



(10) 授权公告号 CN 111373044 B

(45) 授权公告日 2025.01.28

(21) 申请号 201880073961.1

(22) 申请日 2018.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111373044 A

(43) 申请公布日 2020.07.03

(30) 优先权数据
1715113.5 2017.09.19 GB
1715116.8 2017.09.19 GB
1719516.5 2017.11.23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2018/057160 2018.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/058255 EN 2019.03.28

(73) 专利权人 热带生物科学英国有限公司
地址 英国诺里奇市

(72) 发明人 艾尔·毛利 亚伦·盖伦提
克里斯蒂娜·皮诺奇
安吉拉·查帕罗·加西亚
奥菲尔·梅尔

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 孙占华 张拥

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2005203047 A1, 2005.09.15
Jianping Zhou 等. CRISPR-Cas9 Based
Genome Editing Reveals New Insights into
MicroRNA Function and Regulation in Rice.
《Frontiers in plant science》. 2017, 文献编
号1598第1-12页.

ELENA SENIS 等. TALEN/CRISPR-mediated
engineering of a promoterless anti-viral
RNAi hairpin into an endogenous miRNA
locus. 《NUCLEIC ACIDS RESEARCH》. 2016, 第45
卷(第45期), 第e3 1-17页.

THOMAS B JACOBS 等. Targeted genome
modifications in soybean with CRISPR/
Cas9. 《BMC BIOTECHNOLOGY》. 2015, 第15卷(第15
期), 文献编号16 第1-10页.

审查员 张丽玮

权利要求书2页 说明书100页
序列表136页 附图28页

(54) 发明名称

修饰用于沉默基因表达的植物非编码RNA分
子的特异性的方法

(57) 摘要

本发明公开一种在一植物细胞中对用于编
码或被加工成不具有RNA沉默活性的一非编码
RNA分子的一基因进行修饰的方法, 所述方法包
括将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中, 所述
DNA编辑剂赋予所述非编码RNA分子针对一感兴
趣的靶RNA的一沉默特异性。本发明还公开一种
在一植物细胞中对用于编码或被加工成一RNA沉

默分子的一基因进行修饰的方法, 所述方法包括
将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中, 所述DNA
编辑剂将所述非编码RNA分子的所述沉默特异性
重定向至针对一感兴趣的靶RNA。本发明还公开
一种植物细胞、植物种子、植物、以及产生植物的
方法。

1. 一种在植物细胞中对编码或被加工成针对一种靶RNA的一种微型RNA(miRNA)的一种基因进行修饰的方法,其特征在于:所述方法包括:将一种DNA编辑剂和一种包含所需要的修饰的供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中,所述供体寡核苷酸用作修复模板以在所述基因中产生所需要的修饰,其中所需要的修饰将所述miRNA的沉默特异性重定向至针对一种第二靶RNA,所述靶RNA以及所述第二靶RNA是不同的,从而对编码所述miRNA的所述基因进行修饰,其中所述DNA编辑剂包括一种核酸内切酶和至少一种gRNA。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:编码所述miRNA的所述基因对所述植物细胞是内源性的。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述对编码所述miRNA的所述基因进行修饰包括:赋予所述miRNA针对所述第二靶RNA的至少45%的互补性。

4. 如权利要求1或2项所述的方法,其特征在于:所述miRNA的所述沉默特异性是通过测量所述第二靶RNA的RNA水平来确定的。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述miRNA的所述沉默特异性是由表型上确定的。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于:所述由表型上确定的是通过确定选自于由植物的叶色、花色、生长速率、植株尺寸、作物产量、果实性状、生物胁迫耐受性以及非生物胁迫耐受性所组成的群组中的至少一种植物表型来实现。

7. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述miRNA的所述沉默特异性是由基因型上确定的。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:植物表型是在植物基因型之前确定的。

9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:植物基因型是在植物表型之前确定的。

10. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述对所述基因进行修饰是通过选自于由缺失、插入、点突变及其组合所组成的群组中的一种修饰来实现。

11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰是在所述miRNA的茎区域中。

12. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰是在所述miRNA的环区域中。

13. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰是在所述miRNA的非结构化区域中。

14. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰是在所述miRNA的茎区域以及环区域中。

15. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰是在所述miRNA的茎区域、环区域以及非结构化区域中。

16. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:所述修饰包括一种至多200个核苷酸的修饰。

17. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述至少一个gRNA与一种植物可表达启动子可操作连接。

18. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述DNA编辑剂是一种DNA编辑系统,所述DNA编辑系统是选自于由大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)以及CRISPR所组成的群组。

19. 如权利要求18所述的方法,其特征在于:所述核酸内切酶包括Cas9。

20. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述DNA编辑剂是以DNA、RNA或RNP的形式施加至所述细胞。

21. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述DNA编辑剂与用于监测在植物细胞中的表达的一种报道子连接。

22. 如权利要求21所述的方法,其特征在于:所述报道子是一种荧光蛋白。

23. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述第二靶RNA对所述植物细胞是外源性的。

24. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述植物细胞是原生质体。

25. 一种产生具有降低的靶基因表达的植物的方法,其特征在于:所述方法包括:

(a) 育种一种植物,所述植物包括根据权利要求1或2所述的方法所产生的植物细胞,其中所述植物细胞在所述基因中包括所需要的修饰,所述修饰将所述miRNA的沉默特异性重定向至针对第二靶RNA;以及

(b) 选择具有所述第二靶RNA表达降低的多个子代植物,且所述多个子代植物不包括所述DNA编辑剂,

从而产生具有降低的靶基因表达的所述植物。

26. 如权利要求25所述的方法,其特征在于:所述育种包括杂交或自交。

27. 一种产生具有提升的胁迫耐受性、增加的产量、提升的生长速率或提升的产量质量的植物的方法,其特征在于:所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是赋予对胁迫的敏感性、减少的产量、降低的生长速率或降低的产量质量的所述植物的一种基因,从而产生所述植物。

28. 一种产生耐病原体或抗病原体的植物的方法,其特征在于:所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是赋予对所述病原体的敏感性的所述植物的一种基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

29. 一种产生耐病原体或抗病原体植物的方法,其特征在于,所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是所述病原体的一种基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

30. 一种产生耐害虫或抗害虫植物的方法,其特征在于:所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是所述害虫的一种基因,从而产生所述耐害虫或抗害虫植物。

31. 一种产生耐害虫或抗害虫植物的方法,其特征在于:所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是赋予对所述害虫的敏感性的所述植物的一种基因,从而产生所述耐害虫或抗害虫植物。

32. 一种产生抗除草剂植物的方法,其特征在于,所述方法包括:根据权利要求1或2,在植物细胞中对编码或被加工成一种miRNA的一种基因进行修饰,其中所述第二靶RNA是赋予对所述除草剂的敏感性的所述植物的一种基因,从而产生所述抗除草剂植物。

33. 一种根据权利要求1或2所述的方法所产生的非可再生的植物细胞。

34. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在将DNA编辑剂和包含所需要的修饰的供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中后,所述植物细胞对于所需要的修饰是杂合的。

修饰用于沉默基因表达的植物非编码RNA分子的特异性的方法

[0001] 技术领域及背景技术

[0002] 本发明的一些实施例中是有关于对用于编码或被加工成非编码RNA分子(包含RNA沉默分子)的基因进行修饰,且特别地但非完全地是有关于使用相同的基因在植物中沉默感兴趣的内源性或外源性靶基因表达。

[0003] RNA沉默或RNA干扰(RNAi)是RNA分子抑制基因表达或翻译的内源性共转录或转录后遗传调控机制,通常通过非编码RNA分子介导,包含微型RNA(microRNA,miRNA)、小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)、反式作用siRNA(trans-acting RNA,ta-siRNA)、piwi相互作用RNA(piwi-interacting RNA,piRNA)、反义RNA(antisense RNA)等。近年来,其他非编码RNA已被认为具有RNA沉默活性,包含转移RNA(transfer RNA,tRNA)、小核RNA(small nuclear RNA,snoRNA)、小核仁RNA(small nucleolar RNA,snoRNA)以及重复衍生RNA(repeats-derived RNA)。这些典型和非典型RNA沉默分子在其基质(substrate)、生物发生(biogenesis)、效应蛋白以及靶下调模式上有所不同。

[0004] 此外,Argonaute蛋白与小RNA复合形成RNA诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex,RISC)(RNA干扰(RNAi)效应复合物)的核心。所述Argonaute总科分为两个分支,称为Ago和Piwi。Ago蛋白(例如,Ago1和Ago2)通常与miRNA和siRNA复合,而Piwi蛋白(例如,Piwi、Ago3以及茄子(Aubergine,Aub))通常与piRNA复合。

[0005] 小型干扰RNA(siRNA)是长度为20至25个核苷酸(nt)的双链RNA分子,通过在转录过程中或转录后降解其转录产物而导致没有翻译,从而干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达。

[0006] 微型RNA(miRNA)是长度为20至24nt的小的内源性非编码RNA(non-coding RNA,ncRNA),起源于长的自互补前体。成熟的miRNA通过两种方式调节基因表达:(i)通过抑制翻译或(ii)通过与所述靶转录产物的完全或接近完全互补来降解编码mRNA。大多数植物靶mRNA含有一单个miRNA互补位点,这导致所述靶mRNA通过所述RNA沉默分子和RNA衰变机制剪切和降解。

[0007] Piwi相互作用RNA(piRNA)是小的非编码RNA,其是长的单链前体分子的产物,且无需一切割步骤即可产生。piRNA的长度通常为26至31nt,且大部分为反义的。piRNA通过与Piwi蛋白相互作用形成RNA蛋白复合物。反义piRNA通常加载至Piwi或Aub中。

[0008] 反式作用siRNA(tasiRNA)是一类通过转录后基因沉默来抑制基因表达的小干扰RNA(siRNA)。它们的生物发生是通过miRNA与tasiRNA前体的结合来引发的,其会募集RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA-polymerase,RdRp)从所述tasiRNA前体模板来合成dsRNA。接下来,将此类dsRNA通过DICER样4(DICER-LIKE 4,DCL4)加工成约21个核苷酸的“分阶段的”间隔成熟tasiRNA。

[0009] 基因组编辑技术的最新进展使得改变活细胞中的DNA序列成为可能的。通过仅编辑植物细胞中数十亿个核苷酸的数个核苷酸,这些新技术可能是使作物在恶劣气候下(作物表现和非生物胁迫)生长更好并增强对生物胁迫(昆虫、病毒、细菌、甲虫、线虫等)抗性的

最有效方法。使用基因组编辑技术(例如,CRISPR/Cas9)实现对害虫的抗性的方法是有限的:通过引入终止密码子、读框移位(frame shift)、插入、缺失等方法,将植物易感基因敲除(例如,众所周知的MLO基因);或通过修饰调控元件(例如,启动子、微型RNA结合位点等)来上调抗性基因(例如,R基因)。然而,特定针对病原体的方法仅限于转基因CRISPR应用。

[0010] 先前在各种生物(例如,小鼠、人、虾、植物)中对RNA分子进行基因组编辑的工作,侧重于敲除miRNA活性或改变其在靶RNA中的结合位点,例如:

[0011] Zhao等人(Zhao等人,Scientific Reports,2014年,4:3943)提供了一种在小鼠细胞中采用CRISPR系统的miRNA抑制策略。Zhao使用一特定设计的gRNA通过Cas9在一单个位点切割一miRNA基因,导致小鼠细胞中的miRNA的敲低(knockdown)。

[0012] Jiang等人(Jiang等人,RNA Biology,2014年,11(10):1243-9)使用CRISPR/Cas9通过靶向HeLa细胞中的5'区域从一群集中大量减少人类miR-93。在含有Drosha加工位点(即Drosha(一双链RNA特异性RNase III酶)在一宿主细胞的细胞核中结合、剪切并由此将初级miRNA(pri-miRNA)加工成pre-miRNA的位置)和种子序列(即保守的七系统序列(conserved heptametrical sequence),其对于miRNA与mRNA的结合至关重要,通常位于miRNA 5'末端的2至7位)的靶区域中诱导各种小的插入缺失(indel)。根据Jiang等人,即使是一单个核苷酸的缺失,也可以完全敲除具有高特异性的靶miRNA。

[0013] 关于植物基因组编辑,Bortesi和Fischer(Bortesi和Fischer,Biotechnology Advances,2015年,33:41至52)讨论与ZFNs和TALENs相比,CRISPR-Cas9技术在植物中的使用,以及Basak和Nithin(Basak和Nithin,Front Plant Sci.,2015年,6:1001)证明使用CRISPR-Cas9技术敲除典型植物(例如,南芥和烟草)以及作物(例如,小麦、玉米以及水稻)中的蛋白质编码基因。

[0014] 除了破坏miRNA活性或靶结合位点外,还使用了利用人工微型RNA(amiRNA)介导的内源性和外源性靶基因的基因沉默的基因沉默方法(Tiwari等人,Plant Mol Biol.,2014年,86:1)。类似于微型RNA,amiRNA是单链、大约21nt长,且通过替换pre-miRNA内成熟的双链miRNA序列进行设计(Tiwari等人,2014年)。这些amiRNA作为一转基因引入至一人工表达盒(包含启动子、终止子等)中(Carbonell等人,Plant Physiology,2014年,pp.113.234989),通过小RNA生物发生和沉默机制进行加工,并下调靶表达。根据Schwab等人(Schwab等人,The Plant Cell,2006年,第18卷,1121至1133),当在组织特异性或诱导性启动子下表达时,amiRNA是活性的,可用于植物中的特定基因沉默,特别是当几个相关但不完全相同的靶基因需要下调时。

[0015] Senis等人(Senis等人,Nucleic Acids Research,2017年,第45卷(1):e3)公开了将一无启动子的抗病毒amiRNA工程改造成一内源性miRNA基因座(locus)。具体来说,Senis等人通过由序列特异性核酸酶(例如,Cas9或TALEN)诱导的同源定向DNA重组,将一amiRNA前体转基因(发夹pri-amiRNA)插入至一自然发生的miRNA基因(例如,miR122)的附近。此方法通过利用表达自然miRNA(miR122)的转录活性DNA来使用无启动子和无终止子的amiRNA,也就是说,内源性启动子和终止子驱动并调节插入的amiRNA转基因的转录。

[0016] 此前已经描述了将RNA及/或蛋白质引入至细胞的多种无DNA的方法。例如,在美国专利申请号20160289675中描述了使用电穿孔和脂质转染(lipofection)的RNA转染(transfection)。Cho描述了通过显微注射Cas9蛋白和gRNA复合物将Cas9/gRNA核糖核蛋白

(RNP)复合物直接递送至细胞(Cho等人,“通过直接注射Cas9-sgRNA核糖核蛋白在秀丽隐杆线虫中的可遗传基因敲除(Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins)”,*Genetics*,2013年,195:1177至1180)。Kim描述了通过电穿孔递送Cas9蛋白/gRNA复合物(Kim等人,“通过纯化的Cas9核糖核蛋白的递送在人类细胞中的高效RNA引导基因组编辑(Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins)”,*Genome Res.*,2014年,24:1012至1019)。Zuris报道了通过脂质体递送Cas9蛋白相关的gRNA复合物(Zuris等人,“阳离子脂质介导的蛋白递送使得能够在体外和体内进行基于蛋白的有效基因组编辑(Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo)”,*Nat Biotechnol.*,2014年,doi:10.1038/nbt.3081)。

发明内容

[0017] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种在一植物细胞中对用于编码或被加工成不具有RNA沉默活性的一非编码RNA分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括:将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂赋予所述非编码RNA分子针对一感兴趣的靶RNA的一沉默特异性,从而对用于编码或被加工成所述非编码RNA分子的所述基因进行修饰。

[0018] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种在一植物细胞中对用于编码或被加工成不具有RNA沉默活性的一非编码RNA分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括:将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂赋予所述非编码RNA分子针对一感兴趣的靶RNA的一沉默特异性。

[0019] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种在一植物细胞中将用于编码或被加工成针对一靶RNA的一RNA沉默分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括:将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂将所述RNA沉默分子的一沉默特异性重定向至针对一第二靶RNA,所述靶RNA以及所述第二靶RNA是不同的,从而对用于编码所述RNA沉默分子的所述基因进行修饰。

[0020] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种在一植物细胞中将用于编码或被加工成针对一靶RNA的一RNA沉默分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括:将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂将所述RNA沉默分子的一沉默特异性重定向至针对一第二靶RNA,所述靶RNA以及所述第二靶RNA是不同的。

[0021] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种植物细胞,所述植物细胞为根据本发明的一些实施例的所述方法所产生的。

[0022] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种植物,所述植物包括本发明的一些实施例的所述植物细胞。

[0023] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生具有一靶基因表达降低的一植物的方法,所述方法包括:(a)育种本发明的一些实施例的所述植物;以及(b)选择具有所述感兴趣的靶RNA或所述第二靶RNA表达降低的多个子代植物、或选择在针对一感兴趣的靶RNA的所述非编码RNA分子中包括一沉默特异性的子代,且所述多个子代植物或所述子代不

包括所述DNA编辑剂,从而产生具有一靶基因表达降低的所述植物。

[0024] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生具有提升的胁迫耐受性、增加的产量、提升的生长速率或提升的产量质量的一植物的方法,所述方法包括:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对胁迫具有敏感性、减少的产量、降低的生长速率或降低的产量质量的所述植物的一基因,从而产生所述植物。

[0025] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一耐病原体或抗病原体植物的方法,所述方法包括:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对所述病原体具有敏感性的所述植物的一基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

[0026] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一耐病原体或抗病原体植物的方法,所述方法包括:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是所述病原体的一基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

[0027] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一耐害虫或抗害虫植物的方法,所述方法包括:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是所述害虫的一基因,从而产生所述耐害虫或抗害虫植物。

[0028] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一耐害虫或抗害虫植物的方法,所述方法包括:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对所述害虫具有敏感性的所述植物的一基因,从而产生所述耐害虫或抗害虫植物。

[0029] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一抗除草剂植物的方法,所述方法包括如:根据本发明的一些实施例所述的在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对所述除草剂具有敏感性的所述植物的一基因,从而产生所述抗除草剂植物。

[0030] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种植物,所述植物为根据本发明的一些实施例的所述方法所产生的。

[0031] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种种子,所述种子来自如本发明的一些实施例的所述植物。

[0032] 根据本发明的一些实施例,用于编码或被加工成所述非编码RNA分子的所述基因对所述植物细胞是内源性的。

[0033] 根据本发明的一些实施例,用于编码所述RNA沉默分子的所述基因对所述植物细胞是内源性的。

[0034] 根据本发明的一些实施例,对用于编码或被加工成所述非编码RNA分子的所述基因的所述修饰包括:赋予所述非编码RNA分子针对所述感兴趣的靶RNA具有至少45%的互补性。

[0035] 根据本发明的一些实施例,对用于编码所述RNA沉默分子的所述基因的所述修饰

包括：赋予所述RNA沉默分子针对所述第二靶RNA具有至少45%的互补性。

[0036] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子的所述沉默特异性是通过测量所述感兴趣的靶RNA的一RNA或蛋白质水平来确定的。

[0037] 根据本发明的一些实施例，所述RNA沉默分子的所述沉默特异性是通过测量所述第二靶RNA的一RNA水平来确定的。

[0038] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的所述沉默特异性是由表型上确定的。

[0039] 根据本发明的一些实施例，由表型上确定的是通过确定选自于由植物的一叶色、一花色、一生长速率、一植株尺寸、一作物产量、一果实性状、一生物胁迫耐受性以及一非生物胁迫耐受性所组成的群组中的至少一种植物表型来实现。

[0040] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子的所述沉默特异性是由基因型上确定的。

[0041] 根据本发明的一些实施例，所述植物表型是在一植物基因型之前确定的。

[0042] 根据本发明的一些实施例，所述植物基因型是在一植物表型之前确定的。

[0043] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一前体加工而成。

[0044] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是一RNA干扰(RNAi)分子。

[0045] 根据本发明的一些实施例，所述RNA干扰(RNAi)分子是选自于由一小干扰RNA(siRNA)、一短发夹RNA(shRNA)、一微型RNA(miRNA)、一Piwi相互作用RNA(piRNA)以及一反式作用siRNA(tasiRNA)所组成的群组。

[0046] 根据本发明的一些实施例，所述非编码RNA分子是选自于由一小核RNA(snRNA)、一小核仁RNA(snoRNA)、一长非编码RNA(lncRNA)、一核糖体RNA(rRNA)、一转移RNA(tRNA)、一重复衍生RNA以及一转座元件RNA所组成的群组。

[0047] 根据本发明的一些实施例，设计所述RNA分子或所述RNAi分子，使得所述RNAi分子的一序列被修饰，以保留结构的独创性及以便通过多个细胞RNAi因子来识别。

[0048] 根据本发明的一些实施例，对所述基因的修饰是通过选自于由一缺失、一插入、一点突变及其组合所组成的群组中的一种修饰来实现。

[0049] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域中。

[0050] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一环区域中。

[0051] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一非结构化区域中。

[0052] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域以及一环区域中。

[0053] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域、一环区域以及一非结构化区域中。

[0054] 根据本发明的一些实施例，所述修饰是一插入。

- [0055] 根据本发明的一些实施例,所述修饰是一缺失。
- [0056] 根据本发明的一些实施例,所述修饰是一点突变。
- [0057] 根据本发明的一些实施例,所述修饰包括一种至多200个核苷酸的修饰。
- [0058] 根据本发明的一些实施例,所述方法还包括:将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。
- [0059] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂包括与一植物可表达启动子在运作上相连接的至少一个gRNA。
- [0060] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂不包括一核酸内切酶。
- [0061] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂包括一核酸内切酶。
- [0062] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂是一种DNA编辑系统,所述DNA编辑系统是选自于由一大范围核酸酶、一锌指核酸酶(ZFN)、一转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)以及CRISPR所组成的群组。
- [0063] 根据本发明的一些实施例,所述核酸内切酶包括Cas9。
- [0064] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂是以DNA、RNA或RNP的形式施加至所述细胞。
- [0065] 根据本发明的一些实施例,所述DNA编辑剂与用于监测在一植物细胞中的表达的一报道子连接。
- [0066] 根据本发明的一些实施例,所述报道子是一荧光蛋白。
- [0067] 根据本发明的一些实施例,所述感兴趣的靶RNA或所述第二靶RNA对所述植物细胞是内源性的。
- [0068] 根据本发明的一些实施例,所述感兴趣的靶RNA或所述第二靶RNA对所述植物细胞是外源性的。
- [0069] 根据本发明的一些实施例,所述植物细胞是一原生质体。
- [0070] 根据本发明的一些实施例,所述育种包括杂交或自交。
- [0071] 根据本发明的一些实施例,所述植物是非转基因的(非-GMO)。
- [0072] 根据本发明的一些实施例,所述植物是选自于由一作物、一开花植物以及一乔木所组成的群组。
- [0073] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术及/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含意相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法及材料可以用于本发明的实施例的实践或测试中,但是在下文中描述了示例性的方法及/或材料。在有冲突的情况下,以专利说明书及其定义为准。另外,材料、方法及实施例仅是说明性的,并不旨在必然地限制本发明。

附图说明

[0074] 在本文中仅通过示例的方式,参考所述多个附图来描述本发明的一些实施例。现在具体地参考所述多个附图,应当理解,所示出的细节是作为示例并且出于对本发明的实施例的说明性讨论的目的。因此,显而易见的,结合附图中的描述使本领域技术人员清楚地知道如何实施本发明的实施例。

[0075] 在所述多个附图中:

[0076] 图1是用靶向所述PDS基因的siRNA替代内源性miRNA的基因组编辑诱导基因沉默 (Genome Editing Induced Gene Silencing, GEiGS) 的一实施例流程图, 从而诱导所述内源性PDS基因的基因沉默。为了引入所述修饰, 正在使用一2组成部分的系统。首先, 一CRISPR/CAS9系统在一含有GFP的载体中, 通过设计的多个特异性引导RNA在选定的基因座中产生一剪切, 以促进在所述位点中的同源DNA修复 (HDR)。其次, 引入一供体序列 (具有所述miRNA序列所需要的修饰) 作为用于所述HDR的一模板, 以靶向新分配的多个基因。此系统正在用于原生质体转化中, 通过FACS富集 (由于所述CRISPR/CAS9载体中的所述GFP信号), 回收并再生为多个植物。

[0077] 图2A至2C示出了所述PDS基因的沉默引起光致漂白 (photobleaching) 的照片。烟草 (*Nicotiana*) (图2A至2B) 和拟南芥 (*Arabidopsis*) (图2C) 植物中的所述PDS基因的沉默引起本生烟 (*N. benthamiana*) (图2B) 和拟南芥 (图2C, 右侧) 中的光致漂白。照片是在PDS沉默3周半后拍摄。

[0078] 图3A至3D是使用GEiGS敲低拟南芥中GFP表达水平的照片。与使用GEiGS编辑以表达GFP siRNA的原生质体 (图3C至3D) 相比, 表达GFP的拟南芥原生质体显示为对照组 (图3A至3B)。值得注意的是, 沉默GEiGS原生质体或植物以表达GFP蛋白。

[0079] 图4是用靶向GFP的siRNA替换内源性miRNA的GEiGS的一实施例流程图, 用活性RNAi产生抗GFP的拟南芥植物。为了引入所述修饰, 一CRISPR/CAS9系统在一含有RFP的载体中, 通过设计的多个特异性引导RNA在选定的基因座中产生一剪切, 以促进在所述位点中的同源DNA修复 (HDR)。其次, 引入一供体 (DONOR) 序列 (具有所述miRNA序列所需要的修饰) 作为用于所述HDR的一模板, 以靶向所述GFP基因。此系统正在用于GFP表达的原生质体中, 通过FACS进行假定修饰的富集 (由于所述CRISPR/CAS9载体中的所述RFP信号) 正在进行和回收, 再生植物的GFP信号强度正在进行分析。

[0080] 图5是用靶向GFP的siRNA替换内源性miRNA的GEiGS的一实施例流程图, 用GEiGS定向的RNAi产生抗GFP的拟南芥植物。值得注意的是, GEiGS植物在植物转化后沉默GFP表达。RFP正在用于具有瞬时存在的CRISPR/CAS9载体的细胞富集。

[0081] 图6是用靶向GFP的siRNA替换内源性miRNA的GEiGS的一实施例流程图, 产生对病毒感染 (例如, TMV感染 (即外源性基因)) 具有抗性的植物。RFP正在用于具有瞬时存在的CRISPR/CAS9载体的细胞富集。

[0082] 图7是倒伏的 (lodging) 香蕉植物的照片, 其遭受由穿孔线虫 (burrowing nematode) (*Radopholus similis*) 引起的倾覆病 (Toppling Disease)。

[0083] 图8示出在西原 (Tay Nguyen) 地区中不同作物上出现的香蕉穿孔线虫 (*Radopholus similis*) 和咖啡根腐线虫 (*Pratylenchus coffeae*) 的表格。

[0084] 图9是产生多个GEiGS模板的计算管道的一实施例流程图。所述计算GEiGS管道应用生物元数据 (biological metadata), 并能够自动产生多个GEiGS DNA供体模板, 用于最小限度地编辑多个内源性非编码RNA基因 (例如, 多个miRNA基因), 从而导致一新的功能增益, 即将其沉默能力重定向至感兴趣的靶基因表达。

[0085] 图10是示出靶向任何所需的外源性害虫基因的抗害虫植物的设计的一实施例流程图。用靶向病原体/害虫必需基因的siRNA替代内源性miRNA的GEiGS, 产生对病原体/害虫感染具有抗性的植物。

[0086] 图11是示出设计RNA沉默分子并具有最小限度编辑的miRNA基因碱基所需的主要阶段的一实施例流程图。

[0087] 图12A至12G示出了miR-390和修饰的miR-390结构与靶向的序列的初级转录本。miR390的初级转录本的二级结构表示及其修饰形式- (图12A) 野生型; (图12B至12C) 靶向GFP的修饰形式; (图12D至12E) 靶向AtPDS3的修饰形式; (图12F至12G) 靶向AtADH1的修饰形式。成熟miRNA/siRNA以红色勾勒轮廓,通过设计表现出结构保守性。通过CRISPR/CAS9系统操作的靶向的区域以紫色勾勒轮廓,且NGG序列以黄色做标记 (图12A)。

[0088] 图13A至13G示出了miR-173和修饰的miR-173结构与靶向的序列的初级转录本。miR173的初级转录本的二级结构表示及其修饰形式- (图13A) 野生型; (图13B至13C) 靶向GFP的修饰形式; (图13D至13E) 靶向AtPDS3的修饰形式; (图13F至13G) 靶向AtADH1的修饰形式。成熟miRNA/siRNA以红色勾勒轮廓,通过设计表现出结构保守性。通过CRISPR/CAS9系统操作的靶向的区域以紫色勾勒轮廓,且NGG序列以黄色突出显示 (图13A)。

[0089] 图13H示出了多个GEiGS寡核苷酸设计的实施例实例,其中前体结构在生物发生中不起作用,因此不需要被维持。设计是基于甘蓝型油菜 (*Brassica rapa*) bnTAS3B tasiRNA。从上至下:野生型tasiRNA、具有序列变化最小的GEiGS设计、以及具有序列变化最大的GEiGS设计。产生成熟小RNA分子的非编码RNA前体的选择以绿色突出显示。GEiGS寡核苷酸和野生型序列之间的序列差异以红色突出显示。值得注意的是,不同于miRNA和tRNA, tasiRNA生物发生不依赖于所述前体二级结构。

[0090] 图14A至14D示出了通过miR-173及其修饰形式的基因靶向。(图14A) 野生型miR-173通过成熟miRNA与基因中一序列的序列互补性靶向TAS1c转录物 (红色)。新修饰的miRNA (SWAP 1、2、3、4、9以及10) 设计为通过与它们的序列序列互补性 (红色) 靶向 (图14B) GFP、(图14C) AtPDS3以及 (图14D) AtADH1。来自wt序列中修饰的核苷酸以小写形式书写。

[0091] 图15A至15D示出了通过miR-390及其修饰形式的基因靶向。(图15A) 野生型miR-390通过成熟miRNA与基因中一序列的序列互补性靶向TAS3转录物 (红色)。新修饰的miRNA (SWAP 5、6、7、8、11以及12) 设计为通过与它们的序列序列互补性 (红色) 靶向 (图15B) GFP、(图15C) AtPDS3以及 (图15D) AtADH1。来自wt序列中修饰的核苷酸以小写形式书写。

[0092] 图16示出了PDS3表型/基因型:选择漂白的表型植物,并通过内部扩增子PCR进行基因分型,然后用BtsaI (NEB) 进行限制性酶切分析,以验证供体相对于野生型序列的存在。流道1:用无供体限制的经处理的植物;流道2至4:含供体限制的经PDS3处理的植物;流道5:未受限制的阳性质粒供体对照组;流道6:无模板的水对照组;流道7:受限制的阳性质粒供体;流道8:用限制的负性供体轰击的植物;流道9:受限制的未经处理的对照组植物。随后对扩增子进行外部PCR扩增和测序,以验证插入。

[0093] 图17示出了ADH1表型/基因型:通过对烯丙醇的抗性选择植物,并通过内部扩增子PCR进行基因分型,然后通过BccI (NEB) 进行限制性酶切,以验证供体的存在。流道1:受限制的烯丙醇敏感的对照组植物;流道2至4:含供体限制的抗烯丙醇的植物;流道5:未受限制的阳性质粒供体对照组;流道6:无模板对照组;流道7:受限制的阳性质粒供体;流道8:用限制的非特异性供体轰击的植物;流道9:受限制的非烯丙醇处理的对照组。

[0094] 图18是示出了在靶向AtPDS3转录物的miR-173修饰的植物中的基因表达分析的图。与用GEiGS#5和SWAP1和2 (GFP) 轰击的植物相比,在用GEiGS#4和SWAP3轰击的再生中,通

过qRT-PCR进行了AtPDS3表达的分析。值得注意的是,与对照组植物相比,当miR-173修饰为靶向AtPDS3时,平均观察到的基因表达水平降低了82% (误差线显示SD;基于Ct值计算的p值<0.01)。

[0095] 图19是示出了在靶向AtPDS3转录物的miR-390修饰的植物中的基因表达分析的图。与用GEiGS#5和SWAP1和2(GFP)轰击的植物相比,在用GEiGS#1和SWAP11轰击的再生中,通过qRT-PCR进行了AtADH1表达的分析。值得注意的是,与对照组植物相比,当miR-390修饰为靶向AtADH1时,平均观察到的基因表达水平降低了82% (误差线显示SD;基于Ct值计算的p值<0.01)。

具体实施方式

[0096] 本发明的一些实施例中是有关于对用于编码或被加工成非编码RNA分子(包含RNA沉默分子)的基因进行修饰,且特别地但非完全地是有关于使用相同的基因在植物中沉默感兴趣的内源性或外源性靶基因表达。

[0097] 参考所述多个附图以及所附说明,可以更好地理解本发明的原理以及操作。

[0098] 在详细解释本发明的至少一个实施例之前,应当理解,本发明的应用并不一定限于以下描述中所阐述的或由所述多个示例所举例说明的细节。本发明能够具有其他实施例,或者能够以各种方式被实践或执行。此外,应当理解,本文中采用的措词和术语是出于说明的目的,而不应被视为是限制性的。

[0099] 先前在各种生物(例如,小鼠、人、植物)中对多个RNA分子进行基因组编辑的工作,侧重于使用转基因破坏miRNA活性或多个靶结合位点。植物中的基因组编辑进一步集中于使用CRISPR-Cas9技术、ZFN以及TALEN,用于敲除多种典型植物中的多个基因或多个插入。此外,还描述了在多种植物中使用人工微型RNA转基因以沉默多个内源性和外源性靶基因的基因沉默(Molnar A等人,Plant J.,2009年,58(1):165至74,doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03767.x,Epub 2009年1月19日;Borges和Martienssen,Nature Reviews Molecular Cell Biology|AOP,于2015年11月4日在线出版;doi:10.1038/nrm4085)。将所述多个人工miRNA转基因引入至一人工表达盒(包含一启动子、终止子、选择标记等)内的多个植物细胞中,并下调靶表达。

[0100] 在将本发明付诸实践的同时,本发明人设计了一基因编辑技术,所述基因编辑技术针对多个非编码RNA分子(例如,内源性)设计用于靶向和干扰一非自然的感兴趣的靶基因(对所述植物细胞为内源性或外源性)。本文中所述的基因编辑技术并未实现包括多个表达盒(具有一启动子、终止子、选择标记)的多个经典分子遗传和转基因工具。

[0101] 如下文以及在其后的实例部分中所示,本发明人设计了一种基因组编辑诱导基因沉默(Genome Editing Induced Gene Silencing,GEiGS)平台,所述平台能够利用一植物细胞的多个内源性非编码RNA分子(包含例如多个RNA沉默分子(例如,siRNA、miRNA、piRNA、tasiRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、snRNA、snoRNA等)),并对它们进行修饰以靶向和下调任何感兴趣的RNA靶(参见图1中的示例性流程图)。使用GEiGS,本方法能够筛选多个潜在的非编码RNA分子,编辑这些内源性RNA分子中的多个核苷酸,从而重定向其特异性以有效且特异性地靶向和下调任何感兴趣的RNA(包含通过多种病原体和多种害虫编码的内源性及/或外源性RNA(参见图9中的示例性流程图)。综上所述,GEiGS可以用作一种新型的非转基因的技

术,用于提高作物产量、作物生长速率、作物质量以及保护作物免受胁迫、病原体、害虫以及除草剂的侵害。

[0102] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种在一植物细胞中对用于编码或被加工成不具有RNA沉默活性的一非编码RNA分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂赋予所述非编码RNA分子针对一感兴趣的靶RNA的一沉默特异性,从而对用于编码或被加工成所述非编码RNA分子的所述基因进行修饰。

[0103] 根据本发明的另一方面,提供了一种在一植物细胞中将用于编码或被加工成针对一靶RNA的一RNA沉默分子的一基因进行修饰的方法,所述方法包括:将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂将所述RNA沉默分子的所述特异性重定向至针对一第二靶RNA,所述靶RNA以及所述第二靶RNA是不同的,从而对用于编码所述RNA沉默分子的所述基因进行修饰。

[0104] 本文中所使用的术语“植物”包括多个整株植物、一嫁接植物、所述多个植物的祖先和子代以及多个植物部分,包含多个种子、多个幼苗、多个茎、多个根(包含多个块茎)、多个根茎、多个接穗以及多个植物细胞、组织以及器官。所述植物可以是任何形式,包含多个悬浮培养物、多个胚、多个分生组织、多个愈伤组织、多个叶片、多个配子体、多个孢子体、多个花粉以及多个小孢子。在本发明的所述多个方法中可能有用的多个植物包含属于绿色植物总科(superfamily Viridiplantae)的所有植物,特别是选自以下的单子叶(monocotyledonous)和双子叶(dicotyledonous)植物,包含一饲料(fodder)或豆科植物、观赏植物、粮食作物、乔木或灌木(shrub),选自包括以下列表:相思树属(*Acacia* spp.)、槭树属(*Acer* spp.)、猕猴桃属(*Actinidia* spp.)、七叶树属(*Aesculus* spp.)、澳大利亚贝壳杉(*Agathis australis*)、苦合欢(*Albizia amara*)、三色桫欏(*Alsophila tricolor*)、须芒草(*Andropogon* spp.)、落花生属(*Arachis* spp.)、槟榔(*Areca catechu*)、香桂(*Astelia fragrans*)、鹰嘴紫云英(*Astragalus cicer*)、多小叶红苏木(*Baikiaea plurijuga*)、桦木属(*Betula* spp.)、芸苔属(*Brassica* spp.)、木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)、伯克苏木(*Burkea africana*)、紫柳花(*Butea frondosa*)、粉质胚乳白花菜(*Cadaba farinosa*)、朱缨花属(*Calliandra* spp.)、野茶树(*Camellia sinensis*)、美人蕉(*Canna indica*)、辣椒属(*Capsicum* spp.)、决明属(*Cassia* spp.)、距豌豆(*Centroema pubescens*)、木瓜属(*Chacomeles* spp.)、肉桂(*Cinnamomum cassia*)、小果咖啡(*Coffea arabica*)、可乐豆木(*Colophospermum mopane*)、变异小冠花(*Coronillia varia*)、枸子(*Cotoneaster serotina*)、山楂属(*Crataegus* spp.)、黄瓜属(*Cucumis* spp.)、柏木属(*Cupressus* spp.)、银蕨(*Cyathea dealbata*)、榲桲(*Cydonia oblonga*)、日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)、香茅属(*Cymbopogon* spp.)、银蕨(*Cynthea dealbata*)、榲桲(*Cydonia oblonga*)、货贝黄檀(*Dalbergia monetaria*)、大叶骨碎补(*Davallia divaricata*)、金钱草属(*Desmodium* spp.)、新西兰树蕨(*Dicksonia squarosa*)、拢双黄茅(*Dibeteropogon amplexans*)、迪奥豆属(*Dioclea* spp.)、扁豆属(*Dolichos* spp.)、直茅豆(*Dorycnium rectum*)、金字塔稗(*Echinochloa pyramidalis*)、红景天属(*Ehrafia* spp.)、穆子(*Eleusine coracana*)、幽眉草属(*Eragrestis* spp.)、刺桐属(*Erythrina* spp.)、桉属(*Eucalyptus* spp.)、假乌木(*Euclea schimperi*)、绒毛状金茅(*Eulalia villosa*)、荞麦属(*Pagopyrum* spp.)、费约果

(*Feijoa sellowiana*)、草莓属(*Fragaria* spp.)、千斤拔属(*Flemingia* spp.)、河岸藤露览树(*Freycinetia banksii*)、东亚老鹤草(*Geranium thunbergii*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、野黄豆(*Glycine javanica*)、墨西哥丁香属(*Gliricidia* spp.)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、银桦属(*Grevillea* spp.)、鞘杆古夷布提木(*Guibourtia coleosperma*)、岩黄耆属(*Hedysarum* spp.)、牛鞭草(*Hemaphysa altissima*)、黄茅(*Heteropogon contortus*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、红苕茅(*Hyparrhenia rufa*)、小连翘(*Hypericum erectum*)、*Hypericella dissoluta*、异花木蓝(*Indigo tinctoria*)、鸢尾属(*Iris* spp.)、雨伞草(*Leptarrhena pyrrolifolia*)、胡枝子属(*Lespedeza* spp.)、莴苣属(*Lettuca* spp.)、银合欢(*Leucaena leucocephala*)、单罗得草(*Loudetia simplex*)、*Lotonous bainesii*、百脉根属(*Lotus* spp.)、硬皮豆(*Macrotyloma axillare*)、苹果属(*Malus* spp.)、木薯(*Manihot esculenta*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)、水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)、香蕉(*Musa sapientum*)、香蕉(banana)、烟草属(*Nicotiana* spp.)、驴食豆属(*Onobrychis* spp.)、鸟足豆属(*Ornithopus* spp.)、稻属(*Oryza* spp.)、非洲双翼豆(*Peltopodium africanum*)、狼尾草属(*Pennisetum* spp.)、酪梨(*Persea gratissima*)、碧冬苳属(*Petunia* spp.)、菜豆属(*Phaseolus* spp.)、加那利海枣(*Phoenix canariensis*)、新西兰剑麻(*Phormium cookianum*)、石楠属(*Photinia* spp.)、白云杉(*Picea glauca*)、松属(*Pinus* spp.)、豌豆(*Pisum sativum*)、新西兰罗汉松(*Podocarpus totara*)、斑点普格纳西亚草(*Pogonarthria fleckii*)、禮普格纳西亚草(*Pogonaffhria squarrosa*)、杨属(*Populus* spp.)、瓜叶牧豆(*Prosopis cineraria*)、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、星状老虎刺(*Pterolobium stellatum*)、西洋梨(*Pyrus communis*)、栎属(*Quercus* spp.)、厚叶石斑木(*Raphiolepis umbellata*)、美味棒花棕(*Rhopalostylis sapida*)、纳塔尔漆树(*Rhus natalensis*)、欧洲醋栗(*Ribes grossularia*)、茶藨子属(*Ribes* spp.)、刺槐(*Robinia pseudoacacia*)、蔷薇属(*Rosa* spp.)、悬钩子属(*Rubus* spp.)、柳属(*Salix* spp.)、红裂稈草(*Schyzachyrium sanguineum*)、金松(*Sciadopitys verticillata*)、北美红杉(*Sequoia sempervirens*)、巨杉(*Sequoiadendron giganteum*)、两色高粱(*Sorghum bicolor*)、菠菜属(*Spinacia* spp.)、流苏状鼠尾粟(*Sporobolus fimbriatus*)、苦豆草(*Stiburus alopecuroides*)、矮柱花草(*Stylosanthes humilis*)、葫芦茶属(*Tadehagi* spp.)、落羽杉(*Taxodium distichum*)、阿拉伯黄背草(*Themeda triandra*)、三叶草属(*Trifolium* spp.)、小麦属(*Triticum* spp.)、异叶铁杉(*Tsuga heterophylla*)、越桔属(*Vaccinium* spp.)、蚕豆属(*Vicia* spp.)、葡萄(*Vitis vinifera*)、锥穗沃森花(*Watsonia pyramidata*)、马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)、玉蜀黍(*Zea mays*)、苋菜(amaranth)、洋蓟(artichoke)、芦笋(asparagus)、球花甘蓝(broccoli)、抱子甘蓝(Brussels sprouts)、卷心菜、油菜(canola)、胡萝卜、花椰菜、芹菜、绿叶羽衣甘蓝(collard greens)、亚麻(flax)、散叶甘蓝(kale)、小扁豆(lentil)、油籽油菜(oilseed rape)、秋葵、洋葱、马铃薯、水稻、大豆、稻草、甜菜、甘蔗、向日葵、西红柿、南瓜茶(squash tea)、树。或者,藻类和其它非绿色植物(non-*viridiplantae*)可以用于本发明的一些实施例的方法。

