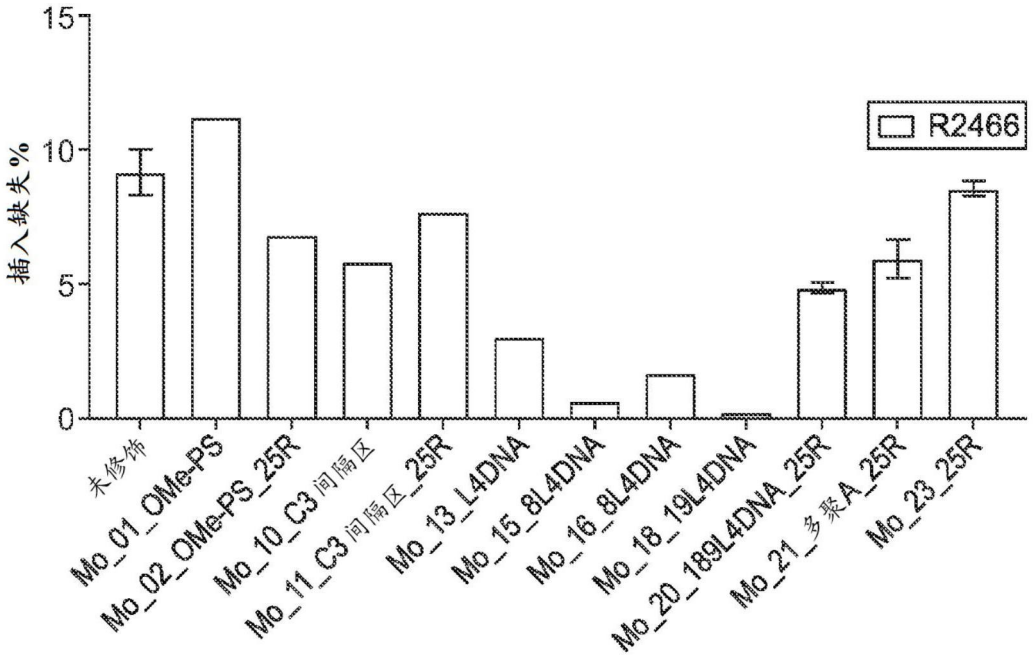


图27A

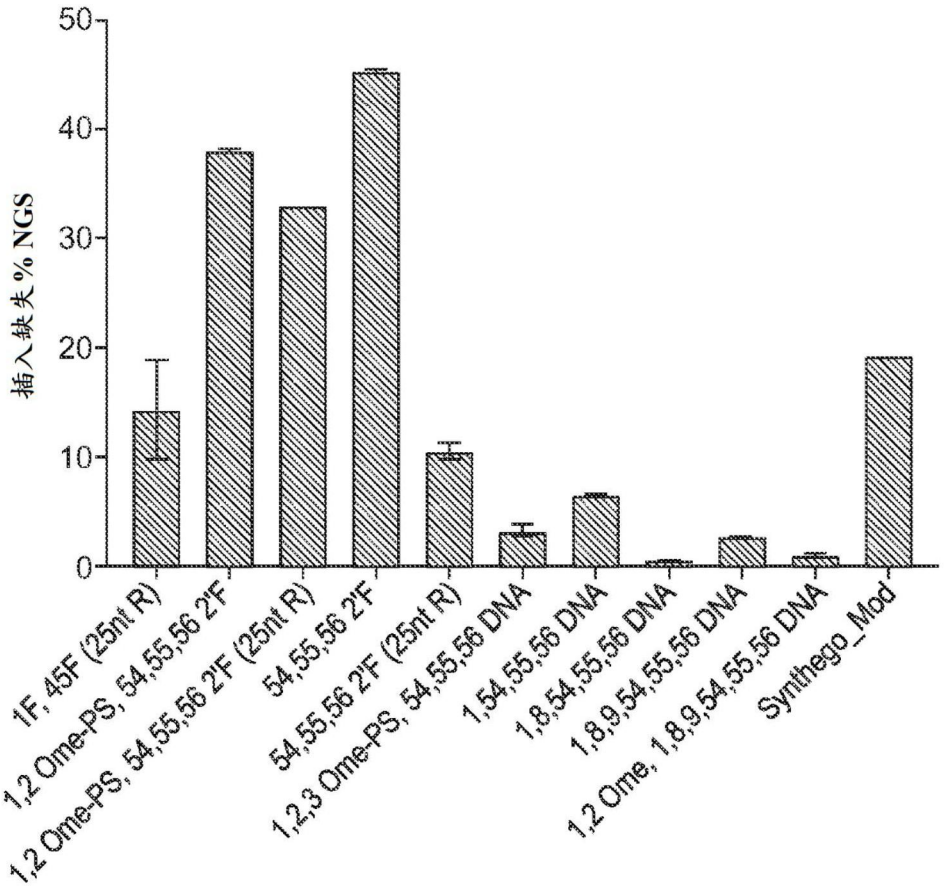

插入缺失% NGS
50
40
30
20
10
0
1F, 45F (25nt R)
1,2 Ome-PS, 54,55,56 2'F
1,2 Ome-PS, 54,55,56 2'F (25nt R)
54,55,56 2'F
54,55,56 2'F (25nt R)
1,2,3 Ome-PS, 54,55,56 DNA
1,54,55,56 DNA
1,8,54,55,56 DNA
1,8,9,54,55,56 DNA
1,2 Ome, 1,8,9,54,55,56 DNA
Synthego_Mod

图27B

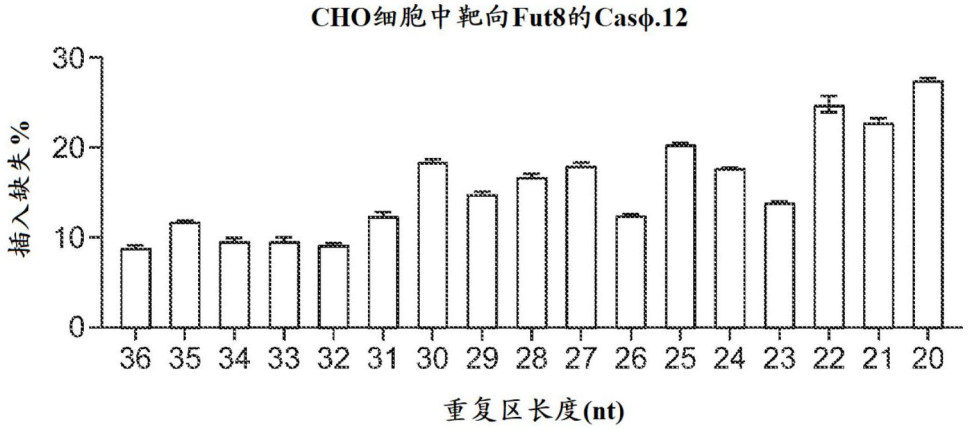

CHO细胞中靶向Fut8的Casϕ.12
插入缺失%
30
20
10
0
36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20
重复区长度(nt)

图28A

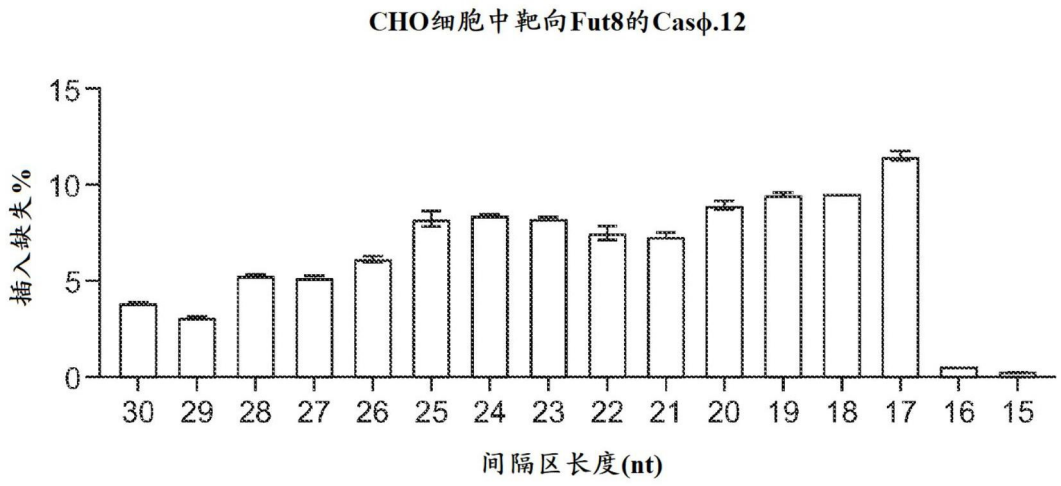

CHO细胞中靶向Fut8的Casϕ.12
插入缺失%
15
10
5
0
30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15
间隔区长度(nt)