[0105] 根据一具体的实施例,所述植物是一作物、一开花植物或一乔木。

[0106] 根据一具体的实施例,所述植物是一木本(woody)植物物种,例如,猕猴桃(*Actinidia chinensis*) (猕猴桃科(Actinidiaceae))、木薯(*Manihot esculenta*) (大戟科

(Euphorbiaceae))、北美鹅掌楸 (*Firiodendron tulipifera*) (木兰科 (Magnoliaceae))、杨树 (*Populus*) (杨柳科 (Salicaceae))、檀香树 (*Santalum album*) (檀香科 (Santalaceae))、榆树 (*Ulmus*) (榆科 (Ulmaceae)) 以及蔷薇科 (Rosaceae) (苹果、李、梨) 和芸香科 (Rutaceae) (柑桔、小柠檬) 的不同物种、裸子植物 (例如, 白云杉 (*Picea glauca*) 和火炬松 (*Pinus taeda*))、林木 (例如, 桦木科 (Betulaceae)、壳斗科 (Fagaceae)、裸子植物以及热带树种)、果树、灌木或草本植物 (例如, 香蕉、可可、椰子、咖啡、枣子、葡萄以及茶) 以及油棕。

[0107] 根据一具体的实施例, 所述植物是一热带作物, 例如, 咖啡、澳洲坚果、香蕉、菠萝、芋头、木瓜、芒果、大麦、豆类、木薯、鹰嘴豆、可可 (巧克力)、豇豆、玉米 (maize) (玉米 (corn))、小米、水稻、高粱、甘蔗、甘薯、烟草、芋头、茶、山药。

[0108] “谷物 (grain)”、“种子”或“豆”是指一开花植物的繁殖单位, 能够发育成另一种这样的植物。如本文中所使用, 所述多个术语同义地且可互换地使用。

[0109] 根据一具体的实施例, 所述植物是一植物细胞, 例如, 在一胚细胞悬浮液中的植物细胞。

[0110] 根据一具体的实施例, 所述植物是一原生质体。

[0111] 所述多个原生质体是源自任何植物组织, 例如, 水果、多个花朵、多个根、多个叶、多个胚、胚细胞悬浮液、愈伤组织或幼苗组织。

[0112] 如本文中所使用, 术语“非编码RNA分子”是指未翻译成一氨基酸序列且未编码一蛋白质的一RNA序列。

[0113] 根据一个实施例, 所述非编码RNA分子通常受制于所述RNA沉默加工机制或活性。然而, 本文中考虑了多个核苷酸的一些变化 (例如, 对于多达24个核苷酸的miRNA), 其可能引起导致RNA干扰或翻译抑制的一加工机制。

[0114] 根据一具体的实施例, 所述非编码RNA分子对所述细胞是内源性的 (自然发生的, 例如, 原生的)。应当理解的是, 所述非编码RNA分子也可以对所述细胞是外源性的 (即外部添加的, 且不是在所述细胞中自然发生的)。

[0115] 根据一些实施例, 所述非编码RNA分子包括一固有的翻译抑制活性。

[0116] 根据一些实施例, 所述非编码RNA分子包括一固有的RNAi活性。

[0117] 根据一些实施例, 所述非编码RNA分子不包括一固有的翻译抑制活性或一固有的RNAi活性 (即所述非编码RNA分子不具有RNA沉默活性)。

[0118] 根据本发明的一实施例, 所述非编码RNA分子对一靶RNA (例如, 一自然靶RNA) 具有特异性, 且不会交叉抑制或沉默一第二靶RNA或感兴趣的靶RNA, 除非设计成这样做 (如下所述), 与所述靶基因表现出100%或更低的全局同源性, 例如低于99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%的全局同源性; 如通过RT-PCR、免疫印迹、免疫组织化学及/或流式细胞仪、测序或任何其他检测方法在所述RNA或蛋白质水平上确定。

[0119] 根据一个实施例, 所述非编码RNA分子是一RNA沉默或RNA干扰 (RNAi) 分子。

[0120] 术语“RNA沉默”或RNAi是指一细胞调节机制, 其中多个非编码RNA分子 (所述“RNA沉默分子”或“RNAi分子”) 以一序列特异性方式介导对基因表达或翻译的共转录或转录后抑制。

[0121] 根据一个实施例, 所述RNA沉默分子能够在转录过程中介导RNA抑制 (共转录基因

沉默)。

[0122] 根据一具体的实施例,共转录基因沉默包含表观遗传沉默(epigenetic silencing)(例如,防止功能基因表达的色态(chromatic state))。

[0123] 根据一个实施例,所述RNA沉默分子能够在转录后介导RNA抑制(转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing))。

[0124] 转录后基因沉默(PTGS)通常是指多个信使RNA(mRNA)分子降解或剪切的过程(通常发生在细胞质中),通过阻止翻译来降低其活性。例如,且如下文详细讨论的,一RNA沉默分子的一引导链与一mRNA分子中的一互补序列配对,并通过例如Argonaute 2(Ago2)诱导剪切。

[0125] 共转录基因沉默通常是指基因活性的失活(即转录抑制),且通常发生在细胞核中。这种基因活性抑制是通过多个表观遗传相关的因子介导,例如,甲基转移酶,其将靶DNA和组蛋白甲基化。因此,在共转录基因沉默中,一小RNA与一靶RNA的结合(小RNA-转录物的相互作用)破坏了所述靶新生转录物的稳定性,且募集多个DNA和组蛋白修饰酶(即多个表观遗传因子),从而诱导染色质重塑为抑制基因活性和转录的一结构。此外,在共转录基因沉默中,与染色质相关的多个长非编码RNA支架可能以独立于多个小RNA而募集多个染色质修饰复合物。这些共转录沉默机制形成多个RNA监视系统,所述系统检测并沉默不适当的转录事件,且通过多个自我增强的表观遗传环提供这些事件的一记忆(如D.Hoch和D.Moazed中所述,RNA介导的基因表达的表观遗传调控(RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression),Nat Rev Genet.,2015年,16(2):71至84)。

[0126] 根据本发明的一实施例,所述RNAi生物发生/加工机制产生所述RNA沉默分子。

[0127] 根据本发明的一实施例,所述RNAi生物发生/加工机制产生所述RNA沉默分子,但尚未鉴定具体的靶。

[0128] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子具有诱导RNA干扰(RNAi)的能力。

[0129] 以下是根据本发明的多个特定实施例可以使用的包括一固有的RNAi活性(例如,是多个RNA沉默分子)的多个非编码RNA分子的详细描述。

[0130] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一前体加工而成。

[0131] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一单链RNA(ssRNA)前体加工而成。

[0132] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一双链结构的单链RNA前体加工而成。

[0133] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一dsRNA前体(例如,包括完全和不完全的碱基配对)加工而成。

[0134] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一非结构化的RNA前体加工而成。

[0135] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一蛋白质编码RNA前体加工而成。

[0136] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子是由一非编码RNA前体加工而成。

[0137] 根据一个实施例,所述dsRNA可以源自两个不同的互补RNA,或源自折叠在其自身

上以形成dsRNA的一单个RNA。

[0138] 基于完全和不完全的配对RNA(即双链RNA;dsRNA)、siRNA以及shRNA-在多个细胞中多个长dsRNA的存在刺激一核糖核酸酶III酶(ribonuclease III enzyme)(称为dicer)的活性。Dicer(也称为核糖核酸内切酶Dicer或具有RNase基序的解螺旋酶(helicase))是一种在多个植物中通常被称为Dicer样(DCL)蛋白的酶。不同植物具有不同数量的DCL基因,因此,例如,拟南芥(*Arabidopsis*)基因组通常具有四个DCL基因,水稻具有八个DCL基因,且玉蜀黍基因组具有五个DCL基因。Dicer参与将所述dsRNA加工成多个短片段的dsRNA(称为短干扰RNA(siRNA))的过程。源自dicer活性的siRNA的长度通常为约21至约23个核苷酸,且包括具有两个3'核苷酸突出端的约19个碱基对双链体。

[0139] 因此,本发明的一些实施例考虑修饰用于编码一dsRNA的一基因,以将一沉默特异性(包含沉默活性)重定向至针对一第二靶RNA(即感兴趣的靶)。

[0140] 根据一个实施例,使用长于21bp的多个dsRNA前体。各种研究表明,长的dsRNA可用于沉默基因表达而不会诱导应激反应或引起显着的脱靶作用-例如参见(Strat等人, *Nucleic Acids Research*, 2006年,第34卷,第13号:3803至3810;Bhargava A等人, *Brain Res. Protoc.*, 2004年,13:115至125;Diallo M.等人, *Oligonucleotides*, 2003年,13:381至392;Paddison P.J.等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002年,;99:1443至1448;Tran N.等人, *FEBS Lett.*, 2004年,573:127至134)。

[0141] 术语“siRNA”是指诱导所述RNA干扰(RNAi)途径的小的抑制性RNA双链体(通常在18至30个碱基对之间)。通常,siRNA被化学合成为21个聚体(mer),具有一中心19bp双链体区域且在末端具有对称的2-碱基3'-突出端,尽管最近已经描述了化学合成的25至30个碱基长的RNA双链体与在相同位置处具有21个聚体相比,效力可提高100倍。表明使用较长的RNA触发RNAi所获得的观察到的提高效力是由为Dicer提供一基质(27个聚体)而不是一产物(21个聚体)引起的,这提高了所述siRNA双链体进入RISC的速度或效率。

[0142] 已经发现,所述3'-突出端的位置(而不是组成)影响一siRNA的效力,且在反义链上具有一3'-突出端的不对称双链体通常比在有义链上具有所述3'-突出端的不对称双链体更有效力(Rose等人,2005年)。

[0143] 一双链干扰RNA(例如,siRNA)的多个链可以连接以形成一发夹(hairpin)或茎环(stem-loop)结构(例如,一shRNA)。因此,如上所述,本发明的一些实施例的所述RNA沉默分子也可以是一短发夹RNA(shRNA)。

[0144] 如本文中所使用,术语短发夹RNA(“shRNA”)是指具有一茎环结构的一RNA分子,包括互补序列的一第一和第二区域,互补程度和所述多个区域的方向足以使得在所述多个区域之间发生碱基配对,所述第一和第二区域通过一环区域连接,所述环是由于所述环区域内的多个核苷酸(或多个核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对而导致的。所述环中的多个核苷酸数目是介于且包含3至23、或5至15、或7至13、或4至9、或9至11之间的数字,在所述环中的一些所述多个核苷酸可以参与所述环中的其他核苷酸的碱基配对交互作用。可以用于形成所述环的多个寡核苷酸序列的实例包含5'-CAAGAGA-3'和5'-UUACAA-3'(国际专利申请号W02013126963和W02014107763)。本领域技术人员将意识到,由此产生的单链寡核苷酸形成一茎环或发夹结构,包括能够与所述RNAi机制相互作用的一双链区。

[0145] 本发明的一些实施例的所述RNA沉默分子不必限于仅含有RNA的那些分子,而是进

一步包括多个化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0146] 本发明考虑了各种类型的siRNA,包含反式作用siRNA(Ta-siRNA)、重复相关siRNA(repeat-associated siRNA,Ra-siRNA)以及自然反义转录衍生siRNA(natural-antisense transcript-derived,Nat-siRNA)。

[0147] 根据一个实施例,沉默RNA包含“piRNA”,其是一类Piwi相互作用RNA,长度约为26和31个核苷酸。多个piRNA通常通过与多个Piwi蛋白质相互作用形成多个RNA-蛋白质复合物,即多个反义piRNA通常加载至多个Piwi蛋白质(例如Piwi、Ago3以及茄子(Aub))中。

[0148] miRNA-根据另一个实施例,所述RNA沉默分子可以是一miRNA。

[0149] 术语“微型RNA”、“miRNA”以及“miR”是同义词,是指长度约为19至24个核苷酸的多个非编码单链RNA分子的一集合,其调节基因表达。miRNA广泛存在于各种生物体(例如,昆虫、哺乳动物、植物、线虫),且已显示其在发育、体内平衡以及疾病病原学中起作用。

[0150] 最初,所述pre-miRNA是以一长的非完全双链茎环RNA的形式存在,进一步通过Dicer将其加工成一siRNA样双链体,包括成熟的引导链(miRNA)和一大小相似的片段(称为乘客(passenger)链(miRNA*))。所述miRNA和miRNA*可以源自所述pri-miRNA和pre-miRNA的相对臂。多个miRNA*序列可以在克隆的miRNA的文库中找到,但出现率通常低于miRNA。

[0151] 尽管最初以一双链类型与miRNA*存在,但所述miRNA最终变成以一单链RNA的形式并入一核糖核蛋白复合物中,称为RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)。各种蛋白质可以形成所述RISC,其可以引起对miRNA/miRNA*双链体的特异性、所述靶基因的结合位点、miRNA的活性(抑制或激活)以及所述miRNA/miRNA*双链体的哪一条链加载至所述RISC的可变性。

[0152] 当将所述miRNA:miRNA*双链体的所述miRNA链加载至所述RISC中时,移除并降解所述miRNA*。加载至所述RISC中的所述miRNA:miRNA*双链体的所述链是5'末端不紧密配对的链。在所述miRNA:miRNA*的两端具有大致相等的5'配对的情况下,miRNA和miRNA*两者都可能具有基因沉默活性。

[0153] 所述RISC根据所述miRNA和所述mRNA之间的高度互补性,特别是通过所述miRNA的核苷酸2至8位(称为“种子序列”)来鉴定多个靶核酸。

[0154] 许多研究已经着眼于miRNA与其mRNA靶之间的所述碱基配对需求,用于实现有效的翻译抑制(通过Bartel(2004年,Cell,116至281)综述)。多个计算研究分析了miRNA在整个基因组上的结合,已表明在所述miRNA的5'端处的碱基2至8位(也称为“种子序列”)在靶结合中的一特定作用,但发现通常为“A”的第一核苷酸的作用也被识别(Lewis等人,2005年,Cell,120至15)。同样地,Krek等人使用核苷酸1至7位或2至8位来鉴定和验证多个靶(2005年,Nat Genet.,37至495)。在所述mRNA中的所述多个靶位点可以在5' UTR、3' UTR或编码区域中。有趣的是,多个miRNA可以通过识别相同或多个位点来调节相同的mRNA靶。在大多数遗传识别的靶中存在多个miRNA结合位点,可能表明多个RISC的协同作用提供了最有效的翻译抑制。

[0155] miRNA可能通过两种机制之一引导所述RISC下调基因表达:mRNA剪切(cleavage)或翻译抑制。如果所述mRNA与所述miRNA具有一定程度的互补性,则所述miRNA可以指定所述mRNA的剪切。当一miRNA引导剪切时,切割通常在与所述miRNA的残基10和11位配对的所述多个核苷酸之间。或者,如果所述miRNA与所述miRNA不具有必要的互补程度,则所述

miRNA可以抑制翻译。由于动物在所述miRNA和结合位点之间的互补性程度较低,因此翻译抑制在动物中可能更为普遍。

[0156] 应注意的是,任何一对miRNA和miRNA*的所述5' 和3' 末端中可能存在可变性。此可变性可能是由于Drosha和Dicer的酶加工中相对于剪切位点的可变性所致。在miRNA和miRNA*的所述5' 和3' 末端处的可变性也可能是由于所述pri-miRNA和pre-miRNA的所述多个茎结构中的不匹配所致。所述多个茎链的不匹配可能引起大量不同的发夹结构。所述多个茎结构中的可变性也可能引起通过Drosha和Dicer剪切多个产物中的可变性。

[0157] 应理解的是,所述pre-miRNA序列可以包括45至90、60至80或60至70个核苷酸,而所述pri-miRNA序列可以包括45至30,000、50至25,000、100至20,000、1,000至1,500或80至100个核苷酸。

[0158] 根据一个实施例,所述miRNA包括miR-390a(如SEQ ID NO:28所示)。

[0159] 根据一个实施例,所述miRNA包括miR-173(如SEQ ID NO:29所示)。

[0160] 反义-反义是一单链RNA,旨在通过与其mRNA特异性杂交来防止或抑制一基因的表达。一靶RNA的下调可以使用一反义多核苷酸来实现,所述反义多核苷酸能够与用于编码所述靶RNA的一mRNA转录物特异性杂交。

[0161] 如前所述,所述非编码RNA分子可以不包括一典型(固有的)RNAi活性(例如,不是一典型RNA沉默分子,或尚未鉴定其靶)。此种非编码RNA分子包含以下:

[0162] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一转移RNA(tRNA)。术语“tRNA”是指作为多个核酸的核苷酸序列与多个蛋白质的氨基酸序列之间的物理连接的一RNA分子,以前称为可溶性RNA或sRNA。tRNA的长度通常约为76至90个核苷酸。

[0163] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一核糖体RNA(rRNA)。术语“rRNA”是指所述核糖体的RNA组成部分,即小核糖体亚基(subunit)或大核糖体亚基。

[0164] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一小核RNA(snRNA或U-RNA)。术语“sRNA”或“U-RNA”是指在多个真核细胞中的细胞核的多个拼接斑点(splicing speckle)和多个卡哈尔体(Cajal body)内发现的多个小RNA分子。snRNA的长度通常约为150个核苷酸。

[0165] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一小核仁RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)。术语“snoRNA”是指主要引导其他RNA(例如,rRNA、tRNA以及snRNA)的化学修饰的多个小RNA分子类别。snoRNA通常分为两类:C/D盒snoRNA的长度通常约为70至120个核苷酸,并与甲基化有关;且H/ACA盒snoRNA的长度通常约为100至200核苷酸,并与假尿苷化(pseudouridylation)有关。

[0166] 与snoRNA相似的是scaRNA(即多个小卡哈尔体RNA基因(Small Cajal body RNA gene)),其在RNA成熟中的作用与snoRNA相似,但它们的靶是剪接体(spliceosomal)snRNA,且它们对多个剪接体snRNA前体(在所述细胞核的所述多个卡哈尔体中)进行位点特异性修饰。

[0167] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一细胞外RNA(extracellular RNA, exRNA)。术语“exRNA”是指存在于转录它们的多个细胞外部的RNA种类(例如,外泌体RNA(exosomal RNA))。

[0168] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子是一长的非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)。术语“lncRNA”或“长ncRNA”是指通常长于200个核苷酸的非蛋白质编码转录

物。

[0169] 根据一个实施例,多个非编码RNA分子的非限制性实例包含但不限于微型RNA (microRNA,miRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、反式作用siRNA(tasiRNA)、小核RNA(small nuclear RNA,snRNA或URNA)、小核仁RNA(snoRNA)、小卡哈尔体RNA(scaRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、细胞外RNA(exRNA)、重复衍生RNA(repeat-derived RNA)、转座元件RNA(transposable element)以及长的非编码RNA(lncRNA)。

[0170] 根据一个实施例,多个RNAi分子的非限制性实例包含但不限于小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微型RNA(miRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)以及反式作用siRNA(tasiRNA)。

[0171] 如上所述,本发明的一些实施例的方法用于将所述非编码RNA分子的一沉默活性及/或特异性重定向(或者,如果所述非编码RNA分子不具有固有的沉默一RNA分子的能力,则产生一沉默活性及/或特异性)至针对一第二靶RNA或针对一感兴趣的靶RNA。

[0172] 根据一个实施例,所述靶RNA和所述第二靶RNA是不同的。

[0173] 根据一个实施例,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰的方法包括将一DNA编辑剂引入至所述植物细胞中,所述DNA编辑剂将所述RNA沉默分子的一沉默活性及/或特异性重定向至针对一第二靶RNA,所述靶RNA和所述第二靶RNA是不同的,从而对用于编码所述RNA沉默分子的所述基因进行修饰。

[0174] 如本文中所使用,术语“重定向一沉默特异性”是指针对所述非编码RNA(例如,RNA沉默分子)的一非自然靶重新编程所述非编码RNA(例如,RNA沉默分子)的原始特异性。因此,消除了所述非编码RNA的所述原始特异性(即功能丧失),且新的特异性是针对不同于所述自然靶(即感兴趣的RNA)的一RNA靶,即功能获得。应理解的是,只有在所述非编码RNA没有沉默活性的情况下,才会发生功能获得。

[0175] 如本文中所使用,术语“靶RNA”是指通过一非编码RNA分子自然地结合的一RNA序列。因此,本领域技术人员认为所述靶RNA是所述非编码RNA的一基质(substrate)。

[0176] 如本文中所使用,术语“第二靶RNA”是指没有通过一非编码RNA分子自然地结合的一RNA序列(编码或非编码)。因此,所述第二靶RNA不是所述非编码RNA的一自然基质。

[0177] 如本文中所使用,术语“感兴趣的靶RNA”是指通过设计的非编码RNA分子来沉默的一RNA序列(编码或非编码)。

[0178] 如本文中所使用,短语“沉默一靶基因”是指来自所述靶基因的mRNA及/或蛋白质产物水平的不存在或可观察到的降低(例如,由于共转录及/或转录后基因沉默)。因此,与本发明没有通过所述设计的非编码RNA分子靶向的一靶基因相比,一靶基因的沉默可以降低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0179] 沉默的结果可以通过检查一植物细胞或整个植物或其他生物体(从所述植物提取所述设计的非编码RNA分子)的多个外部特性或通过多种生物化学技术来证实(如下所述)。

[0180] 应理解的是,本发明的一些实施例的所述设计的非编码RNA分子可以具有一(些)脱靶(off-target)特异性作用,前提是其不影响农业上有价值的性状(例如,生物量、产量等)。

[0181] 根据一个实施例,所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA对所述植物细胞是内源性的。

示例性内源性第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括但不限于,对胁迫、感染、除草剂具有敏感性的一基因产物,或与植物生长速率、作物产量相关的一基因产物,如下文中进一步讨论的。

[0182] 根据一个实施例,所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA对所述植物细胞是外源性的(在本文中也称为异源性的)。在这种情况下,所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA是所述植物基因组非自然部分的一基因产物。示例性外源性第二靶RNA包括但不限于,一植物病原体的一基因产物,例如但不限于,一昆虫、一病毒、一细菌、一真菌、一线虫,如下文中进一步讨论的。一外源性靶RNA(编码或非编码)可以包括与所述植物的一内源性RNA序列(例如,可以与一内源性核酸序列部分同源)共享序列同一性的一核酸序列。

[0183] 一内源性非编码RNA分子与一靶RNA的所述特异性结合可以通过计算算法(例如, BLAST)来确定,且可以通过包含例如北方墨点法(Northern blot)、原位杂交(In Situ hybridization)、QuantiGene Plex分析等方法来鉴定。

[0184] 通过使用术语“互补性(complementarity)”或“互补的(complementary)”是指所述非编码RNA分子(或以所述加工的小RNA形式存在的至少一部分、或一双链多核苷酸的至少一条链或其一部分、或一单链多核苷酸的一部分)在生理条件下与所述靶RNA或其片段杂交,以实现与所述靶基因的调节、作用或抑制。例如,在一些实施例中,当与所述靶RNA(或一给定靶基因的多个家族成员)中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、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500或更多个连续核苷酸的一序列相比时,一非编码RNA分子具有100%的序列同一性或至少约30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0185] 如本文中所使用,当从5'读至3'的所述多个序列中的一个的每一个核苷酸与从3'读至5'的另一个序列的每一个核苷酸互补时,非编码RNA分子或其加工的小RNA形式称为显示出“完全互补性”。与一参考核苷酸序列完全互补的一核苷酸序列将显示出与所述参考核苷酸序列的反向互补序列一相同的序列。

[0186] 确定序列互补性的方法是本领域众所周知的,且包含但不限于本领域众所周知的多个生物信息学工具(例如, BLAST、多序列比对(multiple sequence alignment))。

[0187] 根据一个实施例,如果所述非编码RNA分子是一siRNA或被加工成一siRNA,则与其靶序列的互补性在90至100%(例如,100%)的范围内。

[0188] 根据一个实施例,如果所述非编码RNA分子是一miRNA或piRNA、或被加工成一miRNA或piRNA,则与其靶序列的互补性在33至100%的范围内。

[0189] 根据一个实施例,如果所述非编码RNA分子是一miRNA,则与其靶序列的种子序列互补性(即从所述5'的核苷酸2至8位)在85至100%(例如,100%)的范围内。

[0190] 根据一个实施例,可以将所述非编码RNA进一步加工成一小RNA形式(例如,将pre-miRNA加工成一成熟的miRNA)。在这种情况下,基于所述加工的小RNA形式(例如,所述成熟的miRNA序列)来测量同源性。

[0191] 如本文中所使用,术语“小RNA形式”是指能够与一靶RNA(或其片段)杂交的所述成熟的小RNA。根据一个实施例,所述小RNA形式具有一沉默活性。

[0192] 根据一个实施例,与所述靶序列的互补性至少是所述加工的小RNA形式的约33%

(例如,21至28nt的33%)。因此,例如,如果所述非编码RNA分子是一miRNA,则33%的所述成熟的miRNA序列(例如,21nt)包括种子互补(例如,所述21nt中的7nt)。

[0193] 根据一个实施例,与所述靶序列的互补性至少是所述加工的小RNA形式的约45%(例如,21至28nt的45%)。因此,例如,如果所述非编码RNA分子是一miRNA,则45%的所述成熟的miRNA序列(例如,21nt)包括种子互补(例如,所述21nt中的9至10nt)。

[0194] 根据一个实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有约10%、20%、30%、33%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或高达99%互补性的分子。

[0195] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过99%互补性的分子。

[0196] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过98%互补性的分子。

[0197] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过97%互补性的分子。

[0198] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过96%互补性的分子。

[0199] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过95%互补性的分子。

[0200] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过94%互补性的分子。

[0201] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过93%互补性的分子。

[0202] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过92%互补性的分子。

[0203] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过91%互补性的分子。

[0204] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过90%互补性的分子。

[0205] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过85%互补性的分子。

[0206] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过50%互补性的分子。

[0207] 根据一具体的实施例,通常将所述非编码RNA分子(即在修饰之前)选为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有不超过33%互补性的分子。

[0208] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列包括至少约33%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的互补性。

[0209] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述

第二靶RNA或感兴趣的靶RNA(例如,85至100%种子匹配)包括至少33%的互补性。

[0210] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少40%的互补性。

[0211] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少45%的互补性。

[0212] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少50%的互补性。

[0213] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少45%的互补性。

[0214] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少60%的互补性。

[0215] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少70%的互补性。

[0216] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少80%的互补性。

[0217] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少85%的互补性。

[0218] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少90%的互补性。

[0219] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少91%的互补性。

[0220] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少92%的互补性。

[0221] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少93%的互补性。

[0222] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少94%的互补性。

[0223] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少95%的互补性。

[0224] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少96%的互补性。

[0225] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少97%的互补性。

[0226] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少98%的互补性。

[0227] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括至少99%的互补性。

[0228] 根据一具体的实施例,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)设计为针对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA包括100%的互补性。

[0229] 为了诱导一非编码RNA分子的沉默活性及/或特异性或将一非编码RNA分子(例如, RNA沉默分子)的一沉默活性及/或特异性重定向至针对一第二靶RNA或感兴趣的靶RNA, 使用一DNA编辑剂修饰用于编码一非编码RNA分子(例如, RNA沉默分子)的所述基因。

[0230] 以下是用于将多个核酸改变引入至用于编码一非编码RNA分子(例如, RNA沉默分子)的一基因的多个方法和多个DNA编辑剂的各种非限制性实例的描述, 以及根据本公开的多个具体实施例可以使用的用于实施所述多个方法和多个DNA编辑剂的多个试剂。

[0231] 使用工程核酸内切酶进行基因组编辑-这种方法是指一种反向遗传学方法, 通常使用人工工程核酸酶在所述基因组中(多个)所需的位置切割并产生多个特定双链断裂(double-stranded break, DSB), 然后通过多个细胞内源性过程对其进行修复, 例如, 同源重组(homologous recombination, HR) 或非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)。NHEJ以一双链断裂(DSB)(有或没有最小的末端修饰)直接连接所述多个DNA末端, 而HR利用一同源供体序列作为一模板(即S期形成的姐妹染色单体)用于在所述断裂位点再生/复制缺失的DNA序列。为了将多个特定核苷酸修饰引入至所述基因组DNA, 在HR期间必须存在含有所需序列的一供体DNA修复模板(外源性提供的单链或双链DNA)。

[0232] 基因组编辑不能使用传统的限制性核酸内切酶来进行, 因为大多数限制性酶识别所述DNA上的几个碱基对作为其靶, 且这些序列通常会在所述基因组的许多位置中发现, 从而导致多次切割, 而这些切割并不限于一所需的位置。为了克服这一挑战并产生多个位点特定的(site-specific)单链或双链断裂(DSB), 迄今为止已经发现了几种不同类别的核酸酶, 并对其进行了生物工程。这些包含兆核酸酶(meganuclease)、锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(transcription-activator like effector nuclease, TALEN)以及CRISPR/Cas9系统。

[0233] 兆核酸酶-兆核酸酶通常分为四个家族: LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cys盒家族以及HNH家族。这些家族的特征在于多个结构模序(motif), 它们影响催化活性和识别序列。例如, 所述LAGLIDADG家族的多个成员的特征在于具有保存的LAGLIDADG模序的一个或两个拷贝。这四个兆核酸酶家族在多个保存的结构元素以及DNA识别序列特异性和催化活性方面彼此很大程度地区分。兆核酸酶通常在微生物物种中发现, 并具有独特的特性, 即具有多个非常长的识别序列(>14bp), 因此使其用于在一所需的位置处进行切割自然地具有非常高的特异性。

[0234] 这可以用来在基因组编辑中制造多个位点特异性双链断裂(DSB)。本领域技术人员可以使用这些自然发生的兆核酸酶, 但这种自然发生的兆核酸酶的数量是有限的。为了克服这一挑战, 诱变(mutagenesis)和高通量筛选方法已用于产生识别多个独特序列的多个兆核酸酶变体。例如, 已经融合了各种兆核酸酶以产生识别一新序列的多个杂化(hybrid)酶。

[0235] 或者, 可以改变所述兆核酸酶的多个DNA相互作用氨基酸以设计序列特异性兆核酸酶(例如, 参见美国专利号8,021,867)。可以使用例如在Certo, MT等人(Nature Methods, 2012年, 9:073至975)、美国专利号8,304,222、8,021,867、8,119,381、8,124,369、8,129,134、8,133,697、8,143,015、8,143,016、8,148,098或8,163,514中所述的方法设计兆核酸酶, 每个内容通过引用整体并入本文中。或者, 可以使用商业上可获得的技术(例如, Precision Biosciences的定向核酸酶编辑器™(Directed Nuclease Editor™)基因组编

辑技术)来获得具有位点特异性切割特征的兆核酸酶。

[0236] ZFNs和TALENs-两种不同的工程核酸酶,锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)均被证明能有效地产生多个靶向双链断裂(DSB)(Christian等人,2010年;Kim等人,1996年;Li等人,2011年;Mahfouz等人,2011年;Miller等人,2010年)。

[0237] 基本上,ZFN和TALEN限制性核酸内切酶技术利用一种非特异性DNA切割酶,所述酶与一特定的DNA结合域(分别是一系列的多个锌指域或多个TALE重复序列)相连。通常,选择其DNA识别位点和剪切位点彼此分开的一限制性酶。分开所述剪切部分然后连接至一DNA结合域,从而产生对一所需的序列具有非常高特异性的一核酸内切酶。具有这种性质的一示例性限制酶是FokI。另外,FokI的优点是需要二聚化(dimerization)才能具有核酸酶活性,这意味着随着每个核酸酶伙伴识别一独特的DNA序列,所述特异性会显著地增加。为了增强此效果,已经工程化了多个FokI核酸酶,其仅可以作为多个异二聚体(heterodimer)起作用且具有增加的催化活性。所述异二聚体起作用于核酸酶避免了不需要的同二聚体(homodimer)活性的可能性,因此增加了所述双链断裂(DSB)的特异性。

[0238] 因此,例如为了靶向一特定位置,多个ZFN和多个TALEN被构建为多个核酸酶对,所述对中的每个分子设计为结合在所述靶位点处的多个相邻序列。在多个细胞中瞬时表达后,所述多个核酸酶与它们的多个靶位点结合,且所述多个FokI域异二聚体化(heterodimerize)以产生一双链断裂(DSB)。通过所述非同源末端连接(NHEJ)途径修复这些双链断裂(DSB)通常会导致多个小缺失或多个小序列插入(插入缺失(Indel))。由于通过NHEJ进行的每次修复都是独特的,因此使用一单个核酸酶对可以在所述靶位点处产生具有一系列的多个不同插入或缺失的一等位基因系列(allelic series)。

[0239] 一般来说,在基因编辑中,NHEJ相对准确(在人类细胞中约85%的DSB从检测开始约30分钟内通过NHEJ修复)。错误的NHEJ是依赖的,因为当所述修复是准确的,所述核酸酶将继续切割,直到所述修复产物突变,且识别/切割位点/PAM基序消失/突变、或瞬时引入的核酸酶不再存在。

[0240] 缺失的长度范围通常从几个碱基对到几百个碱基对,但是通过同时使用两对核酸酶在细胞培养中已成功地产生了较大的缺失(Carlson等人,2012年;Lee等人,2010年)。此外,当将与所述靶向的区域具有同源性的一DNA片段与所述核酸酶对结合引入时,可以通过同源重组(HR)修复所述双链断裂(DSB)以产生多个特异性修饰(Li等人,2011年;Miller等人,2010年;Urnov等人,2005年)。

[0241] 尽管多个ZFN和多个TALEN的多个核酸酶部分具有相似的性质,但这些工程核酸酶之间的差异在于其DNA识别肽。ZFN依赖于Cys2-His2锌指(zinc finger),而TALEN依赖于TALE。这两者的这些DNA识别肽域(domain)都具有一个特点,即它们天然存在于其蛋白质的组合中。多个Cys2-His2锌指通常存在于间隔为3bp的多个重复序列中,并存在于多种核酸相互作用蛋白的多个不同组合中。另一方面,多个TALE存在于所述多个氨基酸和所述多个识别的核苷酸对之间具有一对一识别率的多个重复序列中。由于锌指和TALE均以重复的模式发生,因此不同的组合可以尝试来创建各种各样的序列特异性。制备位点特异性锌指核酸内切酶的多个方法包含,例如,模块组装(其中与一三联体序列相关的多个锌指连成一行以覆盖所需的序列)、OPEN(多个肽域的低严格性选择,相对于多个三联体(triplet nucleotide)核苷酸,然后进行多个肽组合的高严格性选择,相对于在多个细菌系统中的最

终靶)、以及多个锌指文库的细菌单杂交筛选(one-hybrid screening)等。ZFN也可以从例如Sangamo BiosciencesTM(Richmond,加利福尼亚州)商业设计和获得。

[0242] 设计和获得TALEN的方法描述于例如Reyon等人(Nature Biotechnology,2012年5月;30(5):460至5)、Miller等人(Nat Biotechnol.,2011年,29:143至148)、Cermak等人(Nucleic Acids Research,2011年,39(12):e82)、以及Zhang等人(Nature Biotechnology,2011年,29(2):149至53)。一种最近开发的基于网络的程序(称为梅奥手(Mojo Hand)),通过梅奥医院(Mayo Clinic)引入,用于为基因组编辑应用程序设计多个TAL和TALEN构建体(可以通过www(dot)talendesign(dot)org进入)。ZFN也可以从例如Sangamo BiosciencesTM(Richmond,加利福尼亚州)商业设计和获得。

[0243] T-GEE系统(靶基因的基因组编辑引擎(TargetGene's Genome Editing Engine))-提供了一种可编程的核蛋白分子复合物,其含有一多肽部分和赋予特异性的核酸(specificity conferring nucleic acid,SCNA),所述核酸在一靶细胞中进行体内组装,并能够与预定的靶核酸序列相互作用。所述可编程的核蛋白分子复合物能够特异性地修饰及/或编辑在所述靶核酸序列内的一靶位点及/或修饰所述靶核酸序列的功能。核蛋白组合物包括(a)用于编码一嵌合多肽的多核苷酸分子并包括(i)能够修饰所述靶位点的一功能域,和(ii)能够与赋予特异性的核酸相互作用的一连接域;以及(b)赋予特异性的核酸(SCNA),其包括(i)与所述靶核酸在所述靶位点两侧的区域互补的一核苷酸序列,和(ii)能够特异性地附着于所述多肽的所述连接域的一识别区。所述组合物通过赋予特异性的核酸与一靶核酸的碱基配对,具有高度的特异性和分子复合物与所述靶核酸的结合能力,能够准确地、可靠地以及成本有效地修饰一预定的核酸序列靶。所述组合物的遗传毒性小、组装模块化、利用无需定制的单个平台、可在专用核心设施外独立使用、以及开发周期短且成本低。

[0244] CRISPR-Cas系统及其所有变体(在本文中也称为“CRISPR”)-许多细菌和古细菌(archea)含有基于内源性RNA的适应性免疫系统,可降解入侵多个噬菌体和多个质粒的多个核酸。这些系统由多个成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat,CRISPR)核苷酸序列组成,所述序列产生多个RNA成分和CRISPR相关的(Cas)多个基因(编码多个蛋白成分)。所述多个CRISPR RNA(crRNA)含有与多个特定病毒和质粒的DNA很短的同源性,并引导Cas核酸酶降解与相应的病原体互补的多个核酸。化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的II型CRISPR/Cas系统的研究指出,3个成分形成一RNA/蛋白质复合物,且在一起足以满足序列特异性的核酸酶活性:所述Cas9核酸酶,一种与所述靶序列含有20个碱基对同源性的crRNA,且是一种反式激活的(trans-activating)crRNA(tracrRNA)(Jinek等人,Science,2012年,337:816至821)。

[0245] 进一步证明,由在crRNA和tracrRNA之间的一融合组成的一合成嵌合引导RNA(gRNA)可以在体外定向Cas9以剪切与所述crRNA互补的多个DNA靶。还证明了Cas9与多个合成gRNA的共同瞬时表达可以用于在多种不同物种中产生靶向的多个双链断裂(DSB)(Cho等人,2013年;Cong等人,2013年;DiCarlo等人,2013年;Hwang等人,2013a,b;Jinek等人,2013年;Mali等人,2013年)。

[0246] 用于基因组编辑的所述CRISPR/Cas系统含有两个不同的组成部分:一gRNA和一内切核酸酶,例如,Cas9。

[0247] 所述gRNA(在本文中也称为短引导RNA(sgRNA))通常是一20个核苷酸的序列,用于编码所述靶同源序列(crRNA)和所述内源性细菌RNA的一组合(在一个嵌合转录物中将所述crRNA连接至所述Cas9核酸酶(tracrRNA)。通过在所述gRNA序列和所述补体基因组DNA之间的所述碱基配对,将所述gRNA/Cas9复合物募集至所述靶序列。为了成功结合Cas9,所述基因组靶序列还必须在所述靶序列之后紧接地含有所述正确的原间隔相邻基序(Protospacer Adjacent Motif,PAM)序列。所述gRNA/Cas9复合物的所述结合将所述Cas9定位在所述基因组靶序列上,因此所述Cas9可以切割所述DNA的两条链,从而导致一双链断裂(DSB)。与ZFN和TALEN一样,通过CRISPR/Cas产生的所述双链断裂(DSB)可以进行同源重组或NHEJ,且在DNA修复期间容易发生特定序列修饰。

[0248] 所述Cas9核酸酶具有两个功能域:RuvC和HNH,各自切割一不同的DNA链。当这两个的这些域都具有活性时,所述Cas9会在所述基因组DNA中引起多个双链断裂(DSB)。

[0249] CRISPR/Cas的一显着优点是,此系统的高效率与容易产生多个合成gRNA的能力相结合。这产生了一种可以容易地被修改以靶向在不同基因组位点的多个修饰及/或靶向在相同位点的多个不同修饰的系统。另外,已经建立了能够同时靶向多个基因的方案。携带所述突变的大多数细胞在所述多个靶向的基因中出现多个双等位基因突变(biallelic mutation)。

[0250] 然而,在所述gRNA序列与所述基因组DNA靶序列之间的所述碱基配对相互作用中明显的灵活性允许对所述靶序列不完全匹配会被Cas9切割。

[0251] 含有一单个无活性催化域(RuvC-或HNH-)的所述Cas9酶的多个修饰形式称为“切口酶(nickase)”。仅具有一个活性核酸酶域,所述Cas9切口酶仅切割所述靶DNA的一条链,从而产生一单链断裂或“切口(nick)”。一单链断裂或切口大多是通过单链断裂修复机制修复的,所述机制涉及蛋白质,例如但不限于,PARP(传感器)和XRCC1/LIG III复合物(接合(ligation))。如果一单链断裂(SSB)是通过多个拓扑异构酶(topoisomerase)I毒物或通过多个药物捕获RARP1在天然存在的SSB上产生的,则这些可能会持续存在,且当所述细胞进入S期并且复制叉(replication fork)遇到此类SSB时,它们将成为多个单端的DSB,其仅能通过HR修复。然而,通过一Cas9切口酶引入的两个近端、相反的链切口被视为一双链断裂,通常在被称为“双切口(double nick)”CRISPR系统中。一双切口,基本上是非平行的DSB,可以像其他DSB一样通过HR或NHEJ修复,取决于对所述基因靶所需的作用以及一供体序列的存在和所述细胞周期阶段(HR的丰度较低,且只能在所述细胞周期的S和G2阶段发生)。因此,如果特异性和降低的脱靶效应至关重要,使用所述Cas9切口酶产生一双切口(通过设计两个gRNA和紧邻且在所述基因组DNA的多个相对链上的多个靶序列)将降低脱靶效应,因为任一gRNA单独都会造成不太可能改变所述基因组DNA的切口,即使这些事件并非不可能。

[0252] 含有两个无活性催化域(死亡的Cas9或dCas9)的所述Cas9酶的修饰形式不具有核酸酶活性,但仍能够基于gRNA特异性与DNA结合。所述dCas9可以用作多个DNA转录调节因子的一平台,通过将所述非活性酶融合至已知的多个调控域来激活或抑制基因表达。例如,dCas9单独与基因组DNA中的一靶序列的所述结合会干扰基因转录。

[0253] 有许多公开可用的工具可帮助选择及/或设计多个靶序列,以及生物信息学确定的不同物种中不同基因的多个独特gRNA列表,例如但不限于,Feng Zhang实验室的靶查找器(Target Finder)、Michael Boutros实验室的靶查找器(E-CRISP)、RGEN工具:Cas-