图28B

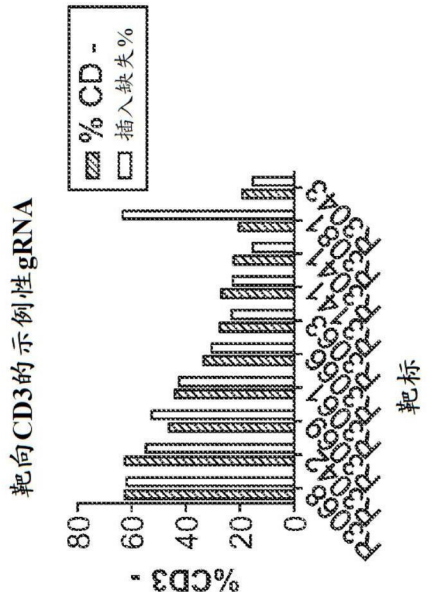

% CD -
插入缺失%
靶向CD3的示例性gRNA
%CD3 -
80
60
40
20
0
靶标

图29A

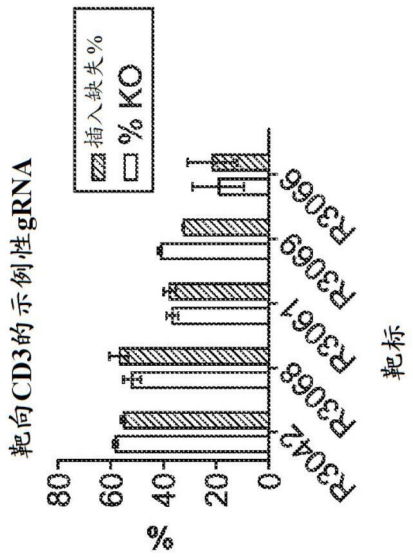

靶向CD3的示例性gRNA
插入缺失%
% KO
%
80
60
40
20
0
R3042
R3068
R3061
R3069
R3066
靶标

图29B

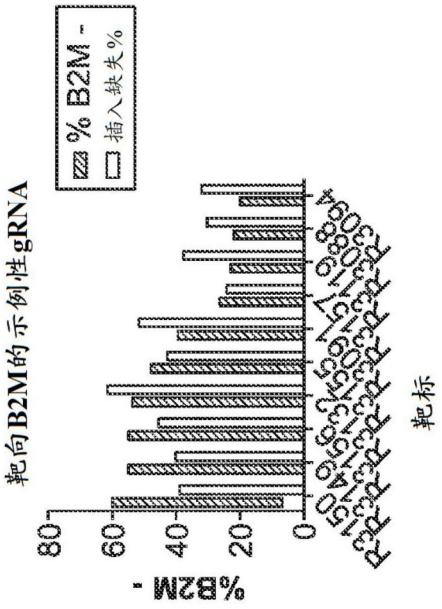

靶向B2M的示例性gRNA
% B2M -
插入缺失%
%B2M -
80
60
40
20
0
靶标

图29C

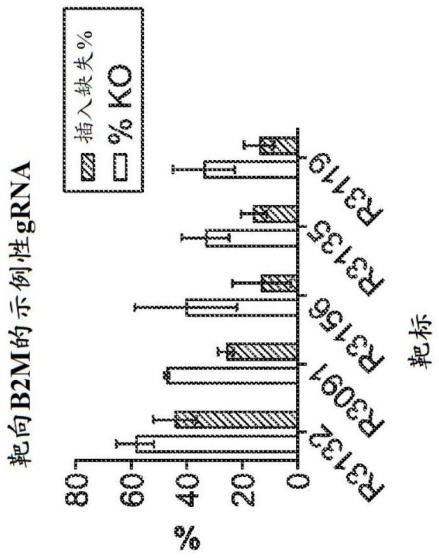

靶向B2M的示例性gRNA
插入缺失%
% KO
%
0
20
40
60
80
R3132
R3091
R3156
R3135
R3119
靶标

图29D

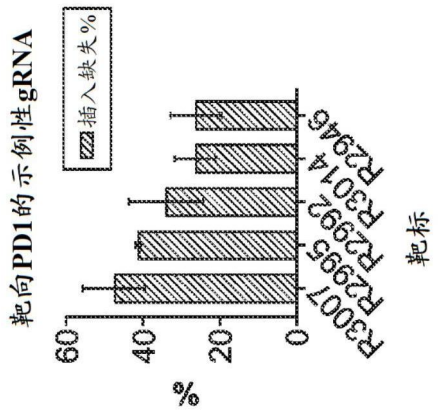

靶向PD1的示例性gRNA
插入缺失%
%
0
20
40
60
R3007
R2995
R2992
R3014
R2946
靶标

图29E

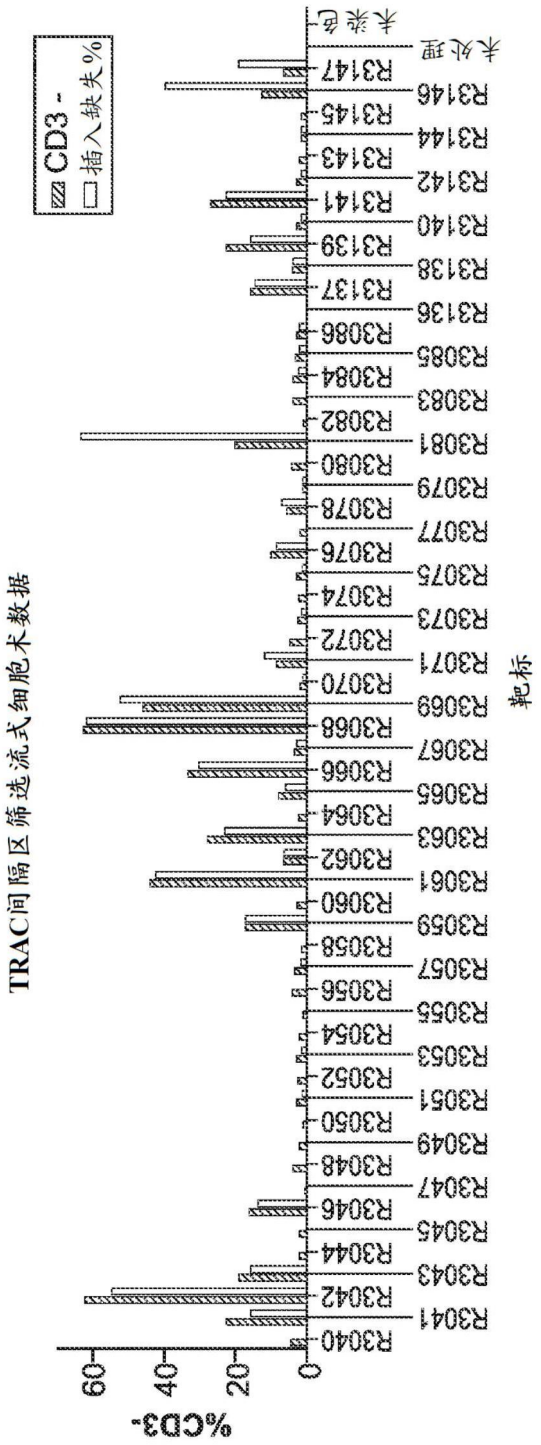


图29F

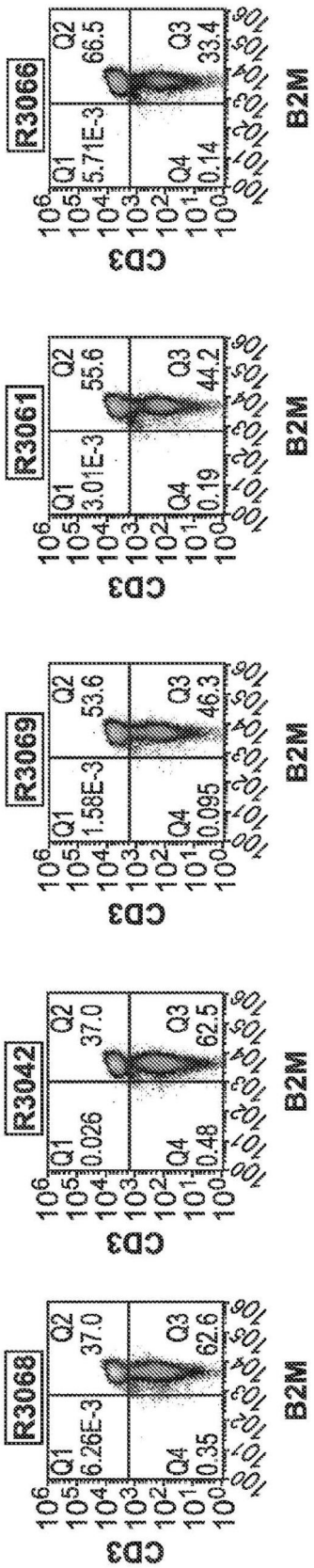

R3066
Q1
5.71E-3
Q2
66.5
Q3
33.4
Q4
0.14
R3061
Q1
3.01E-3
Q2
55.6
Q3
44.2
Q4
0.19
R3069
Q1
1.58E-3
Q2
53.6
Q3
46.3
Q4
0.095
R3042
Q1
0.026
Q2
37.0
Q3
62.5
Q4
0.48
R3068
Q1
6.26E-3
Q2
37.0
Q3
62.6
Q4
0.35
B2M
CD3

图29G

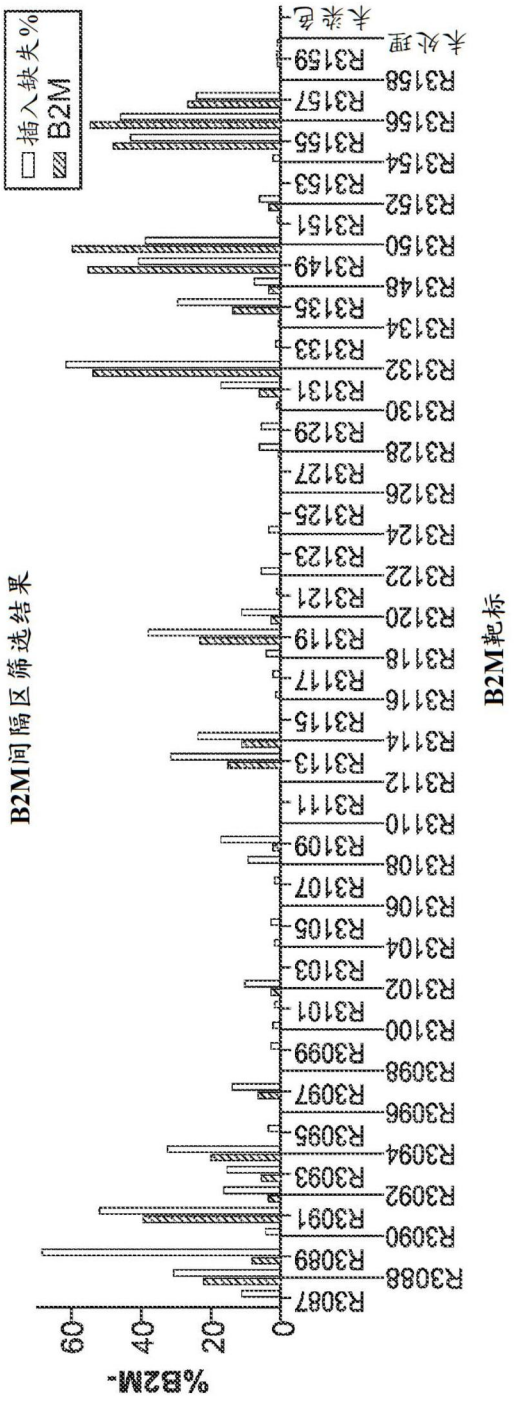

插入缺失%
B2M
未染色
未处理
R3159
R3158
R3157
R3156
R3155
R3154
R3153
R3152
R3151
R3150
R3149
R3148
R3135
R3134
R3133
R3132
R3131
R3130
R3129
R3128
R3127
R3126
R3125
R3124
R3123
R3122
R3121
R3120
R3119
R3118
R3117
R3116
R3115
R3114
R3113
R3112
R3111
R3110
R3109
R3108
R3107
R3106
R3105
R3104
R3103
R3102
R3101
R3100
R3099
R3098
R3097
R3096
R3095
R3094
R3093
R3092
R3091
R3090
R3089
R3088
R3087
60
40
20
0
%B2M-
B2M间隔区筛选结果
B2M靶标

图29H

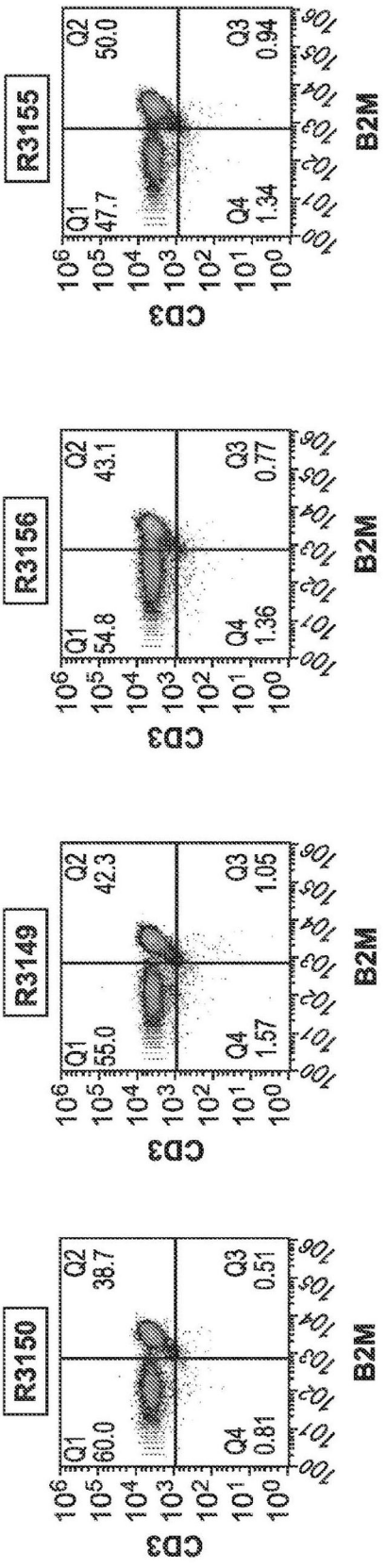

R3155
Q2 50.0
Q3 0.94
Q1 47.7
Q4 1.34
R3156
Q2 43.1
Q3 0.77
Q1 54.8
Q4 1.36
R3149
Q2 42.3
Q3 1.05
Q1 55.0
Q4 1.57
R3150
Q2 38.7
Q3 0.51
Q1 60.0
Q4 0.81
B2M
CD3