OFFinder、CasFinder:用于在基因组中识别特定Cas9靶的灵活算法以及CRISPR最佳靶查找器(CRISPR Optimal Target Finder)。

[0254] 为了使用所述CRISPR系统,gRNA和一Cas核酸内切酶(例如,Cas9)都应在一靶细胞中表达或存在(例如,作为一核糖核蛋白复合物)。所述插入载体可以在一单个质粒上含有两个盒,或者所述多个盒由两个单独的质粒表达。多个CRISPR质粒是可商购的,例如,来自Addgene的px330质粒(75Sidney St,Suite 550A • Cambridge,MA 02139)。Svitashev等人(2015年,Plant Physiology,169(2):931至945)、Kumar和Jain(2015年,J Exp Bot,66:47至57)以及在美国专利申请公开第20150082478号中至少公开了使用成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关的(Cas)引导RNA技术和一Cas核酸内切酶修饰植物基因组,其内容通过引用整体并入本文中。可用于通过gRNA进行DNA编辑的Cas核酸内切酶包括但不限于,Cas9、Cpf1(Zetsche等人,2015年,Cell,163(3):759至71)、C2c1、C2c2以及C2c3(Shmakov等人,Mol Cell.,2015年11月5日;60(3):385至97)。

[0255] 根据一具体的实施例,所述CRISPR包括一短引导RNA(sgRNA),其包括选自SEQ ID NO:1至4或SEQ ID NO:235至366所组成的群组的一核酸序列。

[0256] “基因打靶的策略(hit and run)”或“由内而外(in-out)”涉及一两步骤的重组程序。在第一步骤中,使用含有一双正/负选择标记盒的一插入型载体来引入所需的序列改变。所述插入载体含有与所述靶向的基因座同源的一单个连续区域,且被修饰以携带感兴趣的突变。此靶向构建体在同源性区域内的一个位点处用一限制酶线性化,引入至所述多个细胞中,并进行阳性选择以分离同源重组介导的事件。携带所述同源序列的所述DNA可以以一质粒、单链或双链寡核苷酸的形式提供。这些同源重组体含有一局部复制,所述局部复制由包含所述选择盒在内的中间载体序列隔开。在第二步骤中,对多个靶向的克隆进行负选择,以通过所述重复序列之间的染色体重组鉴定丢失所述选择盒的多个细胞。所述局部重组事件去除所述重复,并取决于所述重组位点,等位基因保留所述引入的突变或恢复为野生型。最终结果是引入了所需的修饰,而没有保留任何外源性序列。

[0257] “双重替换(double-replacement)”或“标记和交换(tag and exchange)”策略:涉及一两步骤选择程序,类似于所述基因打靶的策略(hit and run)方法,但需要使用两种不同的靶构建。在第一步骤中,将具有3'和5'同源臂的一标准靶向载体用在将要引入所述突变的位置附近插入一双正/负选择盒。将所述系统组件引入至所述细胞并施行阳性选择后,即可识别HR介导的事件。接下来,将含有与所需的突变具有一同源性区域的一第二靶向载体引入至多个靶向克隆,并施行阴性选择以去除所述选择盒并引入所述突变。最终的等位基因含有所需的突变,同时消除了不必要的外源性序列。

[0258] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂包括一DNA靶向模块(例如,gRNA)。

[0259] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂不包括一核酸内切酶。

[0260] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂包括一核酸酶(例如,一核酸内切酶)和一DNA靶向模块(例如,gRNA)。

[0261] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂为一CRISPR/Cas,例如,gRNA和Cas9。

[0262] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂为TALEN。

[0263] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂ZEN。

[0264] 根据一具体的实施例,所述DNA编辑剂兆核酸酶。

[0265] 根据一个实施例,所述DNA编辑剂与用于监测在一植物细胞中的表达的一报道子连接。

[0266] 根据一个实施例,所述报道子是一荧光报道子蛋白。

[0267] 术语“一荧光蛋白”是指发出荧光且通常通过流式细胞仪、显微镜或任何荧光成像系统检测的一多肽,因此可以用作选择表达这一种蛋白的多个细胞的基础。

[0268] 可以用作多个报道子的多个荧光蛋白的多个实例是但不限于,绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)以及红色荧光蛋白(例如,dsRed、mCherry、RFP)。荧光或其他报道子的一非限制性列表包含通过发光(例如,荧光素酶(luciferase))或比色测定法(colorimetric assay)(例如,GUS)检测的多个蛋白质。根据一具体的实施例,所述荧光报道子是一红色荧光蛋白(例如,dsRed、mCherry、RFP)或GFP。

[0269] 多种荧光蛋白的多个新类别和多个应用的综述可在生化科学趋势(Trends in Biochemical Sciences)中找到(Rodriguez,Erik A.;Campbell,Robert E.;Lin,John Y.;Lin,Michael Z.;Miyawaki,Atsushi;Palmer,Amy E.;Shu,Xiaokun;Zhang,Jin;Tsien,Roger Y.,“荧光和光敏蛋白的生长和发光工具箱(The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins)”,Trends in Biochemical Sciences,doi:10.1016/j.tibs.2016.09.010)。

[0270] 根据另一个实施例,所述报道子是一植物的一内源性基因。一示例性的报道子是八氢番茄红素脱氢酶基因(phytoene desaturase gene,PDS3),其编码类胡萝卜素生物合成途径中多个重要酶中的一个,其沉默产生一白化(albino)/漂白(bleached)表型。因此,PDS3表达降低的多个植物表现出降低的叶绿素(chlorophyll)水平,直至完全的白化病和矮化症(dwarfism)。可以根据本教导使用的其他基因包含但不限于,参与作物保护的多个基因。多个示例性基因在下表1B中描述。

[0271] 根据另一个实施例,所述报道子是一抗生素选择标记。可以用作多个报道子的多个抗生素选择标记的多个实例是但不限于,新霉素磷酸转移酶II(neomycin phosphotransferase II,nptII)和潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase,hpt)。可以根据本教导使用的其他多个标记基因包含但不限于,庆大霉素乙酰转移酶(gentamycin acetyltransferase,accC3)抗性和博来霉素(bleomycin)和腐草霉素(phleomycin)抗性基因。

[0272] 应理解的是,所述酶NPTII通过磷酸化使许多氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotics)失活,例如,卡那霉素(kanamycin)、新霉素(neomycin)、遗传霉素(geneticin)(或G418)和巴龙霉素(paromomycin)。其中,卡那霉素、新霉素以及巴龙霉素用于多种植物物种。

[0273] 根据另一个实施例,所述报道子是一毒性选择标记。可以用作一报道子的一示例性毒性选择标记是但不限于,使用醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH1)基因进行的烯丙醇选择。ADH1包括一组脱氢酶,其催化多个醇与多个醛或多个酮之间的相互转化以及NAD⁺或NADP⁺的同时还原、分解多个组织内的多个酒精性有毒物质。带有降低的ADH1表达的多个植物表现出对烯丙醇的耐受性增加。因此,具有降低的ADH1的多个植物对烯丙醇的毒性作用具有抗性。

[0274] 无论使用何种DNA编辑剂,都采用本发明的所述方法,使得用于编码所述非编码

RNA分子(例如,RNA沉默分子)的所述基因通过一缺失、一插入或一点突变中的至少一个来修饰。

[0275] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一结构化区域中。

[0276] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域中。

[0277] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一环区域中。

[0278] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域以及一环区域中。

[0279] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一非结构化区域中。

[0280] 根据一个实施例,所述修饰是在所述非编码RNA分子或所述RNA沉默分子的一茎区域、一环区域以及一非结构化区域中。

[0281] 根据一具体的实施例,所述修饰包括约10至250个核苷酸、约10至200个核苷酸、约10至150个核苷酸、约10至100个核苷酸、约10至50个核苷酸、约1至50个核苷酸、约1至10个核苷酸、约50至150个核苷酸、约50至100个核苷酸或约100至200个核苷酸的修饰(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0282] 根据一个实施例,所述修饰包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个或至多250个核苷酸的修饰(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0283] 根据一个实施例,所述修饰可以是一连续的核酸序列(例如,至少5、10、20、30、40、50、100、150、200个碱基)。

[0284] 根据一个实施例,所述修饰可以是以一非连续的方式,例如,遍及于一20、50、100、150、200、500、1000个的核酸序列。

[0285] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多200个核苷酸的修饰。

[0286] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多150个核苷酸的修饰。

[0287] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多100个核苷酸的修饰。

[0288] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多50个核苷酸的修饰。

[0289] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多25个核苷酸的修饰。

[0290] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多20个核苷酸的修饰。

[0291] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多15个核苷酸的修饰。

[0292] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多10个核苷酸的修饰。

[0293] 根据一具体的实施例,所述修饰包括至多5个核苷酸的修饰。

[0294] 根据一个实施例,所述修饰取决于所述RNA沉默分子的所述结构。

[0295] 因此,当所述RNA沉默分子含有一非必需结构(即所述RNA沉默分子的一二级结构(secondary structure)在其适当的生物发生及/或功能中不起作用),或为纯dsRNA时(即所述RNA沉默分子具有一完全或几乎完全的dsRNA),引入一些修饰(例如,20至30个核苷酸,

例如,1至10个核苷酸,例如,5个核苷酸)以重定向所述RNA沉默分子的所述沉默特异性。

[0296] 根据另一个实施例,当所述RNA沉默分子具有一必需结构(即所述RNA沉默分子的所述适当的生物发生及/或活性取决于其二级结构)时,引入多个较大的修饰(例如,10至200个核苷酸,例如,50至150个核苷酸,例如,30个核苷酸以上且不超过200个核苷酸,30至200个核苷酸,35至200个核苷酸,35至150个核苷酸,35至100个核苷酸)以重定向所述RNA沉默分子的所述沉默特异性。

[0297] 根据一个实施例,所述修饰使得所述RNA沉默分子的识别/切割位点/PAM模序被修饰以消除原始PAM识别位点。

[0298] 根据一具体的实施例,所述修饰在一PAM模序中的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个核酸中。

[0299] 根据一个实施例,所述修饰包括一插入。

[0300] 根据一具体的实施例,所述插入包括约10至250个核苷酸、约10至200个核苷酸、约10至150个核苷酸、约10至100个核苷酸、约10至50个核苷酸、约1至50个核苷酸、约1至10个核苷酸、约50至150个核苷酸、约50至100个核苷酸或约100至200个核苷酸的插入(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0301] 根据一个实施例,所述插入包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个或至多250个核苷酸的插入(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0302] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多200个核苷酸的插入。

[0303] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多150个核苷酸的插入。

[0304] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多100个核苷酸的插入。

[0305] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多50个核苷酸的插入。

[0306] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多25个核苷酸的插入。

[0307] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多20个核苷酸的插入。

[0308] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多15个核苷酸的插入。

[0309] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多10个核苷酸的插入。

[0310] 根据一具体的实施例,所述插入包括至多5个核苷酸的插入。

[0311] 根据一个实施例,所述修饰包括一缺失。

[0312] 根据一具体的实施例,所述缺失包括约10至250个核苷酸、约10至200个核苷酸、约10至150个核苷酸、约10至100个核苷酸、约10至50个核苷酸、约1至50个核苷酸、约1至10个核苷酸、约50至150个核苷酸、约50至100个核苷酸或约100至200个核苷酸的缺失(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0313] 根据一个实施例,所述缺失包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个或至多250个核苷酸的缺失(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。

[0314] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多200个核苷酸的缺失。

[0315] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多150个核苷酸的缺失。

- [0316] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多100个核苷酸的缺失。
- [0317] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多50个核苷酸的缺失。
- [0318] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多25个核苷酸的缺失。
- [0319] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多20个核苷酸的缺失。
- [0320] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多15个核苷酸的缺失。
- [0321] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多10个核苷酸的缺失。
- [0322] 根据一具体的实施例,所述缺失包括至多5个核苷酸的缺失。
- [0323] 根据一个实施例,所述修饰包括一点突变。
- [0324] 根据一具体的实施例,所述点突变包括约10至250个核苷酸、约10至200个核苷酸、约10至150个核苷酸、约10至100个核苷酸、约10至50个核苷酸、约1至50个核苷酸、约1至10个核苷酸、约50至150个核苷酸、约50至100个核苷酸或约100至200个核苷酸的点突变(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。
- [0325] 根据一个实施例,所述点突变包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个或至多250个核苷酸的点突变(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。
- [0326] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多200个核苷酸的点突变。
- [0327] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多150个核苷酸的点突变。
- [0328] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多100个核苷酸的点突变。
- [0329] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多50个核苷酸的点突变。
- [0330] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多25个核苷酸的点突变。
- [0331] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多20个核苷酸的点突变。
- [0332] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多15个核苷酸的点突变。
- [0333] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多10个核苷酸的点突变。
- [0334] 根据一具体的实施例,所述点突变包括至多5个核苷酸的点突变。
- [0335] 根据一个实施例,所述修饰包括一缺失、一插入及/或一点突变中的任一个的一组组合。
- [0336] 根据一个实施例,所述修饰包括核苷酸替换(replacement)(例如,核苷酸交换(swapping))。
- [0337] 根据一具体的实施例,所述交换包括交换约10至250个核苷酸、约10至200个核苷酸、约10至150个核苷酸、约10至100个核苷酸、约10至50个核苷酸、约1至50个核苷酸、约1至10个核苷酸、约50至150个核苷酸、约50至100个核苷酸或约100至200个核苷酸(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。
- [0338] 根据一个实施例,所述核苷酸交换包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个或至多250个核苷酸的核苷酸替换(与天然非编码RNA分子相比,例如,RNA沉默分子)。
- [0339] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多200个核苷酸的核苷酸替换。
- [0340] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多150个核苷酸的核苷酸替换。

- [0341] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多100个核苷酸的核苷酸替换。
- [0342] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多50个核苷酸的核苷酸替换。
- [0343] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多25个核苷酸的核苷酸替换。
- [0344] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多20个核苷酸的核苷酸替换。
- [0345] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多15个核苷酸的核苷酸替换。
- [0346] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多10个核苷酸的核苷酸替换。
- [0347] 根据一具体的实施例,所述核苷酸交换包括至多5个核苷酸的核苷酸替换。
- [0348] 根据一个实施例,用于编码所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)的所述基因通过将一内源性RNA沉默分子(例如,miRNA)的一序列与一选择的RNA沉默序列(例如,siRNA)交换来修饰。
- [0349] 根据一具体的实施例,用于一内源性RNA沉默分子(例如,miRNA)的基因交换的一siRNA的所述序列包括一核酸序列,所述核酸序列选自SEQ ID NO:5至12或SEQ ID NO:103至234所组成的群组。
- [0350] 根据一个实施例,修饰所述非编码RNA分子的引导链(guide strand)(例如,RNA沉默分子,例如,多个miRNA前体(pri/pre-miRNA)或多个siRNA前体(dsRNA))以保留结构的独创性并保持相同的碱基配对外形(pairing profile)。
- [0351] 根据一个实施例,修饰所述非编码RNA分子的乘客链(passenger strand)(例如,RNA沉默分子,例如,多个miRNA前体(pri/pre-miRNA)或多个siRNA前体(dsRNA))以保留结构的独创性并保持相同的碱基配对外形(pairing profile)。
- [0352] 如本文中所使用,术语“结构的独创性”是指所述二级RNA结构(即碱基配对外形)。保持所述结构的独创性对于所述非编码RNA(例如,RNA沉默分子,例如,siRNA或miRNA)正确且有效的生物发生/加工是非常重要的,其是结构依赖性的而不是单纯序列依赖性的。
- [0353] 根据一个实施例,在所述引导链(沉默链)中修饰所述非编码RNA(例如,RNA沉默分子),使其与所述靶RNA具有约50至100%的互补性(如上所述),同时修饰所述乘客链以保留原始的(未经修饰的)非编码RNA结构。
- [0354] 根据一个实施例,修饰所述非编码RNA(例如,RNA沉默分子),使得所述种子序列(例如,对于从所述5'末端的miRNA核苷酸2至8位)与所述靶序列互补。
- [0355] 根据一具体的实施例,设计所述RNA沉默分子(即RNAi分子),使得修饰所述RNAi分子的一序列以保留结构的独创性并通过细胞RNAi加工和多个执行因子(executing factor)来识别。
- [0356] 根据一具体的实施例,设计所述非编码RNA分子(即rRNA、tRNA、lncRNA、snoRNA等),使得修饰所述RNAi分子的一序列以通过细胞RNAi加工和多个执行因子来识别。
- [0357] 本发明的所述DNA编辑剂可以使用多个DNA递送方法(例如,通过多个表达载体)或使用多个无DNA方法引入至多个植物细胞中。
- [0358] 根据一个实施例,可以将所述gRNA(或所使用的任何其他DNA识别模块,取决于所使用的DNA编辑系统)作为RNA提供给所述细胞。
- [0359] 因此,应理解的是,本技术涉及使用多个瞬时DNA或无DNA方法引入至所述DNA编辑剂,例如,RNA转染(例如,mRNA+gRNA转染)或核糖核蛋白(ribonucleoprotein,RNP)转染(例如,蛋白质-RNA复合物转染,例如,Cas9/gRNA核糖核蛋白(RNP)复合物转染)。

[0360] 例如,Cas9可以作为一DNA表达质粒、体外转录物(即RNA)、或作为与一核糖核蛋白颗粒(RNP)中的所述RNA部分结合的一重组蛋白引入。gRNA例如可以作为一DNA质粒或一体外转录物(即RNA)递送。

[0361] 根据本教导,可以使用本领域已知的用于RNA或RNP转染的任何方法,例如但不限于,显微注射(microinjection)(如通过Cho等人所述,“在秀丽隐杆线虫中通过直接注射Cas9-sgRNA核糖核蛋白进行可遗传的基因敲除(Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins)”,*Genetics*,2013年,195:1177至1180,通过引用并入本文中)、电穿孔(electroporation)(如通过Kim等人所述,“通过递送纯化的Cas9核糖核蛋白在人类细胞中进行的高效RNA引导的基因组编辑(Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins)”,*Genome Res.*,2014年,24:1012至1019,通过引用并入本文中)、或脂质介导的转染,例如,使用脂质体(liposome)(如Zuris等人所述,“阳离子脂质介导的蛋白质递送使得能够在体外和体内进行基于蛋白质的有效基因组编辑(Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo)”,*Nat Biotechnol.*,2014年,doi:10.1038/nbt.3081,通过引用并入本文中)。RNA转染的其他多个方法在美国专利申请号20160289675中描述,其全部内容通过引用并入本文中。

[0362] 本发明的多个RNA转染方法的一优点是RNA转染本质上是瞬时的且无载体(vector-free)。一RNA转基因可以作为一最小表达盒递送至一细胞并在其中表达,而不需要任何其他序列(例如,多个病毒序列)。

[0363] 根据一个实施例,本发明的所述DNA编辑剂使用多个表达载体引入至所述植物细胞中。

[0364] 本发明一些实施例的所述“表达载体”(在本文中也称为“一核酸构建体(construct)”、“载体”或“构建体”)包含提供此载体适于在原核生物、真核生物或优选两者中复制的多个附加序列(例如,穿梭载体(shuttle vector))。

[0365] 在根据本发明一些实施例的所述多个方法中有用的多个构建体可以使用本领域技术人员众所周知的重组DNA技术来构建。所述多个核酸序列可以插入至多个载体中,所述多个载体可以是市售的、适于转化为多个植物且适于在多个转化的细胞中瞬时表达所述感兴趣的基因。所述遗传构建体可以是一表达载体,其中所述核酸序列可操作地(operably)连接至一个或多个调节序列,从而允许在所述多个植物细胞中表达。

[0366] 根据一个实施例,为了表达一功能性DNA编辑剂,在所述剪切模块(cleaving module)(核酸酶)不是所述DNA识别单元的一组成部分的情况下,所述表达载体可以用于编码所述剪切模块以及所述DNA识别单元(例如,gRNA在CRISPR/Cas的情况下)。

[0367] 或者,可以将所述剪切模块(核酸酶)和所述DNA识别单元(例如,gRNA)克隆至多个单独的表达载体中。在这种情况下,必须将至少两个不同的表达载体转化至同一植物细胞中。

[0368] 或者,当不使用一核酸酶时(即不从一外源性的来源向所述细胞施加),可以使用一单个表达载体克隆并表达所述DNA识别单元(例如,gRNA)。

[0369] 多个典型的表达载体还可以含有一转录和翻译起始序列、转录和翻译终止子以及

可选的一聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal)。

[0370] 根据一个实施例,所述DNA编辑剂包括用于编码至少一个DNA识别单元(例如,gRNA)的一核酸剂,所述DNA识别单元在运作上(operatively)连接至在多个植物细胞中有活性的一顺式作用(cis-acting)调节元件(例如,启动子)。

[0371] 根据一个实施例,所述核酸酶(例如,核酸内切酶)和所述DNA识别单元(例如,gRNA)是从相同的表达载体编码的。这样的载体可以包括在多个植物细胞中有活性的一单个顺式作用调节元件(例如,启动子),用于所述核酸酶和所述DNA识别单元二者的表达。或者,所述核酸酶和所述DNA识别单元可以各自可操作地连接至在多个植物细胞中有活性的一顺式作用调节元件(例如,启动子)。

[0372] 根据一个实施例,所述核酸酶(例如,核酸内切酶)和所述DNA识别单元(例如,gRNA)是从不同的表达载体编码的,其中每个表达载体可操作地连接至在多个植物细胞中有活性的一顺式作用调节元件(例如,启动子)。

[0373] 如本文中所使用,短语“植物可表达的”或“在多个植物细胞中有活性的”是指一启动子序列,包含添加至其中或含在其中的任何其他调节元件,其至少能够诱导、赋予、激活或增强在一植物细胞、组织或器官中的表达,优选一单子叶或双子叶植物细胞、组织或器官。

[0374] 使用的所述植物启动子可以是一组成型启动子、一组织特异性启动子、一诱导型启动子、一嵌合(chimeric)启动子或一发育调控(developmentally regulated)启动子。

[0375] 对于本发明一些实施例的所述多个方法有用的多个优选启动子的多个示例在表I、II、III以及IV中示出。

[0376] 表I:用于实施本发明一些实施例的多个示例性组成型启动子

[0377]	基因来源	表达模式	参考文献
	肌动蛋白	组成型	McElroy 等人, Plant Cell, 2: 163-171, 1990 年
	CAMV 35S	组成型	Odell 等人, Nature, 313: 810-812, 1985 年
	CaMV 19S	组成型	Nilsson 等人, Physiol. Plant, 100:456-462, 1997 年
	GOS2	组成型	de Pater 等人, Plant J Nov.; 2(6):837-44, 1992 年
	泛素	组成型	Christensen 等人, Plant Mol. Biol., 18: 675-689, 1992 年
	水稻亲环素(Rice cyclophilin)	组成型	Bucholz 等人, Plant Mol Biol., 25(5):837-43, 1994 年
	玉米 H3 组蛋白	组成型	Lepetit 等人, Mol. Gen. Genet., 231: 276-285, 1992 年
	肌动蛋白 2	组成型	An 等人, Plant J., 10(1): 107121, 1996 年
	CVMV(木薯脉花叶病)	组成型	Lawrenson 等人, Gen Biol., 16:258, 2015 年
	毒(Cassava Vein Mosaic Virus))		
[0378]	U6 (AtU626; TaU6)	组成型	Lawrenson 等人, Gen Biol., 16:258, 2015 年

[0379] 表II:用于实施本发明一些实施例的多个示例性种子优选启动子

[0380]

基因来源	表达模式	参考文献
种子特异性基因	种子	Simon 等人, Plant Mol. Biol., 5: 191, 1985 年; Scofield 等人, J. Biol. Chem., 262: 12202, 1987 年; Baszczynski 等人, Plant Mol. Biol., 14: 633, 1990 年
巴西坚果白蛋白	种子	Pearson'等人, Plant Mol. Biol., 18: 235-245, 1992 年
豆科植物	种子	Ellis 等人, Plant Mol. Biol., 10: 203-214, 1988 年
谷蛋白 (水稻)	种子	Takaiwa 等人, Mol. Gen. Genet., 208: 15-22, 1986 年; Takaiwa 等人, FEBS Letts., 221: 43-47, 1987 年
玉米醇溶蛋白 (zein)	种子	Matzke 等人, Plant Mol Biol., 143: 323-32, 1990 年
napA	种子	Stalberg 等人, Planta, 199: 515-519, 1996 年
小麦 LMW 和 HMW, 谷蛋白-1	胚乳	Mol Gen Genet., 216: 81-90, 1989 年; NAR 17: 461-2
小麦 SPA	种子	Albanietal, Plant Cell, 9: 171- 184, 1997 年
小麦 a、b 以及 g 麦醇溶蛋白	胚乳	EMBO3:1409-15, 1984 年
大麦 ltrl 启动子	胚乳	
大麦 B1、C、D 大麦醇溶蛋白 (hordein)	胚乳	Theor Appl Gen., 98: 1253-62, 1999 年; Plant J 4:343-55, 1993 年; Mol Gen Genet., 250: 750-60, 1996 年
大麦 DOF	胚乳	Mena 等人, The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998 年
Biz2	胚乳	EP99106056.7
合成启动子	胚乳	Vicente-Carbajosa 等人, Plant J., 13: 629-640, 1998 年
水稻醇溶蛋白 NRP33	胚乳	Wu 等人, Plant Cell Physiology, 39(8) 885-889, 1998 年
水稻球蛋白 Glb-1	胚乳	Wu 等人, Plant Cell Physiology, 398: 885-889, 1998 年
水稻 OSH1	胚 (emryo)	Sato 等人, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122
水稻 alpha-球蛋白 (globulin) REB/OHP-1	胚乳	Nakase 等人, Plant Mol. Biol., 33: 513-S22, 1997 年

[0381]

水稻 ADP-葡萄糖 PP	胚乳	Trans Res, 6: 157-68, 1997 年
玉米 ESR 基因家族	胚乳	Plant J., 12: 235-46, 1997 年
高粱 gamma- 高粱醇溶蛋白 (sorgum gamma-kafirin)	胚乳	PMB, 32: 1029-35, 1996 年
KNOX	胚 (emryo)	Postma-Haarsma 等人, Plant Mol. Biol., 39: 257-71, 1999 年
水稻油质蛋白	胚和 aleuton	Wu 等人, J. Biochem., 123: 386, 1998 年
向日葵油质蛋白	种子 (胚和干种子)	Cummins 等人, Plant Mol. Biol., 19: 873-876, 1992 年

[0382] 表III:用于实施本发明的多个示例性花特异性启动子

[0383]	基因来源	表达模式	参考文献
	AtPRP4	花	www(dot)salus(dot)medium(dot)edu/mg/tierney/html
	沙琳合酶 (chalcone synthase, chsA)	花	Van der Meer 等人, Plant Mol. Biol., 15, 95-109, 1990 年
	LAT52	花药 (anther)	Twell 等人, Gen Genet., 217: 240-245, 1989 年
	apetala-3	花	

[0384] 表IV:用于实施本发明的多个替代水稻启动子

[0385]	PRO #	基因	表达
	PR00001	金属硫蛋白 Mtc	胚+愈伤组织的转移层
	PR00005	假定 beta-淀粉酶 (putative beta-amylase)	胚的转移层
	PR00009	假定纤维素合成酶	在根中弱
	PR00012	脂肪酶 (假定)	
	PR00014	转移酶 (假定)	
	PR00016	肽基脯氨酰顺反异构酶 (假定)	
	PR00019	未知	
	PR00020	prp 蛋白 (假定)	
	PR00029	根瘤素 (noduline) (假定)	
	PR00058	蛋白酶抑制剂 Rgpi9	种子
	PR00061	Beta 扩张蛋白 (expansin) EXPB9	在幼花中弱
	PR00063	结构蛋白	幼组织+愈伤组织+胚
	PR00069	木糖苷酶 (假定)	
	PR00075	谷醇溶蛋白 (Prolamine) 10Kda	在胚乳中强
	PR00076	过敏原 RA2	在胚乳中强
	PR00077	谷醇溶蛋白 RP7	在胚乳中强
	PR00078	CBP80	
	PR00079	淀粉分支酶 I	
	PR00080	类金属硫蛋白 ML2	胚+愈伤组织的转移层
	PR00081	假定咖啡酰-CoA	幼苗 (shoot)

[0386]

	3-0 甲基转移酶	
PR00087	谷醇溶蛋白 RM9	在胚乳中强
PR00090	谷醇溶蛋白 RP6	在胚乳中强
PR00091	谷醇溶蛋白 RP5	在胚乳中强
PR00092	过敏原 RA5	
PR00095	假定蛋氨酸氨基肽酶	胚
PR00098	Ras 相关的 GTP 结合蛋白	
PR00104	beta 扩张蛋白 EXPB1	
PR00105	富含甘氨酸的蛋白质	
PR00108	类金属硫蛋白 蛋白质（假定）	
PR00110	RCc3 强根	
PR00111	ucla 花青素（uclacyanin） 3-样 蛋白	弱辨别中心（discrimination center）/幼芽分生组织（shoot meristem）
PR00116	26S 蛋白酶体调控颗粒非 ATP 酶 亚基 11	分生组特异性非常弱
PR00117	假定 40S 核糖体蛋白	在胚乳中弱
PR00122	叶绿素 a/lb-结合蛋白前体 (Cab27)	在幼苗中非常弱
PR00123	假定原叶绿素还原酶	叶子强
PR00126	金属硫蛋白 RiCMT	辨别中心、幼芽分生组织强
PR00129	GOS2	固有性（constitutive）强
PR00131	GOS9	
PR00133	几丁质酶 Cht-3	分生组特异性非常弱
PR00135	alpha-球蛋白	在胚乳中强
PR00136	丙氨酸转氨酶	在胚乳中弱
PR00138	周期素 A2	
PR00139	周期素 D2	
PR00140	周期素 D3	
PR00141	环菲林（Cyclophyllin） 2	幼苗和种子
PR00146	蔗糖合酶 SS1（大麦）	固有性中等
PR00147	胰蛋白酶抑制剂 ITR1（大麦）	在胚乳中弱
PR00149	有内含子的泛素	固有性强
PR00151	WSI18	胚和胁迫（stress）
PR00156	HVA22 同系物（假定）	
PR00157	EL2	
PR00169	水通道蛋白	在幼龄植物中的固有性中等
PR00170	高迁移率族蛋白	固有性强
PR00171	可逆糖基化蛋白 RGP1	固有性弱
PR00173	胞内 MDH	幼苗
PR00175	RAB21	胚和胁迫
PR00176	CDPK7	
PR00177	Cdc2-1	在分生组织中非常弱
PR00197	蔗糖合酶 3	

[0387]	PRO0198	OsVP1	
	PRO0200	OSH1	在幼龄植物分生组织中非常弱
	PRO0208	假定叶绿素酶	
	PRO0210	OsNRT1	
	PRO0211	EXP3	
	PRO0216	磷酸盐转运蛋白 OjPT1	
	PRO0218	油质蛋白 18kd	糊粉 (aleurone) + 胚
	PRO0219	无内含子的泛素 2	
	PRO0220	RFL	
	PRO0221	玉米 UBI delta 内含子	未检测到
	PRO0223	谷蛋白-1	
	PRO0224	谷醇溶蛋白 RP6 促进子的片段	
	PRO0225	4xABRE	
	PRO0226	谷蛋白 OSGLUA3	
	PRO0227	BLZ-2_短 (大麦)	
	PR00228	BLZ-2_长 (大麦)	

[0388] 所述诱导型启动子是在一特定植物组织中,通过一发育阶段或通过一特定刺激(例如,多个胁迫条件,包括例如光、温度、化学物质、干旱、高盐、渗透压休克(osmotic shock)、氧化剂条件、或在致病性的情况下)诱导的一启动子,且包含但不限于来自豌豆 rbcS 基因的光诱导启动子、来自苜蓿(alfalfa) rbcS 基因的启动子、在干旱中有活性的多个启动子 DRE、MYC 以及 MYB; 在高盐和渗透胁迫(osmotic stress)中有活性的多个启动子 INT、INPS、prxEa、Ha hsp17.7G4 以及 RD21, 以及在病原胁迫下有活性的多个启动子 hsr203J 和 str246C。

[0389] 根据一个实施例,所述启动子是一病原体诱导型(pathogen-inducible)启动子。这些启动子在感染一病原体(例如,细菌、真菌、病毒、线虫以及昆虫)后在多个植物中定向多个基因的表达。这样的启动子包含来自与多个病原相关的蛋白(pathogenesis-related protein, PR 蛋白)的启动子,其在被一病原体感染后被诱导;例如,多个 PR 蛋白、多个 SAR 蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶(beta-1,3-glucanase)、几丁质酶等。参见例如,Redolfi 等人,1983 年, Neth. J. Plant Pathol., 89:245 至 254; Uknes 等人,1992 年, Plant Cell, 4:645 至 656; 以及 Van Loon, 1985 年, Plant Mol. Virol., 4:111 至 116。

[0390] 根据一个实施例,当在所述表达载体中使用超过一个启动子时,所述多个启动子是相同的(例如,全部相同、至少两个相同)。

[0391] 根据一个实施例,当在所述表达载体中使用超过一个启动子时,所述多个启动子是不同的(例如,至少两个不同、全部不同)。

[0392] 根据一个实施例,在所述表达载体中的所述启动子包含但不限于, CaMV 35S、2x CaMV 35S、CaMV 19S、泛素、AtU626 或 TaU6。

[0393] 根据一具体的实施例,在所述表达载体中的所述启动子包括一 35S 启动子。

[0394] 根据一具体的实施例,在所述表达载体中的所述启动子包括一 U6 启动子。

[0395] 多个表达载体还可以包括多个转录和翻译起始序列、多个转录和翻译终止序列以及可选的一聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal)。

[0396] 根据一具体的实施例,所述表达载体包括一终止序列,例如但不限于,一 G7 终止序列、AtuNos 终止序列或一 CaMV-35S 终止序列。

[0397] 多个植物细胞可以用本发明一些实施例的所述多个核酸构建体稳定地或瞬时地转化。在稳定的转化中,本发明一些实施例的所述核酸分子整合至所述植物基因组中,因此它代表了一稳定和遗传的性状。在瞬时的转化中,所述核酸分子通过转化的细胞表达,但未整合至所述基因组中,因此它代表了一瞬时的性状。

[0398] 将多个外源基因引入至单子叶和双子叶植物的方法有很多种(Potrykus, I., *Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol.*, 1991年, 42:205至225; Shimamoto等人, *Nature*, 1989年, 338:274至276)。

[0399] 使外源性DNA稳定整合至植物基因组DNA中的主要方法包含两种主要方法:

[0400] (i) 农杆菌介导(agrobacterium-mediated)的基因转移:Klee等人, 1987年, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38:467至486; Klee和Rogers在植物的细胞培养和体细胞遗传学(*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*)中, 第6卷, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, Schell, J.和Vasil, L.K.编辑, 学术出版社(Academic Publishers), 加州圣地牙哥, 1989年, 第2至25页; Gatenby在植物生物技术(*Plant Biotechnology*)中, Kung, S.和Arntzen, C.J.编辑, 巴特沃思出版社(Butterworth Publishers), 马萨诸塞州波士顿, 1989年, 第93至112页。

[0401] (ii) 直接DNA摄取:Paszkowski等人在植物的细胞培养和体细胞遗传学(*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*)中, 第6卷, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, Schell, J.和Vasil, L.K.编辑, 学术出版社(Academic Publishers), 加州圣地牙哥, 1989年, 第52至68页; 包含直接将DNA摄取至原生质体中的方法, Toriyama, K.等人, 1988年, *Bio/Technology*, 6:1072至1074。通过植物细胞短暂电击(brief electric shock)诱导的DNA摄取:Zhang等人, *Plant Cell Rep.*, 1988年, 7:379至384。Fromm等人, *Nature*, 1986年, 319:791至793。通过粒子轰击(particle bombardment)将DNA注入至植物细胞或组织中, Klein等人, *Bio/Technology*, 1988年, 6:559至563; McCabe等人, *Bio/Technology*, 1988年, 6:923至926; Sanford, *Physiol. Plant*, 1990年, 79:206至209; 通过使用微量移液器系统(micropipette system):Neuhaus等人, *Theor. Appl. Genet.*, 1987年, 75:30至36; Neuhaus和Spangenberg, *Physiol. Plant.*, 1990年, 79:213至217; 美国专利号5,464,765:细胞培养、胚胎或愈伤组织的玻璃纤维或碳化硅晶须转化(glass fibers or silicon carbide whisker transformation of cell cultures, embryos or callus tissue)、或通过将DNA与发芽的花粉直接孵育, DeWet等人在胚珠组织的实验操作(*Experimental Manipulation of Ovule Tissue*)中, Chapman, G.P.、Mantell, S.H.以及Daniels, W.编辑, 朗文(Longman), 伦敦, 1985年, 第197至209页; 以及Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 美国, 1986年, 83:715至719。

[0402] 所述农杆菌系统包含使用多个质粒载体, 所述质粒载体含有整合至所述植物基因组DNA中已定义的一个或多个DNA片段。所述植物组织的一个或多个接种方法根据多个植物种类以及农杆菌递送系统而变化。一种广泛使用的方法是叶盘(leaf disc)法, 其可以用任何组织外植体进行, 这为启动整个植物的分化提供了良好的来源。Horsch等人在植物分子生物学手册A5(*Plant Molecular Biology Manual A5*)中, 克鲁维尔学术出版社(Kluwer Academic Publishers), 多德雷赫特, 1988年, 第1至9页。一种辅助方法是将所述农杆菌递送系统与真空渗透结合使用。所述农杆菌系统在创建转基因双子叶植物中特别有效。

[0403] 根据一个实施例,一无农杆菌表达方法用于将多个外源基因引入至多个植物细胞中。根据一个实施例,所述无农杆菌的表达方法是瞬时的。根据一具体的实施例,一轰击方法用于将多个外源基因引入至多个植物细胞中。根据另一具体的实施例,一植物根的轰击用于将多个外源基因引入至多个植物细胞中。以下多个实例部分中讨论了可以根据本发明的一些实施例使用的一示例性轰击方法。

[0404] 此外,根据本发明的一些实施例的教导,可以使用各种克隆试剂盒(cloning kit)或基因合成。

[0405] 根据一个实施例,所述核酸构建体是一二元载体(binary vector)。二元载体的多个实例是pBIN19、pBI101、pBinAR、pGPTV、pCambia、pBIB-HYG、pBecks、pGreen或pPZP (Hajukiewicz, P. 等人, Plant Mol. Biol., 25, 989, 1994年, 以及 Hellens 等人, Trends in Plant Science, 5, 446, 2000年)。

[0406] 在其他DNA递送方法(例如,如以下所述的转染、电穿孔、轰击、病毒接种)中使用的其他多个载体的多个实例是:pGE-sgRNA (Zhang 等人, Nat. Comms., 2016年, 7:12697)、pJIT163-Ubi-Cas9 (Wang 等人, Nat. Biotechnol., 2004年, 32, 947至951)、pICH47742: 2x35S-5' UTR-hCas9 (STOP) -NOST (Belhan 等人, Plant Methods, 2013年, 11; 9 (1): 39)、pAHC25 (Christensen, A. H. 和 P. H. Quail, 1996年, 基于泛素启动子的载体在单子叶植物中用于可选择及/或可筛选标记基因的高水平表达 (Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants), 转基因研究 (Transgenic Research), 5: 213至218)、pHBT-sGFP (S65T) -NOS (Sheen 等人, 蛋白质磷酸酶活性是玉米中光诱导基因表达所需要的, EMBO J., 12 (9), 3497至3505, 1993年)。

[0407] 根据一个实施例,本发明的一些实施例的所述方法还包括将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。

[0408] 根据一个实施例,当所述修饰是一插入时,所述方法还包括将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。

[0409] 根据一个实施例,当所述修饰是一缺失时,所述方法还包括将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。

[0410] 根据一个实施例,当所述修饰是一缺失和插入时(例如,交换),所述方法还包括将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。

[0411] 根据一个实施例,当所述修饰是一点突变时,所述方法还包括将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。

[0412] 如本文中所使用,术语“多个供体寡核苷酸(donor oligonucleotide)”或“多个供体寡核苷酸(donor oligo)”是指多个外源性核苷酸,即从外部引入至所述植物细胞中以在所述基因组中产生一精确的变化。根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸是合成的。

[0413] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸是多个RNA寡核苷酸。

[0414] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸是多个DNA寡核苷酸。

[0415] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸是多个合成寡核苷酸。

[0416] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个单链供体寡核苷酸(ssODN)。

[0417] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个双链供体寡核苷酸(dsODN)。

- [0418] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个双链DNA(dsDNA)。
- [0419] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个双链DNA-RNA双链体(duplex)(DNA-RNA双链体)。
- [0420] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个双链DNA-RNA杂交体(hybrid)。
- [0421] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个单链DNA-RNA杂交体。
- [0422] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个单链DNA(ssDNA)。
- [0423] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个双链RNA(dsRNA)。
- [0424] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括多个单链RNA(ssRNA)。
- [0425] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括用于交换的所述DNA或RNA序列(如上所述)。
- [0426] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸以一非表达载体形式或寡核苷酸提供。
- [0427] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括一DNA供体质粒(例如,圆形或线性质粒)。
- [0428] 根据一个实施例,所述多个供体寡核苷酸包括约50至5000个、约100至5000个、约250至5000个、约500至5000个、约750至5000个、约1000至5000个、约1500至5000个、约2000至5000个、约2500至5000个、约3000至5000个、约4000至5000个、约50至4000个、约100至4000个、约250至4000个、约500至4000个、约750至4000个、约1000至4000个、约1500至4000个、约2000至4000个、约2500至4000个、约3000至4000个、约50至3000个、约100至3000个、约250至3000个、约500至3000个、约750至3000个、约1000至3000个、约1500至3000个、约2000至3000个、约50至2000个、约100至2000个、约250至2000个、约500至2000个、约750至2000个、约1000至2000个、约1500至2000个、约50至1000个、约100至1000个、约250至1000个、约500至1000个、约750至1000个、约50至750个、约150至750个、约250至750个、约500至750个、约50至500个、约150至500个、约200至500个、约250至500个、约350至500个、约50至250个、约150至250或约200至250个核苷酸。
- [0429] 根据一具体的实施例,包括所述ssODN(例如,ssDNA或ssRNA)的所述多个供体寡核苷酸包括约200至500个核苷酸。
- [0430] 根据一具体的实施例,包括所述dsODN(例如,dsDNA或dsRNA)的所述多个供体寡核苷酸包括约250至5000个核苷酸。
- [0431] 根据一个实施例,对于将一内源性RNA沉默分子(例如,miRNA)与一选择的RNA沉默序列(例如,siRNA)进行基因交换,所述表达载体、ssODN(例如,ssDNA或ssRNA)或dsODN(例如,dsDNA或dsRNA)不需在一植物细胞中表达,且可以作为一非表达模板。根据一具体的实施例,在这种情况下,如果以一DNA形式提供,则仅需表达所述DNA编辑剂(例如,多个Cas9/sgRNA模块)。
- [0432] 根据一些实施例,对于在不使用一核酸酶的情况下对一内源性非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)进行基因编辑,可将所述DNA编辑剂(例如,gRNA)在有或没有例如寡核苷酸供体DNA或RNA(如本文中所述)的情况下引入至所述真核细胞中。
- [0433] 根据一个实施例,使用上述任何方法(例如,使用所述表达载体或RNP转染)将多个供体寡核苷酸引入至所述植物细胞中。
- [0434] 根据一个实施例,将所述gRNA和所述多个DNA供体寡核苷酸共同引入至所述植物