图29I

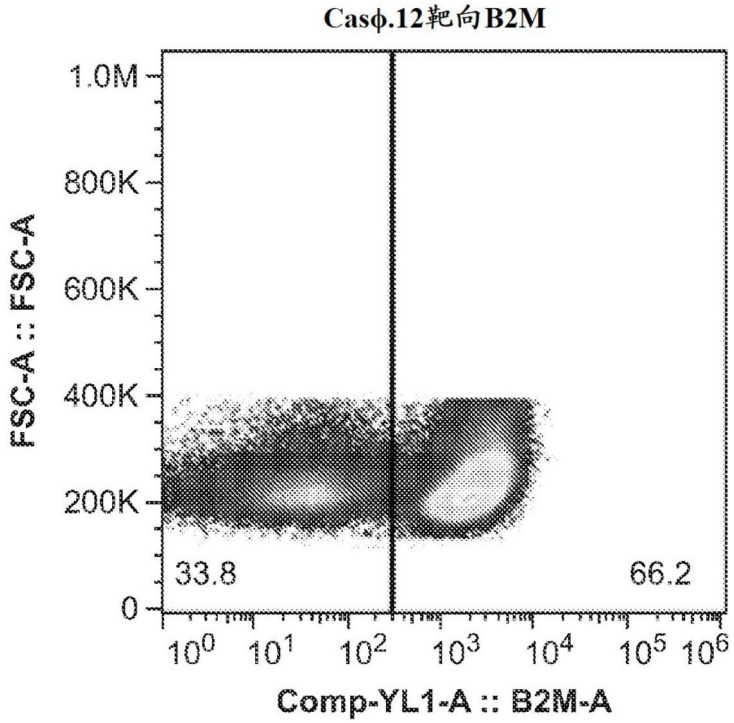

Casϕ.12靶向B2M
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
FSC-A :: FSC-A
33.8
66.2
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Comp-YL1-A :: B2M-A

图30A

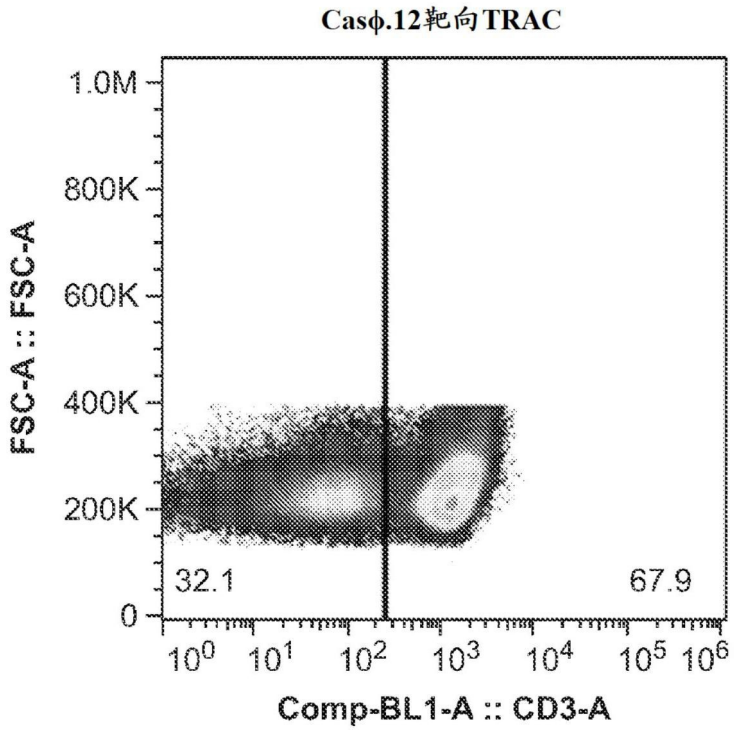

Casϕ.12靶向TRAC
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
FSC-A :: FSC-A
32.1
67.9
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Comp-BL1-A :: CD3-A

图30B

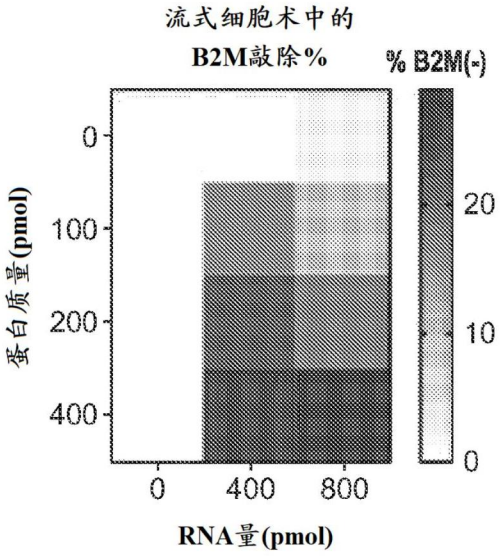

流式细胞术中的
B2M敲除%
% B2M(-)
0
100
200
400
蛋白质量(pmol)
0
400
800
RNA量(pmol)
20
10
0

图30C

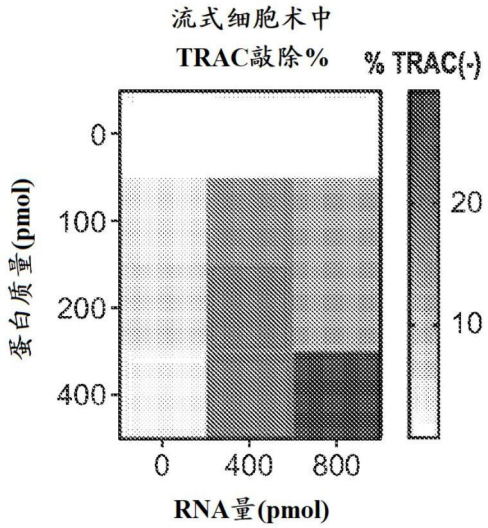

流式细胞术中
TRAC敲除%
% TRAC(-)
0
100
200
400
蛋白质量(pmol)
0
400
800
RNA量(pmol)
20
10

图30D

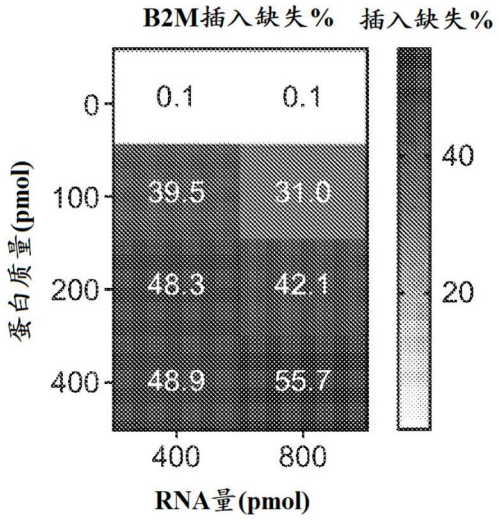

B2M插入缺失%
插入缺失%
0.1
0.1
39.5
31.0
48.3
42.1
48.9
55.7
0
100
200
400
蛋白质量(pmol)
400
800
RNA量(pmol)
40
20

图30E

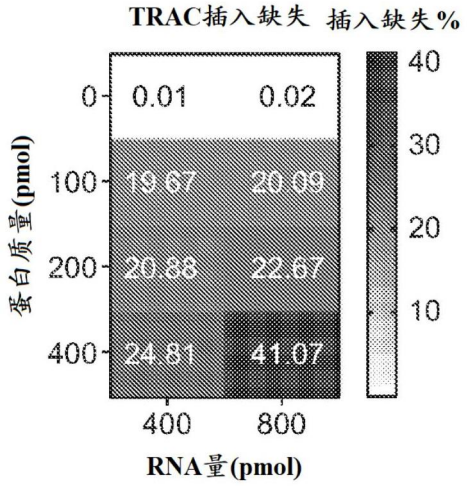

TRAC插入缺失
插入缺失%
0.01
0.02
19.67
20.09
20.88
22.67
24.81
41.07
0
100
200
400
蛋白质量(pmol)
400
800
RNA量(pmol)
40
30
20
10

图30F

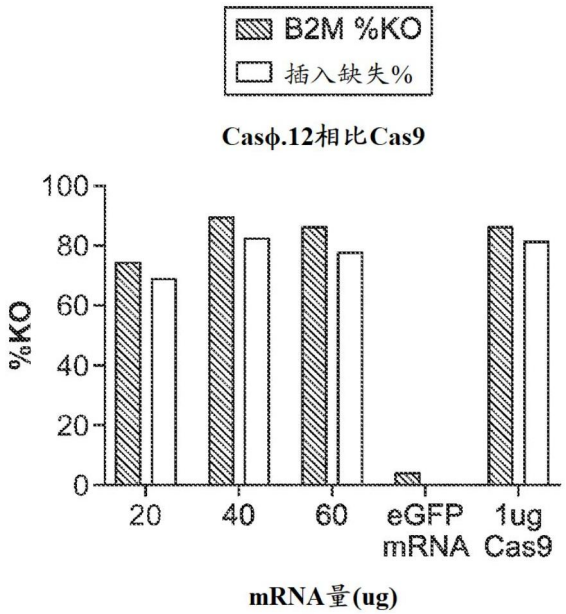

B2M %KO
插入缺失%
Casϕ.12相比Cas9
100
80
60
40
20
0
%KO
20
40
60
eGFP mRNA
1ug Cas9
mRNA量(ug)

图30G

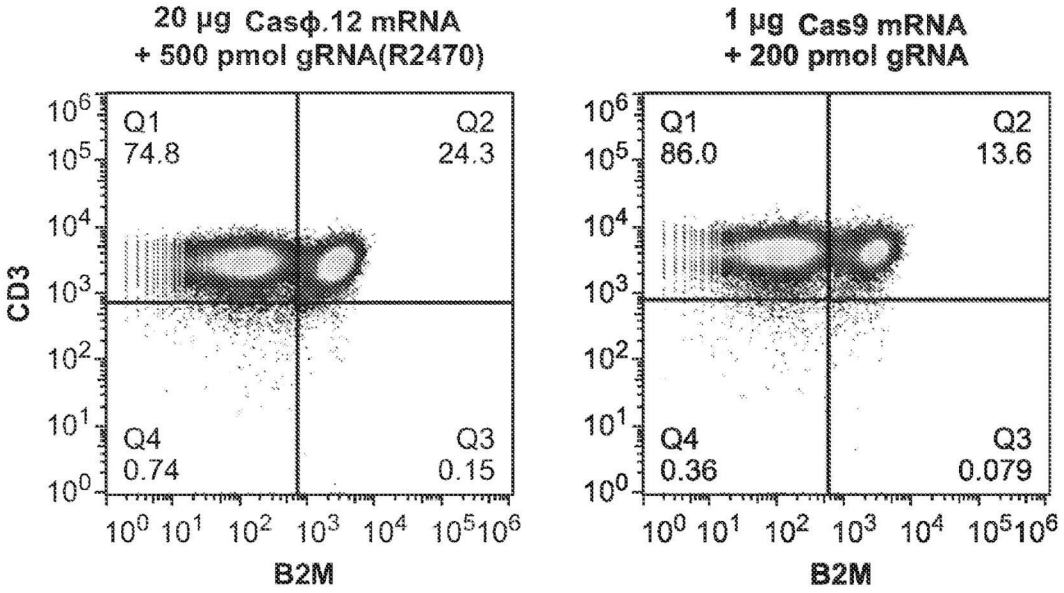

20 µg Casϕ.12 mRNA
+ 500 pmol gRNA(R2470)
Q1
74.8
Q2
24.3
Q4
0.74
Q3
0.15
CD3
B2M
1 µg Cas9 mRNA
+ 200 pmol gRNA
Q1
86.0
Q2
13.6
Q4
0.36
Q3
0.079
B2M