细胞中(例如,通过轰击)。应理解的是,任何其他因子(例如,核酸酶)可以与之共同引入。

[0435] 根据一个实施例,将所述gRNA在所述多个DNA供体寡核苷酸之前引入至所述植物细胞中(例如,在几分钟或几小时内)。应理解的是,任何其他因子(例如,核酸酶)可以在所述gRNA或所述多个DNA供体寡核苷酸之前、同时或之后引入。

[0436] 根据一个实施例,将所述gRNA在所述多个DNA供体寡核苷酸之后引入至所述植物细胞中(例如,在几分钟或几小时内)。应理解的是,任何其他因子(例如,核酸酶)可以在所述gRNA或所述多个DNA供体寡核苷酸之前、同时或之后引入。

[0437] 根据一个实施例,提供了一种组合物,其包括用于基因组编辑的至少一个gRNA和多个DNA供体寡核苷酸。

[0438] 根据一个实施例,提供了一种组合物,其包括用于基因组编辑的至少一个gRNA、一核酸酶(例如,核酸内切酶)以及多个DNA供体寡核苷酸。

[0439] 有多种方法可以直接将DNA转移至多个植物细胞中,且技术人员会知道选择哪种方法。在电穿孔中,所述多个原生质体短暂地暴露于一强电场中。在微量注射中,使用非常小的微量移液器将所述DNA在机械上直接地注射至所述多个细胞中。在微粒轰击中,所述DNA吸附在多个微粒上,例如,多个硫酸镁晶体或多个金或钨微粒,且所述多个微粒在物理上加速进入多个原生质体、多个细胞或多个植物组织。

[0440] 因此,在本发明的多个实施例中,可以通过本领域技术人员已知的任何方法将多个核酸的递送引入至一植物细胞中,例如包含但不限于:通过多个原生质体的转化(例如参见,美国专利号5,508,184);通过干燥(desiccation)/抑制介导的DNA摄取(例如参见, Potrykus等人,1985年,Mol.Gen.Genet.,199:183至8);通过电穿孔(例如参见,美国专利号5,384,253);通过与多个碳化硅纤维搅拌(例如参见,美国专利号5,302,523和5,464,765);通过农杆菌介导的转化(例如参见,美国专利号5,563,055、5,591,616、5,693,512、5,824,877、5,981,840以及6,384,301);通过加速多个DNA涂覆的颗粒(例如参见,美国专利号5,015,580、5,550,318、5,538,880、6,160,208、6,399,861以及6,403,865)、以及通过多个纳米颗粒、多个纳米载体以及多个细胞穿透肽(WO201126644A2;WO2009046384A1;WO2008148223A1)将DNA、RNA、多个肽及/或多个蛋白质或多个核酸和多个肽的多个组合递送至多个植物细胞中的方法。

[0441] 其他转染方法包含使用多个转染试剂(例如,Lipofectin,ThermoFisher)、多个树枝状聚合物(Kukowska-Latallo,J.F.等人,1996年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报),93,4897至1902)、多个细胞穿透肽(Mäe等人,2005年,将细胞穿透肽内化至烟草原生质体中(Intemalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts),Biochimica et Biophysica Acta,1669(2):101至7)或多个多胺(Zhang和 Vinogradov,2010年,用于大脑毛细血管内皮细胞的基因递送和转染的短生物可降解多胺(Short biodegradable polyamines for gene delivery and transfection of brain capillary endothelial cells),J Control Release,143(3):359至366)。

[0442] 根据一具体的实施例,将DNA引入至多个植物细胞(例如,多个原生质体)中的所述方法包括聚乙二醇(PEG)介导的DNA摄取。有关更多详细信息,请参见Karesch等人(1991年,Plant Cell Rep.,9:575至578);Mathur等人(1995年,Plant Cell Rep.,14:221至226);Negrutiu等人(1987年,Plant Cell Mol.Biol.,8:363至373)。然后将多个植物细胞(例如,

多个原生质体)在允许它们生长多个细胞壁、开始分裂以形成一愈伤组织、发育多个幼芽和多个根、以及再生整个植物的条件下培养。

[0443] 稳定的转化后,进行植物繁殖。最常见的植物繁殖方法是通过种子。然而,通过种子繁殖进行再生的缺点在于,由于杂合性(heterozygosity)而导致所述作物中缺乏均匀性,因为多个种子是通过多个植物根据孟德尔规则所支配的多个遗传变异产生的。基本上,每个种子在基因上都是不同的,且每个都有自己的特定性状。因此,优选的是产生转化植物,使得再生植物具有与亲本转基因(parent transgenic)植物相同的性状和特征。因此,优选的是通过微繁殖(micropropagation)再生所述转化植物,其提供在遗传上相同的转化植物的一快速、一致的繁殖。

[0444] 微繁殖是从一选定的亲本植物或品种中切除的一单块组织中生长多个新一代植物的一过程。此过程允许具有所需性状的多个植物大量繁殖。多个新产生的植物在遗传上与原始植物相同,且具有所述原始植物的所有特征。微繁殖(或克隆)可以在一短时间内大量产生高质量的植物材料,并在保留所述原始转基因或转化植物的所述多个特征提供多个选定品种的一快速繁殖。多个克隆植物的优点是植物繁殖的速度以及多个所产生植物的质量和均匀性。

[0445] 微繁殖是一多阶段的程序,需要在多个阶段之间改变培养基或生长条件。因此,所述微繁殖过程包括四个基本阶段:第一阶段,初始组织培养;第二阶段,组织培养繁殖;第三阶段,分化和植物形成;以及第四阶段,温室培养和硬化。在第一阶段期间(初始组织培养),建立所述组织培养并证明无污染。在第二阶段期间,繁殖所述初始组织培养,直到产生一足够数量的组织样品以满足生产目标为止。在第三阶段期间,将在第二阶段中生长的所述多个组织样品分开并生长成多个单独的植株。在第四阶段期间,将多个转化植株转移至一温室进行硬化,在所述温室中所述植物对光的耐受性逐渐地增加,使其可以在自然环境中生长。

[0446] 尽管目前优选是稳定的转化,但是本发明的一些实施例还设想了多个叶细胞、多个分生细胞或所述整个植物的瞬时的转化。

[0447] 瞬时的转化可以通过上述任何直接DNA转移方法或通过使用多个修饰的植物病毒的病毒感染来实现。

[0448] 已证明对多个植物宿主转化有用的多个病毒包含CaMV、TMV、TRV以及BV。使用多个植物病毒的多个植物转化描述于美国专利号4,855,237(BGV)、EP-A 67,553(TMV)、日本公开申请号63-14693(TMV)、EPA 194,809(BV)、EPA 278,667(BV);以及Gluzman,Y.等人(分子生物学通讯:病毒载体(Communications in Molecular Biology:Viral Vectors),纽约冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),第172至189页,1988年)中。用于在包含植物的许多宿主中表达外源DNA的伪病毒颗粒(pseudovirus particle)描述于W0 87/06261中。

[0449] 通过以上参考文献以及通过Dawson,W.O.等人(Virology,1989年,172:285至292;Takamatsu等人(EMBO J.,1987年,6:307至311);French等人(Science,1986年,231:1294至1297);以及Takamatsu等人(FEBS Letters,1990年,269:73至76)证明了在多个植物中引入和表达多个非病毒外源性核酸序列的多个植物RNA病毒的构建。

[0450] 当所述病毒是一DNA病毒时,可以对所述病毒本身进行适当的修饰。或者,可以首

先将所述病毒克隆至一细菌质粒中,以易于用所述外源DNA构建所需的病毒载体。然后可以从所述质粒中切除所述病毒。如果所述病毒是一DNA病毒,则一细菌的复制起点可以附着至所述病毒DNA上,然后通过所述细菌复制。此DNA的转录和翻译将产生外壳蛋白(coat protein),其将包埋(encapsidate)所述病毒DNA。如果所述病毒是一RNA病毒,则通常将所述病毒克隆为一cDNA并插入至一质粒中。然后将所述质粒用于制造所有的构建。然后通过转录所述质粒的所述病毒序列产生所述RNA病毒,并翻译所述多个病毒基因以产生包埋所述病毒RNA的所述(多个)外壳蛋白。

[0451] 通过以上参考文献以及美国专利号5,828,514中证明了用于在多个植物中引入和表达多个非病毒外源性核酸序列(例如,本发明的一些实施例的所述构建体中包括的序列)的多个植物RNA病毒的构建。

[0452] 在一个实施例中,提供了一种植物病毒核酸,其中已经从一病毒核酸删除了所述天然外壳蛋白编码序列,已经插入了一非天然植物病毒外壳蛋白编码序列和一非天然启动子(优选为所述非天然病毒外壳蛋白编码序列的亚基因组启动子),其能够在所述植物宿主中表达、包装所述重组植物病毒核酸以及确保所述宿主通过所述重组植物病毒核酸的一系统感染。或者,所述外壳蛋白基因可以通过在其内插入所述非天然核酸序列而失活,从而产生一蛋白质。所述重组植物病毒核酸可以含有一个或多个其他非天然亚基因组启动子。每个非天然亚基因组启动子能够在所述植物宿主中转录或表达多个相邻的基因或核酸序列,且不能彼此重组,也不能与多个天然亚基因组启动子重组。如果包含超过一个核酸序列,则可以在所述天然植物病毒亚基因组启动子或所述天然植物病毒亚基因组和一非天然植物病毒亚基因组启动子附近插入多个非天然(外源)核酸序列。所述多个非天然核酸序列在所述亚基因组启动子的控制下在所述宿主植物中转录或表达以产生多个所需的产物。

[0453] 在一第二实施例中,如在所述第一实施例中提供了一种重组植物病毒核酸,除了将所述天然外壳蛋白编码序列置于所述多个非天然外壳蛋白亚基因组启动子之一的附近而不是一非天然外壳蛋白编码序列。

[0454] 在一第三实施例中,提供了一种重组植物病毒核酸,其中所述天然外壳蛋白基因与其亚基因组启动子相邻,且一个或多个非天然亚基因组启动子已经插入所述病毒核酸中。所述多个插入的非天然亚基因组启动子能够在一植物宿主中转录或表达多个相邻基因,且不能彼此重组,也不能与多个天然亚基因组启动子重组。可以将多个非天然核酸序列插入所述多个非天然亚基因组植物病毒启动子附近,使得在所述多个亚基因组启动子的控制下在所述宿主植物中转录或表达所述多个序列以产生多个所需的产物。

[0455] 在一第四实施例中,如在所述第三实施例中提供了一种重组植物病毒核酸,除了将所述天然外壳蛋白编码序列通过一非天然外壳蛋白编码序列替换。

[0456] 所述多个病毒载体通过所述重组植物病毒核酸编码并通过所述多个外壳蛋白包埋以产生一重组植物病毒。所述重组植物病毒核酸或重组植物病毒用于感染多个合适的宿主植物。所述重组植物病毒核酸能够在所述宿主中复制、在所述宿主中系统传播以及在所述宿主中转录或表达(多个)外源基因(分离的核酸),以产生所需的蛋白质。

[0457] 除上述之外,本发明的一些实施例的所述核酸分子也可以引入至一叶绿素基因组中,从而使叶绿素能够表达。

[0458] 将多个外源性核酸序列引入至所述叶绿素的所述基因组的技术是已知的。此技术

包括以下多个步骤。首先,对多个植物细胞进行化学处理,以使每个细胞的叶绿素数量减少至约一个。然后,通过粒子轰击将所述外源性核酸引入至所述多个细胞中,目的是将至少一个外源性核酸分子引入至所述多个叶绿素中。选择所述外源性核酸,使其通过同源重组整合至所述叶绿素的基因组中,所述同源重组容易受所述叶绿素固有的多个酶影响。为此,所述外源性核酸除了包含一感兴趣的基因之外,还包含至少一个源自所述叶绿素的基因组的核酸片段(stretch)。另外,所述外源性核酸包含一可选择的标记,其通过多个顺序选择步骤来确定在此类选择之后所述多个叶绿素基因组的全部或实质上全部的拷贝将包含所述外源性核酸。与此技术有关的更多细节可在美国专利号4,945,050以及5,693,507找到,其通过引用并入本文中。因此,一多肽可以通过所述叶绿素的所述蛋白质表达系统产生并整合至所述叶绿素的内膜中。

[0459] 无论采用何种转化/感染方法,本教示进一步选择包括一基因组编辑事件的多个转化细胞。

[0460] 根据一具体的实施例,进行选择使得仅选择在所述特定基因座中包括一成功准确修饰(例如,交换、插入、缺失、点突变)的多个细胞。因此,不选择包括在一非预期基因座中包含一修饰(例如,一插入、缺失、点突变)的任何事件的多个细胞。

[0461] 根据一个实施例,可以通过检测一分子事件、通过检测一荧光报道子、或通过在选择物(例如,抗生素)存在的情况下生长,在表型水平上进行多个修饰细胞的选择。

[0462] 根据一个实施例,通过分析新编辑的非编码RNA分子的所述生物发生和发生(occurrence)(例如,新miRNA形式的存在、新编辑的siRNA、piRNA、tasiRNA等的存在)来进行多个修饰细胞的选择。

[0463] 根据一个实施例,通过分析所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)针对一第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述沉默活性及/或特异性(通过验证在所述植物或生物体中用于编码所述靶RNA的至少一个表型)来进行多个修饰细胞的选择,所述表型例如为植物叶片着色,例如,叶片和其他器官中叶绿素的部分或全部丧失(漂白)、存在/不存在坏死模式(necrotic pattern)、花色、果实性状(例如,保质期、硬度以及风味)、生长速率、植株尺寸(例如,矮化)、作物产量、生物胁迫耐受性(例如,抗病性、线虫死亡率、甲虫的产卵率或其他与细菌、病毒、真菌、寄生虫、昆虫、杂草以及栽培或本地植物相关的抗性表型)、非生物胁迫耐受性(例如,耐热/抗寒、抗旱、耐盐、耐烯丙醇或耐营养素(例如,磷(P))缺乏)。

[0464] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子的所述沉默特异性是由基因型上确定的,例如,通过一基因表达或缺乏表达。

[0465] 根据一个实施例,所述非编码RNA分子的所述沉默特异性是由表型上确定的。

[0466] 根据一个实施例,所述植物的一表型是在一基因型之前确定的。

[0467] 根据一个实施例,所述植物的一基因型是在一表型之前确定的。

[0468] 根据一个实施例,通过分析所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)针对一第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述沉默活性及/或特异性(通过测量所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的一RNA水平)来进行多个修饰细胞的选择。这可以使用本领域中已知的任何方法进行,例如,通过北方墨点法、核酸酶保护分析、原位杂交或定量RT-PCR。

[0469] 根据一个实施例,通过分析包括所述DNA编辑事件的多个植物细胞或多个克隆来进行多个修饰细胞的选择,所述DNA编辑事件在本文中也称为“突变”或“编辑”,取决于寻求

的编辑类型,例如,插入、缺失、插入-缺失(插入缺失(Indel))、倒位(inversion)、取代及其组合。

[0470] 用于检测序列改变的方法在本领域中是众所周知的,包括但不限于,DNA和RNA测序(例如,次世代定序(next generation sequencing))、电泳、一基于酶的错配检测测定法(enzyme-based mismatch detection assay)以及一杂交测定法,例如,PCR、RT-PCR、RNase保护、原位杂交、引物延伸(primer extension)、南方墨点法、北方墨点法以及斑点印迹(dot blot)分析。也可以使用用于检测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)的各种方法,例如,基于PCR的T7核酸内切酶、异源双链(Hetroduplex)和Sanger测序、或PCR后进行限制酶切(restriction digest)以检测(多个)独特限制位点的出现或消失。

[0471] 验证一DNA编辑事件(例如,插入缺失(Indel))的存在的另一种方法包括一错配剪切测定法,其利用识别和剪切错配DNA的一结构选择酶(例如,内切核酸酶)。

[0472] 根据一个实施例,通过流式细胞术(FACS)选择多个转化的细胞,所述流式细胞术选择表现出荧光(通过所述荧光报道子发射)的多个转化的细胞。在FACS分选后,收集阳性选择的多个转化植物细胞群,其显示所述荧光标记,且可以使用一等分试样(aliquot)来测试如上所述的DNA编辑事件。

[0473] 在使用抗生素选择标记的情况下,转化后,在选择(例如,抗生素)存在下培养多个植物细胞克隆,直到它们发展成多个集落(colony),即多个克隆和多个微愈伤组织(microcalli)。如上所述,然后对所述愈伤组织的一部分细胞针对所述DNA编辑事件进行分析(验证)。

[0474] 因此,根据本发明的一个实施例,所述方法进一步包括在所述多个转化的细胞中验证所述内源性非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)对所述第二靶RNA的互补性。

[0475] 如上所述,在对用于编码所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)的所述基因进行修饰后,所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)对所述第二靶RNA或感兴趣的靶RNA的所述序列具有至少约30%、33%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的互补性。

[0476] 设计的非编码RNA分子与一感兴趣的靶RNA的所述特异性结合可以通过本领域中已知的任何方法来确定,例如,通过计算算法(例如,BLAST),并通过例如包含北方墨点法、原位杂交、QuantiGene Plex测定法等多个方法来验证。

[0477] 应理解的是,对于所述DNA编辑事件,多个阳性克隆可以是纯合的(homozygous)或杂合的(heterozygous)。在一杂合细胞的情况下,所述细胞(例如,当二倍体时)可以包括所述非编码RNA分子(例如,RNA沉默分子)的一修饰基因的一拷贝和一非修饰基因的一拷贝。技术人员将根据预期用途选择所述克隆用于进一步的培养/再生。

[0478] 根据一个实施例,当需要一种瞬时方法时,针对缺少一DNA编辑剂的情况(即丢失用于编码所述DNA编辑剂的多个DNA序列),进一步分析和选择表现出存在所需的DNA编辑事件的多个克隆。例如,这可以通过分析所述DNA编辑剂的表达损失(例如,在所述mRNA、蛋白质上)来进行,例如通过荧光检测GFP或q-PCR、HPLC。

[0479] 根据一个实施例,当需要一种瞬时方法时,可以分析所述多个细胞是否缺少如本文中所述的核酸构建体或其部分,例如,用于编码所述DNA编辑剂的核酸序列。这可以通过

荧光显微镜、q-PCR、FACS或任何其他方法(例如,南方墨点法、PCR、测序、HPLC)来确认。

[0480] 根据一个实施例,如下所述,对所述植物进行杂交,以获得缺乏所述DNA编辑剂(例如,核酸内切酶)的一植物。

[0481] 多个阳性克隆可以被保存(例如,冷冻保存)。

[0482] 或者,多个植物细胞(例如,多个原生质体)可以首先通过生长成一组发育为一愈伤组织的多个植物细胞,然后通过使用多个植物组织培养方法从所述愈伤组织再生多个芽(愈伤组织再生(callogenesis))而再生为多个完整植物。多个原生质体向愈伤组织的生长和多个芽的再生需要所述组织培养基中多个植物生长调节剂的适当平衡,所述培养基必须针对每个植物物种进行定制。

[0483] 使用称为原生质体融合(fusion)的技术,多个原生质体也可以用于植物育种。通过使用一电场或一聚乙二醇溶液诱导来自不同物种的多个原生质体融合。此技术可以用于在组织培养中产生体细胞杂种。

[0484] 原生质体再生的方法是本领域众所周知的。几个因素会影响原生质体分离、培养以及再生,即所述基因型、所述供体组织及其前处理、用于原生质体分离的酶处理、原生质体培养方法、培养物、培养基以及物理环境。关于一全面的评论请参见Maheshwari等人(1986年,原生质体和转化植物细胞的分化(Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells):3至36,施普林格出版社(Springer-Verlag),柏林)。

[0485] 如技术人员认为合适的,可以对多个再生的植物进行进一步的育种(breeding)和选择。

[0486] 因此,本发明的多个实施例进一步涉及多个植物、多个植物细胞以及多个植物的加工产物,其包括能够沉默根据本教示产生的一第二靶RNA的所述非编码RNA分子(例如, RNA沉默分子)。

[0487] 根据本发明的一个方面,提供了一种产生一靶基因表达降低的一植物的方法,所述方法包括:(a)育种根据本发明一些实施例的所述植物;以及(b)选择具有所述感兴趣的靶RNA或所述第二靶RNA表达降低的多个子代植物、或选择在针对一感兴趣的靶RNA的所述非编码RNA分子中包括一沉默特异性的子代,且所述多个子代植物或所述子代不包括所述DNA编辑剂,从而产生具有一靶基因表达降低的所述植物。

[0488] 根据一个实施例,育种包括杂交(crossing)或自交(selfing)。

[0489] 本文中所使用的术语“杂交”是指多个雄性植物(或多个配子(gamete))对多个雌性植物(或多个配子)的受精(fertilization)。术语“配子”是指通过来自一配子体(gametophyte)的有丝分裂(mitosis)在多个植物中产生并参与有性生殖的单倍体(haploid)生殖细胞(卵或精子),在此期间,异性的两个配子融合以形成一二倍体合子(diploid zygote)。所述术语通常包含指一花粉(pollen)(包含所述精子细胞)和一胚珠(ovule)(包含所述卵子)。因此,“杂交”通常是指一个个体的多个胚珠与来自另一个个体的花粉的受精,而“自交”是指一个体的多个胚珠与来自相同个体的花粉的受精。杂交被广泛用于植物育种中,且导致所述两个植物之间的基因组信息混合在一起,所述两个植物杂交来自母亲的一条染色体和来自父亲的一条染色体。这将导致在遗传上多个遗传性状的一新组合。

[0490] 如上所述,可以杂交所述植株以获得不含多个不需要因子的一植株,例如,DNA编

辑剂(例如,核酸内切酶)。

[0491] 根据一个实施例,提供了一种产生具有提升的胁迫耐受性(stress tolerance)、增加的产量、提升的生长速率或提升的产量质量的一植物的方法,所述方法包括:根据本发明一些实施例的所述方法,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对胁迫具有敏感性、减少的产量、降低的生长速率或降低的产量质量的所述植物的一基因,从而产生所述植物。

[0492] 如本文中所使用的短语“胁迫耐受性”是指一植物承受一生物或非生物胁迫的能力,而未经在代谢、生长、生产力及/或生存力上的一实质改变。

[0493] 本文中所使用的短语“非生物胁迫”是指一植物、植物细胞等暴露于对所述植物在代谢、生长、发育、繁殖或存活(统称为“生长(growth)”)上有一不利影响的一非生物(non-living) (“非生物”(abiotic))物理或化学试剂。一非生物胁迫可以施加在一植物上,例如,由于一环境因子,例如水(例如,洪水、干旱或脱水)、多种厌氧情况(例如,一较低水平的氧气或高水平的CO₂)、多种异常渗透情况(例如,渗透胁迫)、盐度、或温度(例如,热(hot)/热(heat)、冷、冷冻或霜)、暴露于多种污染物(例如,重金属毒性)、厌氧生长(anaerobiosis)、营养缺乏(例如,氮缺乏或氮含量有限)、大气污染或紫外线辐射。

[0494] 本文中所使用的短语“生物胁迫”是指植物、植物细胞等暴露于对所述植物在代谢、生长、发育、繁殖或存活(统称为“生长”)上有一不利影响的一生物(living) (“生物”(biotic))生物(organism)。生物胁迫可以由例如细菌、病毒、真菌、寄生虫、有益和有害的昆虫、杂草以及栽培或天然植物引起。

[0495] 如本文中所使用的短语“产量”或“植物产量”是指增加的植物生长(生长速率)、增加的作物生长、增加的生物量及/或增加的植物产物产量(包含谷物、水果、种子等)。

[0496] 根据一个实施例,为了产生具有提升的胁迫耐受性、增加的产量、提升的生长速率或提升的产量质量的一植物,将所述非编码RNA分子设计为靶向一感兴趣的RNA,所述感兴趣的RNA是对胁迫具有敏感性、减少的产量、降低的生长速率或降低的产量质量的所述植物的一基因。

[0497] 根据一个实施例,待靶向的(例如,敲除)的多个示例性易感性植物基因包括但不限于,多个易感性S基因,例如,那些位于称为ML0(霉病基因座0(Mildew Locus 0))的遗传基因座的易感性S基因。

[0498] 根据一个实施例,通过本方法产生的所述多个植物与非通过本方法产生的多个植物相比,提升的胁迫耐受性、增加的产量、提升的产量质量、提升的生长速率至少增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0499] 根据本发明,可以使用本领域中已知的任何用于评估提升的胁迫耐受性的方法。评估提升的胁迫耐受性的多个示例性方法包括但不限于,如Yoon, S.K.、Bae, E.K.、Lee, H.等人所述,在杨树(poplar)中PagSAP1对于增加的盐胁迫耐受性的下调(Trees, 2018年, 32: 823; [www.doi\(dot\)org/10.1007/s00468-018-1675-2](https://www.doi.org/10.1007/s00468-018-1675-2)),以及在西红柿中通过下调SlbZIP38增强了耐旱性(Pan Y等人, Genes, 2017年, 8, 402; doi:0.3390/genes8120402, 通过引用并入本文中)。

[0500] 根据本发明,可以使用本领域中已知的任何用于评估增加的产量的方法。评估增

加的产量的多个示例性方法包含但不限于,如Ar-Rafi Md.Faisal等人所述,水稻中DST表达降低(AJPS,第8卷第9号,2017年8月,DOI:10.4236/ajps.2017.89149);以及如Wang Y等人所述,油菜籽(canola)中BnFTA的下调导致增加的产量(Mol Plant.,2009年1月;2(1):191至200;doi:10.1093/mp/ssn088),两者均以引用方式并入本文中。

[0501] 根据本发明,可以使用本领域中已知的任何用于评估提升的生长速率的方法。评估提升的生长速率的多个示例性方法包含但不限于,如Marcelo de Freitas Lima等人所述,拟南芥(Arabidopsis)中BIG BROTHER或GA2-氧化酶的表达降低导致生长和生物量增加(Biotechnology Research and Innovation,2017年,1,14至25),以引用方式并入本文中。

[0502] 根据本发明,可以使用本领域中已知的任何用于评估提升的产量质量的方法。评估提升的产量质量的多个示例性方法包含但不限于,如Yeh S_Y等人所述,水稻中OsCKX2的下调导致分蘖(tiller)更多、谷粒更多、谷粒更重(Rice,纽约,2015年;8:36);以及如Verma SR和Dwivedi UN所述,降低许多植物中的OMT水平,从而改变木质素的积累,增加工业用材料的消化率(South African Journal of Botany,第91卷,2014年3月,第107至125页),两者均以引用方式并入本文中。

[0503] 根据一个实施例,所述方法进一步使得能够产生包括增加的甜度、增加的糖含量、增加的风味、改善的成熟控制、增加的水分胁迫耐受性、增加的热胁迫耐受性以及增加的耐盐性的一植物。本领域技术人员将知道如何利用本文中所述的方法来选择多个靶RNA序列进行修饰。

[0504] 根据一个实施例,提供了一种产生一耐病原体或抗病原体植物的方法,所述方法包括:根据本发明一些实施例的所述方法,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对所述病原体具有敏感性的所述植物的一基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

[0505] 根据一个实施例,提供了一种产生一耐病原体或抗病原体植物的方法,所述方法包括:根据本发明一些实施例的所述方法,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是所述病原体的一基因,从而产生所述耐病原体或抗病原体植物。

[0506] 根据一个实施例,提供了一种产生一耐害虫或抗害虫植物的方法,所述方法包括:根据本发明一些实施例的所述方法,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是所述害虫的一基因,从而产生所述耐害虫或抗害虫植物。

[0507] 如本文中所使用的术语“病原体”是指通过定植(colonizing)、破坏、攻击或感染多个植物而对所述多个植物产生负面影响的一生物。因此,病原体可以影响一植物的生长、发育、繁殖、收获或产量。这包含传播疾病及/或破坏所述宿主及/或竞争宿主营养的多个生物。多种植物病原体包含但不限于,真菌、卵菌(oomycete)、细菌、病毒、类病毒(viroid)、类病毒生物(virus-like organism)、植原体(phytoplasma)、原生动物(protozoa)、线虫、昆虫以及寄生植物。

[0508] 病原体的多个非限制性实例包含但不限于,圆头蛀虫(Roundheaded Borer)(例如,长角蛀虫(long horned borer));木虱(psyllid)(例如,红胶齿状木虱(red gum lerp psyllid)(Glycaspis brimblecombei)、蓝胶木虱、斑点胶齿状木虱(spotted gum lerp

psyllid)、柠檬胶齿状木虱(lemon gum lep psyllid);龟甲虫(tortoise beetle);鼻甲虫(snout beetle);叶甲虫(leaf beetle);蜜环菌(honey fungus);青铜虫(Thaumastocoris peregrinus);无柄五倍子蜂(sessile gall wasps)(瘿蜂科(Cynipidae))(例如,桉树枝瘿姬小蜂(Leptocybe invasa)、桉树胆黄蜂(Ophelimus maskelli)以及长脉啮小蜂(Selitrichodes globules));食草毛虫(Foliage-feeding caterpillar)(例如,杂食尺蠖(Omnivorous looper)和甜橙卷叶蛾(Orange tortrix);玻璃翅叶蝉(Glassy-winged sharpshooter);以及粉虱(Whitefly)(例如,巨型粉虱(Giant whitefly)。病原体的其他非限制性实例包含蚜虫(Aphid)(例如,柳黑毛蚜属(Chaitophorus spp.)、云翅三角叶杨(Cloudywinged cottonwood)以及态毛蚜属(Periphyllus spp.));盾蚧(Armored scale)(例如,榆蚧盾蚧(Oystershell scale)和梨圆介壳虫(San Jose scale));洋槐木蠹蛾(Carpenterworm);透翅蛾虫(Clearwing moth borer)(例如,美国大黄蜂蛾(American hornet moth)和西杨透翅蛾(Western poplar clearwing));扁头穿孔虫(Flatheaded borer)(例如,青铜桦木螟(Bronze birch borer)和青杨蛀虫(Bronze poplar borer));食草毛虫(Foliage-feeding caterpillar)(例如,美国白蛾(Fall webworm)、果树卷蛾(Fruit-tree leafroller)、红疣天社蛾(Redhumped caterpillar)、缎蛾毛虫(Satin moth caterpillar)、刺榆毛虫(Spiny elm caterpillar)、黄褐天幕毛虫(Tent caterpillar)、毒蛾科(Tussock moths)以及西部虎凤蝶(Western tiger swallowtail));叶矿虫(Foliage miner)(例如,杨树盾蚧(Poplar shield bearer));瘿螨(Gall)和泡蟬(blister mites)(例如,三角叶杨瘿螨(Cottonwood gall mite));瘿螨蚜虫(Gall aphid)(例如,白杨叶蚜(Poplar petiolegall aphid));琉璃叶蝉(Glassy-winged sharpshooter);叶甲虫(Leaf beetle)和叶甲科甲虫(flea beetle);水蜡虫(Mealybug);杨树和柳螟;圆头蛀虫;叶蜂(sawfly);软蚧(Soft scale)(例如,黑皮蚧(Black scale)、褐软蚧(Brown soft scale)、葡萄绵蚧(Cottony maple scale)以及欧洲果介壳虫(European fruit lecanium));角蝉(Treehoppers)(例如,牛形沫蝉(buffalo treehopper));以及椿象(True bug)(例如,网蝽(Lace bug)和草盲蝽(Lygus bug))。

[0509] 病毒植物病原体的其他非限制性实例包括但不限于,物种:豌豆早褐病毒(Pea early-browning virus,PEBV),属:烟草脆裂病毒属(Tobravirus.Species);物种:辣椒斑纹病毒(Pepper ringspot viurs,PepRSV),属:烟草脆裂病毒属;物种:西瓜花叶病毒(Watermelon mosaic virus,WMV),属:马铃薯Y病毒属(Potyvirus)和其他来自马铃薯Y病毒属的病毒;物种:烟草花叶病病毒(Tobacco mosaic virus,TMV)属,烟草花叶病毒属(Tobamovirus)和其他来自烟草花叶病毒属的病毒;物种:马铃薯X病毒(Potato virus X,PVX)属、马铃薯X病毒属其他来自马铃薯X病毒属的病毒。因此,本教示设想靶向RNA以及DNA病毒(例如,双子病毒(Gemini virus或Bigeminivirus))。可能靶向的双子病毒科病毒包括但不限于,苜蓿属花叶病双子病毒(Abutilon mosaic bigeminivirus)、藜香黄脉双子病毒(Ageratum yellow vein bigeminivirus)、菜豆花斑花叶病双子病毒(Bean calico mosaic bigeminivirus)、菜豆金黄花叶病双子病毒(Bean golden mosaic bigeminivirus)、黄秋葵黄脉花叶病双子病毒(Bhendi yellow vein mosaic bigeminivirus)、非洲木薯花叶病双子病毒(Cassava African mosaic bigeminivirus)、印度木薯花叶病双子病毒(Cassava Indian mosaic bigeminivirus)、奇诺的西红柿双子

病毒(Chino del tomatébigeminivirus)、棉花皱叶双子病毒(Cotton leaf crumple bigeminivirus)、棉花卷叶双子病毒(Cotton leaf curl bigeminivirus)、巴豆黄脉花叶病双子病毒(Croton yellow vein mosaic bigeminivirus)、扁豆黄花叶病双子病毒(Dolichos yellow mosaic bigeminivirus)、大戟花叶病双子病毒(Euphorbia mosaic bigeminivirus)、马豆黄花叶病双子病毒(Horsegram yellow mosaic bigeminivirus)、麻风树花叶病双子病毒(Jatropha mosaic bigeminivirus)、利马豆黄金花叶病双子病毒(Lima bean golden mosaic bigeminivirus)、甜瓜卷叶双子病毒(Melon leaf curl bigeminivirus)、绿豆黄花叶病双子病毒(Mung bean yellow mosaic bigeminivirus)、秋葵卷叶双子病毒(Okra leaf-curl bigeminivirus)、瓦斯特科辣椒双子病毒(Pepper hausteco bigeminivirus)、德州辣椒双子病毒(Pepper Texas bigeminivirus)、马铃薯黄花叶病双子病毒(Potato yellow mosaic bigeminivirus)、鹿藿花叶病双子病毒(Rhynchosia mosaic bigeminivirus)、墨西哥泽拉诺辣椒黄金花叶病双子病毒(Serrano golden mosaic bigeminivirus)、南瓜卷叶双子病毒(Squash leaf curl bigeminivirus)、烟草卷叶双子病毒(Tobacco leaf curl bigeminivirus)、澳洲西红柿卷叶双子病毒(Tomato Australian leafcurl bigeminivirus)、西红柿黄金花叶病双子病毒(Tomato golden mosaic bigeminivirus)、印度西红柿双子病毒(Tomato Indian leafcurl bigeminivirus)、西红柿皱叶双子病毒(Tomato leaf crumple bigeminivirus)、西红柿斑点双子病毒(Tomato mottle bigeminivirus)、西红柿黄卷叶双子病毒(Tomato yellow leaf curl bigeminivirus)、西红柿黄花叶病双子病毒(Tomato yellow mosaic bigeminivirus)、西瓜褪绿矮化双子病毒(Watermelon chlorotic stunt bigeminivirus)以及西瓜卷曲斑点双子病毒(Watermelon curly mottle bigeminivirus)。

[0510] 如本文中所使用,术语“害虫”是指直接或间接伤害所述植物的生物。一直接作用包含例如,以所述植物叶片为食。间接作用包含例如,一疾病因子(例如,一病毒、细菌等)向所述植物的传播。在后一种情况下,所述害虫是一病原体传播的载体。示例性的害虫包含但不限于,甲虫、木虱、昆虫、线虫(nematode)、蜗牛。

[0511] 根据一个实施例,所述病原体是一线虫。示例性线虫包含但不限于,穴居线虫(burrowing nematode)(穿孔线虫(Radopholus similis))、秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)、阿拉伯咖啡穿孔线虫(Radopholus arabocoffeae)、咖啡根腐线虫(Pratylenchus coffeae)、根结线虫(root-knot nematode)(根结线虫属(Meloidogyne spp.))、孢囊线虫(cyst nematode)(异皮线虫属(Heterodera spp.)和球异皮线虫属(Globodera spp.))、根腐线虫(root lesion nematode)(根腐线虫属(Pratylenchus spp.))、甘薯茎线虫(stem nematode)(茎线虫(Ditylenchus dipsaci))、松树萎蔫线虫(pine wilt nematode)(松材线虫(Bursaphelenchus xylophilus))、肾形线虫(reniform nematode)(肾形线虫(Rotylenchulus reniformis))、匕首线虫(Xiphinema index)、假根瘤线虫(Nacobbus aberrans)以及叶芽线虫(Aphelenchoides besseyi)。

[0512] 根据一个实施例,所述病原体是一种真菌。示例性真菌包含但不限于,尖孢镰刀菌(Fusarium oxysporum)、油菜茎基溃疡病菌(Leptosphaeria maculans)(和春油菜黑胥病(Phoma lingam))、油菜菌核病菌(Sclerotinia sclerotiorum)、水稻稻瘟病菌

(*Pyricularia grisea*)、藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)念珠镰孢(*Fusarium moniliforme*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)、柄锈双单孢菌属(*Puccinia* spp.)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、禾本科布氏白粉菌(*Blumeria graminis*)、禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)、亚麻栅锈菌(*Melampsora lini*)、豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*)以及立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)。

[0513] 根据一个实施例,为了产生对一病原体具有抗性或耐受性的植物,所述非编码RNA分子设计成靶向一感兴趣的RNA,所述感兴趣的RNA是赋予一病原体具有敏感性的一植物基因。

[0514] 根据一个实施例,一待靶向的示例性植物基因包含但不限于,赋予对黄瓜中病毒感染具有敏感性的所述基因eIF4E。

[0515] 根据一个实施例,为了产生对一病原体具有抗性或耐受性的植物,所述非编码RNA分子设计成靶向一感兴趣的RNA,所述感兴趣的RNA是所述病原体的一基因。

[0516] 可以使用本领域中已知的任何方法(例如,通过常规生物信息学分析)来确定所述多个植物或病原体靶基因。

[0517] 根据一个实施例,所述线虫病原体基因包括所述穿孔线虫(*Radopholus similis*)基因钙网硬蛋白(*Calreticulin13, CRT*)或胶原蛋白5(*col-5*)。

[0518] 根据一个实施例,所述真菌病原体基因包括所述尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)基因FOW2、FRP1以及OPR。

[0519] 根据一个实施例,所述病原体基因包含例如,液泡ATP酶(*vacuolar ATPase, vATPase*)、dvssj1和dvssj2、 α -微管蛋白和snf7。

[0520] 根据一具体的实施例,当所述植物是一甘蓝型油菜(*Brassica napus*) (油菜(rapeseed))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,油菜茎基溃疡病菌(*Leptosphaeria maculans*) (和春油菜黑胥病(*Phoma lingam*)) (例如,引起和春油菜茎溃疡) (例如,如GenBank登录号:AM933613.1中所述)的一基因;叶甲科甲虫(*Flea beetle*) (黄狭条跳甲(*Phyllotreta vittula*)或叶甲科(*Chrysomelidae*),例如,如GenBank登录号:KT959245.1中所述)的一基因;或油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) (例如,引起核盘菌茎腐病) (例如,如GenBank登录号:NW_001820833.1中所述)的一基因。

[0521] 根据一具体的实施例,当所述植物是一柑橘类果实(*Citrus*)x茶树(*sinensis*) (桔树,Orange)时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,柑橘溃疡病(*Citrus Canker, CCK*) (例如,如GenBank登录号:AE008925中所述)的一基因;黄龙病菌属(*Candidatus Liberibacter* spp.) (例如,引起柑橘绿化病(*Citrus greening disease*)) (例如,如GenBank登录号:CP001677.5中所述)的一基因;或蜜环菌根腐病(*Armillaria root rot*) (例如,如GenBank登录号:KY389267.1中所述)的一基因。

[0522] 根据一具体的实施例,当所述植物是一非洲油棕(*Elaeis guineensis*) (油棕(*Oil palm*))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,灵芝属(*Ganoderma* spp.) (例如,引起基腐病(*Basal stem rot, BSR*),也称为灵芝茎腐病(*Ganoderma butt rot*) (例如,如GenBank登录号:U56128.1中所述)的一基因;荨麻毛虫(*Nettle Caterpillar*)的一基因、或镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、致病疫霉属(*Phytophthora infestans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia*

solani) (例如,引起根腐病)中任何一种的一基因。

[0523] 根据一具体的实施例,当所述植物是一林地草莓(*Fragaria vesca*) (野草莓(Wild strawberry))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,黄萎病菌(*Verticillium dahlia*) (例如,引起黄萎病(*Verticillium Wilt*)) (例如,如GenBank登录号:DS572713.1中所述)的一基因;草莓属尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.fragariae) (例如,引起枯萎病(*Fusarium wilt*)) (例如,如GenBank登录号:KR855868.1中所述)的一基因。

[0524] 根据一具体的实施例,当所述植物是一大豆属(*Glycine max*) (大豆(Soybean))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,P.豆薯苜(*P.pachyrhizi*) (例如,引起大豆锈病(Soybean rust),也称为亚洲锈病(Asian rust)) (例如,如GenBank登录号:DQ026061.1中所述)的一基因;大豆蚜虫(Soybean Aphid) (例如,如GenBank登录号:KJ451424.1中所述)的一基因;大豆矮缩病毒(Soybean Dwarf Virus,SbDV) (例如,如GenBank登录号:NC_003056.1中所述)的一基因;或绿色臭虫(Green Stink Bug) (绿椿(*Acrosternum hilare*)) (例如,如GenBank登录号:NW_020110722.1中所述)的一基因。

[0525] 根据一具体的实施例,当所述植物是一雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*) (棉花)时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum) (例如,引起枯萎病(*Fusarium wilt*)) (例如,如GenBank登录号:JN416614.1中所述)的一基因;大豆蚜虫(Soybean Aphid) (例如,如GenBank登录号:KJ451424.1中所述)的一基因;或粉红棉铃虫(Pink bollworm) (棉红铃虫(*Pectinophora gossypiella*)) (例如,如GenBank登录号:KU550964.1中所述)的一基因。

[0526] 根据一具体的实施例,当所述植物是一水稻(*Oryza sativa*) (水稻(Rice))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*) (例如,引起稻瘟病(Rice Blast)) (例如,如GenBank登录号:AF027979.1中所述)的一基因;藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*) (念珠镰孢(*Fusarium moniliforme*)) (例如,引起水稻徒长病(Bakanae Disease)) (例如,如GenBank登录号:AY862192.1中所述)的一基因;或三化螟虫(Stem borer):例如,沃克三化螟虫(*Scirpophaga incertulas* Walker-黄色三化螟虫(Yellow Stem Borer)、沃克三化螟虫(*S.innota* Walker)-白色三化螟虫、沃克二化螟虫(*Chilo suppressalis* Walker)-二化螟虫(Striped Stem Borer)、沃克大螟虫(*Sesamia inferens* Walker)-粉色三化螟虫(Pink Stem Borer) (例如,如GenBank登录号:KF290773.1中所述)的一基因。

[0527] 根据一具体的实施例,当所述植物是一番茄(*Solanum lycopersicum*) (西红柿(Tomato))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,致病疫霉(*Phytophthora infestans*) (例如,引起晚疫病(Late blight)) (例如,如GenBank登录号:AY855210.1中所述)的一基因;粉虱(whitefly)烟草粉虱(*Bemisia tabaci*) (例如,烟草粉虱(*Gennadius*),例如,如GenBank登录号:KX390870.1中所述)的一基因;或西红柿黄曲叶双生病毒群(Tomato yellow leaf curl geminivirus,TYLCV) (例如,如GenBank登录号:LN846610.1中所述)的一基因。

[0528] 根据一具体的实施例,当所述植物是一马铃薯(*Solanum tuberosum*) (土豆(Potato))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,致病疫霉(*Phytophthora infestans*) (例如,引起晚疫病(Late Blight)) (例如,如GenBank登录号:AY050538.3中所述)的一基因;软腐病菌(*Erwinia* spp.) (例如,引起黑腿病(Blackleg)和软腐病(Soft Rot)) (例如,如

GenBank登录号CP001654.1中所述)的一基因;或胞囊线虫(Cyst Nematodes)(例如,马铃薯胞囊线虫(*Globodera Pallida*)和马铃薯金线虫(*G.rostochiensis*))(例如,如GenBank登录号KF963519.1中所述)的一基因。

[0529] 根据一具体的实施例,当所述植物是一可可树(*Theobroma cacao*)(可可豆(*Cacao*))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,担子菌(basidiomycete,*Moniliophthora roreri*)(例如,引起黑斑病(*Frosty Pod Rot*))(例如,如GenBank登录号LATX01001521.1中所述)的一基因;可可丛枝病菌(*Moniliophthora pernicioso*)(例如,引起簇叶病(*Witches' Broom disease*))的一基因;或盲蝽类的一基因,例如,狄氏盲蝽(*Distantiella theobroma*)和可可褐盲椿(*Sahlbergella singularis*)、刺盲蝽属(*Helopeltis spp.*)、盲蝽属(*Monalonion specie*)。

[0530] 根据一具体的实施例,当所述植物是一酿酒葡萄(*Vitis vinifera*)(葡萄(*Grape*)或葡萄藤(*Grapevine*))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,丝状病毒属(closterovirus)GVA(例如,引起粗皮综合症(*Rugose wood disease*))(例如,如GenBank登录号AF007415.2中所述)的一基因;葡萄卷叶病毒(*Grapevine leafroll virus*)(例如,如GenBank登录号FJ436234.1中所述)的一基因;葡萄叶片变性疾病病毒(*Grapevine fanleaf degeneration disease virus*,GFLV)(例如,如GenBank登录号NC_003203.1中所述)的一基因;或葡萄斑点病(*Grapevine fleck disease*,GFkV)(例如,如GenBank登录号NC_003347.1中所述)的一基因。

[0531] 根据一具体的实施例,当所述植物是一玉米(*Zea mays*)(玉米(*Maize*),也称为玉米(*corn*))时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,秋季粘虫(*Fall Armyworm*)(例如,秋行军虫(*Spodoptera frugiperda*))(例如,如GenBank登录号AJ488181.3中所述)的一基因;欧洲玉米螟虫(*European corn borer*)(例如,如GenBank登录号GU329524.1中所述)的一基因;或北部和西部玉米根虫(*Northern and western corn rootworms*)(例如,如GenBank登录号NM_001039403.1中所述)的一基因。

[0532] 根据一具体的实施例,当所述植物是一甘蔗时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,蔗条螟(*Internode Borer*)(例如,甘蔗节间螟(*Chilo Saccharifagus Indicus*))的一基因、条黄单胞杆菌(*Xanthomonas Albileneans*)(例如,引起白条病(*Leaf Scald*))的一基因、或甘蔗黄叶病毒(*Sugarcane Yellow Leaf Virus*,SCYLV)的一基因。

[0533] 根据一具体的实施例,当所述植物是一小麦时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,小麦条锈病菌(*Puccinia striiformis*)(例如,引起条锈病(*stripe rust*))的一基因、或蚜虫(*Aphid*)的一基因。

[0534] 根据一具体的实施例,当所述植物是一大麦时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,大麦柄锈菌(*Puccinia hordei*)(例如,引起叶锈病(*Leaf rust*))的一基因、大麦专化型(*Puccinia striiformis f.sp.Hordei*)(例如,引起条锈病(*stripe rust*))的一基因、或蚜虫(*Aphid*)的一基因。

[0535] 根据一具体的实施例,当所述植物是一向日葵(*sunflower*)时,所述感兴趣的靶RNA包含但不限于,向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthi*)(例如,引起锈病(*Rust disease*))的一基因;对向日葵黑茎病菌(*Boerema macdonaldii*)(例如,引起茎点霉黑茎病(*Phoma black stem*))的一基因;豆象(*Seed weevil*)(例如,红色和灰色)的一基因,例如,红色种子

象 (*Smicronyx fulvus*) (红色)、灰色种子象 (*Smicronyx sordidus*) (灰色); 或油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) (例如, 引起菌核病茎和头腐病 (*Sclerotinia stalk and head rot disease*)) 的一基因。

[0536] 根据一具体的实施例, 当所述植物是一橡胶植物 (*rubber plant*) 时, 所述感兴趣的靶RNA包含但不限于, 南美叶疫病菌 (*Microcyclus ulei*) (例如, 引起南美叶枯病 (*South American leaf blight, SALB*)) 的一基因; 小孔硬孔菌 (*Rigidoporus microporus*) (例如, 引起白根病 (*White root disease*)) 的一基因; 橡胶树红根病菌 (*Ganoderma pseudoferreum*) (例如, 引起红根病 (*Red root disease*)) 的一基因。

[0537] 根据一具体的实施例, 当所述植物是一苹果植物 (*apple plant*), 所述感兴趣的靶RNA包含但不限于, 新蜜环菌 (*Neonectria ditissima*) (例如, 引起苹果腐烂病 (*Apple Canker*)) 的一基因; 苹果白粉菌 (*Podosphaera leucotricha*) (例如, 引起苹果白粉病 (*Apple Powdery Mildew*)) 的一基因; 或苹果黑星菌 (*Venturia inaequalis*) (例如, 引起苹果黑星病 (*Apple Scab*)) 的一基因。

[0538] 下文表1B中提供了可以被修饰以靶向所述感兴趣的RNA (例如, 一病原体的一基因) 的多个示例性内源性非编码RNA分子、可以用于修饰所述多个内源性非编码RNA分子的多个示例性的gRNA序列 (即, 一DNA编辑剂) 以及用于将所述内源性非编码RNA分子的一沉默特异性重定向至所述感兴趣的靶RNA的多个示例性核苷酸序列。

[0539]

表 1B: 在各种宿主中产生不同性状的多个 GEiGS 寡核苷酸设计的多个实例

宿主、性状以及 miRNA 模板	寡核苷酸信息	寡核苷酸序列	序列与 wt 的差异	Sg 序列	pam 差异	sgRNA 链
宿主 (粗体); 病原菌/害虫/疾病 (斜体)		GEiGS 寡核苷酸序列, 由所述前体序列与其相应的成熟的所需分子 (通过一 siRNA 靶取代) 组成 - SEQ ID NO:	野生型前体和所述 GEiGS 寡核苷酸变化数量	CRISPR/cas9 小引导 RNA 靶向用于交换所述前体序列的序列 - SEQ ID NO:	属于所述 sgRNA 的所述 PAM 区域和所述 GEiGS 序列之间的核苷酸化数量	
甘蓝型油菜 (油菜籽) <i>AM933613.1/茎点霉属溃疡病 (Phoma stem canker) (由油菜茎基溃疡病菌 (leptosphaeria maculans) 或甘蓝茎点霉 (phoma lingam) 引起 - 真菌病原菌)</i>						
bna-MIR169e	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	103	132	235	3	rv
bna-MIR156d	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	104	25	236	1	fw
bna-MIR169e	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	105	128	237	3	rv

[0540]

baa-MIR169e	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	106	131	238	3	rv
KT959245.1/叶甲科甲虫 (Flea beetle) (黄曲条菜 (Phyllotreta vittula 或叶甲科 (Chrysomelidae)))						
baa-MIR169e	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	107	138	239	3	rv
baa-MIR156d	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	108	29	240	1	fw
baa-MIR156b	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	109	76	241	1	fw
baa-MIR169e	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	110	133	242	3	rv
NW_001820833.1/核盘菌茎腐病 (Sclerotinia stem rot) (由真菌病原菌核盘菌 (Sclerotinia sclerotiorum) 引起)						
baa-MIR169e	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	111	130	243	3	rv

[0541]

bn-MIR390b	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	112	23	244	3	fw
bn-MIR156b	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	113	68	245	1	fw
bn-MIR169e	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	114	135	246	3	rv
柑橘类果实 (Citrus) x 茶树 (sinensis) (桔树, Orange)						
AE008925/ 柑橘溃疡病 (Citrus Canker, CCK)						
csi-MIR167c	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	115	173	247	3	fw
csi-MIR156a	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	116	24	248	3	rv
csi-MIR167c	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	117	150	249	3	fw
csi-MIR167c	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	118	173	250	2	fw

[0543]

csi-MIR167c	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	126	182	258	3	fv
非洲油棕 (Elaeis guineensis) (油棕 (Oil palm))						
U56128.1/ 基腐病 (Basal stem rot, BSR) 也称为灵芝茎腐病 (Ganoderma butt rot) (灵芝属 (Ganoderma spp.))						
egu-MIR172c	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	127	89	259	1	rv
egu-MIR172c	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	128	53	260	1	rv
egu-MIR172c	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	129	74	261	1	rv
egu-MIR172c	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	130	94	262	1	rv
林地草莓 (Fragaria vesca) (野草莓 (Wild strawberry))						
DS572713.1/ 黄萎病 (Verticillium Wilt) (黄萎病菌 (Verticillium))						

[0544]

<i>dahlia</i>))									
fve-MIR159c	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	131	100	263	3			fw	
fve-MIR160b	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	132	22	264	3			rv	
fve-MIR166a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	133	56	265	3			fw	
fve-MIR164b	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	134	95	266	3			fw	
KR855868.1/ 枯萎病 (<i>Fusarium wilt</i>) (草薺属尖孢镰刀菌 (<i>Fusarium oxysporum f.sp. fragariae</i>))									
fve-MIR159c	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	135	97	267	3			fw	
fve-MIR167b	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	136	17	268	1			rv	
fve-MIR169a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	137	69	269	3			rv	

[0545]

fve-MIR164b	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	138	94	270	3	fw
大豆属(<i>Glycine max</i>)(大豆 (Soybean))						
DQ026061.1/由 <i>P. 豆薯苜</i> (<i>P. pachyrhizi</i>) 引起的大豆锈病(<i>Soybean rust</i>)(也称为亚洲锈病 (Asian rust))						
gma-MIR167c	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	139	166	271	3	rv
gma-MIR1511	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	140	23	272	3	fw
gma-MIR167c	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	141	141	273	3	rv
gma-MIR167c	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	142	163	274	3	rv
KJ451424.1/ 大豆蚜虫 (<i>Soybean Aphid</i>)						
gma-MIR167c	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	143	163	275	3	rv

[0546]

gma-MIR168a	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	144	23	276	0	rv
gma-MIR167c	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	145	132	277	3	rv
gma-MIR167c	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	146	161	278	3	rv
NC_003056.1/大豆矮缩病毒 (Soybean Dwarf Virus, ShDV)						
gma-MIR167c	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	147	165	279	3	rv
gma-MIR1516a	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	148	23	280	1	fw
gma-MIR167c	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	149	135	281	3	rv
gma-MIR167c	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	150	163	282	3	rv
NW_020110722.1/绿色臭虫 (Green Stink Bug) (绿椿 (Acrosternum hilare))						

[0547]

gma-MIR167c	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	151	158	283	3	rv
gma-MIR162a	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	152	22	284	1	rv
gma-MIR167c	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	153	135	285	3	rv
gma-MIR167c	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	154	164	286	3	rv
雷蒙德氏棉 (Gossypium raimondii) (棉花)						
JN416614.1/ 枯萎病 (Fusarium wilt) (棉花枯萎病菌 (Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum))						
gra-MIR8637	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	155	154	287	3	rv
gra-MIR7486e	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	156	21	288	3	fw
gra-MIR8633	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	157	58	289	3	fw

[0548]

gra-MIR8635	最大变化/完全结构 / 非 特 异 性 siRNA	158	149	290	3	fw
KJ451424.1/ 大 豆 蚜 虫 (<i>Soybean Aphid</i>)						
gra-MIR8637	最大变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	159	153	291	3	rv
gra-MIR157a	最小变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	160	16	292	1	fw
gra-MIR8636	最大变化/改变结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	161	62	293	3	fw
gra-MIR8637	最大变化/完全结构 / 非 特 异 性 siRNA	162	149	294	3	rv
KU550964.1/ 粉红棉铃虫 (<i>Pink bollworm</i>) (棉红 铃 虫 (<i>Pectinophora</i> <i>gossypiella</i>))						
gra-MIR8637	最大变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	163	155	295	3	rv
gra-MIR157a	最小变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	164	21	296	1	fw

[0549]

gra-MIR8644	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	165	53	297	3	rv
gra-MIR8635	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	166	154	298	3	fw
水稻 (<i>Oryza sativa</i>) (水稻 (Rice)) AF027979.1/稻瘟病 (Rice Blast) (由稻瘟病菌 (<i>Pyricularia grisea</i>) 引起的真菌病)						
osa-MIR166b	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	167	105	299	1	fw
osa-MIR156e	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	168	21	300	0	fw
osa-MIR160b	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	169	59	301	3	rv
osa-MIR166b	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	170	100	302	3	fw
AY862192.1/水稻徒长病 (Bakanae Disease) (由念珠镰孢 (<i>Fusarium moniliforme</i>) 和藤仓赤霉菌 (<i>Gibberella fujikuroi</i>))						

[0551]

<i>inferens Walker</i>) - 粉色 三化螟虫 (<i>Pink Stem Borer</i>)									
osa-MIR166b	最大变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	175	100	307	1	fw			
osa-MIR156j	最小变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	176	21	308	3	rv			
osa-MIR160b	最大变化/改变结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	177	57	309	3	rv			
osa-MIR166b	最大变化/完全结 构 / 非 特 异 性 siRNA	178	103	310	3	fw			
番 茄 (<i>Solanum lycopersicum</i>) (西红柿 (Tomato))									
<i>AY855210.1</i> /晚疫病 (Late blight) (致 病 疫 霉 (<i>Phytophthora infestans</i>))									
sly-MIR319b	最大变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	179	143	311	3	fw			
sly-MIR156b	最小变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	180	24	312	0	fw			

[0552]

sly-MIR395a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	181	75	313	3	fw
sly-MIR319b	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	182	145	314	3	fw
KX390870.1/ 粉虱 (whitefly) 烟草粉虱 (Bemisia tabaci) (烟草 粉虱 (Gennadius))						
sly-MIR319b	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	183	144	315	3	fw
sly-MIR391	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	184	16	316	3	fw
sly-MIR319c	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	185	79	317	1	rv
sly-MIR319b	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	186	138	318	3	fw
LN846610.1/ 西红柿黄曲 叶双生病毒群 (Tomato yellow leaf curl geminivirus, TYLCV)						
sly-MIR319b	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	187	141	319	3	fw

[0553]

sly-MIR156b	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	188	24	320	0	fw
sly-MIR395a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	189	81	321	3	fw
sly-MIR319b	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	190	143	322	3	fw
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>) (土豆 (Potato)) AY050538.3/晚疫病 (Late Blight) (致病疫霉 (<i>Phytophthora infestans</i>))						
	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	191	110	323	1	fw
	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	192	19	324	1	rv
stu-MIR482d	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	193	50	325	3	rv
stu-MIR6022	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	194	106	326	1	fw

[illegible]

[0555]

stu-MIR6022	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	202	107	334	1	fw
可可树 (Theobroma cacao)(可可豆(Cacao))						
LATX01001521.1/ 由担子菌 (basidiomycete , Moniliophthora roreri) 引起的黑斑病 (Frosty Pod Rot)						
tcc-MIR169b	最大变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	203	100	335	3	fw
tcc-MIR167a	最小变化/完全结构 / 性状特异性 siRNA	204	25	336	3	rv
tcc-MIR167b	最大变化/改变结构 / 性状特异性 siRNA	205	52	337	1	fw
tcc-MIR169b	最大变化/完全结构 / 非特异性 siRNA	206	104	338	3	fw
酿酒葡萄 (Vitis vinifera)(葡萄 (Grape))						
AF007415.2/ 粗皮综合症 (Rugose wood disease) (丝状病毒属 (closterovirus) GVA)						

[0556]

vvi-MIR167a	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	207	154	339	3	fw
vvi-MIR164b	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	208	22	340	3	fw
vvi-MIR167a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	209	108	341	3	fw
vvi-MIR167a	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	210	153	342	2	fw
FJ436234.1/ 葡萄卷叶病毒 (Grapevine leafroll virus)						
vvi-MIR167a	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	211	152	343	2	fw
vvi-MIR167c	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	212	20	344	3	rv
vvi-MIR167a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	213	118	345	2	fw
vvi-MIR167a	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	214	152	346	3	fw

[0557]

NC_003203.1/ 葡萄叶片 变性疾病病毒 (Grapevine fanleaf degeneration disease virus, GFLV) - 线虫传多面体病毒属 (nepovirus)	最大变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	215	158	347	2		fw
vvi-MIR167a	最小变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	216	19	348	3		fw
vvi-MIR166h	最大变化/改变结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	217	118	349	2		fw
vvi-MIR167a	最大变化/完全结 构 / 非 特 异 性 siRNA	218	156	350	3		fw
NC_003347.1/葡萄斑点病 (Grapevine fleck disease, GFkV)							
vvi-MIR167a	最大变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	219	161	351	2		fw
vvi-MIR166b	最小变化/完全结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	220	19	352	3		fw
vvi-MIR167a	最大变化/改变结 构 / 性 状 特 异 性 siRNA	221	127	353	2		fw

[0558]

vvi-MIR167a	最大变化/完全结构 / 非 特 异 性 siRNA	222	157	354	2	fw
玉米 (Zea mays) (玉米 (Maize))						
AJ488181.3/ 秋 季 粘 虫 (Fall Armyworm) (秋行军 虫 (Spodoptera frugiperda))						
zma-MIR166a	最大变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	223	100	355	0	fw
zma-MIR160c	最小变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	224	20	356	2	fw
zma-MIR156f	最大变化/改变结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	225	64	357	0	fw
zma-MIR166a	最大变化/完全结构 / 非 特 异 性 siRNA	226	101	358	3	fw
GU329524.1/ 欧洲玉米螟 虫 (European corn borer)						
zma-MIR166a	最大变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	227	103	359	1	fw
zma-MIR166h	最小变化/完全结构 / 性 状 特 异 性 siRNA	228	20	360	1	rv

[0559]

zma-MIR171f	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	229	62	361	3	rv
zma-MIR166a	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	230	106	362	3	fw
NM_001039403.1/北部和西部玉米根虫 (Northern and western corn rootworms)						
zma-MIR166a	最大变化/完全结构/性状特异性 siRNA	231	107	363	0	fw
zma-MIR172d	最小变化/完全结构/性状特异性 siRNA	232	20	364	3	rv
zma-MIR166a	最大变化/改变结构/性状特异性 siRNA	233	73	365	1	fw
zma-MIR166a	最大变化/完全结构/非特异性 siRNA	234	105	366	3	fw

表 1B 提供了针对几种宿主生物中的多种靶设计的多个 GeiGS 寡核苷酸的实例。对于每个宿主-靶组合，提供了四个寡核苷酸：具有匹配结构和有效 siRNA 的最小序列变化；具有匹配结构和有效 siRNA 的最大序列变化；具有非匹配结构和有效 siRNA 的最大序列变化；以及具有匹配结构和无效 siRNA 的最大序列变化。

[0560] 根据一个实施例,通过本方法产生的所述多个植物与未通过本方法产生的多个植物相比 (即与多个野生型植物相比),对多个病原体的抗性或耐受性至少提高约10%、20%、

30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0561] 根据本发明,可以使用本领域中已知的任何用于评估一植物对一病原体的耐受性或抗性的方法。多个示例性方法包含但不限于,如Ramírez V1、García-Andrade J、Vera P.所述,降低拟南芥 (*Arabidopsis*) 中的MYB46表达导致增强对灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 的抗性 (*Plant Signal Behav.*, 2011年6月;6(6):911至3, Epub:2011年6月1日);或如Gallego-Giraldo L.等人所述,苜蓿中HCT的下调促进了植物中防御反应的激活 (*New Phytologist*, 2011年,190:627至639, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03621.x), 两者均以引用方式并入本文中。

[0562] 根据一个实施例,提供了一种产生一抗除草剂植物的方法,所述方法包括如:根据本发明一些实施例的所述方法,在一植物细胞中对用于编码或被加工成一非编码RNA分子的或被加工成一RNA沉默分子的一基因进行修饰,其中所述感兴趣的靶RNA是对所述除草剂具有敏感性的所述植物的一基因,从而产生所述抗除草剂植物。

[0563] 根据一个实施例,所述多个除草剂靶向的多个途径是位于多个质体内(例如,所述叶绿素内)。

[0564] 因此,为了产生多个抗除草剂的植物,将所述非编码RNA分子设计为靶向一感兴趣的RNA,包含但不限于,所述叶绿素基因psbA(其编码光合醌结合膜蛋白(photosynthetic quinone-binding membrane protein)QB,除草剂阿特拉津(atrazine)的所述靶)和EPSP合酶的基因(一种核蛋白,然而,它在所述叶绿素中的过表达或积累使植物对除草剂草甘膦(glyphosate)具有抗性,因为它提高了EPSPs的转录速率,并降低了所述酶的转换率(turnover))。

[0565] 根据一个实施例,通过本方法产生的所述多个植物与未通过本方法产生的多个植物相比,对除草剂的抗性至少提高约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

[0566] 根据一个实施例,提供了根据本发明一些实施例的所述方法产生的一植物。

[0567] 根据一个实施例,植物是非转基因的(非-GMO)。

[0568] 根据一个实施例,提供了根据本发明一些实施例的所述方法产生的所述植物的一种子。

[0569] 设计GEiGS(在所述内源性非编码RNA中的核苷酸修饰/编辑最少)可以使用生物信息学(in silico)方法来达成,所述方法是基于技术人员众所周知的生物信息学工具。

[0570] 根据一个实施例,这种方法的达成如下:

[0571] 应提供以下信息:(a)通过基因编辑诱导的基因沉默(Gene Editing induced Gene Silencing, GEiGS)沉默的靶序列(“靶”);(b)选择所述GEiGS(即具有修饰的沉默活性及/或特异性的所述非编码RNA)是普遍表达(例如,组成性表达)还是特异性表达(例如,一特定组织、发育阶段、压力、热/冷休克等的表达)。

[0572] 将此信息提交给公开或内部可用的miRNA数据集(例如,小RNA测序、多个基因组序列、多个微阵列等),以便仅筛选(即选择)符合输入标准的多个相关miRNA:根据上述(多个)要求表达的多个miRNA,例如,miRbase (Kozommará和Griffiths-Jones, 2014年)、tasRNadb (Zhang Changqing等人, 2013年)以及mirEx 2.0 (Zielezinski, Andrzej等人, “mirEX 2.0-用于植物microRNAs表达资料搜集的一集成环境 (mirEX 2.0-an Integrated Environment

for Expression Profiling of Plant microRNAs), BMC Plant Biology, 15, 2015年:144, PMC.Web.2018年9月15日)。

[0573] 使用公开可用的工具,可以产生有效的多个靶特异性siRNA序列的一列表。可以将所述多个miRNA与所述有效的多个siRNA序列比对,且可以选择最同源的多个miRNA。多个筛选后的miRNA可能与所述有效的多个siRNA一样在相同方向上具有一相似的序列。

[0574] 修饰天然成熟的多个miRNA序列,使其与多个靶特异性有效的siRNA具有高度同源性,从而与所述靶的序列完全匹配。这种修饰可以发生在具有最高靶同源性的一条成熟miRNA链中(例如,可以是所述原始miRNA引导链或乘客链)。这种与所述靶的100%互补性可以将所述miRNA序列转化为一siRNA。

[0575] 最小的GE可以通过筛选多个miRNA序列(与所述靶具有天然的高同源性(反向互补))来达成。

[0576] 基于位在所述修饰的miRNA前体序列(pre-miRNA)两侧的所述多个基因组DNA序列,使用所述多个初级(primary)修饰的miRNA基因来产生多个ssDNA寡核苷酸(例如,200至500nt ssDNA长)和多个dsDNA片段(例如,仅250至5000nt dsDNA片段或克隆在多个质粒内)。所述修饰的miRNA的引导链(沉默链)序列可以设计为与所述靶100%互补。

[0577] 通过保持相同的碱基配对外形,修饰其他miRNA基因区域的所述序列以保留所述原始(未修饰的)miRNA前体和成熟结构。

[0578] 设计多个sgRNA以特异性靶向所述原始未修饰的miRNA基因(特定于所述基因组miRNA基因座),而不是靶向所述修饰的形式(即所述多个寡核苷酸/片段序列)。

[0579] 分析所述修饰的miRNA和所述原始miRNA基因之间的比较限制性酶切位点(comparative restriction enzyme site),并总结多个差异性限制性位点(differential restriction site)。这一种检测系统基于PCR,随后进行限制性酶切(restriction enzyme digestion)和凝胶电泳。

[0580] 如上详细讨论的进行验证。

[0581] 当所述内源性非编码RNA(例如,miRNA)包括与所述靶具有天然的高同源性(例如,60至90%)时,使用生物信息学方法检查所述非编码RNA针对其他多个靶的靶向作用(targeting)(例如,“脱靶效应(off target effect)”),以获得所述感兴趣的靶的特异性沉默。

[0582] 最小程度地修饰所述内源性非编码RNA(例如,miRNA),以增强其使所述感兴趣的靶沉默的效力。

[0583] 验证多个主要最低程度编辑的miRNA基因的GEiGS结果以产生多个候选的精炼的(refined)最低程度编辑的miRNA。一实验上有效的主要GEiGS结果(所述多个主要最低程度编辑的miRNA基因)被认为是具有修饰为与所述靶匹配100%的一引导链或乘客链的(多个)miRNA。

[0584] 产生多个引导链或乘客链序列,其逐渐地还原回所述原始序列(如图11中所示)。

[0585] 保持所述种子序列的方式是在七个种子核苷酸中至少有5个匹配(从5'端的核苷酸2至8位)。

[0586] 测试各种候选的“精炼的最低程度编辑的miRNA基因”的靶沉默效率。选择所述基因GE-介导的敲入(knock-in),提供最高的沉默与最少的miRNA序列修饰。

[0587] 测试多个精炼的最低程度编辑的miRNA候选的潜在“脱靶效应”。对“脱靶效应”的一重要预测影响了所述多个精炼的最低程度编辑的miRNA基因的最终评估。

[0588] 基于实验验证,测试多个较少精炼的最低程度编辑的miRNA基因候选。

[0589] 如本文中所使用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0590] 术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包含(includes)”、“包含(including)”、“具有(having)”及其词形变化意指“包含但不限于(including but not limited to)”。

[0591] 术语“由……组成(consisting of)”是指“包含并限于”。

[0592] 术语“基本由……组成(consisting essentially of)”意味着组成、方法或结构可包含其它成分、步骤及/或部分,但只要其它成分、步骤及/或部分不实质性地改变所要求保护的组成、方法或结构的基本和新的特征。

[0593] 如本文中所使用的单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”以及“所述/该(the)”包含复数指代物,除非文中另有明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0594] 在整个本申请中,本发明的不同的实施例可以范围形式呈现。应理解的是,范围形式的描述仅出于方便和简洁,不应解释为本发明范围的不可变更的限制。因此,范围的描述应视为具体公开了所有可能的子范围以及该范围的各个数值。例如,范围诸如1至6的描述应视为具体公开了诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子范围,以及该范围的各个数,例如1、2、3、4、5和6。其不论范围宽度均适用。

[0595] 每当本文中规定数值范围时,均意指包含该指定范围内的任何所述的数值(分数或整数)。短语第一标示数字和第二标示数字“之间的范围”和“从”第一标示数字“到”第二标示数字“的范围”在本文中互换使用,意指包含第一标示数字和第二标示数字和其间的的所有分数和整数。

[0596] 如本文中所使用的术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术以及程序,包含但不限于化学、药理学、生物、生物化学以及医学领域从业人员已知或容易由他们从已知的方式、手段、技术和程序开发的方式、手段、技术以及程序。

[0597] 如本文中所使用的术语“治疗”包含消除、实质上抑制、减慢或逆转病情的进展、实质上改善病情的临床和美学症状或实质上预防病情的临床或美学症状的出现。

[0598] 应理解的是,为了清楚起见,在各个实施例的背景下描述的本发明的某些特征,也可在单一实施例中组合提供。相反,出于简洁起见,在单一实施例的背景下描述的本发明的不同特征,也可单独提供或以任何合适的亚组合提供或适用于本发明的任何其它描述的实施例。在不同实施例的情况下描述的某些特征不视为所述实施例的必需特征,除非该实施例在无所述要素时是无效的。

[0599] 在下面的实例中,提供对上文描述和随附权利要求书部分要求保护的本发明的不同实施例和方面的实验支持。

[0600] 应理解的是,本申请中公开的任何序列识别号(SEQ ID NO)可以是指一DNA序列或一RNA序列,这根据提及该SEQ ID NO的上下文,即使该SEQ ID NO仅以一DNA序列格式或一RNA序列格式表达。例如,SEQ ID NO:1至4以一DNA序列格式表达(例如,用T表示胸腺嘧啶),但它可以是指对应于一gRNA核酸序列的一DNA序列,或是指一RNA分子核酸序列的所述RNA

序列。同样地,尽管某些序列以一RNA序列格式表达(例如,用U表示尿嘧啶),但根据所述分子的实际类型,它可以是指包括一dsRNA的一RNA分子的序列,也可以是指对应于所示RNA序列的一DNA分子的序列。在任何情况下,可以设想具有与任何取代基一起公开的序列的DNA和RNA分子

[0601] 实例

[0602] 现在参照以下实例,连同上文的描述,其以非限制性方式说明本发明。

[0603] 一般而言,本文中使用的命名和本发明中利用的实验室程序包含分子、生物化学、微生物和重组DNA技术。文献中全面阐释了这样的技术。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual”, Sambrook等人,1989年;“Current Protocols in Molecular Biology”,第I至III卷, Ausubel, R.M. 编辑,1994年; Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley和Sons, Baltimore, 马里兰,1989年; Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley和Sons, 纽约,1988年; Watson等人,“Recombinant DNA”, Scientific American Books, 纽约; Birren等人(编辑)“Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”,第1至4卷,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽约,1998年,; 如美国专利号4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659以及5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”,第I至III卷, Cellis, J.E. 编辑,1994年; “Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique” Freshney, Wiley-Liss, 纽约,1994年,第三版; “Current Protocols in Immunology”,第I至III卷, Coligan J.E. 编辑,1994年; Stites等人(编辑), “Basic and Clinical Immunology” (第8版), Appleton和Lange, Norwalk, CT, 1994年; Mishell和Shiigi (编辑), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., 纽约,1980年中所所示的方法; 可得的免疫测定法大量描述于专利和科学文献中, 参见例如美国专利号3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771以及和5,281,521, “Oligonucleotide Synthesis”, Gait, M.J. 编辑,1984年; “Nucleic Acid Hybridization”, Hames, B.D. 和 Higgins S.J. 编辑,1985年; “Transcription and Translation”, Hames, B.D. 和 Higgins S.J. 编辑,1984年; “Animal Cell Culture”, Freshney, R.I. 编辑,1986年; “Immobilized Cells and Enzymes”, IRL出版社 (IRLPRESS), 1986年; “A Practical Guide to Molecular Cloning”, Perbal, B., 1984年以及 “Methods in Enzymology”,第1至317卷, 学术出版社 (Academic Press); “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, 学术出版社 (Academic Press), 加州圣地牙哥, 1990年; Marshak等人, “Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”, CSHL出版社 (CSHL Press), 1996年; 其全部通过引用并入,如同在本文中完全阐述一样。在整个文件中提供其它一般参考文献。其中的程序被视为是本领域中众所周知的,并且为了方便读者而提供。其中所含的全部信息通过引用并入本文中。

[0604] 一般材料和实验步骤

[0605] 拟南芥 (*Arabidopsis*) 细胞培养

[0606] 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (生态型 *Landsberg-erecta*) 细胞培养物维持在100mL液体生长培养基 (4.4g/L无血清培养基 (Murashige and Skoog, MS) 盐, 含维生素

(Duchefa, Haarlem, 荷兰)、30g/L蔗糖、0.5mg/L 1-萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)以及0.5mg/L 6-苯甲酸嘌呤(6-benzylaminoipurine, BAP))中,在25℃下,光周期16小时,以及温和搅拌(100rpm)。每周将6ml培养液移至新鲜培养基。

[0607] 植物生长

[0608] 将多个拟南芥(生态型Colombia-0)幼苗进行表面灭菌后,在含有MS培养基(添加了0.8g/L琼脂(agar))的平板上生长,在20℃下,光周期16小时。

[0609] 拟南芥细胞培养的稳定转化

[0610] 携带pK7WGF2质粒的农杆菌(Agrobacterium)在LB培养基(添加了100mg/L大观霉素(spectinomycin))中(在28℃下)生长至OD为0.8。通过离心收集细菌,并将其重悬于相同量的植物细胞培养基中。转移至新鲜培养基4天后,4ml拟南芥细胞与0.1ml农杆菌悬浮液培养在一有盖培养皿(Petri dish)中(在20℃下,黑暗中,温和搅拌(130rpm))。48小时后,通过离心收集所述多个细胞,并用细胞培养基洗涤5次以去除大部分细菌。最后,将多个细胞重悬于2ml细胞培养基中,并平板接种(plate)至一有盖培养皿(含有细胞培养基,添加了0.4%植物凝胶(Phytigel)、500mg/L特美丁(timenten)以及50mg/L卡那霉素(kanamycin))上。所述培养皿在25℃下黑暗中保存,直到观察到愈伤组织形成,通常在2或3周后。

[0611] 香蕉胚性愈伤组织(embryogenic calli):

[0612] 香蕉胚性愈伤组织是从一最初的外植体(例如,未成熟的雄花或茎尖(shoot tip))发育而来,如Ma (Ma S.S.,园艺作物组织培养研讨会论文集(Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops),台湾台北,1988年3月8日至9日,第181至188页)和Schoofs (Schoofs H.,香蕉中胚性细胞的起源(The origin of embryogenic cells in Musa),博士论文,比利时鲁汶大学,比利时,1997年)所述。胚性细胞悬浮液是由新发育的高度胚性愈伤组织在液体培养基中诱导而成。每12至14天更新80%的所述培养基,直到诱导的细胞悬浮液完全地建立(6至9个月)。

[0613] 咖啡胚愈伤组织(embryonic calli):

[0614] 咖啡胚愈伤组织如先前所述获得(Etienne, H., 木本植物中体细胞胚发生的规程(Protocol for somatic embryogenesis in woody plants),2005年,施普林格出版社(Springer),第167至1795页)。简单地说,将多片幼叶表面灭菌,切成1cm²的多块,并置于半强度半固体MS培养基中(添加了2.26μM 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、4.92μM 吲哚-3-丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)以及9.84μM 异戊烯基腺苷(isopentenyladenine, iP))1个月。然后将多个外植体转移至半强度半固体MS培养基中(含有4.52μM 2,4-D和17.76μM 6-苯甲酸嘌呤(6-benzylaminopurin, 6-BAP))6至8个月,直到再生胚性愈伤组织。胚性愈伤组织在MS培养基(添加了5μM 6-BAP)上维持。

[0615] 如先前所述(Acuna, J.R.和M.de Pena, Plant Cell Reports, 1991年, 10(6):第345至348页),细胞悬浮培养物是从胚性愈伤组织产生。将胚性愈伤组织(30g/l)置于液体MS培养基中(添加了13.32μM 6-BAP)。将烧瓶置于28℃的一振荡培养箱(110rpm)中。每2至4周对所述细胞悬浮液进行传代培养(subculture)/传代(passage)直至完全地建立。细胞悬浮培养物维持在含4.44μM 6-BAP的液体MS培养基中。

[0616] 计算管道以产生GEiGS模板

[0617] 所述计算GEiGS管道应用了生物元数据(biological metadata),并能够自动产生

多个GEiGS DNA模板,所述模板用于最低程度编辑多个非编码RNA基因(例如,多个miRNA基因),从而获得一新的功能,即将其沉默能力重定向至感兴趣的靶序列。

[0618] 如图9中所示,所述管道从填入和提交输入开始:(a)通过GEiGS沉默靶序列;(b)基因编辑所述宿主生物并表达所述GEiGS;(c)可以选择是否普遍表达所述GEiGS。如果需要特定GEiGS表达,则可以从几个选项中选择(特定于一特定组织、发育阶段、胁迫、热/冷休克等的表达)。

[0619] 当所有必需的输入提交后,所述计算过程将从在多个miRNA数据集(例如,小RNA测序、微阵列等)之间搜索并仅筛选符合输入标准的多个相关miRNA开始。接下来,将选定的多个成熟miRNA序列与所述靶序列进行比对,并筛选具有最高互补水平的miRNA。然后修饰这些天然的靶互补成熟miRNA序列,使其与所述靶的序列完全匹配。然后,所述修饰的多个成熟miRNA序列通过预测siRNA效能的一算法运行,并筛选出沉默得分最高的前20个。然后将这些最终修饰的miRNA基因用于产生200至500nt ssDNA或250至5000nt dsDNA序列,如下所示。

[0620] 基于在所述修饰的miRNA两侧的所述基因组DNA序列来设计200至500nt ssDNA寡核苷酸和250至5000nt dsDNA片段。所述pre-miRNA序列位于所述寡核苷酸的中心。所述修饰的miRNA的引导链(沉默)序列与所述靶100%互补。然而,所述修饰的乘客miRNA链的所述序列进一步修饰以保留所述原始(未修饰的)miRNA结构,保持相同的碱基配对外形。

[0621] 接下来,将多个差异性sgRNA设计为特异性靶向所述原始未修饰的miRNA基因,而不是所述修饰的交换形式。最后,在所述修饰的miRNA基因和所述原始的miRNA基因之间进行比较限制性酶切位点分析,并总结了多个差异性限制性位点。

[0622] 因此,所述管道输出包含:

[0623] (a)具有最低程度修饰的miRNA的200至500nt ssDNA寡核苷酸或250至5000nt dsDNA片段序列。

[0624] (b)2至3个特异性靶向所述原始miRNA基因而非所述修饰的miRNA基因的差异性sgRNA。

[0625] (c)在所述修饰的miRNA基因和原始的miRNA基因之间的多个差异性限制性酶切位点的列表。

[0626] 靶基因

[0627] 八氢番茄红素脱饱和酶基因(Phytoene desaturase gene,PDS)

[0628] 基本原理:

[0629] PDS是叶绿素生物合成途径中的一必需基因,且植物中PDS功能的丧失会导致白化病(albino)表型(Fan等人,Sci Rep,2015年,5:12217)。当用作基因组编辑(GE)策略或RNAi的一靶基因时,正编辑的植物容易通过叶片或其他器官中的叶绿素部分或完全丧失(漂白)来识别。

[0630] 方法:

[0631] 选择具有普遍表达外形的多个miRNA(取决于应用,可以选择具有特定于一特定组织、发育阶段、温度、胁迫等的表达外形的多个miRNA)。

[0632] 将多个miRNA修饰为靶向来自拟南芥的所述PDS基因的siRNA(参见下表1A)。转染和FACS分选后(RFP/GFP用于鉴定阳性Cas9/sgRNA转染事件),将多个原集落(或愈伤组织)

转移至固体再生培养基(半强度MS+B5维生素、20g/l蔗糖、0.8%琼脂)直到芽再生。这些芽中色素沉着(pigmentation)的丧失表明所述PDS基因和正确的GE的功能丧失。在用携带随机序列的一寡核苷酸转染的对照组植株中未观察到白化病表型。

[0633] 绿色荧光蛋白(GFP)基因

[0634] 基本原理

[0635] GFP是一种由238个氨基酸残基(26.9kDa)组成的蛋白质,当暴露于蓝色至紫外线范围内的光时,会显示出亮绿色的荧光。尽管许多其他海洋生物也具有类似的绿色荧光蛋白,但GFP传统上是指首先从维多利亚发光水母(jellyfish *Aequorea victoria*)中分离出的蛋白。来自维多利亚发光水母的所述GFP在395nm波长处具有一主要的激发峰,以及在475nm处具有一次要的激发峰。它的发射峰是在509nm处,其在可见光谱的下绿色部分。GFP的荧光量子产率(quantum yield, QY)为0.79。来自海肾(sea pansy)(海肾(*Renilla reniformis*))的所述GFP在498nm处具有一单个主要的激发峰。GFP在许多生物学领域中都是一种优秀的工具,因为它能够除了分子氧以外,无须其他任何辅助的辅因子、基因产物或酶/底物的情况下形成内部发色团(chromophore)。

[0636] 方法:

[0637] 选择具有普遍表达外形的多个miRNA(取决于应用,可以选择具有特定于一特定组织、发育阶段、温度、胁迫等的表达外形的多个miRNA)。

[0638] 将多个miRNA修饰为靶向所述GFP基因的siRNA(参见下表1A)。转染后进行FACS分选,分离无或低GFP信号的mCherry表达的多个原生质体(mCherry是用于鉴定阳性Cas9/sgRNA转染事件)。在对照组(具有非靶siRNA序列的寡核苷酸)中,所有原生质体均表达mCherry和GFP。接下来,将候选成功的GE原生质体(mCherry阳性和GFP阴性)再生至多个植物中以进行进一步分析。多个原生质体也在显微镜下定性记录。为了进行定量分析和比率分析,使用了FACS分析。

[0639] 表1A:靶基因ID

[0640]	基因名称	查询序列 ID	查询序列生物
	PDS	NM_001340908.1 (SEQ ID NO: 25)	拟南芥
		NM_117498 (SEQ ID NO: 26)	
	ADH1	NC_003070.9	拟南芥
	eGFP	AFA52654 (SEQ ID NO: 27)	维多利亚水母