图30H

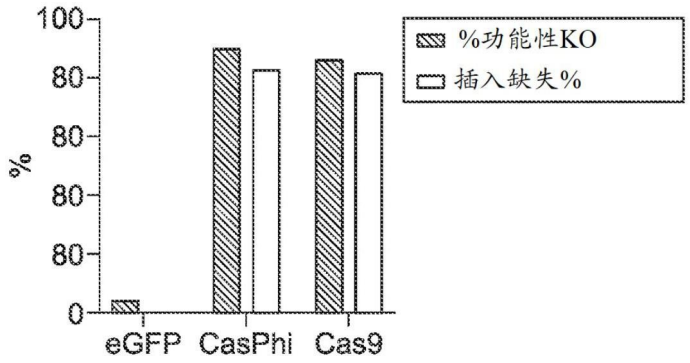
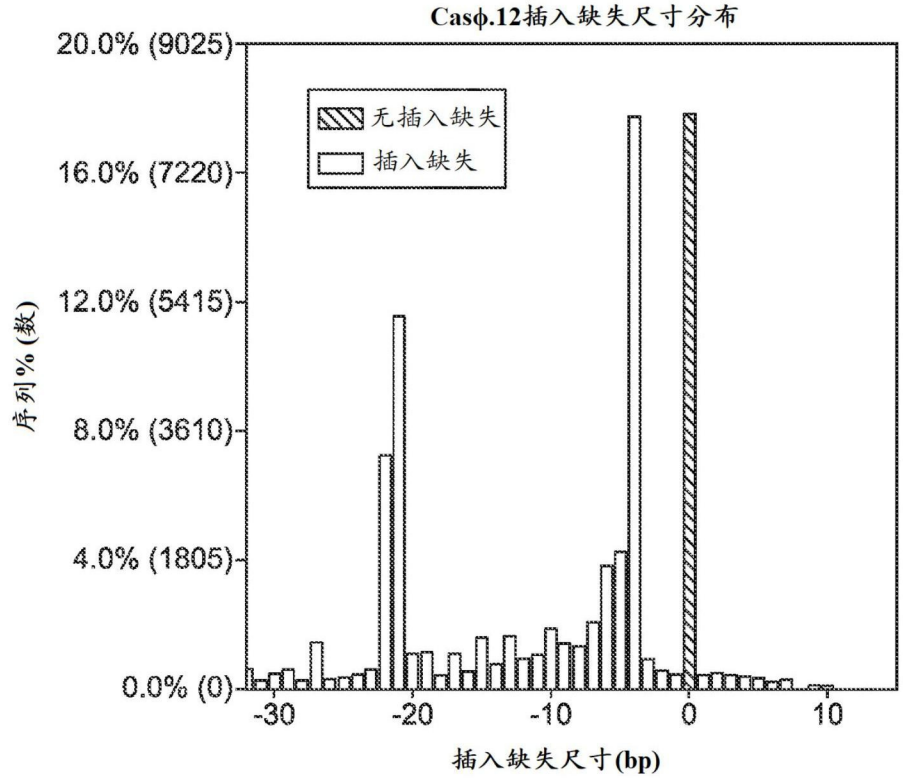

100
80
80
80
80
0
%
%功能性KO
插入缺失%
eGFP
CasPhi
Cas9

图30I


Casϕ.12插入缺失尺寸分布
20.0% (9025)
16.0% (7220)
12.0% (5415)
8.0% (3610)
4.0% (1805)
0.0% (0)
序列% (数)
无插入缺失
插入缺失
-30
-20
-10
0
10
插入缺失尺寸(bp)

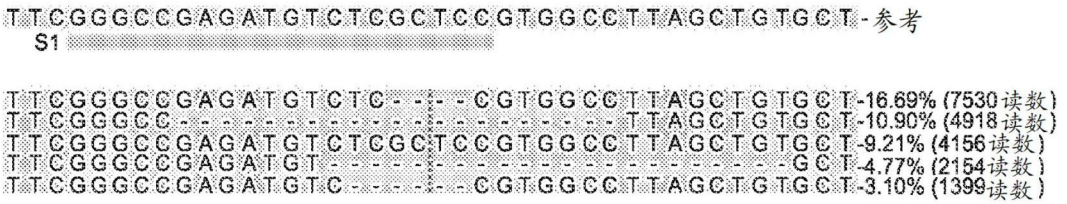
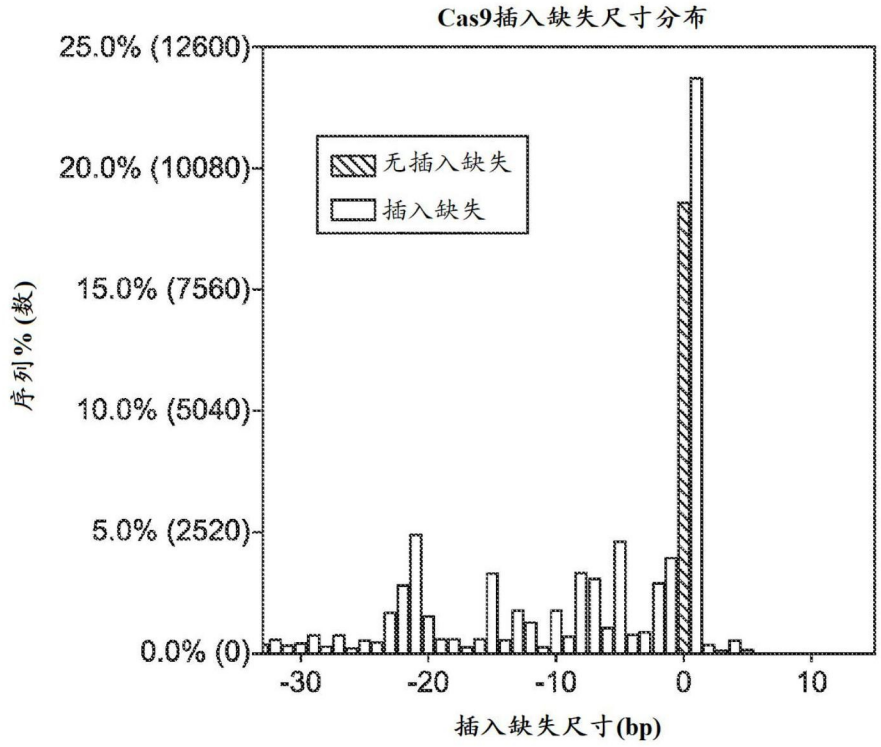

TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT-参考
S1
TTCGGGCCGAGATGTCTC----CGTGGCCTTAGCTGTGCT-16.69% (7530读数)
TTCGGGCC----------TTAGCTGTGCT-10.90% (4918读数)
TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT-9.21% (4156读数)
TTCGGGCCGAGATGT----------GCT-4.77% (2154读数)
TTCGGGCCGAGATGTC----CGTGGCCTTAGCTGTGCT-3.10% (1399读数)

图30J


Cas9插入缺失尺寸分布
25.0% (12600)
20.0% (10080)
15.0% (7560)
10.0% (5040)
5.0% (2520)
0.0% (0)
序列% (数)
无插入缺失
插入缺失
-30
-20
-10
0
10
插入缺失尺寸(bp)

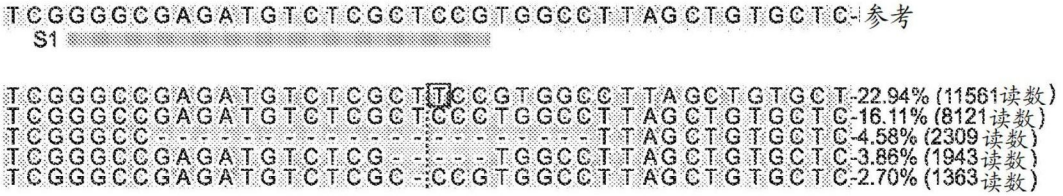

TCGGGGCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTC-参考
S1
TCGGGCCGAGATGTCTCGCTTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT-22.94% (11561读数)
TCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCCTGGCCTTAGCTGTGCTC-16.11% (8121读数)
TCGGGCC----------T TAGCTGTGCTC-4.58% (2309读数)
TCGGGCCGAGATGTCTCG----TGGCCTTAGCTGTGCTC-3.86% (1943读数)
TCGGGCCGAGATGTCTCGC-CCGTGGCCTTAGCTGTGCTC-2.70% (1363读数)

图30J(续)

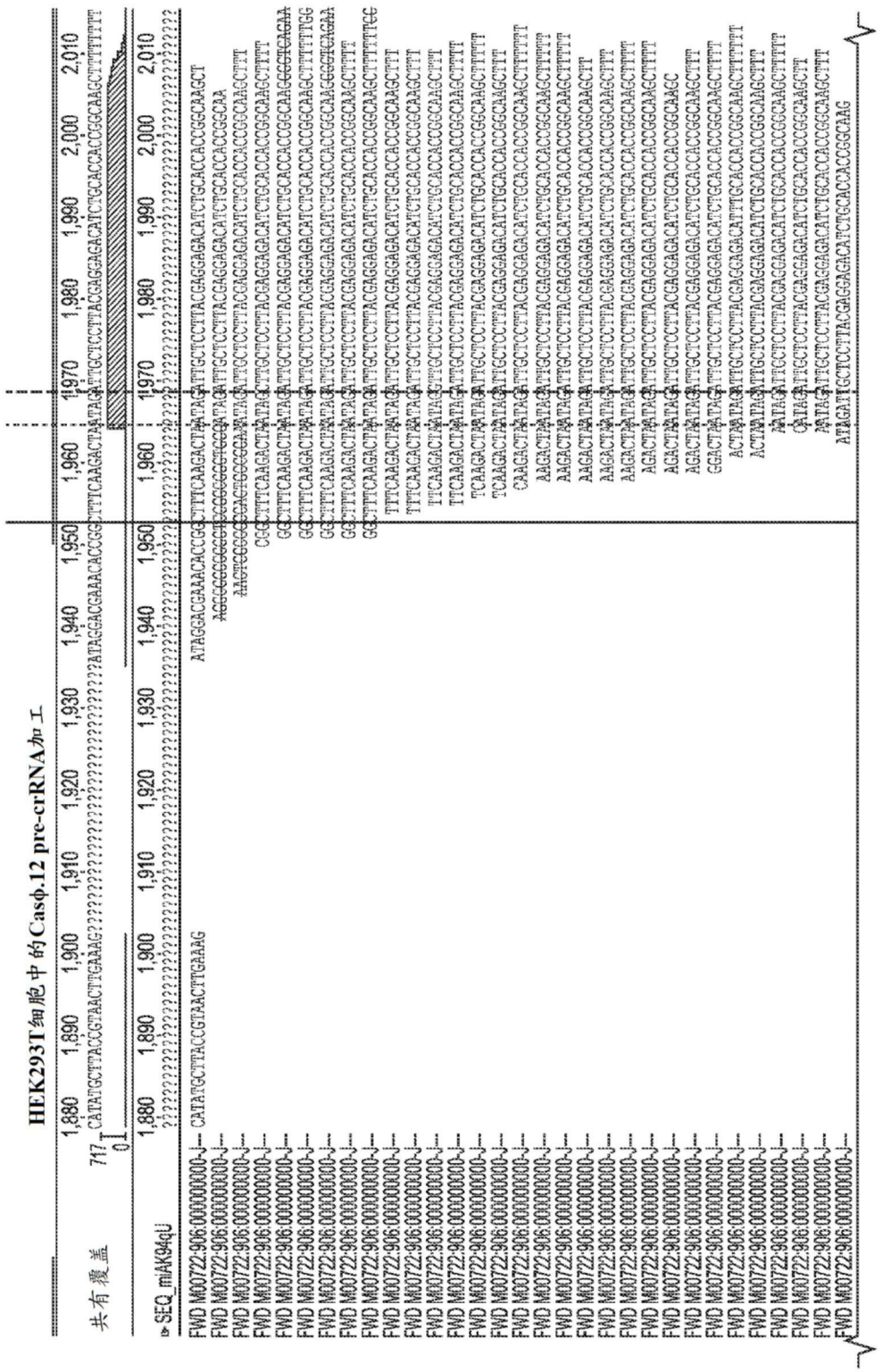

HEK293T细胞中的Casϕ.12 pre-crRNA加工
共有覆盖
SEQ_mlAK94qU
FWD M00722:906:000000000-J...