[0641] siRNA设计

[0642] 多个靶特异性的siRNA是通过可公开获得的siRNA设计器设计,例如, ThermoFisher Scientific的“BLOCK-iT™ RNAi设计器(BLOCK-iT™ RNAi Designer)”和 Invivogen的“寻找siRNA序列(Find siRNA sequences)”。

[0643] sgRNA设计

[0644] 如先前Park等人所述(Bioinformatics, 2015年, 31(24):4014至4016),使用所述

可公开获得的sgRNA设计器将多个sgRNA设计为靶向所述多个内源性miRNA基因。每个盒都设计了两个sgRNA,但每个细胞只表达一单个sgRNA以启动基因交换。sgRNA对应于交换后修饰的所述pre-miRNA序列。

[0645] 为了最大程度地提高有效选择sgRNA的机会,使用两种不同的可公开获得的算法(CRISPER设计:www(dot)crispr(dot)mit(dot)edu:8079/和CHOPCHOP:www(dot)chopchop(dot)cbu(dot)uib(dot)no/),且从每种算法中选择得分最高的sgRNA。

[0646] 交换ssDNA寡核苷酸设计

[0647] 基于所述miRNA基因的所述基因组DNA序列设计了400b ssDNA寡核苷酸。所述pre-miRNA序列位于所述寡核苷酸的中心。接下来,将所述多个双链siRNA序列与所述多个成熟miRNA序列交换,以使所述引导(沉默)siRNA链与所述靶保持100%互补。修饰所述乘客siRNA链的所述序列以保留所述原始miRNA结构,保持相同的碱基配对外形。

[0648] 交换质粒DNA设计

[0649] 基于所述miRNA基因的所述基因组DNA序列设计了4000bp dsDNA片段。所述pre-miRNA序列位于所述dsDNA片段的中心。接下来,将所述多个双链siRNA序列与所述多个成熟miRNA序列交换,以使所述引导(沉默)siRNA链与所述靶保持100%互补。修饰所述乘客siRNA链的所述序列以保留所述原始miRNA结构,保持相同的碱基配对外形。最后,将所述片段克隆至一标准载体(例如,pBluescript)中。

[0650] 用于交换的长质粒:

[0651] 质粒-1:GEiGS_mir173_si-GFP_1(SEQ ID NO:31)

[0652] 质粒-2:GEiGS_mir173_si-GFP_2(SEQ ID NO:32)

[0653] 质粒-3:GEiGS_mir173_si-PDS_1(SEQ ID NO:33)

[0654] 质粒-4:GEiGS_mir173_si-PDS_2(SEQ ID NO:34)

[0655] 质粒-5:GEiGS_mir390a_si-GFP_1(SEQ ID NO:35)

[0656] 质粒-6:GEiGS_mir390a_si-GFP_2(SEQ ID NO:36)

[0657] 质粒-7:GEiGS_mir390a_si-PDS_1(SEQ ID NO:37)

[0658] 质粒-8:GEiGS_mir390a_si-PDS_2(SEQ ID NO:38)

[0659] sgRNA序列:

[0660] 拟南芥mir-390A:

[0661] 1.CTATCCATCCTGAGTTTCATTGG(SEQ ID NO:1);

[0662] 2.AAGAATCTGTAAAGCTCAGGAGG(SEQ ID NO:2);

[0663] 拟南芥mir-173:

[0664] 1.CTTGCAGAGAGAAATCACAGTGG(SEQ ID NO:3);

[0665] 2.GCTTACACAGAGAATCACAGAGG(SEQ ID NO:4);

[0666] 交换的内源性miRNA的列表:

[0667] 1.拟南芥mir-390A

[0668] 2.拟南芥mir-173

[0669] 用于基因交换的ssDNA寡核苷酸:

[0670] 寡核苷酸-1:GEiGS_mir173_si-GFP_1(5'→3')(SEQ ID NO:5)

[0671] 寡核苷酸-2:GEiGS_mir173_si-GFP_2(5'→3')(SEQ ID NO:6)

[0672] 寡核苷酸-3:GEiGS_mir173_si-PDS_1(5' → 3') (SEQ ID NO:7)

[0673] 寡核苷酸-4:GEiGS_mir173_si-PDS_2(5' → 3') (SEQ ID NO:8)

[0674] 寡核苷酸-5:GEiGS_mir390a_si-GFP_1(5' → 3') (SEQ ID NO:9)

[0675] 寡核苷酸-6:GEiGS_mir390a_si-GFP_2(5' → 3') (SEQ ID NO:10)

[0676] 寡核苷酸-7:GEiGS_mir390a_si-PDS_1(5' → 3') (SEQ ID NO:11)

[0677] 寡核苷酸-8:GEiGS_mir390a_si-PDS_2(5' → 3') (SEQ ID NO:12)

[0678] sgRNA克隆

[0679] 使用的所述转染质粒是由4个模块组成,包括:

[0680] (1) 通过所述CsVMV启动子(通过一G7终止序列终止)驱动的mCherry;

[0681] (2) 2x 35S::hCas9-35S-ter,即通过所述35S启动子(通过AtuNos终止序列终止)驱动的hCas9

[0682] (3) 驱动引导1的sgRNA的AtU6-26及/或U6合成启动子;

[0683] 质粒设计

[0684] 为了瞬时表达,使用含有3个转录单元的一质粒。第一转录单元含有驱动mCherry表达和所述G7终止子的CsVMV启动子。下一个转录单元由驱动Cas9表达和所述35S终止子的2x-35S启动子组成。第三个含有表达sgRNA以靶向多个miRNA基因的所述拟南芥U6启动子(每个载体包括一单个sgRNA)。

[0685] 设计和克隆CRISPR/CAS9以靶向miR-173和miR-390以及引入SWAP以靶向GFP、AtPDS3以及AtADH1

[0686] 本发明人已经设计了成熟miR-173和miR-390序列中的改变,在它们的基因组背景下,通过产生反向互补所述多个靶基因的小RNA,以靶向GFP、AtPDS3或AtADH1,如图12A至12G和图13A至13G中所示。此外,为了维持所述miRNA前体转录物的二级结构,对所述pri-miRNA进行进一步的改变,如图12A至12G、13A至13G、14A至14D和15A至15D以及表2中所示(见下文)。这些片段克隆至多个PUC质粒中并命名为供体(DONORS),且所述多个DNA片段称为SWAP。对于修饰miR-173的序列-SWAP1和SWAP2靶向GFP、SWAP3和SWAP4靶向AtPDS3、以及SWAP9和SWAP10靶向AtADH1(参见下表2)。对于修饰miR-390的序列-SWAP5和SWAP6靶向GFP、SWAP7和SWAP8靶向AtPDS3、以及SWAP11和SWAP12靶向AtADH1(参见下表2)。

[0687] 将靶向miR-173和miR-390的多个引导RNA引入至CRISPR/CAS9载体系统中,以在所需的miRNA基因座中产生一DNA剪切。通过基因轰击方案将它们与所述多个供体(DONOR)载体共同引入至所述多个植物中,以通过同源DNA修复(Homologous DNA Repair,HDR)引入所需的多个修饰。这些引导RNA在下表2中有详细说明,并在图12A和13A中示出。

[0688] 表2:所述实验中使用的序列和寡核苷酸

[0689]

SEQ ID NO:	目标
39	miR173
40	miR390
41	用于 CRISPR/CAS9 系统中 miR173 靶向的 sgRNA 序列 - GEiGS#4
42	用于 CRISPR/CAS9 系统中 miR173 靶向的 sgRNA 序列 - GEiGS#5
43	用于 CRISPR/CAS9 系统中 miR390 靶向的 sgRNA 序列 - GEiGS#1
44	用于 CRISPR/CAS9 系统中 miR390 靶向的 sgRNA 序列 - GEiGS#3

[0690]

45	靶向 GFP 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP5 中（基于 miR390）和 SWAP1 中（基于 miR173）
46	靶向 GFP 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP5 中（基于 miR390）和 SWAP1 中（基于 miR173）
47	靶向 GFP 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP6 中（基于 miR390）和 SWAP2 中（基于 miR173）
48	靶向 GFP 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP6 中（基于 miR390）和 SWAP2 中（基于 miR173）
49	靶向 AtPDS3 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP7 中（基于 miR390）和 SWAP3 中（基于 miR173）
50	靶向 AtPDS3 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP7 （基于 miR390）和 SWAP3 中（基于 miR173）
51	靶向 AtPDS3 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP8 中（基于 miR390）和 SWAP4 中（基于 miR173）
52	靶向 AtPDS3 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP8 中（基于 miR390）和 SWAP4 中（基于 miR173）
53	靶向 AtADH1 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP11 中（基于 miR390）和 SWAP9 中（基于 miR173）
54	靶向 AtADH1 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP11 中（基于 miR390）和 SWAP9 （基于 miR173）
55	靶向 AtADH1 的成熟 GEiGS-siRNA - 用于 SWAP12 中（基于 miR390）和 SWAP10 中（基于 miR173）
56	靶向 AtADH1 的成熟 GEiGS-siRNA 的互补链 - 用于 SWAP12 中（基于 miR390）和 SWAP10 中（基于 miR173）
57	miR173 的初级转录体（pri-miR173）
58	SWAP1 的初级转录体（用于靶向 GFP 的供体载体中）
59	SWAP2 的初级转录体（用于靶向 GFP 的供体载体中）
60	SWAP3 的初级转录体（用于靶向 PDS3 的供体载体中）
61	SWAP4 的初级转录体（用于靶向 PDS3 的供体载体中）

[0691]

62	SWAP9 的初级转录体（用于靶向 ADH1 的供体载体中）
63	SWAP10 的初级转录体（用于靶向 ADH1 的供体载体中）
64	miR390 的初级转录体（pri-miR390）
65	SWAP5 的初级转录体（用于靶向 GFP 的供体载体中）
66	SWAP6 的初级转录体（用于靶向 GFP 的供体载体中）
67	SWAP7 的初级转录体（用于靶向 PDS3 的供体载体中）
68	SWAP8 的初级转录体（用于靶向 PDS3 的供体载体中）
69	SWAP11 的初级转录体（用于靶向 ADH1 的供体载体中）
70	SWAP12 的初级转录体（用于靶向 ADH1 的供体载体中）
71	miR173 基因座的序列
72	SWAP1 的寡核苷酸序列（用于靶向 GFP 的修饰 miR173 的供体载体中）
73	SWAP2 的寡核苷酸序列（用于靶向 GFP 的修饰 miR173 的供体载体中）
74	SWAP3 的寡核苷酸序列（用于靶向 PDS3 的修饰 miR173 的供体载体中）
75	SWAP4 的寡核苷酸序列（用于靶向 PDS3 的修饰 miR173 的供体载体中）
76	SWAP9 的寡核苷酸序列（用于靶向 ADH1 的修饰 miR173 的供体载体中）
77	SWAP10 的寡核苷酸序列（用于靶向 ADH1 的修饰 miR173 的供体载体中）
78	miR390 基因座的寡核苷酸序列
79	SWAP 的寡核苷酸序列 5（用于靶向 GFP 的修饰 miR390 的供体载体中）
80	SWAP6 的寡核苷酸序列（用于靶向 GFP 的修饰 miR390 的供体载体中）

[0692]

81	SWAP7 的寡核苷酸序列 (用于靶向 PDS3 的修饰 miR390 的供体载体中)
82	SWAP8 的寡核苷酸序列 (用于靶向 PDS3 的修饰 miR390 的供体载体中)
83	SWAP11 的寡核苷酸序列 (用于靶向 ADH1 的修饰 miR390 的供体载体中)
84	SWAP12 的寡核苷酸序列 (用于靶向 ADH1 的修饰 miR390 的供体载体中)
85	用于管家基因的 qRT - 18S 表达 (NC_037304) - 正向引物
86	用于管家基因的 qRT - 18S 表达 (NC_037304) - 反向引物
87	用于 PDS3 表达分析的 qRT (AT4G14210) - 正向引物
88	用于 PDS3 表达分析的 qRT (AT4G14210) - 反向引物
89	用于 ADH1 表达分析的 qRT (AT1G77120) - 正向引物
90	用于 ADH1 表达分析的 qRT (AT1G77120) - 反向引物
91	用于 miR390 及其修改形式的内部放大的正向引物
92	用于 miR390 及其修改形式的内部放大的反向引物
93	用于 miR390 及其修改形式的外部放大的正向引物 - 初级反应
94	用于 miR390 及其修改形式的外部放大的反向 - 初级反应
95	用于 miR390 及其修改形式的外部放大的正向引物 - 嵌套反应(nested reaction)
96	用于 miR390 及其修改形式的外部放大的反向 - 嵌套反应
97	用于 miR173 及其修改形式的内部放大的正向引物
98	用于 miR173 及其修改形式的内部放大的反向引物
99	用于 miR173 及其修改形式的外部放大的正向引物 - 初级反应
100	用于 miR173 及其修改形式的外部放大的反向 - 初级反应
101	用于 miR173 及其修改形式的外部放大的正向引物 - 嵌套反应
102	用于 miR173 及其修改形式的外部放大的反向 - 嵌套反应

[0693]

[0694]

原生质体分离

[0695] 通过将植物材料(例如,叶片、愈伤组织、细胞悬浮液)在一酶切液(1%纤维素酶、0.5%离析酶(Macerozyme)、0.5%崩溃酶(driselase)、0.4M甘露醇(mannitol)、154mM NaCl、20mM KCl、20mM MES pH 5.6、10mM CaCl₂)中培养(在室温下温和摇动4至24小时)来分离原生质体。酶切后,将剩余的植物材料用W5溶液(154mM NaCl、125mM CaCl₂、5mM KCl, 2mM MES pH5.6)洗涤,并将原生质体悬浮液通过一40μm过滤器过滤。在室温下以80g离心3分钟后,将原生质体重悬于2ml W5缓冲液中,并通过重力在冰中沉淀。将最终的原生质体团粒(pellet)重悬于2ml MMg(0.4M甘露醇、15mM MgCl₂、4mM MES pH 5.6)中,并使用一血细胞计数器测定原生质体浓度。使用锥虫蓝(Trypan Blue)染色估算原生质体活性(viability)。

[0696] 聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)介导的质粒转染

[0697] 原生质体的PEG转染是使用Wang报告的一改进形式的策略(Wang等人,Scientia Horticulturae,2015年,191:第82至89页)来实现。将原生质体重悬于MMg溶液中(密度为 2×10^6 至 5×10^6 原生质体/ml)。将100至200μl原生质体悬浮液加入至含有所述质粒的一试管中。质粒:原生质体的比例对转化效率影响很大,因此测定了原生质体悬浮液中的质粒浓度的范围(5至300μg/μl)。将PEG溶液(100至200μl)加入至混合物,并在23℃下培养10至60分钟的各种时间长度。优化PEG4000的浓度,测定在200至400mM甘露醇、100至500mM CaCl₂溶液中的20至80%PEG4000的范围。然后将所述原生质体在W5中洗涤并以80g离心3分钟,然后重悬于1ml W5中,并在23℃的黑暗中培养。培养24至72小时后,通过显微镜检测荧光。

[0698] 荧光蛋白表达细胞的FACS分选

[0699] 质粒/RNA递送后24至72小时,使用一流式细胞仪收集细胞并分选荧光蛋白表达,以富集如先前所述的表达mCherry/编辑剂的多个细胞(Chiang等人,Sci Rep,2016年,6:24356)。此富集步骤允许绕过抗生素选择,且仅收集瞬时表达所述荧光蛋白、Cas9以及所述sgRNA的细胞。这些细胞可以进一步测试,通过HR产生成功的交换事件和相应的基因表达的丢失的所述靶基因的编辑。

[0700] 轰击和植物再生

[0701] 拟南芥根制备:

[0702] 将经过氯气灭菌的多个拟南芥(cv.Col-0)种子播种在MS减蔗糖(minus sucrose)平板上,在4℃的黑暗中催近发育(vernalised)3天,然后在25℃的恒定光照下垂直发芽(germination vertically)。2周后,将根切成1cm的根段,并置于愈伤组织诱导培养基(Callus Induction Media,CIM:1/2 MS(含B5维生素)、2%葡萄糖、pH 5.7、0.8%琼脂、2mg/l IAA、0.5mg/l 2,4-D、0.05mg/l激动素(kinetin))平板上。在25℃的黑暗中培养6天后,将所述多个根段转移至多个滤纸圆盘上,并置于多个CIMM平板上(1/2 MS(不含维生素)、2%葡萄糖、0.4M甘露醇、pH 5.7以及0.8%琼脂)4至6小时,以备于轰击。

[0703] 轰击

[0704] 通过PDS-1000/He粒子递送(Bio-Rad;PDS-1000/He系统#1652257)将多个质粒构建体引入至所述根组织,此程序需要进行以下概述的几个制备步骤。

[0705] 黄金储备制备

[0706] 将40mg 0.6μm金(Bio-Rad;Cat:1652262)与1ml 100%乙醇混合,进行脉冲(pulse)离心成团粒,并去除所述乙醇。将此洗涤程序重复另外两次。

[0707] 洗涤后,将所述团粒重悬于1ml无菌蒸馏水中,并分配至1.5ml试管(50 μ l等分试样工作体积)中。

[0708] 磁珠制备

[0709] 简而言之,进行以下操作:

[0710] 一单个试管有足够的金轰击2盘的拟南芥根(每盘2发),因此,每个试管分配在4个(1,100psi)基因枪破裂盘(Biolistic Rupture disk)(Bio-Rad;Cat:1652329)之间。

[0711] 轰击需要同一样品的多个平板,为了保持样品的一致性并尽量减少整体准备工作,将试管合并,并相应地调整DNA和CaCl₂/亚精胺(spermidine)混合物的体积。

[0712] 以下方案总结制备一个试管的金的过程,应根据所使用的试管的金的数量进行调整。

[0713] 所有后续过程均在4℃的一艾本德热混合器(Eppendorf thermomixer)中进行。

[0714] 制备多个质粒DNA样品,每个试管包括以1000ng/ μ l的浓度添加11 μ g DNA。

[0715] (1)将493 μ l ddH₂O添加至1等份(7 μ l)亚精胺(Sigma-Aldrich;S0266)中,最终浓度为0.1M亚精胺。将1250 μ l 2.5M CaCl₂添加至所述亚精胺混合物中,涡旋振荡(vortexed)并置于冰上。

[0716] (2)将一试管预先准备好的金置于所述热混合器中,并以1400rpm的速度旋转。

[0717] (3)将11 μ l DNA添加至所述试管中、涡旋振荡并放回旋转的热混合器中。

[0718] (4)为了结合DNA/金粒子,将70 μ l亚精胺CaCl₂混合物添加至每个试管中(在所述热混合器中)。

[0719] (5)将所述多个试管剧烈地涡旋振荡15至30秒,并置于冰上约70至80秒。

[0720] (6)将所述混合物以7000rpm离心1分钟,去除上清液并置于冰上。

[0721] (7)向每个试管中添加500 μ l 100%乙醇,并通过移液(pipetting)和涡旋振荡重悬所述团粒。

[0722] (8)将所述多个试管以7000rpm离心1分钟。

[0723] (9)去除所述上清液,将所述团粒重悬于50 μ l 100%乙醇中,并保存在冰上。

[0724] 宏载体(macro carrier)制备

[0725] 以下操作是在一层流柜(laminar flow cabinet)中进行:

[0726] (1)灭菌和干燥多个宏载体(Bio-Rad;1652335)、多个停止屏(stopping screen)(Bio-Rad;1652336)以及多个宏载体磁盘架。

[0727] (2)将多个宏载体平放至所述多个宏载体磁盘架中。

[0728] (3)涡旋振荡多个涂覆DNA的金混合物并分散(5 μ l)至每个基因枪破裂盘的中心上。

[0729] 允许乙醇蒸发。

[0730] PDS-1000(氦粒子递送系统)

[0731] 简而言之,进行以下操作:

[0732] 将氦气瓶的调节阀调整至至少1300psi的输入(incoming)压力。通过按下vac/vent/hold开关并按住点火(fire)开关3秒产生真空。这确保将氦气排放至管路系统中。

[0733] 将多个1100psi破裂盘置入异丙醇中并混合以去除静电。

[0734] (1)将1个破裂盘置入所述磁盘固定盖(disk retaining cap)中。

[0735] (2) 构建微载体发射组件 (microcarrier launch assembly) (带有一停止屏和一含金微载体)。

[0736] (3) 将拟南芥根愈伤组织有盖培养皿 (Petri dish) 置于所述发射组件下方6cm处。

[0737] (4) 将真空压力设置为27英寸汞柱 (水银), 并打开氦气阀 (约1100psi)。

[0738] (5) 释放真空; 移除微载体发射组件和所述破裂盘固定盖。

[0739] (6) 在同一组织上轰击 (即每个平板轰击2次)。

[0740] (7) 随后将多个轰击过的根置于25℃的黑暗中的多个CIM平板上, 再放置24小时。

[0741] 联合轰击 (co-bombardment)

[0742] 当轰击多个GEiGS质粒的多个组合时, 将5μg (1000ng/μl) 所述sgRNA质粒与8.5μg (1000ng/μl) 交换质粒混合, 并将11μl此混合物添加至样品中。如果同时轰击更多的GEiGS质粒, 则多个sgRNA质粒与所使用的多个交换质粒的浓度比例为1:1.7, 并将11μg (1000ng/μl) 此混合物添加至所述样品中。如果用与GEiGS交换不相关的多个质粒联合轰击, 则以等比例混合, 并将11μg (1000ng/μl) 所述混合物添加至每个样品中。

[0743] 植物再生

[0744] 对于芽再生, 进行来自Valvekens等人的改良方案 (Valvekens, D. 等人, Proc Natl Acad Sci, 美国, 1988年, 85 (15): 5536至5540)。将轰击过的多个根置于多个幼苗诱导培养基 (Shoot Induction Media, SIM) 平板上, 其包含1/2 MS (含B5维生素)、2% 葡萄糖、pH 5.7、0.8% 琼脂、5mg/l 2iP、0.15mg/l IAA。将多个平板留在25℃的光照下16小时-23℃的黑暗中8小时的循环。10天后, 将多个平板转移至多个MS平板 (含3% 蔗糖、0.8% 琼脂) 上1周, 然后转移至多个新鲜的相似平板中。一旦多个植物再生, 将它们从所述多个根上切除, 并置于多个MS平板 (含3% 蔗糖、0.8% 琼脂) 上, 直到进行分析。

[0745] 集落形成与植物再生

[0746] 部分采样所述多个荧光蛋白阳性细胞并用于DNA提取和基因组编辑 (GE) 测试, 部分以高稀释度平板接种在液体培养基中以允许集落形成28至35天。挑选多个集落, 使其生长并分成两等分试样。一个等分试样用于DNA提取和基因组编辑 (GE) 测试以及CRISPR无DNA测试 (见下文), 而其他等分试样则保持培养直至其状态得到验证。只有向前筛选那些明确显示为GE且CRISPR无DNA。多个集落在培养基中生长约6至10周。将多个原集落 (或愈伤组织) 继代培养至再生培养基 (例如, 半强度MS+B5维生素、20g/l 蔗糖) 中。将再生的多个植株置于28℃的一低光照强度下的固化培养基 (0.8% 琼脂) 上。2个月后, 将多个植株转移至土壤中, 并置于80至100%湿度的温室中。

[0747] 病毒接种 (inoculation) 和DNA递送至拟南芥幼苗

[0748] 用TuMV感染性克隆p35S::TuMV-GFP (0.1mg/ml) 感染的来自拟南芥叶的汁液用于机械接种。

[0749] 植物繁殖

[0750] 将测序并预测失去所述多个靶基因表达并发现无所述CRISPR系统DNA/RNA的多个克隆大量且平行繁殖以分化出多个幼苗, 并从中进行功能测定来测试所需的性状。

[0751] 表型分析

[0752] 如上所述, 例如通过观察取决于所述靶基因的所述色素沉着 (pigmentation)、花期 (florescence) 或形态。

[0753] 烯丙醇(allyl alcohol)选择

[0754] 为了选择含烯丙醇的多个植物,轰击后10天,将多个根置于SIM培养基上。将多个根浸入30mM烯丙醇(Sigma-Aldrich,美国)中2小时。然后将所述多个根用MS培养基洗涤3次,并置于多个MS平板(含3%蔗糖、0.8%琼脂)上。如前所述进行再生过程。

[0755] 基因分型(genotyping)

[0756] 根据制造商的建议处理多个组织样品并扩增多个扩增子(amplicon)。MyTaq植物-PCR试剂盒(BioLine BIO 25056)用于较短的内部扩增,而菲尔植物直接PCR试剂盒(Phire Plant Direct PCR Kit)(Thermo Scientific;F-130WH)用于较长的外部扩增。用于这些扩增的多个寡核苷酸在上面表2中详细说明。通过所述多个扩增子的不同酶切模式来确定所述miRNA基因座中的不同修饰,如下所示:

[0757] 对于miR-390的修饰-内部扩增子的长度为978个碱基对,而对于外部扩增,其长度为2629个碱基对。为了鉴定交换7,用NlaIII酶切得到636个碱基对大小的一片段,而在wt形式中,其被剪切成为420和216个长的片段。为了鉴定交换8,用Hpy188I酶切得到293和339个碱基对大小的片段,而在wt形式中,此位点不存在,且得到一632个长的片段。为了鉴定交换11和12,用BccI酶切得到662个碱基对大小的一片段,而在wt形式中,其被剪切成为147和417个长的片段。

[0758] 对于miR-173的修饰-内部扩增子的长度为574个碱基对,而对于嵌套外部扩增,其长度为466个碱基对。为了鉴定交换3,用BslI酶切得到在外部扩增子中有217和249个碱基对大小的片段,而在内部扩增子中有317和149个碱基对大小的片段。在wt形式中,此位点不存在,且得到在外部扩增子中有一466个长的片段,而在内部反应中有一574个长的片段。为了鉴定交换4,用BtsaI酶切得到在外部扩增子中有212和254个碱基对大小的片段,而在内部扩增子中有212和362个碱基对大小的片段。在wt形式中,此位点不存在,且得到在外部扩增子中有一466个长的片段,而在内部反应中有一574个长的片段。为了鉴定交换9,用NlaIII酶切得到在外部扩增子中有317和149个碱基对大小的片段,而在内部扩增子中有317和244个碱基对大小的片段。在wt形式中,此位点不存在,且得到在外部扩增子中有一466个长的片段,而在内部反应中有一561个长的片段。为了鉴定交换10,用NlaIII酶切得到在外部扩增子中有375和91个碱基对大小的片段,而在内部扩增子中有375和186个碱基对大小的片段。在wt形式中,此位点不存在,且得到在外部扩增子中有一466个长的片段,而在内部反应中有一561个长的片段。

[0759] DNA和RNA分离

[0760] 将多个样品收集至液氮中,并保存在-80℃中直至进行加工。使用塑料组织研磨器研杵(Tissue Grinder Pestle)(Axygen,美国)在置于干冰中的多个试管中进行组织研磨。根据制造商的指示,使用RNA/DNA纯化试剂盒(cat.48700;Norgen Biotek Corp.,加拿大)从磨碎的组织中分离DNA和总RNA。在所述RNA部分为低260/230比例(<1.6)的情况下,分离的RNA用1μl糖原(glycogen)(cat.10814010;Invitrogen,美国)10%V/V乙酸钠、3M pH5.5(cat.AM9740,Invitrogen,美国)以及3倍体积的乙醇在-20℃下沉淀过夜。将所述溶液在4℃下以最大速度离心30分钟。随后用70%乙醇洗涤2次,风干15分钟,并重悬于无核酸酶的水(cat.10977035;Invitrogen,美国)中。

[0761] 反转录(reverse transcription,RT)和定量实时PCR(quantitative real-time

PCR, qRT-PCR)

[0762] 根据制造商的手册 (AMPD1; Sigma-Aldrich, 美国), 用 DNase I 处理 1 微克分离的总 RNA。所述样品按照高容量 cDNA 反转录试剂盒 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) (cat. 4368814; Applied Biosystems, 美国) 的指导手册进行反转录。

[0763] 对于基因表达, 根据制造商的方案, 在 CFX96 Touch™ 实时 PCR 检测系统 (BioRad, 美国) 和 SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (S4438, Sigma-Aldrich, 美国) 上进行定量实时 PCR (qRT-PCR) 分析, 并用 Bio-Rad CFX 管理程序 (manager program) (3.1 版) 进行分析。对于分析 AtADH1 (AT1G77120), 使用以下引物组: 正向 GTTGAGAGTGTGGAGAAGGAG (SEQ ID NO: 367) 和反向 CTCGGTGTGATCCTGAGAAG (SEQ ID NO: 368); 对于分析 AtPDS3 (AT4G14210), 使用以下引物组: 正向 GTACTGCTGGTCCTTTGCAG (SEQ ID NO: 369) 和反向 AGGAGCACTACGGAAGGATG (SEQ ID NO: 370); 对于内源性校准基因, 使用所述 18S 核糖体 RNA 基因 (NC_037304) - 正向 ACACCCTGGGAATTGTTTT (SEQ ID NO: 371) 和反向 GTATGCGCCAATAAGACCAC (SEQ ID NO: 372)。

[0764] 实例 1A

[0765] 基因组编辑诱导基因沉默 (GEiGS)

[0766] 为了设计多个 GEiGS 寡核苷酸, 需要对多个模板非编码 RNA 分子 (多个前体) 进行加工, 并引起衍生出多个小沉默 RNA 分子 (多个成熟体 (mature))。多个前体的两个来源及其相应的成熟序列用于产生多个 GEiGS 寡核苷酸。对于多个 miRNA, 多个序列是从所述 miRBase 数据库中获得 (Kozomara, A. 和 Griffiths-Jones, S., Nucleic Acids Res, 2014 年, 42: D68, ¶ 1073)。多个 tasiRNA 前体和多个成熟体是从所述 tasiRNAdb 数据库中获得 (Zhang, C. 等人, Bioinformatics, 2014 年, 30: 1045, ¶ 1046)。

[0767] 在多种宿主生物中选择多个沉默靶 (参见上表 1B)。使用所述 siRNArules 软件 (Holen, T., RNA, 2006 年, 12: 1620, ¶ 1625) 设计针对这些靶的多个 siRNA。这些 siRNA 分子中的每一个用于替换在每个前体中存在的所述多个成熟序列, 从而产生多个“缺乏经验的 (naive)”GEiGS 寡核苷酸。使用所述 ViennaRNA Package v2.6 (Lorenz, R. 等人, ViennaRNA Package 2.0, Algorithms for Molecular Biology, 2011 年, 6: 26) 将这些缺乏经验的序列的结构调整至尽可能接近所述野生型前体的结构。调整所述结构后, 计算在所述野生型的寡核苷酸和所述修饰的寡核苷酸之间的多个序列的数量和二级结构的变化。这些计算对于鉴定多个潜在功能性的 GEiGS 寡核苷酸至关重要, 所述多个寡核苷酸相对于所述野生型需要最低程度的序列变化。

[0768] 使用所述 CasOT 软件 (Xiao, A. 等人, Bioinformatics, 2014 年, 30: 1180, ¶ 1182) 产生针对所述多个野生型前体的多个 CRISPR/cas9 小引导 RNA (sgRNA) (参见上表 1B)。选择多个 sgRNA, 其中用于产生所述 GEiGS 寡核苷酸的所述修饰会影响所述 sgRNA 的所述 PAM 区域, 使其对所述修饰的寡核苷酸无效。

[0769] 实例 1B

[0770] 内源性植物基因的基因沉默-PDS

[0771] 为了建立一高通量筛选以使用基因组编辑诱导的基因沉默 (GEiGS) 定量评估内源

性基因沉默,本发明人考虑了几种潜在的视觉标记。本发明人选择集中于涉及色素积累的多个基因,例如,用于编码八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase,PDS)的基因。PDS沉默会导致光致漂白(图2B),这使得可以使用其在基因编辑后作为概念验证(proof-of-concept,POC)用作可靠的幼苗筛选。图2A至2C示出了对本生烟(*N.benthamiana*)和拟南芥(*Arabidopsis*)植物进行PDS沉默的一代表性实验。多个植物示出在具有少量类胡萝卜素的多个植物中观察到的特征性光致漂白表型。

[0772] 在所述POC实验中,选择多个siRNA的步骤如下:

[0773] 为了使用GEiGS应用启动在拟南芥或本生烟中针对所述PDS基因的所述RNAi机制,需要鉴定靶向PDS的有效的21至24bp siRNA。为了找到多个活性的siRNA序列,使用了两种方法:(1)筛选文献:由于PDS沉默在许多植物中是一众所周知的测定方法,因此本发明人正在不同植物中鉴定多个特征化良好的短siRNA序列,这些序列可能与拟南芥或本生烟中的所述基因100%匹配。(2)有许多公开的算法正在用来预测哪种siRNA将对一特定基因启动基因沉默。由于这些算法的所述多个预测不是100%,因此本发明人仅使用了至少两种不同算法的结果的序列。

[0774] 为了使用沉默所述PDS基因的多个siRNA序列,本发明人正在使用所述CRISPR/Cas9系统将它们与一已知的内源性非编码RNA基因序列交换(例如,改变一miRNA序列、改变一长dsRNA序列、产生反义RNA、改变tRNA等)。有许多特征化的非编码RNA的数据库,例如,miRNA;本发明人正在选择几种已知的拟南芥或本生烟的多个内源性非编码RNA,例如,具有不同表达模式的多个miRNA(例如,低构成性表达(constitutive expression)、高表达、应激诱导等)。例如,为了将所述内源性miRNA序列与靶向所述PDS基因的siRNA交换,本发明人正在使用所述HR方法(同源重组(Homologous Recombination))。使用HR,可以考虑两种选择:使用大约250至500nt的一供体ssDNA寡核苷酸序列,其例如包含在中间的所述修饰的miRNA序列,或使用携带1Kb至4Kb插入物的多个质粒,其与在所述植物基因组中附近的所述miRNA几乎100%相同,除了2x 21bp的所述miRNA和所述*miRNA改变为所述PDS的所述siRNA(在所述siRNA上下游500至2000bp,如图1中所示)以外。所述转染包含以下多个构建体:用于追踪和富集多个阳性转化细胞的CRISPR:Cas9/GFP传感器、引导所述Cas9以产生一双链断裂(DSB)(通过取决于所述插入载体/寡核苷酸的HR来修复)的多个gRNA。所述插入载体/寡核苷酸含有围绕所述靶向的基因座的两个连续的同源性区域,所述多个区域被替换(即,miRNA)并被修饰以携带所述感兴趣的突变(即,siRNA)。如果使用质粒,则靶向的构建体包括或不包括多个限制性酶识别位点(restriction enzymes-recognition site),并且用作一同源重组的模板,以所述选择的siRNA替换所述miRNA结束。转染至多个原生质体后,FACS用于富集Cas9/sgRNA转染的事件,多个原生质体再生为多个植物,并对多个漂白的幼苗进行筛选和评分(见图1)。作为对照组,多个原生质体用携带一随机非PDS靶向序列的一寡核苷酸转染。所述多个阳性编辑的植物预期产生靶向PDS的多个siRNA序列,因此,与没有gRNA的所述对照组相比,PDS基因被沉默,幼苗被视为白色。需要注意的是,所述交换后,所述编辑的miRNA仍将作为miRNA被加工,因为保留了所述原始的碱基对外形。然而,所述新编辑的经加工miRNA与所述靶具有很高的互补性(例如,100%),因此,实际上所述新编辑的小RNA将作为siRNA。

[0775] 实例2

[0776] “内源性”转基因的基因沉默-GFP

[0777] 检查GEiGS效率的另一种快速且可靠的方法是通过沉默一转基因,所述转基因也是一种标记基因,例如,GFP(绿色荧光蛋白(green fluorescent protein))。评估所述细胞中所述GFP沉默的有效性有几种简单的方法,例如,FACS分析、PCR以及显微镜检查。为了示出使用GEiGS的GFP沉默的POC,本发明人正在使用稳定表达GFP的一转基因拟南芥或烟草系。来自多个GFP表达植物的多个原生质体与GEiGS方法一起用于修饰内源性非编码RNA,例如,miRNA作为siRNA,有效地来启动靶向所述GFP基因的所述RNA沉默机制。如图3中所示,所述多个阳性编辑的植物预期将沉默GFP表达。此外,多个植物中的GFP沉默特征化良好,且有许多可用的短RNA序列(siRNA)可以用于启动GFP沉默。因此,为了进行基因交换,本发明人正在使用多个公开可获得的工具来产生对GFP特异性的siRNA,或正在使用从文献中可获得的多个已知siRNA分子。

[0778] 为了使用将使所述GFP基因沉默的多个siRNA序列,本发明人使用所述CRISPR/Cas9系统将它们与一已知的内源性非编码RNA(例如,miRNA基因序列)交换,(例如,改变一miRNA序列、改变一长dsRNA序列、产生反义RNA、改变tRNA等)。有许多特征化的非编码RNA的数据库,例如,多个miRNA,本发明人正在选择几种已知的拟南芥或本生烟非编码RNA,例如,具有不同表达模式的多个miRNA(例如,低构成性表达(constitutive expression)、高表达、应激诱导等)。例如,为了将所述内源性miRNA序列与siRNA交换,本发明人正在使用所述HR方法。在HR中,可以考虑两种选择:使用大约250至500nt的一供体寡核苷酸序列,其例如包含在中间的所述siRNA序列,或使用表达1Kb至4Kb插入物的多个质粒,其与在所述植物基因组中附近的所述miRNA几乎100%相同,除了2x 21bp的所述miRNA和所述*miRNA改变为所述GFP的所述siRNA(在所述siRNA上下游500至2000bp,见图1)以外。所述转染包含以下多个构建体:用于追踪和富集多个阳性转化细胞的CRISPR:Cas9/RFP传感器(例如,使用FACS分析)、引导所述Cas9以产生一DSB(通过取决于所述插入载体/寡核苷酸的HR来修复)的多个gRNA。所述插入载体含有围绕所述靶向的基因座的两个连续的同源性区域,所述多个区域被替换(即,miRNA)并被修饰以携带所述感兴趣的突变(即,siRNA)。所述靶向的构建体包括或不包括多个限制性酶识别位点,并且用作一同源重组的模板,以所述选择的siRNA替换所述miRNA结束。转染至多个原生质体后,FACS用于富集阳性转染的事件(使用所述红色荧光蛋白(RFP)标记),在显微镜下对富集的多个原生质体的GFP沉默进行评分(图4)。所述多个阳性编辑的原生质体预期产生靶向GFP的多个siRNA序列,因此,与对照组原生质体相比,所述转基因的GFP表达预期被沉默。GFP是一种比PDS更快的方法,因为不需要最后两个步骤的恢复和再生,可以在所述多个原生质体/细胞水平上进行评分。

[0779] 实例3

[0780] 外源性转基因的基因沉默-拟南芥中的GFP

[0781] 除了GFP沉默的先前实例外,另一种证明GEiGS效率的方法是在一瞬时GFP转化测定中通过沉默一类似GFP(绿色荧光蛋白)的标记基因。在此实例中,使用GEiGS处理多个第一植物细胞(例如,拟南芥)以表达靶向GFP的多个小siRNA分子(利用siGFP的方法在上面实例2中讨论)。然后用分别表达两个标记(传感器)GFP+RFP的一质粒转染对照组原生质体(例如,GEiGS-PDS)和使用GEiGS编辑的原生质体(表达siGFP)。在所述GEiGS处理中仅表达RFP但不表达GFP的多个原生质体是由于siGFP表达而导致GFP沉默的结果(如图5中所示)。

[0782] 实例4

[0783] 对病毒感染免疫的植物,外源性病毒基因的沉默(使用GFP作为标记)

[0784] 为了证明GEiGS是具有敲除多个外源性基因能力的植物免疫的一可靠方法,本发明人提供了沉默一病毒基因的一实例。有多种病毒可以感染不同的植物物种,且可以在当前的POC中使用:TuMV、CMV、TMV等。

[0785] 芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)是通过蚜虫的非持续性传播,且在世界许多地方引起十字花科作物的流行性疾病。TuMV基因组是单链、大约10,000nt的一正义(positive-sense)RNA分子(登录号:NC_002509)。TuMV具有与Urcuqui-Inchima等人先前讨论的典型的马铃薯Y病毒(potyvirus)基因组织(Urcuqui-Inchima等人, *Virus Res.*, 2001年, 74:157至175)。TuMV的症状是广泛、黄色、圆形以及不规则区域的斑点。最老的叶子通常变成到处都是亮黄色。叶片(lamina)常常坏死。广泛使用TuMV-GFP和抑制缺陷型TuMV-AS9-GFP以在拟南芥中暴露抗病毒沉默活性。多个野生型植物对TuMV-AS9-GFP免疫,但通过DCL2和DCL4的丢失而使免疫被有效地抑制,这表明TuMV通常掩盖一siRNA依赖性抗病毒反应的作用(Hernan Garcia-Ruiz等人, *The Plant Cell*, 2010年, 22:481至496)。

[0786] 黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)是雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)家族的一植物病原病毒。它是植物病毒属黄瓜花叶病毒属(Cucumovirus)的类型成员。此病毒分布在世界各地,且宿主范围非常广泛。实际上,它以拥有任何已知植物病毒中宿主范围最广而闻名。它可以通过树液和通过蚜虫以一口针带毒(stylet-borne)的方式在植物之间机械地传播。此病毒最早于1934年在表现出花叶病症状的黄瓜(小黄瓜(*Cucumis sativus*))中发现,因此被称为黄瓜花叶病。开发了一基于CMV表达的表达载体,所述表达载体利用所述突变体3a MP进行CP无关的(CP-independent)细胞间移动。将此新载体(Fujiki等人, *Virology*, 2008年, 381(1):136至142)整合至一农杆菌二元载体中并通过农杆菌渗入(agroinfiltration)递送至多个植物中。结果表明,此种新颖的基于CMV的表达载体对于重组蛋白生产具有广阔的应用前景。

[0787] 烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)是一单链RNA病毒,通常会感染茄科植物(solanaceous plant),所述茄科植物是一种植物家族,其中包含矮牵牛(petunia)、西红柿以及烟草等许多物种。所述病毒在多个叶片的表面形成多个褐色斑点的一马赛克图案(mosaic pattern)。所述病毒通常不会导致所述植物死亡,但可能会严重阻碍其生长。在炎热和干燥的天气中,较低的叶片可能会遭受“马赛克烧伤(mosaic burn)”,大面积的叶片会死亡。此病毒不能自行进入多个植物中。多个植物通常是通过人类处理后的多个植物伤口或通过受污染的设备而感染。一旦进入所述植物,所述病毒会释放其遗传密码(RNA)。通过此密码使所述植物感到困惑,误以为是它自己的,并开始产生多个病毒蛋白。植物中基于病毒的表达系统相对于替代性瞬时表达系统而言具有特别的吸引力,这是因为其高水平的基因增殖和在一短时间内可同时达到较高的表达水平,同时最大程度地降低对宿主活动的损害。TMV是研究最广泛的多种植物病毒之一,因此已成为载体开发的一自然选择。多个基于TMV的载体引起的重组蛋白产量高达总可溶性蛋白的80%。农杆菌感染(Agroinfection)是一种廉价且可重现的方法,使其成为将多个病毒表达载体作为通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)携带的一二元载体的所述T-DNA的一部分递送至所述多个植物组织的一优选的方法。