图31

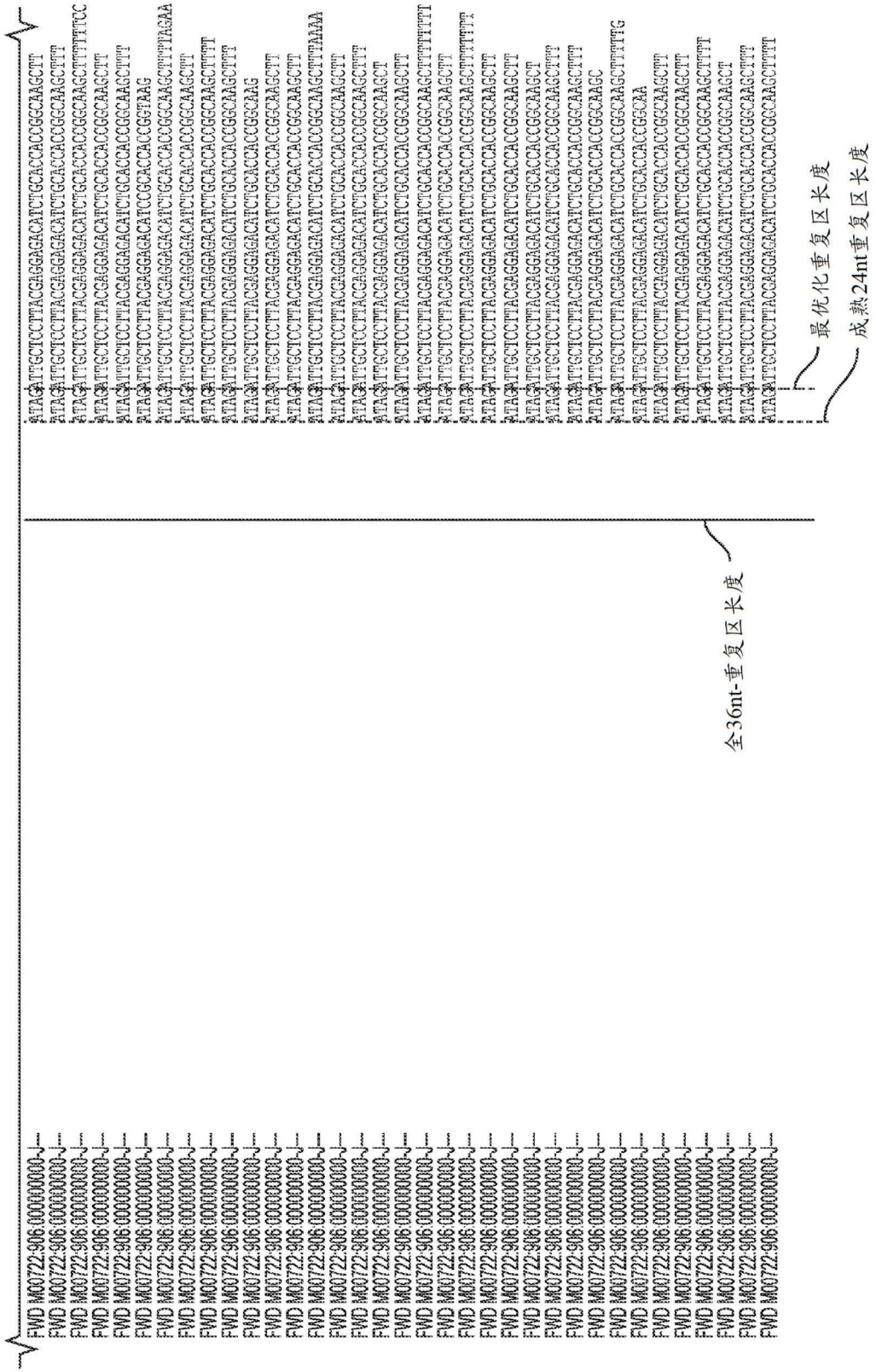


图31(续)

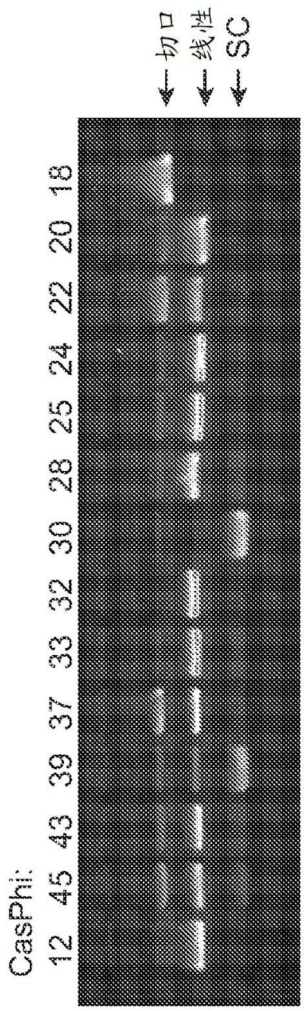


图32A

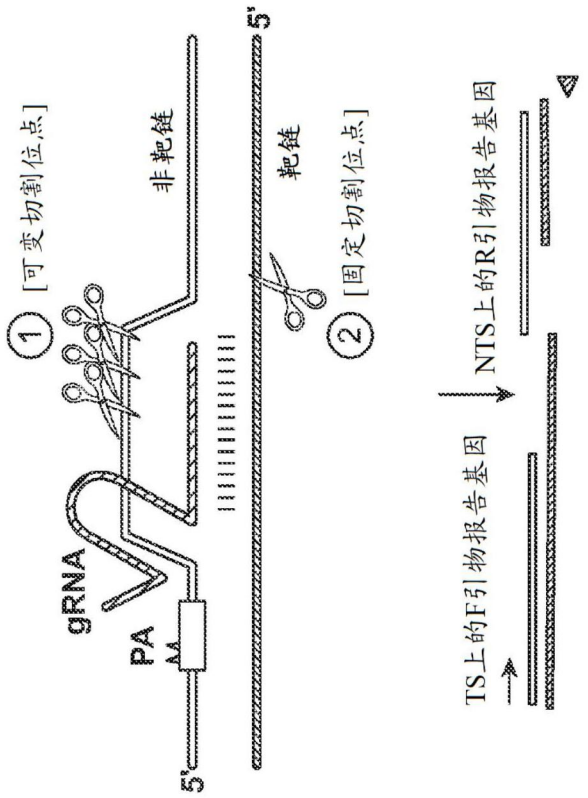

①
[可变切割位点]
非靶链
gRNA
PA
5'
5'
靶链
②
[固定切割位点]
TS上的F引物报告基团
NTS上的R引物报告基团

图32B

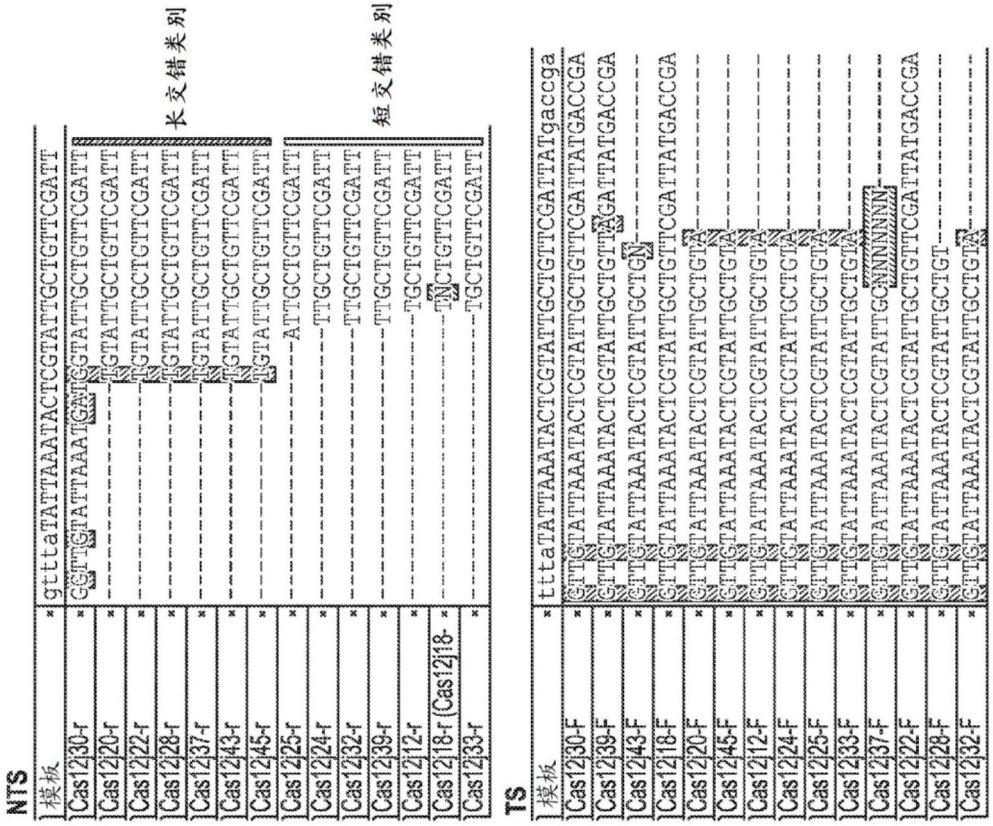

NTS
模板
Cas12j30-r
Cas12j20-r
Cas12j22-r
Cas12j28-r
Cas12j37-r
Cas12j43-r
Cas12j45-r
Cas12j25-r
Cas12j24-r
Cas12j32-r
Cas12j39-r
Cas12j12-r
Cas12j18-r (Cas12j18-
Cas12j33-r
长交错类别
短交错类别
TS
模板
Cas12j30-F
Cas12j39-F
Cas12j43-F
Cas12j18-F
Cas12j20-F
Cas12j45-F
Cas12j12-F
Cas12j24-F
Cas12j25-F
Cas12j33-F
Cas12j37-F
Cas12j22-F
Cas12j28-F
Cas12j32-F

图32C

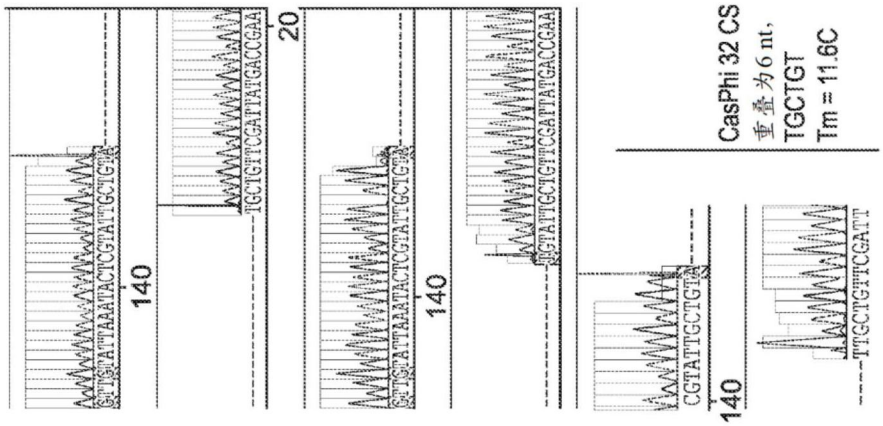
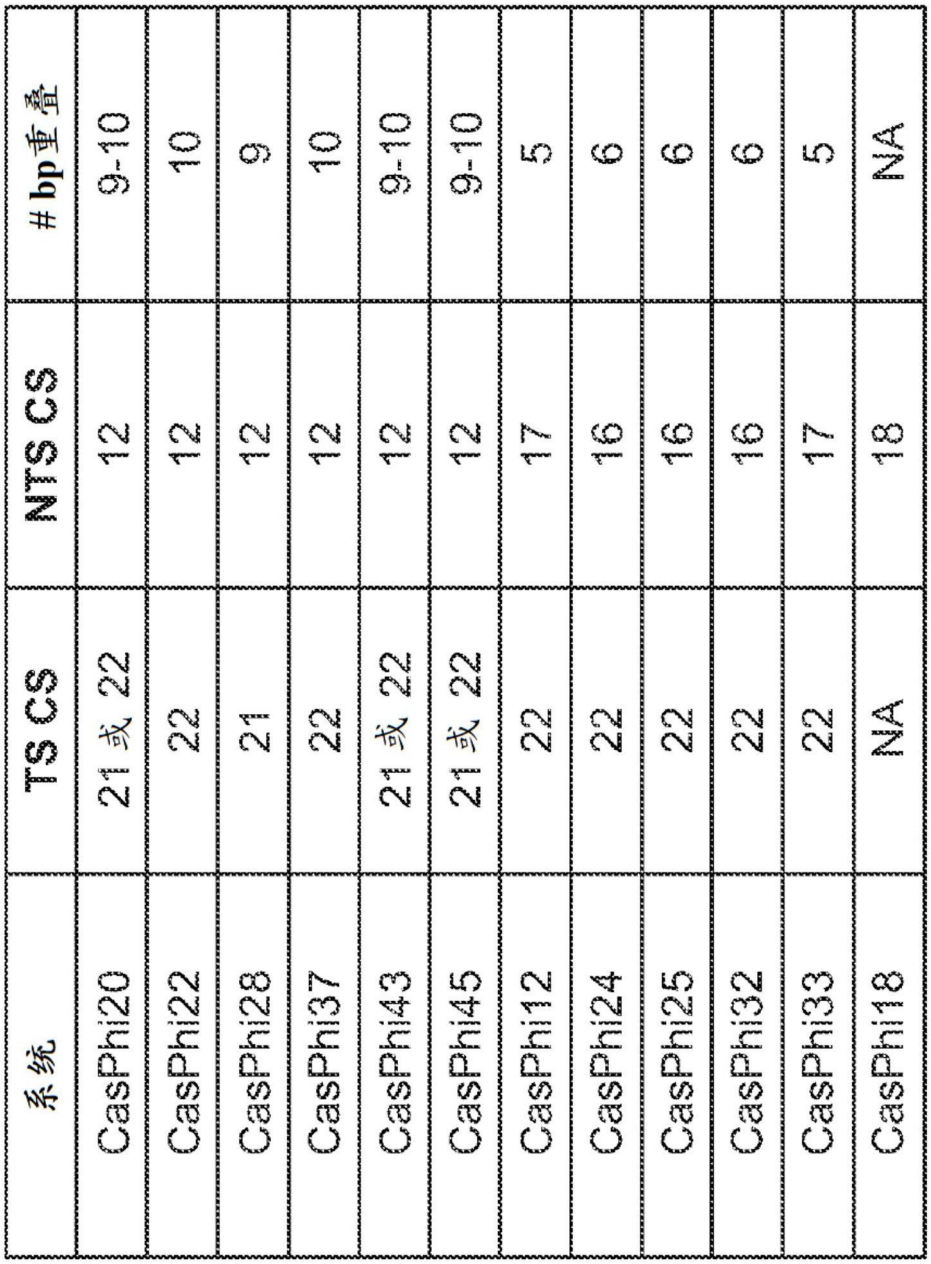

140
20
140
140
CasPhi 32 CS
重叠为6 nt,
TGCTGT
Tm = 11.6C

图32D



系统	TS CS	NTS CS	# bp重叠
CasPhi20	21 或 22	12	9-10
CasPhi22	22	12	10
CasPhi28	21	12	9
CasPhi37	22	12	10
CasPhi43	21 或 22	12	9-10
CasPhi45	21 或 22	12	9-10
CasPhi12	22	17	5
CasPhi24	22	16	6
CasPhi25	22	16	6
CasPhi32	22	16	6
CasPhi33	22	17	5
CasPhi18	NA	18	NA

图32E

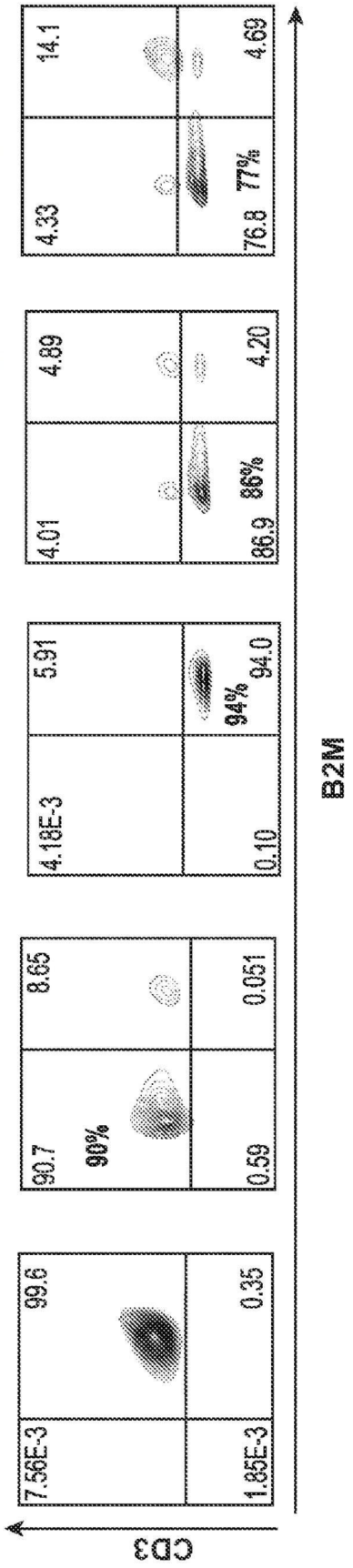

未编辑
仅B2M指导
仅TRAC指导
B2M + TRAC复用
三重靶标复用
CD3
B2M
7.56E-3
99.6
1.85E-3
0.35
90.7
8.65
90%
0.59
0.051
4.18E-3
5.91
0.10
94%
94.0
4.01
4.89
86.9
86%
4.20
4.33
14.1
76.8
77%
4.69

图33

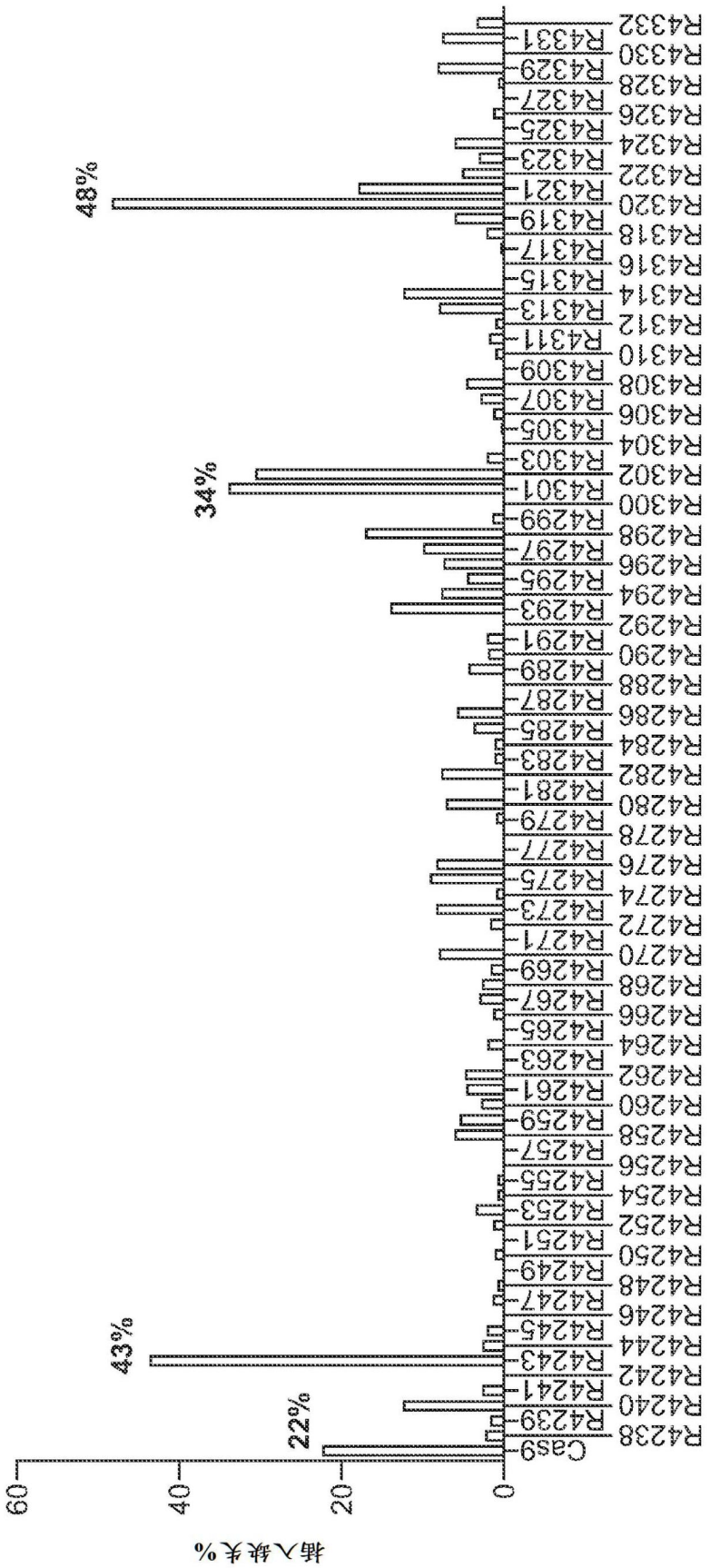

插入缺失%
0
20
40
60
Cas9
22%
43%
34%
48%
R4238
R4239
R4240
R4241
R4242
R4243
R4244
R4245
R4246
R4247
R4248
R4249
R4250
R4251
R4252
R4253
R4254
R4255
R4256
R4257
R4258
R4259
R4260
R4261
R4262
R4263
R4264
R4265
R4266
R4267
R4268
R4269
R4270
R4271
R4272
R4273
R4274
R4275
R4276
R4277
R4278
R4279
R4280
R4281
R4282
R4283
R4284
R4285
R4286
R4287
R4288
R4289
R4290
R4291
R4292
R4293
R4294
R4295
R4296
R4297
R4298
R4299
R4300
R4301
R4302
R4303
R4304
R4305
R4306
R4307
R4308
R4309
R4310
R4311
R4312
R4313
R4314
R4315
R4316
R4317
R4318
R4319
R4320
R4321
R4322
R4323
R4324
R4325
R4326
R4327
R4328
R4329
R4330
R4331
R4332

图34

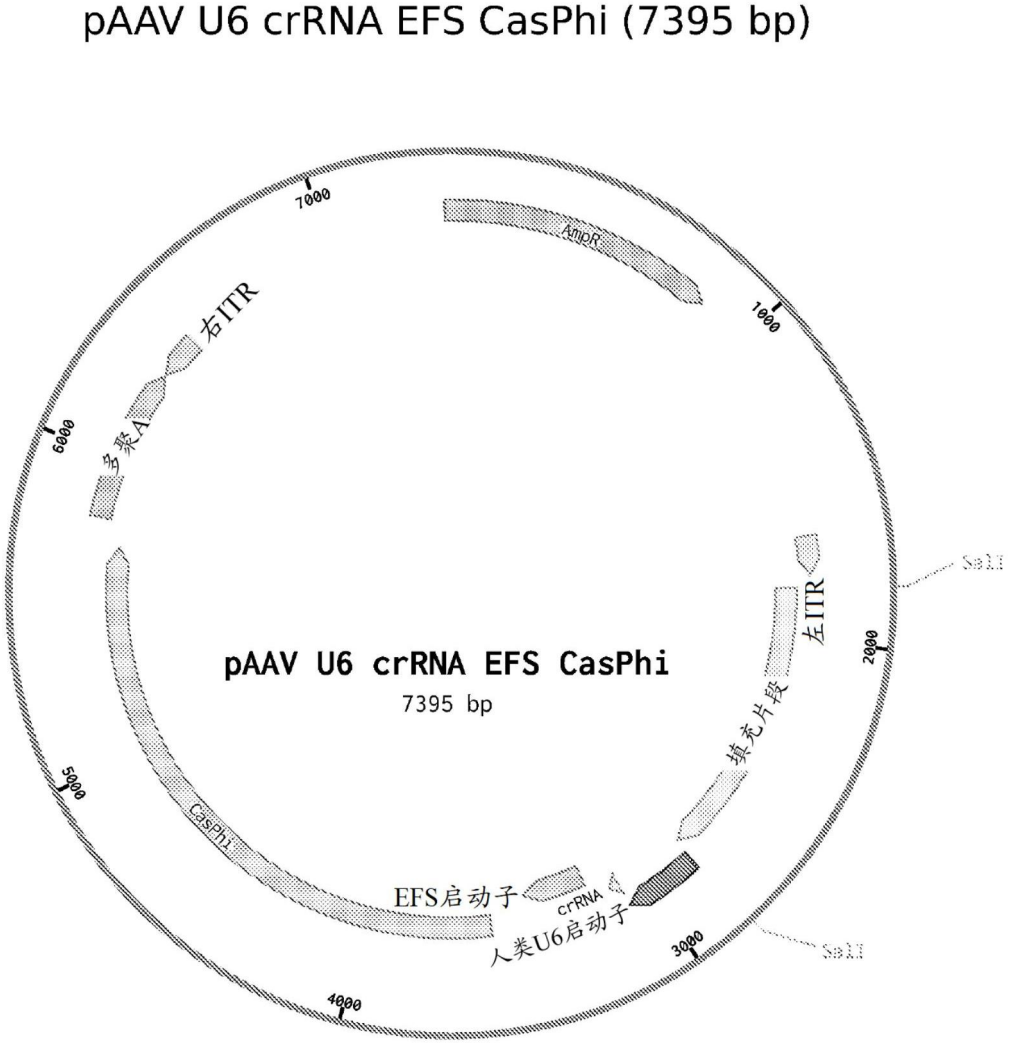

pAAV U6 crRNA EFS CasPhi (7395 bp)
pAAV U6 crRNA EFS CasPhi
7395 bp
AmpR
右ITR
多聚A
CasPhi
EFS启动子
crRNA
人类U6启动子
填充片段
左ITR
SalI
SalI
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