[0788] 本发明人使用TuMV-GFP用于拟南芥的感染或使用TMV-GFP用于多种烟草植物。为了产生抗病毒感染的多个植物,本发明人使用了在植物感染后表达GFP的一工程病毒。使用这一种病毒将能够使用与以上实例3中所述相同的构建体。区别在于现在所述GFP是由所述病毒感染表达的。感染了病毒GFP(CMV或TMV)的对照组植物在显微镜下示出GFP的表达(图6),然而,经工程改造为表达siRNA GFP的多个GEiGS植物预期示出的GFP水平降低(图6)。因此,用病毒-GFP感染后产生没有GFP表达的多个GEiGS植物将证明实现了外源性基因的RNAi沉默,且GEiGS是一种使多个植物对病毒和其他潜在病原体免疫的有效方法。评估所述细胞中所述GFP沉默的有效性有几种简便的方法,例如,使用FACS分析、PCR以及显微镜检查。多个植物中的GFP沉默特征化良好,且有许多可用的短RNA序列(siRNA)在启动GFP沉默中具有活性。因此,为了进行基因交换,本发明人使用了从文献中可获得的几种已知的siRNA分子。

[0789] 为了使用将使所述GFP基因沉默的多个siRNA序列,本发明人使用所述CRISPR/Cas9系统将它们与一已知的内源性非编码RNA(例如,miRNA基因序列)交换,(如上所述,引入这些siRNA序列还有许多其他选择,例如,改变多个长dsRNA序列、产生反义RNA、改变tRNA等)。有许多特征化的内源性非编码RNA的数据库,例如,多个miRNA,本发明人正在选择几种已知的拟南芥或本生烟非编码RNA,例如,具有不同表达模式的多个miRNA(例如,低构成性表达(constitutive expression)、高表达、应激诱导等)。例如,为了将所述内源性miRNA序列与siRNA交换,本发明人正在使用所述HR方法。在HR中,可以考虑两种选择:使用大约250至500nt的一供体寡核苷酸序列,其例如包含在中间的所述siRNA序列,或使用表达1Kb至4Kb插入物的多个质粒,其与在所述植物基因组中附近的所述miRNA几乎100%相同,除了2x 21bp的所述miRNA和所述*miRNA改变为所述GFP的所述siRNA(在所述siRNA上下游500至2000bp,见图1)以外。所述转染包含以下多个构建体:用于追踪和富集多个阳性转化细胞的CRISPR:Cas9/RFP传感器(例如,使用FACS分析)、引导所述Cas9以产生一DSB(通过取决于所述插入载体/寡核苷酸的HR来修复)的多个gRNA。所述插入载体含有围绕所述靶向的基因座的两个连续的同源性区域,所述多个区域被替换(即,miRNA)并被修饰以携带所述感兴趣的突变(即,siRNA)。所述靶向的构建体包括或不包括多个限制性酶识别位点,并且用作一同源重组的模板,以所述选择的siRNA替换所述miRNA结束。转染至多个原生质体后,FACS用于富集阳性转染的事件,多个原生质体再生为多个植物,且多个植物通过机械接种(inoculation)感染病毒。在显微镜下对多个植物的GFP沉默进行评分(如图6中所示)。带有GEiGS的所述多个阳性编辑的原生质体预期产生靶向GFP的多个siRNA序列,因此,与对照组未编辑的植物相比,所述病毒GFP基因表达预期被沉默。

[0790] 实例5

[0791] 抗线虫的香蕉植物

[0792] 线虫对香蕉生产力的危害是巨大的,在未经处理的土壤中,高达产量损失的50%。在传统的香蕉种植园中,单一种植(mono cropping)是一种常见的做法,这一问题更加突出。在世界各地禁止诸如甲基溴(methyl bromide)等杀线虫剂(nematicide)加剧了这一问题,并给农民留下了不适当和不可靠的替代品。香蕉穿孔线虫(Radopholus similis)(所述穿孔线虫(burrowing nematode))是世界上香蕉中经济最重要的线虫寄生虫。穿孔线虫的感染会导致香蕉倒伏病(toppling disease)、辣椒黄化病以及柑橘扩散性衰退病(spreading decline)。这些疾病是穿孔线虫感染破坏根部组织的结果,致使多个植物几乎

没有支撑或吸收水分和转移养分的能力。由于它对全世界的柑橘、观赏植物(ornamentals)以及其他农业产业造成破坏,因此穿孔线虫是最受管制的线虫植物害虫之一(图7)。

[0793] RNA干扰(RNAi)已成为一种在各种生物中进行功能分析的极有用的基因沉默工具,尤其是自由生活模式的线虫秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)。越来越多的研究描述了其在植物寄生线虫中的应用。当多个线虫吸收引起一系统性RNAi反应的多个双链RNA(dsRNA)或短干扰RNA(siRNA)时,在多种细胞类型中表达的基因被沉默。秀丽隐杆线虫的广泛siRNA研究表明,成功地阻止线虫完成其生命周期的原因是在胚胎发育早期表达的多个沉默基因。在香蕉穿孔线虫中,这些候选基因可能是钙网硬蛋白(Calreticulin13, CRT)或所述基因胶原蛋白5(col-5)。CRT是一种Ca²⁺结合的多功能蛋白,在许多动物寄生虫和植物线虫的寄生虫、免疫逃避(immune evasion)、繁殖以及发病机制中起关键作用。因此,CRT是控制香蕉穿孔线虫一有希望的靶。Col-5属于线虫的所述多个胶原蛋白基因,其用于编码具有多种功能的蛋白质。其中他们最丰富的产品是表皮胶原蛋白(cuticular collagen),其包含在线虫表皮中约80%的蛋白质。迄今为止,已发现这些胶原蛋白的结构在自由生活方式中与在寄生线虫物种中极为相似,且用于编码它们的所述多个基因似乎构成了一庞大的多基因家族,其表达受发育调节。

[0794] 通过利用GEiGS,本发明人创造了表达多个siRNA分子的多个香蕉植物,所述多个siRNA分子在进食时从其多个根部传递至多个线虫,随后诱导多个线虫基因沉默。生命周期中连续必不可少的多个基因的沉默抑制了线虫的繁殖并消除了通过多个线虫引起的危害。本发明人正在改变一些香蕉内源性非编码RNA,例如,具有来自所述CRT或所述col-5基因的多个短序列的多个miRNA序列。GEiGS用于多个香蕉原生质体,其再生为多个植株,然后用不同的线虫进行抗性筛选。

[0795] 实例6

[0796] 香蕉植物对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性

[0797] 所述镰刀菌(*Fusarium*)属包含几种真菌种,广泛分布于世界各地的土壤和有机基质中。尖孢镰刀菌是此属中最相关的物种之一,并且是100多种植物物种中的根腐病、枯萎病(damping-off)以及落叶病(wilt disease)的致病病原,包含多种经济上重要的园艺作物、花卉、树木以及一些田间作物(例如,甘蓝、香蕉以及棉花)。尖孢镰刀菌是一种毁灭性的病原体,其在多种作物中造成大量的产量损失,因此发展可持续的、环境友好的方法以提高作物抗性是至关重要的。尖孢镰刀菌是由其主要宿主植物确定的120多种特殊形式的致病菌株组成。所有的尖孢镰刀菌菌株都是腐生的(saprophytic),能够在土壤中的有机物上生长并存活很长时间,因此很难控制。它的致病性生命周期从识别一合适宿主后开始孢子萌发(spore germination)。一旦形成菌丝,所述病原体通过直接地穿透所述多个根部进入其宿主,并通过产生导致菌丝体形成的小分生孢子(microconidia)在木质部内定植(colonize)。通过所述病原体的定植和毒素产生导致所述宿主脉管系统阻塞,引起多个特征性疾病症状,包含叶脉和叶片中的脉管系统黄化、脉露病(vein clearing)、缺绿病(chlorosis)以及坏死、叶片脱落和枯萎。所述植物死亡后,所述真菌在腐烂的叶片表面形成孢子(sporulate)。尖孢镰刀菌在热带和亚热带地区最为普遍,由于气候变化,预计其地理范围将扩大。由于宿主范围大且在土壤中的持久性,目前对枯萎病(*Fusarium wilt*)的控制方法非常有限,轮作法(crop rotation)无效。枯萎病的处理手段主要通过文化习俗和农

场卫生来进行,这仅能减少接种物的传播,而土壤灭菌仅能在温室中进行。使用广谱生物杀灭剂(biocide)(例如,甲基溴)进行土壤熏蒸(soil fumigation)是昂贵的,且对环境具有许多危害。

[0798] Hu z.已使用宿主传递的RNA干扰技术部分地沉默半活养寄生的(hemi-biotrophic)真菌甘蓝黄叶病菌(*F.oxysporum f.sp.Conglutinans*)中的3个不同基因(FOW2、FRP1以及OPR)(Hu等人,Front Chem.,2015年,20(3):1)。在许多转基因拟南芥株系中实现了靶向多个真菌病原体基因的多个双链RNA(dsRNA)分子的表达。感染所述多个转基因株系的尖孢镰刀菌在所有3个靶向的基因上均显示出显著降低的mRNA水平,FOW2、FRP1以及OPR分别平均降低了75%、83%以及72%。多个病原体基因的沉默对所述转基因株系抵抗感染的能力具有一明显的正向影响。所有转基因株系对尖孢镰刀菌均表现出增强的抗性,并延缓了疾病症状的发展,尤其是FRP1和OPR株系。真菌感染后,所述多个转基因株系的存活率高于对照组野生型株系植物,后者始终显示出10%的存活率,而FOW2株系显示出25%的存活率;FRP1株系的存活率为30至50%,OPR的存活率为45%至70%之间。所述下调作用对所述多个靶向基因是特异性的,而在多个相关基因中没有非预期作用(Hu Z.,2015年,同上)。结果表明,在真菌中,长dsRNA和短dsRNA均被内化并诱导RNAi以沉默多个靶基因。

[0799] 本发明人正在利用GEiGS来通过改变少量的内源性非编码RNA(例如,多个miRNA序列,以特异性地靶向所述多个真菌基因,例如,FOW2、FRP1以及OPR)来产生对尖孢镰刀菌具有抗性的香蕉植物。将多个经编辑的原生质体再生为多个植株,并在一受控环境中用尖孢镰刀菌攻击,验证抗性植物表达所述相关的siRNA。

[0800] 实例7

[0801] 咖啡树对线虫的抗性

[0802] 咖啡是开花植物的一种,其种子被称为咖啡豆,用于制作各种咖啡饮料和产品。它是茜草科(Rubiaceae)的成员。它们是原生于热带和南部非洲以及热带亚洲的灌木或小乔木。咖啡被认为是世界上最价值和交易最广泛的商品作物之一,且是包含中南美、南美、加勒比海以及非洲在内的多个国家的重要出口产品。咖啡产量的持续下降归因于生物和社会经济方面的限制。在研究较少的生物限制因素中有线虫。

[0803] 在世界上,尤其是在越南,植物寄生线虫被认为是对咖啡生产的一严重限制(图8)。优势且最重要的物种是阿拉伯咖啡穿孔线虫(*Radopholus arabocoffeae*)和咖啡根腐线虫(*Pratylenchus coffeae*)。这两种物种是使5年以下的植物死亡的原因。传统上,控制咖啡根腐线虫的主要方法是通过化学手段,但没有针对阿拉伯咖啡穿孔线虫的特定控制策略。

[0804] 本发明人正在利用GEiGS策略(如以上实例5中所述)来创建表达多个siRNA分子的多个中果咖啡(*Coffea canephora*)(罗布斯塔(Robusta))树,所述多个siRNA分子在进食时从其多个根部传递至多个线虫,随后诱导多个线虫基因沉默。生命周期中连续必不可少的多个基因的沉默抑制了线虫的繁殖并消除了通过多个线虫引起的危害。因此,本发明人正在改变一些内源性非编码RNA,例如,具有来自所述多个线虫基因的多个短序列的多个miRNA序列RNA。GEiGS用于多个咖啡原生质体,其再生为多个植株,然后用不同的线虫进行抗性筛选。

[0805] 实例8

[0806] 产生具有修饰的内源性miRNA以靶向不同基因的植物

[0807] 一miRNA的所述基因组基因座中的最低程度的修饰(在其识别序列中)(其将成熟为一miRNA)可以导致以一非转基因方式调节多个新基因的一新系统。因此,使用一无农杆菌的瞬时表达方法,以通过轰击多个拟南芥根引入这些修饰,并对其再生进行进一步分析。本发明人已选择靶向拟南芥植物中的两个基因PDS3和ADH1。

[0808] 类胡萝卜素在多个植物中的许多生理过程中起着重要作用,而八氢番茄红素脱氢酶基因(PDS3)编码所述类胡萝卜素生物合成途径中多个重要酶中的一个,其沉默产生一白化/漂白表型。因此,PDS3表达降低的多个植物表现出降低的叶绿素水平,直至完全的白化病和矮化症。

[0809] 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH1)包括一组脱氢酶,其催化多个醇与多个醛或多个酮之间的相互转化,同时降低NAD⁺或NADP⁺。此酶的主要代谢目的是分解多个组织内的酒精性有毒物质。ADH1表达降低的多个植物表现出对烯丙醇的耐受性增加。因此,ADH1降低的植物对烯丙醇的所述毒性作用具有抗性,因此它们的再生是通过烯丙醇选择进行的。

[0810] 选择了两个已经成熟的miRNA进行修饰,即miR-173和miR-390,其先前已被证明在整个植物发育过程中都有表达(Zielezinski A等人,BMC Plant Biology,2015年,15:144)。为了引入所述修饰,使用了一2组成部分的系统。首先,使用所述CRISPR/CAS9系统,通过设计的多个特异性引导RNA(图12A和13A;以及上表2)在所述miR-173和miR-390基因座中产生一剪切,以促进在所述位点中的同源DNA修复(HDR)。其次,引入一供体序列(具有所述miRNA序列所需要的修饰)作为用于所述HDR的一模板,以靶向新分配的多个基因(图12A至12G、13A至13G、14A至14D以及15A至15D;上表2)。此外,由于所述miRNA的所述初级转录本(pri-miRNA)的所述二级结构对于所述成熟miRNA的正确生物发生和活性很重要,因此进一步修饰引入所述pri-miRNA中的所述互补链中,并在mFOLD中进行分析([www\(dot\)unafold\(dot\)rna\(dot\)Albany\(dot\)edu](http://www(dot)unafold(dot)rna(dot)Albany(dot)edu)),以用于结构保护(图12A至12G和13A至13G)。总共为每个miRNA基因座设计了两个引导,且为每个基因设计了两个不同的供体序列(修饰的miRNA序列)(图14A至14D和15A至15D,以及上表2)。

[0811] 实例9

[0812] 轰击和植物再生

[0813] 将多个GEiGS构建体轰击至多个预先制备的根中(如上文材料和实验步骤部分中详细讨论的)并进行再生。通过多个PDS3转化体(transformant)的漂白表型和多个ADH1转化体在烯丙醇处理下的存活率筛选多个植株。为了验证交换与不进行交换(即,保留野生型)相比,随后通过跨越所述修饰区域的多个特异性引物的插入对这些植物进行筛选,然后进行限制性酶切(图16)。

[0814] 实例10

[0815] 表型选择的基因型验证

[0816] 如上所述,使用众所周知的表型性状、八氢番茄红素脱氢酶(PDS3)以及乙醇脱氢酶(ADH1)作为多个靶,建立了所述基因编辑系统的概念验证(proof-of-concept,POC)。

[0817] 如上所述,ADH1表达降低的多个植物表现出对烯丙醇的耐受性增加。因此,在含有30mM烯丙醇的培养基中再生经轰击的植物(经修饰的miRNA以靶向ADH1),并将其与对照组

植物的再生速率进行比较。与在烯丙醇培养基上的51个对照组植物相比,有118个GEiGS#3+SWAP11烯丙醇选择的植物存活(数据未显示)。在所选的GEiGS#3+SWAP11中,有5个显示包含所述供体(数据未显示)。在所述多个供体处理的植物中,再生大量的植物也可能是由于所述轰击过程中的瞬时表达所致。

[0818] 因此,分别通过漂白表型(图16)和烯丙醇选择(图17)进行PDS3和ADH1选择,为转化植株的基因分型选择提供了理想的方法。

[0819] 主要通过多个内部引物和原始野生型的特异性扩增子分化(通过限制性内切酶酶切变异的插入)来评估4kb的交换区域。

[0820] ADH1(图17)示出了,当与限制性和非限制性供体质粒相比时,烯丙醇选择的植物具有预期的供体存在限制模式的一比较基因型。PDS3(图16)示出了,当与限制性和非限制性供体质粒相比时,具有和不具有供体的多个轰击样品表型及其各自的差异性限制性内切酶酶切模式的比较。这些结果提供了PDS3白化/漂白表型与预期的限制模式的明确关联。随后进行了外部PCR,将所述交换区域内的特定内部与外部引物(在所述基因组区域外部且特定于所述基因组区域)结合在一起,以进行交换(数据未显示)。为了评估杂合子、纯合子或供体交换的存在,通过所述多个PCR扩增子的Sanger测序获得了所述交换的进一步验证(数据未显示)。

[0821] 实例11

[0822] 修饰的miRNA减少其新靶基因的所述表达

[0823] 为了验证所述GEiGS系统中所述多个修饰的miRNA下调其新指定的多个靶的表达的潜力,使用qRT-PCR(定量实时PCR)进行基因表达分析。从所述阳性鉴定的多个再生植物中提取RNA并进行反转录,并与多个再生植物进行比较,平行处理,但未引入相关的多个修饰构建体。在将miR-173修饰为靶向PDS3(GEiGS#4+SWAP4)的情况下,平均观察到所述基因表达水平降低了83%(图18)。在将miR-390修饰为靶向ADH1(GEiGS#3+SWAP11)的植物中,观察到类似的基因表达变化,占对照组植物水平的82%(图19)。综上所述,这些结果通过替换所述内源性基因座中所述miRNA转录物中的所述靶识别序列,证实了修饰多个内源性miRNA以成功地靶向多个新基因并降低其表达的所述多个基因编辑方法。

[0824] 尽管已经结合本发明的特定实施例来描述本发明,但是显然地,对于本领域技术人员而言,许多替代、修改及变化将是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求书的精神及广泛范围内的所有这样的替代、修改及变化。

[0825] 本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请都通过引用整体并入本文,其程度与好像每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地及单独地指示通过引用并入本文的程度相同。此外,在本申请中对任何参考文献的引用或标识均不应解释为承认所述参考文献可作为本发明的现有技术。在使用章节标题的程度上,不应将其解释为必然的限制。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 热带生物科学英国有限公司
- [0003] 艾尔, 毛利
- [0004] 亚伦, 盖伦提
- [0005] 克里斯蒂娜, 皮诺奇
- [0006] 安吉拉, 查帕罗, 加西亚
- [0007] 奥菲尔, 梅尔
- [0008] <120> 修饰用于沉默基因表达的植物非编码RNA分子的特异性的方法
- [0009] <130> 74277
- [0010] <150> Great Britain 1715113.5
- [0011] <151> 2017-09-19
- [0012] <150> Great Britain 1715116.8
- [0013] <151> 2017-09-19
- [0014] <150> Great Britain 1719516.5
- [0015] <151> 2017-11-23
- [0016] <160> 417
- [0017] <170> PatentIn version 3.5
- [0018] <210> 1
- [0019] <211> 23
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> Arabidopsis thaliana
- [0022] <400> 1
- [0023] ctatccatcc tgagtttcat tgg 23
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 23
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> Arabidopsis thaliana
- [0028] <400> 2
- [0029] aagaatctgt aaagctcagg agg 23
- [0030] <210> 3
- [0031] <211> 23
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> Arabidopsis thaliana
- [0034] <400> 3
- [0035] cttgcagaga gaaatcacag tgg 23
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 23
- [0038] <212> DNA
- [0039] <213> Arabidopsis thaliana
- [0040] <400> 4
- [0041] gcttacacag agaatcacag agg 23

[0042] <210> 5
 [0043] <211> 400
 [0044] <212> DNA
 [0045] <213> Artificial sequence
 [0046] <220>
 [0047] <223> Oligo-1: GEiGS_mir173_si-GFP_1
 [0048] <400> 5
 [0049] gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc 60
 [0050] tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttctttctact gatctttctc tcacaaataa 120
 [0051] acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact taagtcgtgc tgcttcatgt 180
 [0052] ggagtggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctctccaca taagcaggac 240
 [0053] gagttaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt 300
 [0054] aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca 360
 [0055] ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg 400
 [0056] <210> 6
 [0057] <211> 400
 [0058] <212> DNA
 [0059] <213> Artificial sequence
 [0060] <220>
 [0061] <223> Oligo-2: GEiGS_mir173_si-GFP_2
 [0062] <400> 6
 [0063] gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc 60
 [0064] tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttctttctact gatctttctc tcacaaataa 120
 [0065] acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact tagttgtact ccagcttggtg 180
 [0066] ccagtggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctctggcaa agctgcagta 240
 [0067] caactaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt 300
 [0068] aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca 360
 [0069] ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg 400
 [0070] <210> 7
 [0071] <211> 400
 [0072] <212> DNA
 [0073] <213> Artificial sequence
 [0074] <220>
 [0075] <223> Oligo-3: GEiGS_mir173_si-PDS_1
 [0076] <400> 7
 [0077] gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc 60
 [0078] tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttctttctact gatctttctc tcacaaataa 120
 [0079] acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact ttatccacac aaactacctg 180
 [0080] caagtggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctcttgacag tagttagtgt 240
 [0081] ggataaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt 300
 [0082] aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca 360
 [0083] ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg 400

[0084] <210> 8
 [0085] <211> 400
 [0086] <212> DNA
 [0087] <213> Artificial sequence
 [0088] <220>
 [0089] <223> Oligo-4: GEiGS_mir173_si-PDS_2
 [0090] <400> 8
 [0091] gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc 60
 [0092] tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa 120
 [0093] acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact ttgacaatcc agccaatcca 180
 [0094] gcagtggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctctgctga ttggcaggat 240
 [0095] tgtcaaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt 300
 [0096] aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca 360
 [0097] ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg 400
 [0098] <210> 9
 [0099] <211> 400
 [0100] <212> DNA
 [0101] <213> Artificial sequence
 [0102] <220>
 [0103] <223> Oligo-5: GEiGS_mir390a_si-GFP_1
 [0104] <400> 9
 [0105] agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc 60
 [0106] tcttctcctt cttctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt 120
 [0107] atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta aagtcgtgct 180
 [0108] gcttcatgtg gatgatgatc acattcggtt tctatTTTTT ccacatgaag aagcacgact 240
 [0109] tgattggctc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag 300
 [0110] aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc 360
 [0111] tcttttggtt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa 400
 [0112] <210> 10
 [0113] <211> 400
 [0114] <212> DNA
 [0115] <213> Artificial sequence
 [0116] <220>
 [0117] <223> Oligo-6: GEiGS_mir390a_si-GFP_2
 [0118] <400> 10
 [0119] agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc 60
 [0120] tcttctcctt cttctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt 120
 [0121] atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta agttgtactc 180
 [0122] cagcttggtc catgatgatc acattcggtt tctatTTTTT ggcacaagct tgagtacaac 240
 [0123] tgattggctc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag 300
 [0124] aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc 360
 [0125] tcttttggtt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa 400

[0126] <210> 11
 [0127] <211> 400
 [0128] <212> DNA
 [0129] <213> Artificial sequence
 [0130] <220>
 [0131] <223> Oligo-7: GEiGS_mir390a_si-PDS_1
 [0132] <400> 11
 [0133] agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc 60
 [0134] tcttctcctt cttcctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt 120
 [0135] atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tatccacaca 180
 [0136] aactacctgc aatgatgac acattcgta tctatttttt tgcaggtagt gtgtgtggat 240
 [0137] agattggtc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag 300
 [0138] aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc 360
 [0139] tcttttgttt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa 400
 [0140] <210> 12
 [0141] <211> 400
 [0142] <212> DNA
 [0143] <213> Artificial sequence
 [0144] <220>
 [0145] <223> Oligo-8: GEiGS_mir390a_si-PDS_2
 [0146] <400> 12
 [0147] agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc 60
 [0148] tcttctcctt cttcctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt 120
 [0149] atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tgacaatcca 180
 [0150] gccaatccag catgatgac acattcgta tctatttttt gctggattgg atggattgtc 240
 [0151] agattggtc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag 300
 [0152] aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc 360
 [0153] tcttttgttt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa 400
 [0154] <210> 13
 [0155] <211> 1005
 [0156] <212> DNA
 [0157] <213> Artificial sequence
 [0158] <220>
 [0159] <223> CaMV-35S-promoter nucleic acid sequence
 [0160] <400> 13
 [0161] tttggagagg acaggcttct tgagatcctt caacaattac caacaacaac aaacaacaaa 60
 [0162] caacattaca attactattht acaattacag tcgactctag aggatccatg gtgagcaagg 120
 [0163] gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcttggtcga gctggacggc gacgtaaacg 180
 [0164] gccacaagtt cagcgtgaga ggcgaggcgc agggcgatgc caccaacggc aagctgaccc 240
 [0165] tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccaccc 300
 [0166] tgacctacgg cgtgcagtgc ttacagcgtc accccgacca catgaagcag cagcacttct 360
 [0167] tcaagtccgc catgcccga ggtacgtcc aggagcgcac catctctttc aaggacgacg 420

[0168] gcacttacaa gacccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctgggtg aaccgcatcg 480
 [0169] agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca 540
 [0170] acttcaacag ccacaacgtc tatatcactg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggcca 600
 [0171] acttcaagat ccgccacaac gttgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc 660
 [0172] agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc 720
 [0173] agtccgttct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg 780
 [0174] tgaccgccgc cgggatcact ctcggcattg acgagctgta caagtaaagc ggccgcccgg 840
 [0175] ctgcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc 900
 [0176] ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacaatg 960
 [0177] aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcc 1005
 [0178] <210> 14
 [0179] <211> 855
 [0180] <212> DNA
 [0181] <213> Artificial sequence
 [0182] <220>
 [0183] <223> NOS terminator nucleic acid sequence
 [0184] <400> 14
 [0185] gctcgtccat gccgagagtg atcccggcgg cggtcacgaa ctccagcagg accatgtgat 60
 [0186] cgcgcttctc gttggggctc ttgctcagaa cggactgggt gctcaggtag tggttgtcgg 120
 [0187] gcagcagcac ggggccgtcg ccgatggggg tgttctgctg gtagtggtcg gcgagctgca 180
 [0188] cgctgccgtc ctcaacgttg tggcggtatc tgaagttggc cttgatgccg ttcttctgct 240
 [0189] tgtcggcagt gatatagacg ttgtggctgt tgaagttgta ctccagcttg tgccccagga 300
 [0190] tggtgccgtc ctcttgaag tcgatgccct tcagctcgat gcggttcacc aggggtgtcg 360
 [0191] cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt aagtgccgtc gtccttgaag gagatggtgc 420
 [0192] gtccttgac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc ttcatgtggt 480
 [0193] cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtcagggt ggtcacgagg gtgggccagg 540
 [0194] gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt cagcttgccg ttggtggcat 600
 [0195] cgccctcgcc ctgcctctc acgtgaact tgtggccgtt tacgtcgccg tccagctcga 660
 [0196] ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct ctcgccctt gtcaccatg gatectctag 720
 [0197] agtcgactgt aattgtaaat agtaattgta atgttgttg ttgtttgtg ttgttggtaa 780
 [0198] ttgttgaagg atctcaagaa gcctgtcctc tccaaatgaa atgaacttcc ttatatagag 840
 [0199] gaagggtctt gcgaa 855
 [0200] <210> 15
 [0201] <211> 215
 [0202] <212> DNA
 [0203] <213> Artificial sequence
 [0204] <220>
 [0205] <223> CaMV-35S terminator nucleic acid sequence
 [0206] <400> 15
 [0207] cgctctgtca tcgttacaat caacatgcta ccctccgca gatcatccgt gtttcaaacc 60
 [0208] cggcagctta gttgccgttc ttccgaatag catcggtaac atgagcaaag tctgccgct 120
 [0209] tacaacggt ctcccgtga cgccgtccc gactgatggg ctgcctgtat cgagtgtgta 180

[0210] ttttgtgccg agctgccggt cggggagctg ttggc 215
 [0211] <210> 16
 [0212] <211> 216
 [0213] <212> DNA
 [0214] <213> Artificial sequence
 [0215] <220>
 [0216] <223> G7-ter nucleic acid sequence
 [0217] <400> 16
 [0218] gatcccccgt cgacagctag ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tategcactc 60
 [0219] agtctttcat ctacggcaat gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat 120
 [0220] ttaaaacttgc atcaataaat ttatgttttt gcttggacta taataacctga cttgttattt 180
 [0221] tatcaataaa tatttaaact atatttcttt caagat 216
 [0222] <210> 17
 [0223] <211> 516
 [0224] <212> DNA
 [0225] <213> Artificial sequence
 [0226] <220>
 [0227] <223> CsVMV promoter nucleic acid sequence
 [0228] <400> 17
 [0229] ccagaaggta attatccaag atgtagcatc aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg 60
 [0230] gaagtattat gtaagctcag caagaagcag atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt 120
 [0231] tcaaaaatga agaattgaca gatacaagat cctatactgc cagaatacga agaagaatac 180
 [0232] gtagaaattg aaaaagaaga accaggcgaa gaaaagaatc ttgatgacgt aagcactgac 240
 [0233] gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctg gtgattgtga aagagacata gaggacacat 300
 [0234] gtaagggtga aatgtaagg gcgaaagta accttatcac aaaggaatct tatccccac 360
 [0235] tacttatect tttatatatt tccgtgtcat ttttgcctt gagttttcct atataaggaa 420
 [0236] ccaagttcgg catttgtgaa aacaagaaaa aatttgggtg aagctatttt ctttgaagta 480
 [0237] ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa gtttgt 516
 [0238] <210> 18
 [0239] <211> 636
 [0240] <212> DNA
 [0241] <213> Arabidopsis thaliana
 [0242] <400> 18
 [0243] gtcgacgagt cagtaataaa cggcgtcaaa gtggttgcag ccggcacaca cgagtcgtgt 60
 [0244] ttatcaactc aaagcacaaa tacttttcct caacctaaaa ataaggcaat tagccaaaaa 120
 [0245] caactttgcg tgtaaacac gctcaatata cgtgtcattt tattattagc tattgcttca 180
 [0246] ccgccttagc tttctcgtga cctagtcgtc ctcgtctttt cttcttcttc ttctataaaa 240
 [0247] caatacccaa agagctcttc ttcttcacaa ttcagatttc aatttctcaa aatcttaaaa 300
 [0248] actttctctc aattctctct accgtgatca aggtaaattt ctgtgttcct tattctctca 360
 [0249] aaatcttcga ttttgttttc gttcgatccc aatttcgtat atgttctttg gtttagattc 420
 [0250] tgtaaatctt agatcgaaga cgattttctg ggtttgatcg ttagatatca tcttaattct 480
 [0251] cgattagggt ttcatagata tcatccgatt tgttcaaata atttgagttt tgtcgaataa 540

[0252] ttactcttcg atttgtgatt tctatctaga tctggtgta gtttctagtt tgtgcgatcg 600
 [0253] aatttctaga ttaatctgag tttttctgat taacag 636
 [0254] <210> 19
 [0255] <211> 4140
 [0256] <212> DNA
 [0257] <213> Artificial sequence
 [0258] <220>
 [0259] <223> pco_Cas9_NLS nucleic acid sequence
 [0260] <400> 19
 [0261] atggataaga agtactctat cggactcgat atcggaaacta actctgtggg atgggctgtg 60
 [0262] atcaccgatg agtacaaggt gccatctaag aagttcaagg ttctcggaaa caccgatagg 120
 [0263] cactctatca agaaaaacct tatcgggtgct ctctcttcg attctggtga aactgctgag 180
 [0264] gctaccagac tcaagagaac cgctagaaga aggtacacca gaagaaagaa caggatctgc 240
 [0265] tacctccaag agatcttctc taacgagatg gctaaagtgg atgattcatt cttccacagg 300
 [0266] ctccaagagt cattctcgt ggaagaagat aagaagcacg agaggcaccc tatcttcgga 360
 [0267] aacatcggtg atgaggtggc ataccacgag aagtacccta ctatctacca cctcagaaag 420
 [0268] aagctcggtg attctactga taaggctgat ctgaggtca tctacctgc tctcgctcac 480
 [0269] atgatcaagt tcagaggaca cttctcctc gaggggtgatc tcaacctga taactctgat 540
 [0270] gtggataagt tgttcatcca gctcgtgcag acctacaacc agcttttcga agagaacct 600
 [0271] atcaacgctt caggtgtgga tgctaaggct atcctctctg ctaggctctc taagtcaaga 660
 [0272] aggcttgaga acctcattgc tcagctccct ggtgagaaga agaacggact ttctcgaaac 720
 [0273] ttgatcgctc tctctctcgg actcaccct aacttcaagt ctaacttga tctcgctgag 780
 [0274] gatgcaaagc tccagctctc aaaggatacc tacgatgatg atctcgataa cctcctcgct 840
 [0275] cagatcgag atcagtacgc tgatttgttc ctgctgcta agaacctctc tgatgctatc 900
 [0276] ctctcagtg atatctcag agtgaacacc gagatcacca aggtccact ctgagcttct 960
 [0277] atgatcaaga gatacgatga gcaccaccag gatctcacac ttctcaagc tcttggttaga 1020
 [0278] cagcagctcc cagagaagta caaagagatt ttcttcgatc agtctaagaa cggatacgct 1080
 [0279] ggttacatcg atggtggtgc atctcaagaa gagttctaca agttcatcaa gcctatctc 1140
 [0280] gagaagatgg atggaaccga ggaactctc gtgaagetca atagagagga tcttctcaga 1200
 [0281] aagcagagga cttcgataa cggatctatc cctcatcaga tccacctcg agagttgcac 1260
 [0282] gctatcctta gaaggcaaga ggatttctac ccattcctca aggataacag ggaaaagatt 1320
 [0283] gagaagattc tcacctcag aatcccttac tacgtgggac ctctcgctag aggaaactca 1380
 [0284] agattcgctt ggatgaccag aaagtctgag gaaacatca ccccttgga cttcgaagag 1440
 [0285] gtggtggata aggtgctag tgctcagctc ttcatcgaga ggatgaccaa cttcgataag 1500
 [0286] aaccttcaa acgagaaggt gctccctaag cactctttgc tctacagta cttcacctg 1560
 [0287] tacaacgagt tgaccaaggt taagtacgtg accgaggga tgaggaagcc tgcttttttg 1620
 [0288] tcaggtgagc aaaagaaggc tatcgttgat ctcttggtca agaccaacag aaaggtgacc 1680
 [0289] gtgaagcagc tcaaagagga ttacttcaag aaaatcgagt gcttcgattc agttgagatt 1740
 [0290] tctggtgttg aggataggtt caacgcactc ctcggaacct accacgatct cctcaagatc 1800
 [0291] attaaggata aggatttctt ggataacgag gaaaacgagg atatcttgga ggatctggt 1860
 [0292] cttacctca ccctcttga agatagagag atgattgaag aaaggctcaa gacctacgt 1920
 [0293] catctcttcg atgataaggt gatgaagcag ttgaagagaa gaagatacac tggttgggga 1980

[0294]	aggctctcaa gaaagctcat taacggaatc agggataagc agtctggaaa gacaatcctt	2040
[0295]	gatttcctca agtctgatgg attcgctaac agaaacttca tgcagctcat ccacgatgat	2100
[0296]	tctctcacct ttaaagagga tatccagaag gctcaggttt caggacaggg tgatagtctc	2160
[0297]	catgagcata tcgctaacct cgctggatct cctgcaatca agaagggaat cctccagact	2220
[0298]	gtgaaggttg tggatgagtt ggtgaaggtg atgggaaggc ataagcctga gaacatcgtg	2280
[0299]	atcgaaatgg ctagagagaa ccagaccact cagaaggac agaagaactc tagggaaagg	2340
[0300]	atgaagagga tcgaggaagg tatcaaagag cttggatctc agatcctcaa agagcaccct	2400
[0301]	gttgagaaca ctcagctcca gaatgagaag ctctacctct actacctcca gaacggaagg	2460
[0302]	gatatgtatg tggatcaaga gttggatata aacaggctct ctgattacga tgttgatcat	2520
[0303]	atcgtgccac agtcattctt gaaggatgat tctatcgata acaagggtct caccaggctt	2580
[0304]	gataagaaca ggggtaagag tgataacgtg ccaagtgaag aggttgtgaa gaaaatgaag	2640
[0305]	aactattgga ggcagctcct caacgctaag ctcatcactc agagaaagtt cgataacttg	2700
[0306]	actaaggctg agaggggagg actctctgaa ttggataagg caggattcat caagaggcag	2760
[0307]	cttgtggaaa ccaggcagat cactaagcac gttgcacaga tcctcgattc taggatgaac	2820
[0308]	accaagtacg atgagaacga taagttgatc aggggaagtga aggttatcac cctcaagtca	2880
[0309]	aagctcgtgt ctgatttcag aaaggatttc caattctaca aggtgaggga aatcaacaac	2940
[0310]	taccaccacg ctcacgatgc ttaccttaac gctgttgttg gaaccgctct catcaagaag	3000
[0311]	tatcctaagc tcgagtcaga gtctgtgtac ggtgattaca aggtgtacga tgtgaggaag	3060
[0312]	atgatcgcta agtctgagca agagatcgga aaggctaccg ctaagtattt cttctactct	3120
[0313]	aacatcatga atttcttcaa gaccgagatt accctcgcta acggtgagat cagaaagagg	3180
[0314]	ccactcatcg agacaaacgg tgaaacaggt gagatcgtgt gggataaggg aagggttttc	3240
[0315]	gctaccgtta gaaagggtct ctctatgcca caggatgaaca tcgttaagaa aaccgagggtg	3300
[0316]	cagaccggtg gattctctaa agagtctatc ctccctaaga ggaactctga taagctcatt	3360
[0317]	gctaggaaga aggattggga ccctaagaaa tacggtggtt tcgattctcc taccgtggct	3420
[0318]	tactctgttc tcgttggtgc taaggttgag aagggaagaa gtaagaagct caagtctgtt	3480
[0319]	aaggaacttc tcggaatcac tatcatggaa aggtcatctt tcgagaagaa cccaatcgat	3540
[0320]	ttctctgagg ctaagggata caaagagggt aagaaggatc tcatcatcaa gctcccaaag	3600
[0321]	tactcactct tcgaactcga gaacggtaga aagaggatgc tcgcttctgc tggtagctt	3660
[0322]	caaaaggga acgagcttgc tctcccatct aagtacgtta actttcttta cctcgcttct	3720
[0323]	cactacgaga agttgaagg atctccagaa gataacgagc agaagcaact tttcgttgag	3780
[0324]	cagcacaagc actacttgga tgagatcatc gagcagatct ctgagttctc taaaagggtg	3840
[0325]	atcctcgctg atgcaaacct cgataagggtg ttgtctgctt acaacaagca cagagataag	3900
[0326]	cctatcaggg aacaggcaga gaacatcatc catctcttca cccttaccaa cctcggtgct	3960
[0327]	cctgctgctt tcaagtactt cgatacaacc atcgatagga agagatacac ctctaccaa	4020
[0328]	gaagtgtctg atgctaccct catccatcag tctatcactg gactctacga gactaggatc	4080
[0329]	gatctctcac agctcggttg tgattcaagg gctgatccta agaagaagag gaaggtttga	4140
[0330]	<210> 20	
[0331]	<211> 263	
[0332]	<212> DNA	
[0333]	<213> Artificial sequence	
[0334]	<220>	
[0335]	<223> AtuNos ter nucleic acid sequence	

- [0336] <400> 20
- [0337] gtcaagcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg 60
- [0338] gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca 120
- [0339] tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca 180
- [0340] ttttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg 240
- [0341] tgtcatctat gttactagat cga 263
- [0342] <210> 21
- [0343] <211> 1147
- [0344] <212> DNA
- [0345] <213> Artificial sequence
- [0346] <220>
- [0347] <223> Synthetic construct clone eGFP-0sP5SM_E/R eGFP (eGFP) gene
- [0348] <400> 21
- [0349] atgtctagag tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccac cctggtcgag 60
- [0350] ctggacggcg acgtaaaccg ccacaagtgc agcgtgtccg gcgaggcgca gggcgatgcc 120
- [0351] acctacggca agctgacct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 180
- [0352] cccaccctcg tgaccacct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 240
- [0353] atgaagcagc acgacttctt caagtcggcc atgcccgaag gctacgtcca ggaggtagat 300
- [0354] ttatgcatcc tcttgtcatg agaagtcgaa ttgttcccat tctgtgtgtt gcagctacag 360
- [0355] atggagatac atagagatac tcgtggattt tgcttagtgt tgagttttgt tctggttgtg 420
- [0356] aactaaaagt ttatacatc gcaggaaata aatagcctt tgtttaaatc aaaaggtctt 480
- [0357] acctatgtta gtgtgaagca ttgatccca aagaactcca aaatgcgatg aggcataatt 540
- [0358] aatcttgtct ggactagtaa caggttggga tgaccacctg tgaagctcca acaggattgc 600
- [0359] ctctcacgc aatgtttgag gtctgatgtt caatagcttg ttttgtttca ctttgctttg 660
- [0360] gactttcttt tcgccaatga gctatgttc tgatggtttt cactcttttg gtgtgtagag 720
- [0361] aaccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg 780
- [0362] cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacac 840
- [0363] ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag 900
- [0364] cagaagaagg catcaagggt aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc 960
- [0365] agctcgccga ccactacagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga 1020
- [0366] caaccactac ctgagacccc agtcggcct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca 1080
- [0367] catggtcctg ctggagtctg tgaccggcgc cgggatcact ctcggcatgg acgagctgta 1140
- [0368] caagtaa 1147
- [0369] <210> 22
- [0370] <211> 2074
- [0371] <212> DNA
- [0372] <213> Arabidopsis thaliana
- [0373] <400> 22
- [0374] caattatgtg ttaaagatac aaacttttgt ctgatttgc tccaccggtt tcacctaaga 60
- [0375] tactcaattt tcttactttt tgttgtttt gtaattctaa ttcttttata gcttcaattt 120
- [0376] ttagattcat tgaagcagtt gtgagttaa ttggagaaaa tggttgtgtt tgggaatgtt 180
- [0377] tctgcggcga atttgcctta tcaaacggg tttttggagg cactttcatc tggaggttgt 240