图35A

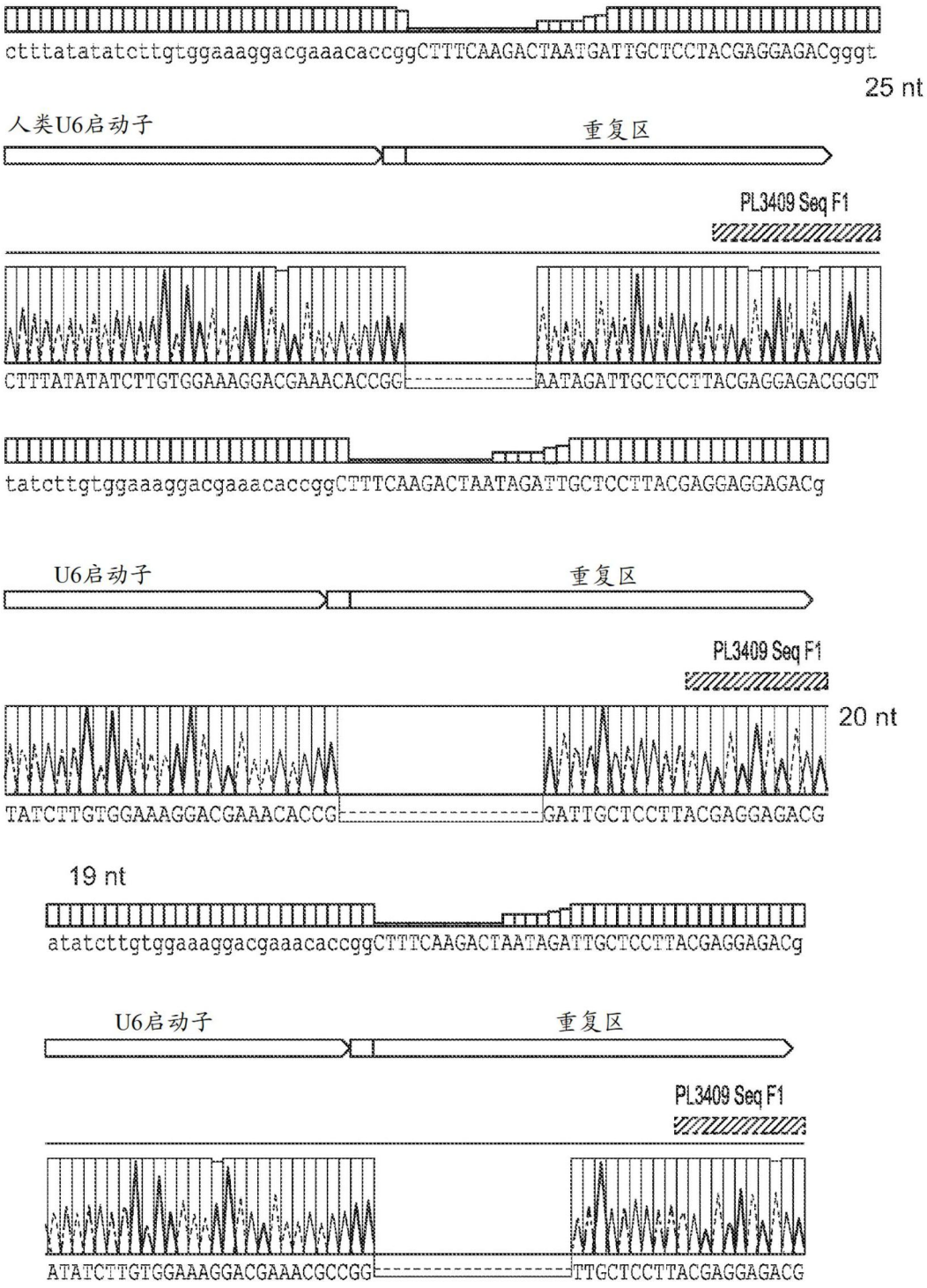

ctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccggCTTTCAAGACTAATGATTGCTCCTACGAGGAGACgggt
25 nt
人类U6启动子
重复区
PL3409 Seq F1
CTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGG
AATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACGGGT
tatcttgtggaaaggacgaaacaccggCTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGGAGACg
U6启动子
重复区
PL3409 Seq F1
20 nt
TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
GATTGCTCCTTACGAGGAGACG
19 nt
atatcttgtggaaaggacgaaacaccggCTTTCAAGACTAATAGATTGCTCCTTACGAGGAGACg
U6启动子
重复区
PL3409 Seq F1
ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACGCCGG
TTGCTCCTTACGAGGAGACG

图35B

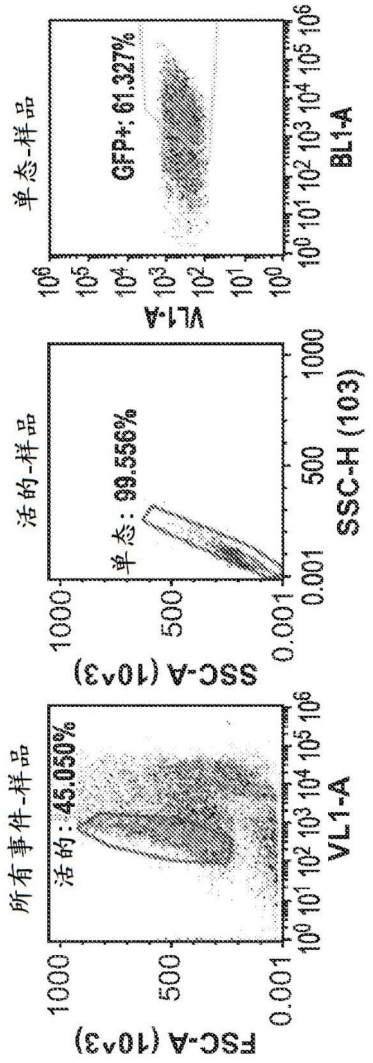

所有事件-样品
活的：45.050%
FSC-A (10^3)
VL1-A
活的-样品
单态：99.556%
SSC-A (10^3)
SSC-H (103)
单态-样品
GFP+：61.327%
VL1-A
BL1-A

图35C

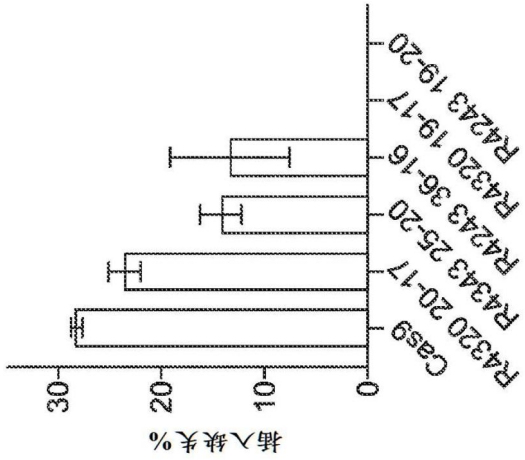

插入缺失%
Cas9
R4320 20-17
R4243 25-17
R4243 36-20
R4320 36-16
R4320 19-17
R4243 19-20

图35D

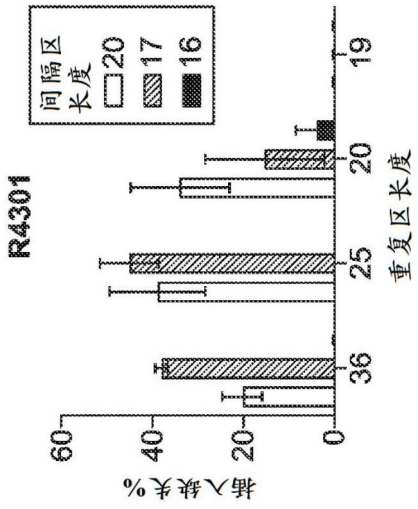

R4301
间隔区长度
20
17
16
插入缺失%
0
20
40
60
36
25
20
19
重复区长度

图35E

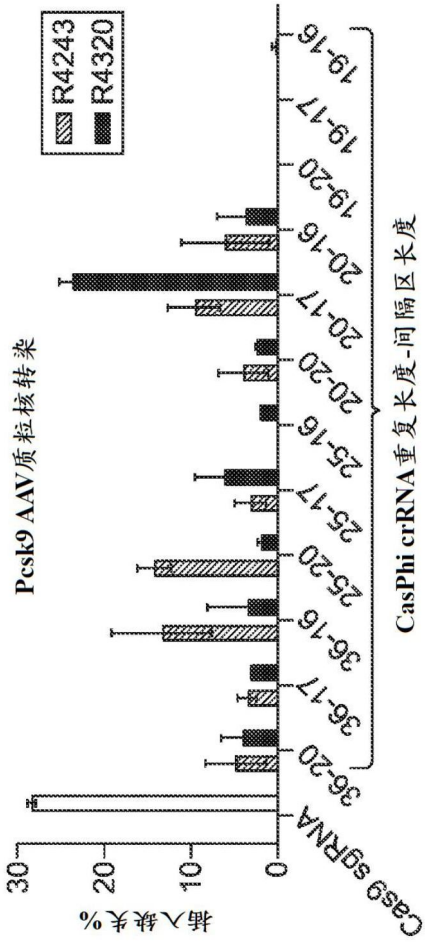

R4243
R4320
Pcsk9 AAV质粒核转染
插入缺失%
0
10
20
30
Cas9 sgRNA
36-20
36-17
36-16
25-20
25-17
25-16
20-20
20-17
20-16
19-20
19-17
19-16
CasPhi crRNA重复长度-间隔区长度

图35F

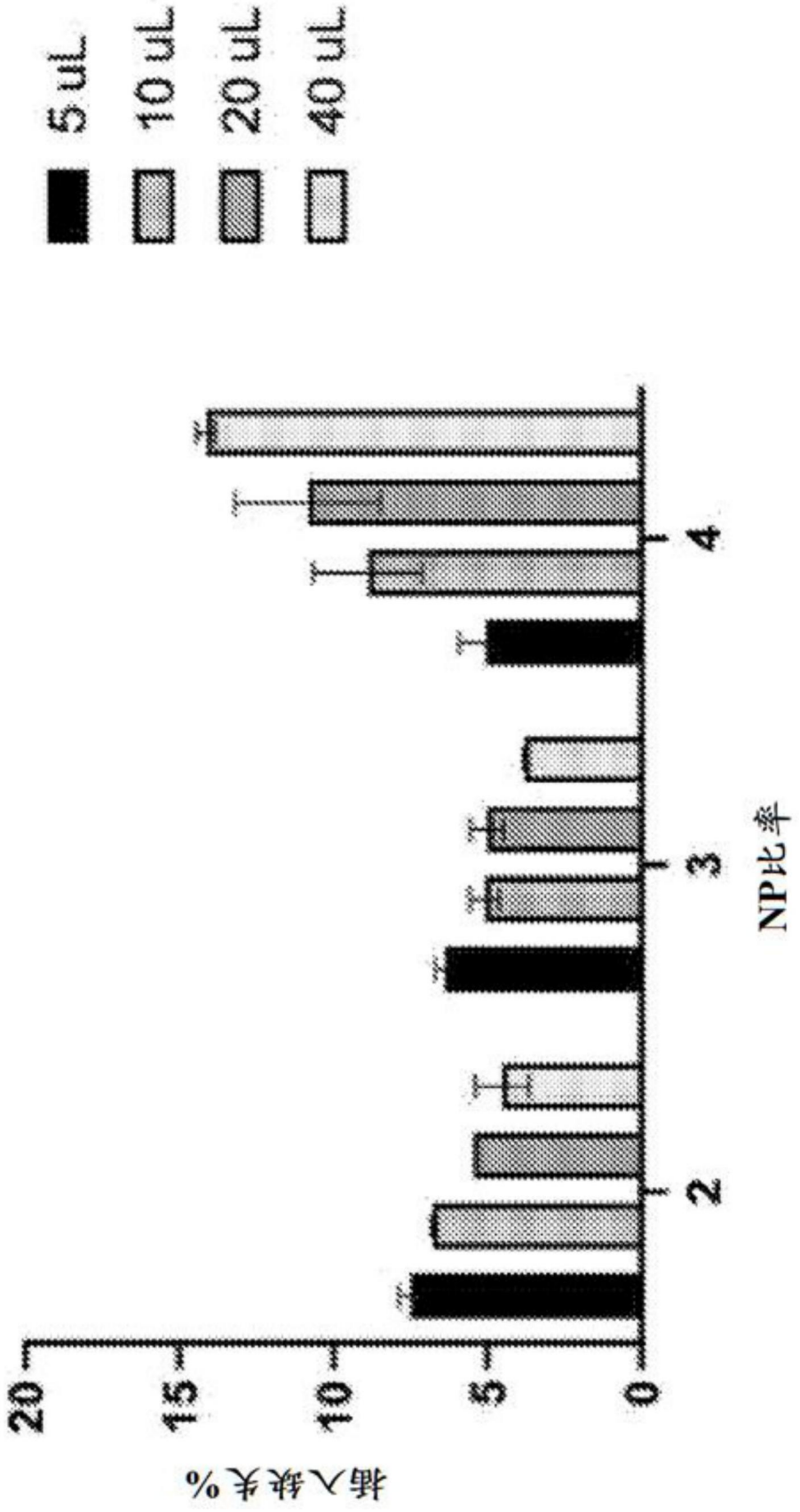


图36

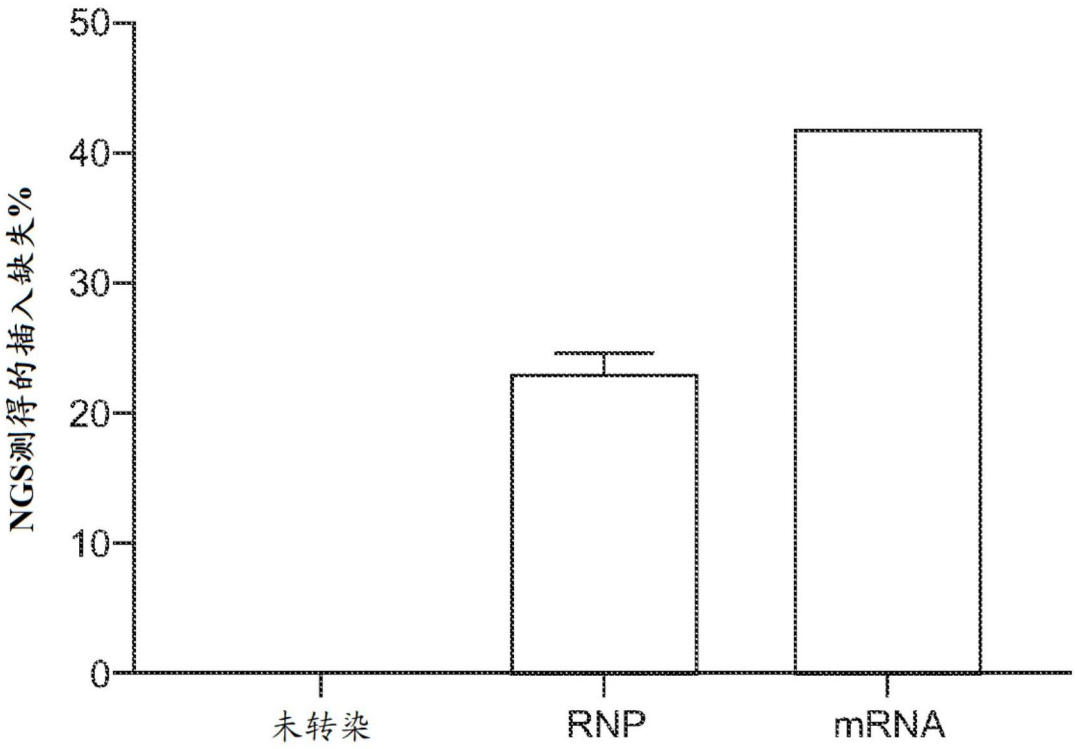

NGS测得的插入缺失%
50
40
30
20
10
0
未转染
RNP
mRNA

图37

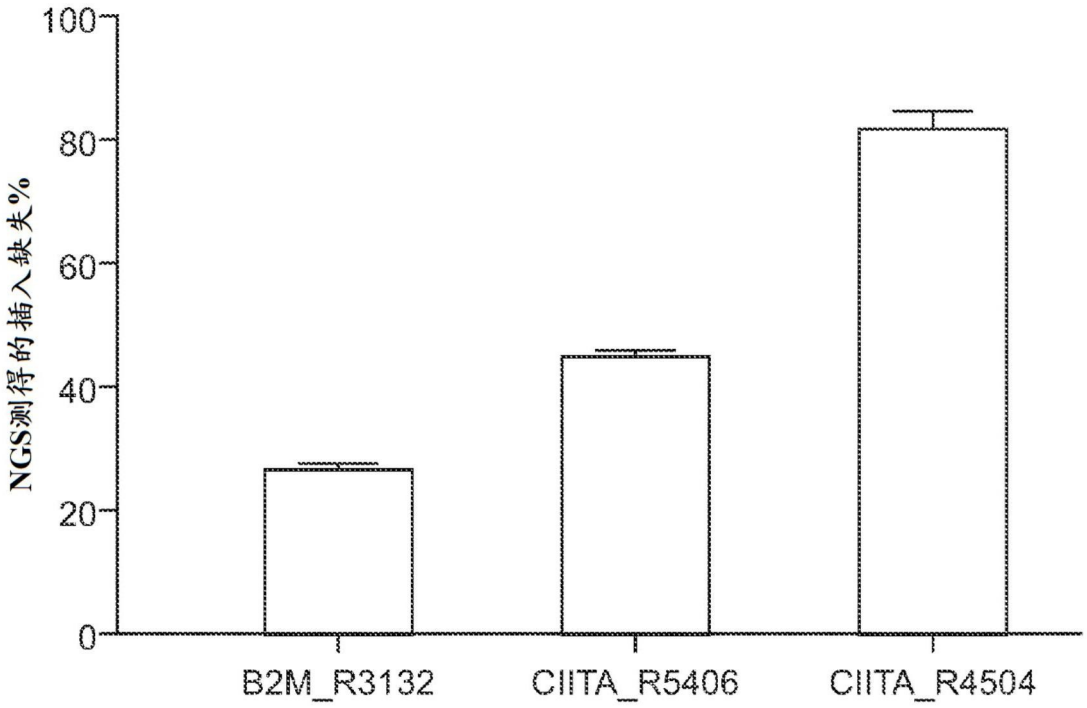

NGS测得的插入缺失%
100
80
60
40
20
0
B2M_R3132
CIITA_R5406
CIITA_R4504

图38

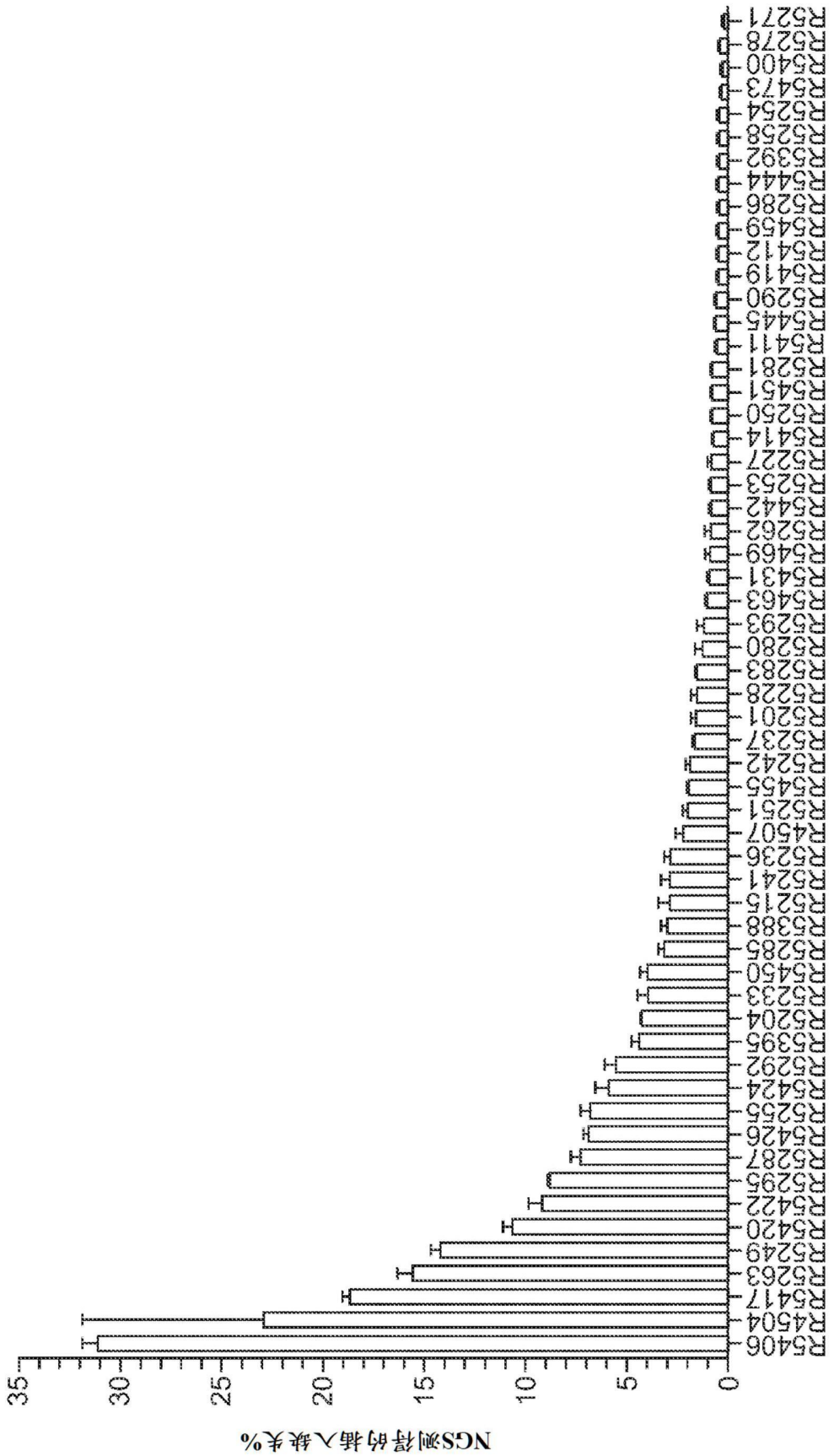


图39