[0378]	gaactaatgg gacatagctt tagggttccc acttctcaag cgcttaagac aagaacaagg	300
[0379]	aggaggagta ctgctgggcc tttgcaggta gtttgtgtgg atattccaag gccagagcta	360
[0380]	gagaacactg tcaatttctt ggaagctgct agtttatctg catccttccg tagtgctcct	420
[0381]	cgtcctgcta agcctttgaa agttgtaatt gctgggtgctg gattggctgg attgtcaact	480
[0382]	gcaaagtacc tggctgatgc aggccacaaa cctctgttgc ttgaagcaag agatgttctt	540
[0383]	ggtggaaaga tagctgcatg gaaggatgaa gatggggact ggtatgagac tggtttacat	600
[0384]	attttcttcg gtgcttatcc gaatgtgcag aattttattg gagaacttgg gatcaatgat	660
[0385]	cggttgcagt ggaaggaaca ctccatgatt tttgctatgc caagtaaacc tggagaattt	720
[0386]	agtagatttg acttcccaga tgtcctacca gcacccttaa atgggtattg ggctattttg	780
[0387]	cggacaacg agatgctgac atggccagag aaaataaagt ttgctattgg acttttgcca	840
[0388]	gccatggctg gcggtcaggc ttatgttgag gcccaagatg gtttatcagt caaagaatgg	900
[0389]	atggaaaagc agggagtacc tgagcgcgtg accgacgagg tgtttattgc catgtcaaag	960
[0390]	gcgctaaact ttataaaccc tgatgaactg tcaatgcaat gcattttgat agctttgaac	1020
[0391]	cggtttcttc aggaaaaaca tggttccaag atggcattct tggatggtaa tcctccgga	1080
[0392]	aggctttgta tgccagtagt ggatcatatt cgatcactag gtggggaagt gcaacttaat	1140
[0393]	tctaggataa agaaaattga gctcaatgac gatggcacgg ttaagagttt ctactcact	1200
[0394]	aatggaagca ctgtcgaagg agacgcttat gtgtttgccg ctccagtcga tctcctgaag	1260
[0395]	ctccttttac cagatccctg gaaagaaata ccgtacttca agaaattgga taaattagtt	1320
[0396]	ggagtaccag ttattaatgt tcatatatgg tttgatcgaa aactgaagaa cacatatgat	1380
[0397]	cactactct ttagcagaag taacctctg agcgtgtatg ccgacatgc cttaacttgt	1440
[0398]	aaggaatatt acgatcctaa ccggtcaatg ctggagctag tatttgcacc agcagaggaa	1500
[0399]	tggatatcac ggactgattc tgacatcata gatgcaacaa tgaaagaact tgagaaactc	1560
[0400]	ttccctgatg aaatctcagc tgaccaaacg aaagctaaaa ttctgaagta ccatgtcgtt	1620
[0401]	aagactccaa gatctgtgta caagaccatc ccaactgtg aaccatgtcg tcctctacaa	1680
[0402]	agatcaccta ttgaaggatt ctacttagct ggagattaca caaacagaa gtacttagct	1740
[0403]	tccatggaag gcgctgtcct ctctggcaaa ttctgctctc agtctattgt tcaggattac	1800
[0404]	gagctactgg ctgcgtctgg accaagaaag ttgtcggagg caacagtatc atcatcatga	1860
[0405]	gaagaggaca aaacttaaag atgatttgct tgtaagcatt attattttg tataaatctc	1920
[0406]	attgcaatcc aaacttaacc ttactctctt cagtaaata atctcacaga ttgacatct	1980
[0407]	cacgtttctg tcaattttat aattttttaa aagtaattac tgtcgacctt ttgtaatcat	2040
[0408]	agtattttat cattatgtct ctctttttaa aacc	2074
[0409]	<210>	23
[0410]	<211>	1419
[0411]	<212>	DNA
[0412]	<213>	Arabidopsis thaliana
[0413]	<400>	23
[0414]	ggagcatctt cattcttaag atatgaagat aatcttcaaa aggccctgg gaatctgaaa	60
[0415]	gaagagaagc aggccattt atatgggaaa gaacaatagt atttcttata taggcccatt	120
[0416]	taagttgaaa acaatcttca aaagtccac atcgcttaga taagaaaacg aagctgagtt	180
[0417]	tatatacagc tagagtcgaa gtagtgattg tgagacggat atcaatacgc aaaccgcctc	240
[0418]	tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag	300
[0419]	cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggtt	360

[0420]	tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	420
[0421]	catactagag aaagaggaga aatactagat ggcttcctcc gaggacgtta tcaaagagtt	480
[0422]	catgcgtttc aaagttcgta tggaaggttc cgttaacggt cacgagttcg aaatcgaagg	540
[0423]	tgaaggtgaa ggtcgtccgt acgaaggtac ccagaccgct aaactgaaag ttaccaaagg	600
[0424]	tggtccgctg ccgttcgctt gggacatcct gtccccgcag ttccagtacg gttccaaagc	660
[0425]	ttacgttaaa caccggctg acatcccgga ctacctgaaa ctgtccttcc cggaagggtt	720
[0426]	caaatgggaa cgtgttatga acttcgagga cgggtggtgt gttaccgtta cccaggactc	780
[0427]	ctccctgcaa gacggtgagt tcatctacaa agttaaactg cgtggtacca acttcccgtc	840
[0428]	cgacggtcg gttatgcaga aaaaaacat gggttgggaa gcttccaccg aacgtatgta	900
[0429]	cccgaggagc ggtgctctga aagtgaaat caaatgcgt ctgaaactga aagacggtgg	960
[0430]	tcactacgac gctgaagtta aaaccaccta catggctaaa aaaccgggtc agtgccggg	1020
[0431]	tgcttcaaaa accgacatca aactggacat cacctccac aacgaggact acaccatcgt	1080
[0432]	tgaacgtac gaacgtctg aagtcgtca ctccaccggt gcttaataac gctgatagt	1140
[0433]	ctagttaga tcgctactag agccaggcat caaataaac gaaaggctca gtcgaaagac	1200
[0434]	tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgtc tctactagag tcacactggc	1260
[0435]	tcacctcgg gtgggccttt ctgcgtttat acgtctcagt tttagagcta gaaatagcaa	1320
[0436]	gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt	1380
[0437]	tctagacca gctttcttgt acaaagttgg cattacgt	1419
[0438]	<210> 24	
[0439]	<211> 1286	
[0440]	<212> DNA	
[0441]	<213> Artificial sequence	
[0442]	<220>	
[0443]	<223> U6III-synthetic pol 3 promoter for sgRNA expression	
[0444]	<400> 24	
[0445]	ggagtatgat caaaagtccc acatcgatca ggtgatatat agcagcttag tttatataat	60
[0446]	gatagagtcg acatagcgat tgggagacgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg	120
[0447]	gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgcgcg	180
[0448]	caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatget	240
[0449]	tccggtcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacat actagagaaa	300
[0450]	gaggagaaat actagatggc ttctccgag gacgttatca aagagttcat gcgtttcaaa	360
[0451]	gttcgtatgg aaggttccgt taacggtcac gagttcgaat tcgaagggtga aggtgaagg	420
[0452]	cgtccgtacg aaggtaccca gaccgctaaa ctgaaagtta ccaaagggtg tccgctgccg	480
[0453]	ttcgttggg acatcctgtc cccgcagttc cagtacggtt ccaaagctta cgttaaacac	540
[0454]	ccggtgaca tcccggacta cctgaaactg tccttcccgg aaggtttcaa atgggaacgt	600
[0455]	gttatgaact tcgaggacgg tggtgttgtt accgttaccc aggactcctc cctgcaagac	660
[0456]	ggtgagttca tctacaaagt taaactgcgt ggtaccaact tccggtccga cgggtccggt	720
[0457]	atgcagaaaa aaacctaggg ttgggaagct tccaccgaac gtatgtaccc ggaggacggt	780
[0458]	gctctgaaag gtgaaatcaa aatgcgtctg aaactgaaag acggtggtca ctacgacgt	840
[0459]	gaagttaaaa ccacctacat ggctaaaaaa ccggttcagc tgccgggtgc ttacaaaacc	900
[0460]	gacatcaaac tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgttga acagtacgaa	960
[0461]	cgtgtgaag gtcgtcactc caccggtgct taataacgt gatagtgcga gtgtagatcg	1020

[0462] ctactagagc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt 1080
 [0463] ttatctgttg ttgtcgggtg aacgctctct actagagtca cactggctca ccttcgggtg 1140
 [0464] ggctttcttg cgtttatacg tctccgtttt agagctagaa atagcaagtt aaaataaggc 1200
 [0465] tagtccgtta tcaacttgaa aaagtggcac cgagtcgggtg ctttttttct agaccagct 1260
 [0466] ttctgtaca aagttggcat tacgct 1286
 [0467] <210> 25
 [0468] <211> 2074
 [0469] <212> DNA
 [0470] <213> Arabidopsis thaliana
 [0471] <400> 25
 [0472] caattatgtg ttaaagatac aaacttttgt ctgatttgc tccaccggtt tcacctaaga 60
 [0473] tactcaattt tcttactttt tgtgtgtttt gtaattctaa ttcttttata gcttcaattt 120
 [0474] ttagattcat tgaagcagtt gtgagttaag ttggagaaaa tggttgtgtt tgggaatgtt 180
 [0475] tctgcggcga atttgcctta tcaaacggg tttttggagg cactttcatc tggaggttgt 240
 [0476] gaactaatgg gacatagctt tagggttccc acttctcaag cgcttaagac aagaacaagg 300
 [0477] aggaggagta ctgctggtcc ttgtcaggtg gtttgtgtgg atattccaag gccagagcta 360
 [0478] gagaacactg tcaatttctt ggaagctgct agtttatctg catccttccg tagtgctcct 420
 [0479] cgtcctgcta agcctttgaa agttgtaatt gctggtgctg gattggctgg attgtcaact 480
 [0480] gcaaagtacc tggctgatgc aggccacaaa cctctgttgc ttgaagcaag agatgttctt 540
 [0481] ggtggaaaga tagctgcatg gaaggatgaa gatggggact ggtatgagac tggtttacat 600
 [0482] attttcttcg gtgcttatcc gaatgtgcag aattttattg gagaacttgg gatcaatgat 660
 [0483] cggttgcagt ggaaggaaca ctccatgatt ttgtctatgc caagtaaacc tggagaattt 720
 [0484] agtagatttg acttccaga tgtcctacca gcaccctaa atggtatttg ggctattttg 780
 [0485] cggaacaacg agatgctgac atggccagag aaaataaagt ttgctatttg acttttgcca 840
 [0486] gccatggtcg gcggtcagge ttatgttgag gcccaagatg gtttatcagt caaagaatgg 900
 [0487] atggaaaagc agggagtacc tgagcgcgtg accgacgagg tgtttattgc catgtcaaag 960
 [0488] gcgctaaact ttataaacc tgatgaactg tcaatgcaat gcattttgat agctttgaac 1020
 [0489] cggtttcttc aggaaaaaca tggttccaag atggcattct tggatggtaa tcctccgga 1080
 [0490] aggtttgta tgccagtagt ggatcatatt cgatactag gtggggaagt gcaacttaat 1140
 [0491] tctaggataa agaaaattga gctcaatgac gatggcacgg ttaagagttt ctacttact 1200
 [0492] aatggaagca ctgtcgaagg agacgcttat gtgtttgccg ctccagtcga tatcctgaag 1260
 [0493] ctctttttac cagatccctg gaaagaaata ccgtacttca agaaattgga taaattagtt 1320
 [0494] ggagtaccag ttattaatgt tcatatatgg ttgatcgaa aactgaagaa cacatatgat 1380
 [0495] cacctactct ttagcagaag taacctctg agcgtgtatg ccgacatgct ctttaacttgt 1440
 [0496] aaggaatatt acgaccta cgggtcaatg ctggagctag tatttgcacc agcagaggaa 1500
 [0497] tggatatcac ggactgattc tgacatcata gatgcaacaa tgaaagaact tgagaaactc 1560
 [0498] ttccctgatg aaatctcagc tgaccaaaagc aaagctaaaa ttctgaagta ccatgtcgtt 1620
 [0499] aagactccaa gatctgtgta caagaccatc ccaactgtg aaccatgtcg tcctctacaa 1680
 [0500] agatcaccta ttgaaggatt ctacttagct ggagattaca caaacagaa gtacttagct 1740
 [0501] tccatggaag gcgctgtcct ctctggcaaa ttctgctctc agtctattgt tcaggattac 1800
 [0502] gagctactgg ctgcgtctgg accaagaaag ttgtcggagg caacagtatc atcatcatga 1860
 [0503] gaagaggaca aaacttaaag atgatttgc tgtgaagcatt attatttgtg tataaatctc 1920

[0504]	attgcaatcc aaacttaacc ttactctctt cagtaaata ga atctcacaga ttgacatct	1980
[0505]	cacgtttctg tcaattttat aatttttaaa aagtaattac tgctgacctt ttgtaatcat	2040
[0506]	agtattttat cattatgtct ctctttttta aacc	2074
[0507]	<210>	26
[0508]	<211>	2290
[0509]	<212>	DNA
[0510]	<213>	Arabidopsis thaliana
[0511]	<400>	26
[0512]	ctttggtggg caaaaacata ttagctgaga ggtcaatttc tttttcccct aaaccaaatt	60
[0513]	acgttgagat gcatggtctc tctctactca attaaccaaa taaggaaaag aatcatatgg	120
[0514]	tcatcaattc gtaaatcaaa attttaattt gtgtggtatt taatccatct acatgtttcg	180
[0515]	taagcaacaa aagagcttgg tctgaaaacc aaacaagacc atatgggcac tcgaatactc	240
[0516]	cattttgtta tcggctactt ccactagcct cctccttcgc tgcgtctcct gtttctctac	300
[0517]	ttcacgatta ctgcttagat tcattgaagc agttgtgagt taagttggag aaaatggttg	360
[0518]	tgtttgggaa tgtttctgcg gcgaatttgc cttatcaaaa cgggtttttg gaggcacttt	420
[0519]	catctggagg ttgtgaacta atgggacata gctttagggt tcccacttct caagcgctta	480
[0520]	agacaagaac aaggaggagg agtactgctg gtcctttgca ggtagtttgt gtggatattc	540
[0521]	caagccaga gctagagaac actgtcaatt tcttggaagc tgctagtta tctgcatcct	600
[0522]	tccgtagtgc tcctcgtcct gctaagcctt tgaaagtgt aattgctggt gctggattgg	660
[0523]	ctggattgtc aactgcaaag tacctggctg atgcaggcca caaacctctg ttgcttgaag	720
[0524]	caagagatgt tcttgggtga aagatagctg catggaagga tgaagatggg gactggatatg	780
[0525]	agactggttt acatattttc ttcggtgctt atccgaatgt gcagaattta tttggagaac	840
[0526]	ttgggatcaa tgatcggttg cagtggagg aacactccat gatttttgct atgccaaagta	900
[0527]	aacctggaga atttagtaga ttgacttcc cagatgtcct accagcacc ttaaatggta	960
[0528]	tttgggctat tttgcggaac aacgagatgc tgacatggcc agagaaaata aagtttgcta	1020
[0529]	ttggactttt gccagccatg gtcggcggtc aggccttatgt tgaggcccaa gatggtttat	1080
[0530]	cagtcaaaga atggatggaa aagcaggag tacctgagcg cgtgaccgac gaggtgtta	1140
[0531]	ttgccatgtc aaaggcgcta aactttataa accctgatga actgtcaatg caatgcattt	1200
[0532]	tgatagcttt gaaccggtt cttcaggaaa aacatggttc caagatggca ttcttggatg	1260
[0533]	gtaatcctcc ggaaagcctt tgtatgccag tagtggatca tattcgatca ctaggtgggg	1320
[0534]	aagtgaact taattctagg ataaagaaaa ttgagctcaa tgacgatggc acggttaaga	1380
[0535]	gtttcttact cactaatgga agcactgtcg aaggagacgc ttatgtgttt gccgctccag	1440
[0536]	tcgatatacct gaagctcctt ttaccagatc cctggaaaaga aataccgtac ttcaagaaat	1500
[0537]	tggataaatt agttggagta ccagttatta atgttcatat atggtttgat cgaaaactga	1560
[0538]	agaacacata tgatcaccta ctcttttagca gaagtaacct tctgagcgtg tatgccgaca	1620
[0539]	gtccttaac ttgtaaggaa tattacgac ctaaccggtc aatgctggag ctagtatttg	1680
[0540]	caccagcaga ggaatggata tcacggactg attctgacat catagatgca acaatgaaag	1740
[0541]	aacttgagaa actcttcct gatgaaatct cagctgacca aagcaaagct aaaattctga	1800
[0542]	agtaccatgt cgtaagact ccaagatctg tgtacaagac catcccaaac tgtgaacct	1860
[0543]	gtcgtcctct acaaagatca cctattgaag gattctactt agctggagat tacacaaaac	1920
[0544]	agaagtactt agcttccatg gaaggcgtg tcctctctgg caaattctgc tctcagtcta	1980
[0545]	ttgttcagga ttacgagcta ctggctgcgt ctggaccaag aaagttgtcg gaggaacag	2040

[0546] tatcatcatc atgagaagag gacaaaactt aaagatgatt tgcttgtaag cattattatt 2100
 [0547] tgtgtataaa tctcattgca atccaaactt aaccttactc tcttcagtaa atgaatctca 2160
 [0548] cagatttgac atctcacgtt tctgtcaatt ttataatttt taaaaagtaa ttactgtcga 2220
 [0549] ccttttgtaa tcatagtgat ttatcattat gtctctcttt ttaaaacctt ttctggtaca 2280
 [0550] aattataaaa 2290
 [0551] <210> 27
 [0552] <211> 241
 [0553] <212> PRT
 [0554] <213> Artificial sequence
 [0555] <220>
 [0556] <223> eGFP [synthetic construct] amino acid sequence
 [0557] <400> 27
 [0558] Met Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
 [0559] 1 5 10 15
 [0560] Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
 [0561] 20 25 30
 [0562] Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
 [0563] 35 40 45
 [0564] Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
 [0565] 50 55 60
 [0566] Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
 [0567] 65 70 75 80
 [0568] Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
 [0569] 85 90 95
 [0570] Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
 [0571] 100 105 110
 [0572] Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
 [0573] 115 120 125
 [0574] Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
 [0575] 130 135 140
 [0576] Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
 [0577] 145 150 155 160
 [0578] Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
 [0579] 165 170 175
 [0580] Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
 [0581] 180 185 190
 [0582] Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
 [0583] 195 200 205
 [0584] Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
 [0585] 210 215 220
 [0586] Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 [0587] 225 230 235 240

[0588] Lys
 [0589] <210> 28
 [0590] <211> 107
 [0591] <212> DNA
 [0592] <213> Arabidopsis thaliana
 [0593] <400> 28
 [0594] guagagaaga aucuguaaag cucaggaggg auagcgccau gaugaucaca uucguuauca 60
 [0595] auuuuuuggc gcuauccauc cugaguuuca uuggcucuuc uuacuac 107
 [0596] <210> 29
 [0597] <211> 102
 [0598] <212> DNA
 [0599] <213> Arabidopsis thaliana
 [0600] <400> 29
 [0601] uaaguacuuu cgcuugcaga gagaaucac aguggucaa aaaguuguag uuuucuuaaa 60
 [0602] gucucuucc ucugugauuc ucuguguaag cgaaagagcu ug 102
 [0603] <210> 30
 [0604] <211> 711
 [0605] <212> DNA
 [0606] <213> Artificial Sequence
 [0607] <220>
 [0608] <223> nucleic acid sequence encoding mCherry
 [0609] <400> 30
 [0610] atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag 60
 [0611] gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgagggcga gggcgagggc 120
 [0612] cgccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaaggtga ccaagggtgg cccctgccc 180
 [0613] ttcgctggg acatctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac 240
 [0614] cccgccgaca tccccgacta cttgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc 300
 [0615] gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgaccc aggactcctc cctgcaggac 360
 [0616] ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccagta 420
 [0617] atgcagaaga aaaccatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtaccc cgaggacggc 480
 [0618] gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggtg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgct 540
 [0619] gaggtcaaga ccacctaca ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgtc 600
 [0620] aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa 660
 [0621] cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagtg a 711
 [0622] <210> 31
 [0623] <211> 4100
 [0624] <212> DNA
 [0625] <213> Artificial Sequence
 [0626] <220>
 [0627] <223> Plasmid-1: GEiGS_ mir173_si-GFP_1
 [0628] <400> 31
 [0629] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60

[0630]	tttghtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[0631]	acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
[0632]	tgaacatggg tttaccaaatt tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
[0633]	agcaaaatgg cgttcttggg aagggcattg cggcccggtg ccgccaggga tatgtgtgca	300
[0634]	gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
[0635]	ctcgtttggg aaataacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
[0636]	aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttctttttct aagagtagaa	480
[0637]	tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg ttttagatcct gtcgcacccg	540
[0638]	agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtattttata	600
[0639]	gagggaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
[0640]	gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
[0641]	tgtagaccgg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
[0642]	gtagagacat cgggtcaactt tggtttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgtat	840
[0643]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggg	900
[0644]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
[0645]	gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatctgtt	1020
[0646]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatg ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[0647]	aaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
[0648]	aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[0649]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[0650]	cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[0651]	aactttcgaa ttcttgtttt tggtgcctca aagttgttgg atcattattt tttacgtaaa	1380
[0652]	tgtggcttaa tgagaattta tggttgggg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
[0653]	tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
[0654]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[0655]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[0656]	aaaacgacga taaggtttag gtaaatattt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[0657]	attttcatcc ataaaaaat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[0658]	aacaaaaaaa agtttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[0659]	aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[0660]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[0661]	cttaaaagcg cggtctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat	1980
[0662]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[0663]	tgtgttggtg attaatgact taagtcgtgc tgcttcatgt ggagtgggtca aaaaagttgt	2100
[0664]	agttttctta aagtctcttt cctctccaca taagcaggac gagttaagag cttgctccct	2160
[0665]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttctg aaatctatgt gtttgataga	2220
[0666]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[0667]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactgggtta	2340
[0668]	taaaatctga ataatgtatt tcaatttggg gattcgggtg taaaaattac tgattttacga	2400
[0669]	atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttgggtg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[0670]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[0671]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatgta agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccac	2580

[0672] aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccagccc 2640
 [0673] aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc ttctattact agcaaaaagg atgcattaga 2700
 [0674] gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcaactattgt attgtatacg tacatttcaa 2760
 [0675] gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaataata attggccttt aattagctca 2820
 [0676] aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact 2880
 [0677] gtacatgatt tcaaataattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga 2940
 [0678] agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg 3000
 [0679] ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc 3060
 [0680] actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc 3120
 [0681] caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca 3180
 [0682] acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa 3240
 [0683] gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc 3300
 [0684] cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgg 3360
 [0685] atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa 3420
 [0686] taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttga gtttgtcccg gaatgatcaa 3480
 [0687] gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg 3540
 [0688] aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc 3600
 [0689] ccaagacctc attctacaaa ccaatgttcc ttttttctt ttctttttgg tgatagtttt 3660
 [0690] tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta 3720
 [0691] ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata 3780
 [0692] caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttgg ttaaattagt actccctata 3840
 [0693] ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt 3900
 [0694] taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg 3960
 [0695] attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020
 [0696] ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
 [0697] aaaaataact ctttaattta 4100
 [0698] <210> 32
 [0699] <211> 4100
 [0700] <212> DNA
 [0701] <213> Artificial Sequence
 [0702] <220>
 [0703] <223> Plasmid-2: GEiGS_mir173_si-GFP_2
 [0704] <400> 32
 [0705] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60
 [0706] tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta 120
 [0707] acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta 180
 [0708] tgaacatggt ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc 240
 [0709] agcaaaatgg cgttcttga aagggcattg cgccccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca 300
 [0710] gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg 360
 [0711] ctcgtttggg aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag 420
 [0712] aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa 480
 [0713] tggaatgaat aatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg 540

[0714]	agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtattttata	600
[0715]	gagggaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
[0716]	gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
[0717]	tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
[0718]	gtagagacat cgggtcaactt tgttttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
[0719]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
[0720]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
[0721]	gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcgtt	1020
[0722]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[0723]	aaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt ttggcatct attcaaatat	1140
[0724]	aatagaatcc caaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[0725]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[0726]	cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[0727]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgccctca aagttgttgg atcattattt ttacgtaaa	1380
[0728]	tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagt ttgctccaac ttttttttt	1440
[0729]	ttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct tttcttatt tcaagttaaa	1500
[0730]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaatc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[0731]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[0732]	aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatgtgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[0733]	attttcatcc ataaaaaat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[0734]	aacaaaaaaa agtttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[0735]	aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[0736]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[0737]	cttaaaagcg cggctctcag gtaatctcag cccaataccc tattttctc tcccctatat	1980
[0738]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[0739]	tgtgttggtg attaatgact tagttgtact ccagcttggt ccagtgtgca aaaaagttgt	2100
[0740]	agttttctta aagtctcttt cctctggcaa agctgcagta caactaagag ctgctccct	2160
[0741]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
[0742]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[0743]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
[0744]	taaaatctga ataatgtatt tcaatttggg gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
[0745]	atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[0746]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[0747]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatgga agttgatgt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
[0748]	aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[0749]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc ttctattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[0750]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcaactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[0751]	gcgtaattaa acctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[0752]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[0753]	gtacatgatt tcaaatattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[0754]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaattc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
[0755]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060

[0756] actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc 3120
 [0757] caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaact tactaacaca 3180
 [0758] acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa 3240
 [0759] gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc 3300
 [0760] cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttggatca ctttgttcag tttgttgg 3360
 [0761] atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa 3420
 [0762] taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa 3480
 [0763] gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg 3540
 [0764] aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc 3600
 [0765] ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttctt tttttttgg tgatagtttt 3660
 [0766] tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta 3720
 [0767] ttatatatag tcattaacac tcattacca tccataatc aatagtctat tttgattata 3780
 [0768] caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttgg ttaaattagt actccctata 3840
 [0769] ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt 3900
 [0770] taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg 3960
 [0771] attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020
 [0772] ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
 [0773] aaaaataact cttaattta 4100
 [0774] <210> 33
 [0775] <211> 4100
 [0776] <212> DNA
 [0777] <213> Artificial Sequence
 [0778] <220>
 [0779] <223> Plasmid-3: GEiGS_ mir173_si-PDS_1
 [0780] <400> 33
 [0781] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60
 [0782] tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta 120
 [0783] acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta 180
 [0784] tgaacatggg ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc 240
 [0785] agcaaaatgg cgttcttggg aagggcattg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca 300
 [0786] gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg 360
 [0787] ctctgtttgt aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag 420
 [0788] aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa 480
 [0789] tggaatgaat aatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg 540
 [0790] agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata 600
 [0791] gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt 660
 [0792] gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt 720
 [0793] tgtagaccgg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga 780
 [0794] gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgtat 840
 [0795] cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggg 900
 [0796] caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagtgtg tccattctta agtatacata 960
 [0797] gaggtggcct gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcgtt 1020

[0798]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[0799]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
[0800]	aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[0801]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[0802]	cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[0803]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgccatc aagttgttgg atcattatit tttacgtaaa	1380
[0804]	tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
[0805]	tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
[0806]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[0807]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[0808]	aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaat ataattgagc accgttaata	1680
[0809]	attttcatcc ataaaaaat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[0810]	aacaaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[0811]	aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[0812]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[0813]	cttaaaegg cggtctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttctct tcccctatat	1980
[0814]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[0815]	tgtgttggtg attaagtact ttatccacac aaactacctg caagtgtgca aaaaagttgt	2100
[0816]	agttttctta aagtctcttt cctcttcag tagtttagtt ggataaagag cttgctccct	2160
[0817]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
[0818]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[0819]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
[0820]	taaaatctga ataatgtatt tcaatttga gattcgggtg taaaaattac tgatttacga	2400
[0821]	atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[0822]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[0823]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatgta agttgatgtt gaaccaacaa atctgccccaa	2580
[0824]	aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[0825]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[0826]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcaactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[0827]	gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[0828]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[0829]	gtacatgatt tcaaatattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[0830]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
[0831]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
[0832]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[0833]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
[0834]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[0835]	gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[0836]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgtgg	3360
[0837]	atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[0838]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
[0839]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540

[0840] aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc 3600
 [0841] ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttctttttgg tgatagtttt 3660
 [0842] tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta 3720
 [0843] ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata 3780
 [0844] caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata 3840
 [0845] ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt 3900
 [0846] taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg 3960
 [0847] attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020
 [0848] ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
 [0849] aaaaataact ctttaattta 4100
 [0850] <210> 34
 [0851] <211> 4100
 [0852] <212> DNA
 [0853] <213> Artificial Sequence
 [0854] <220>
 [0855] <223> Plasmid-4: GEiGS_ mir173_si-PDS_2
 [0856] <400> 34
 [0857] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60
 [0858] tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta 120
 [0859] acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta 180
 [0860] tgaacatggt tttaccaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc 240
 [0861] agcaaaatgg cgttcttggg aagggcattg cggcccggtg ccgccaggga tatgtgtgca 300
 [0862] gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg 360
 [0863] ctctgttggg aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag 420
 [0864] aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttctttttct aagagtagaa 480
 [0865] tggaatgaat aatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg 540
 [0866] agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata 600
 [0867] gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt 660
 [0868] gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt 720
 [0869] tgtagaccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga 780
 [0870] gtagagacat cggatcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgat 840
 [0871] cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt 900
 [0872] caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata 960
 [0873] gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt 1020
 [0874] gatctgtttc ttatctcaag ctaaactgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca 1080
 [0875] aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt ttggcatct attcaaatat 1140
 [0876] aatagaatcc caaaattatg atatttgc atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 [0877] aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca 1260
 [0878] cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat 1320
 [0879] aactttcgaa ttcttgtttt tgttgccctc aagttgttgg atcattattt ttacgtaaa 1380
 [0880] tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt 1440
 [0881] tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa 1500

[0882] catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc 1560
 [0883] aaatcttttg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta 1620
 [0884] aaaacgacga taaggttttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata 1680
 [0885] attttcatcc ataaaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt 1740
 [0886] aaccaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat 1800
 [0887] aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag 1860
 [0888] gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa 1920
 [0889] cttaaaagcg cggtctcctc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat 1980
 [0890] aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac 2040
 [0891] tgtgttggtg attaatgact ttgacaatcc agccaatcca gcagtggta aaaaagttgt 2100
 [0892] agttttctta aagtctcttt cctctgctga ttggcaggat tgtcaaagag cttgctcctt 2160
 [0893] aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga 2220
 [0894] tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg 2280
 [0895] gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggta 2340
 [0896] taaaatctga ataatgtatt tcaatttga gattcggta taaaattac tgatttacga 2400
 [0897] atgacattta tatcgataga tgagtttctt gatttggttg ttaaatgat aaatcaagga 2460
 [0898] catgagaaac tgtttttga tgctaatttg tccatggaat aaaattgga ggtgaggacc 2520
 [0899] gtgaggtag tcaggaaacc ttaatatga agttgatgt gaaccaaca atctgccc 2580
 [0900] aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc 2640
 [0901] aaaaggcatc tgtacctgag cccattatc ttcttact agcaaaaagg atgcattaga 2700
 [0902] gaccccggtg tagtaaatg acctacaaat tcaatttgt attgtatag tacatttcaa 2760
 [0903] gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca 2820
 [0904] aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact 2880
 [0905] gtacatgatt tcaaatatit taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaattga 2940
 [0906] agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaattc gatcatttac ttgcaaagt 3000
 [0907] ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgta cagtcacgcc 3060
 [0908] actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc 3120
 [0909] caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaact tactaacaca 3180
 [0910] acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa 3240
 [0911] gctaataatc gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc 3300
 [0912] cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgtg 3360
 [0913] atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa 3420
 [0914] taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtccg gaatgatcaa 3480
 [0915] gtagagcatt catagtgtct tgccaatag gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg 3540
 [0916] aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc 3600
 [0917] ccaagacctc attctacaaa ccaatgttcc ttttttctt ttcttttttg tgatagtttt 3660
 [0918] tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta 3720
 [0919] ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata 3780
 [0920] caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata 3840
 [0921] ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaagttc tatgtaaatt 3900
 [0922] taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg 3960
 [0923] attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020

[0924] ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
 [0925] aaaaataact ctttaattta 4100
 [0926] <210> 35
 [0927] <211> 4000
 [0928] <212> DNA
 [0929] <213> Artificial Sequence
 [0930] <220>
 [0931] <223> Plasmid-5: GEiGS_ mir390a _si-GFP_1
 [0932] <400> 35
 [0933] accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat 60
 [0934] tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc 120
 [0935] attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact 180
 [0936] cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata 240
 [0937] ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa 300
 [0938] aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt 360
 [0939] ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat 420
 [0940] ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaacttga tcatctattc 480
 [0941] caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag 540
 [0942] ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac 600
 [0943] ctcatctctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca 660
 [0944] agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga 720
 [0945] tatatatcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt 780
 [0946] tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat 840
 [0947] tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct 900
 [0948] agagtataaa acacatatat attgaccgta caacttttagt caaattagaa actctgtttt 960
 [0949] atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa 1020
 [0950] tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca 1080
 [0951] ggaaaatgac acaaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt 1140
 [0952] cattagttaa atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac 1200
 [0953] ctgaattttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc 1260
 [0954] taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat 1320
 [0955] tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataataa taaaattata 1380
 [0956] ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt 1440
 [0957] cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatatattg aatatcggac caatggtata 1500
 [0958] taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaatag gatatgcaat 1560
 [0959] gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa 1620
 [0960] tagatgcata tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attagcttc 1680
 [0961] cttcattttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg 1740
 [0962] atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag 1800
 [0963] aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaaggt agtcatcaga tatatatttt 1860
 [0964] ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc 1920
 [0965] cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctctctcact 1980

[0966] tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac 2040
 [0967] ccaaaaaaac aaagtagaga agaattctgta aagtcgtgct gcttcatgtg gatgatgac 2100
 [0968] acattcggtta tctatttttt ccacatgaag aagcacgact tgattggctc ttcttactac 2160
 [0969] aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc 2220
 [0970] catttaagct atcttttata aacgtgtcct attttctatc tcttttggtt aaactaagaa 2280
 [0971] actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct 2340
 [0972] ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt 2400
 [0973] acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa 2460
 [0974] cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta 2520
 [0975] cattaaagta gaatcggaag tgttacatac taacaaaag ttacatatac tagtatcatt 2580
 [0976] ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggctcaggga 2640
 [0977] agtggggaac agatatgtc tgcatagaac acgtggacca acatgcatac acacagttac 2700
 [0978] atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcat 2760
 [0979] ggtgagtttt ttggtcgcat attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt 2820
 [0980] cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc 2880
 [0981] gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg 2940
 [0982] ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat 3000
 [0983] atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc 3060
 [0984] cagtgaactt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta 3120
 [0985] ttcattttcg ttgtaaaaat cattataatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgattt 3180
 [0986] gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagt acaaactgtt gtatacagcc 3240
 [0987] tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat 3300
 [0988] aatggataat ttggatttta gaattactaa tttggatttt tagtgacaaa ctgttgtagt 3360
 [0989] gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcataatgt 3420
 [0990] atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc 3480
 [0991] gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa 3540
 [0992] tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaatt 3600
 [0993] gttataaaat aatcatagga gaagtaaac ccggtattta attaatacct tacaaactta 3660
 [0994] cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat 3720
 [0995] gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggtg ttcaaaaaga 3780
 [0996] gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcagt gaggtgctc 3840
 [0997] tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
 [0998] ttcatgtaa attggtgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
 [0999] tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000
 [1000] <210> 36
 [1001] <211> 4000
 [1002] <212> DNA
 [1003] <213> Artificial Sequence
 [1004] <220>
 [1005] <223> Plasmid-6: GEiGS_ mir390a _si-GFP_2
 [1006] <400> 36
 [1007] accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgattc ttttaggaac agtaattaat 60

[1008]	tttaaatttg	agaaaaatgt	agtgatgaaa	gtgagatata	tgggacgcac	tattgaaagc	120
[1009]	attgtccaca	ccgcatgatg	tgagattgat	gtgaatatgg	taactaataa	cacccagact	180
[1010]	cacttttatg	agaaaaatga	tcttaaaaaa	tgttattcat	caaagcttag	atgcgctata	240
[1011]	ggggaacata	atcattatgt	gaaaagaacc	aattcaaata	tttttttttt	taagagttaa	300
[1012]	aatcctatat	aacataacca	tccaaacttt	gggcatgaac	acaacaatat	tttttttcgt	360
[1013]	ttttgataaa	ttctttcaat	tgcaatcaaa	acttaccagc	tatacaaatg	tttgctgcat	420
[1014]	ccaatcctaat	acaccgttaa	acaataaaat	ttgttatctc	tcaaactctga	tcatctattc	480
[1015]	caacctgact	gtttttattct	agtattttta	ggccagggtat	aacgaaaaca	aagaaaaaag	540
[1016]	ttcagcgacc	aagacatgtt	gacatcaggc	tcaaacggtc	aaaccacga	aaacttttac	600
[1017]	ctcatttctt	aaccacgcag	tggtatttga	atagccttaa	taggctaata	caaaacaaca	660
[1018]	agccatcgat	tacagtttta	actataatat	tacaaaatct	taaacaaaaa	caagaaaaga	720
[1019]	tatatattcc	gtaaaattaa	aataatattt	ttaatatagt	cattatgtaa	gttagctctt	780
[1020]	tcgacaaaat	cattataaat	taggccatgt	tgtaagttag	ttctttttatc	gacaagccat	840
[1021]	tataacttag	gtaattttgt	aagttagctg	gactataacc	aatttttttg	tttcacatct	900
[1022]	agagtataaa	acacatatat	attgaccgta	caacttttagt	caaattagaa	actctgtttt	960
[1023]	atctgcagaa	aagaaaaaaa	aagaggatga	attatgtaaa	tacttcagga	ttagaaataa	1020
[1024]	tgtcatcgta	tatctcttga	tatgaataca	tattttactt	gactagtacc	gtagtcggca	1080
[1025]	ggaaaatgac	acaaacaacc	atctaaaaag	ataaagtaag	aactaaaaag	tcttgacatt	1140
[1026]	cattagtttta	atcattttct	gttaacatat	atggaaaaaa	caaacttcac	cgttattttac	1200
[1027]	ctgaattttac	ctatttgggt	agaatttgta	cctctggacc	tctagtattt	tatatacacc	1260
[1028]	taaaaatata	attttggteg	ggaaaatata	actctgttta	attaattaaa	ttttcagtat	1320
[1029]	tgtgtaagtg	taattataga	aatcaatttt	atccgcgtaa	caaaataata	taaaattata	1380
[1030]	ctttcaaatc	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaaataag	cattgggtctt	1440
[1031]	cggccgacaa	aaaaaaaaagc	attggctctc	gaatattttg	aatatcggac	caatgggtata	1500
[1032]	taattaataa	tatgtgggtat	ataaatacat	atttatttta	atcacaatag	gatatgcaat	1560
[1033]	gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaag	tccgggttaa	actgatagca	tatattataa	1620
[1034]	tagatgcac	tataattgtt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
[1035]	cttcatttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
[1036]	atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaatactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
[1037]	aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaaggt	agtcacgaga	tatatatttt	1860
[1038]	ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataatttca	cgtttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
[1039]	cttcgaaccc	gagttttgtt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
[1040]	tccatctttt	tagcttccat	atctctctat	aatcggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
[1041]	ccaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	agttgtactc	cagcttgtgc	catgatgac	2100
[1042]	acattcggtta	tctatttttt	ggcacaagct	tgagtacaac	tgattggctc	ttcttactac	2160
[1043]	aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
[1044]	catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	atcttctatc	tcttttgttt	aaactaagaa	2280
[1045]	actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
[1046]	ctttctccgg	tgcagtcagc	caccgtcggg	taagtttcat	ctgtatttta	ttaattaatt	2400
[1047]	acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcgggtccaaa	2460
[1048]	cattctaaac	caattattct	gaaaagggtg	aacgccaatc	agttatatac	aatattctta	2520
[1049]	cattaaagta	gaatcggaga	tgttacatac	taacaaaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580

[1050]	ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggtg	2640
[1051]	agtggggaac agatatgctc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
[1052]	atattttttt tctagtaggt tcatattgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
[1053]	ggtgagtttt ttggtcgcat attccttggtg attccttctc tacgttttca ctttcttctt	2820
[1054]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[1055]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[1056]	ccaatttagt acgaatatat ttatgggccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[1057]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[1058]	cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[1059]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaa acgttgtatt	3180
[1060]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagt acaaactgtt gtatacagcc	3240
[1061]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
[1062]	aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
[1063]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
[1064]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[1065]	gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[1066]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
[1067]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaactta	3660
[1068]	cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[1069]	gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[1070]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggtgctc	3840
[1071]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[1072]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[1073]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[1074]	<210> 37	
[1075]	<211> 4000	
[1076]	<212> DNA	
[1077]	<213> Artificial Sequence	
[1078]	<220>	
[1079]	<223> Plasmid-7: GEiGS_ mir390a _si-PDS_1	
[1080]	<400> 37	
[1081]	accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
[1082]	tttaaatattg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[1083]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[1084]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[1085]	ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[1086]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat ttttttctgt	360
[1087]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
[1088]	ccaatcta atacacgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc	480
[1089]	caacctgact gttttattct agtattttaa ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[1090]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[1091]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660

[1092]	agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[1093]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gtagctctt	780
[1094]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttcttttatac gacaagccat	840
[1095]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
[1096]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[1097]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[1098]	tgtcatcgta tatctcttga tatgaataca tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[1099]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[1100]	cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
[1101]	ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[1102]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat	1320
[1103]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
[1104]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt	1440
[1105]	cggccgacaa aaaaaaagc attggctctc gaatatattg aatatcggac caatgggtata	1500
[1106]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacatag gatatgcaat	1560
[1107]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[1108]	tagatgcac tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attagcttc	1680
[1109]	cttcatttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[1110]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[1111]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagg agtcatcaga tatatatattt	1860
[1112]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[1113]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcacctc tcttctcctt cttcctcact	1980
[1114]	tccatctttt tagcttact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[1115]	ccaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tatccacaca aactacctgc aatgatgac	2100
[1116]	acattcgta tctattttt tgcaggtagt gtgtgtggat agattggctc ttcttactac	2160
[1117]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[1118]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgitt aaactaagaa	2280
[1119]	actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
[1120]	ctttctcgg tgcagtcage caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[1121]	acaattatta gtgttcttat taccgtttg gtaaaattag ttaattaatg tcgggtccaaa	2460
[1122]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[1123]	cattaaagta gaatcggaga gtgtacatac taacaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[1124]	ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggtta	2640
[1125]	agtggggaac agatatgtc tgcatagaac acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
[1126]	atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
[1127]	ggtgagtttt ttggtcgc atctctgtg attcttctc tacgttttca ctttcttctt	2820
[1128]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[1129]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[1130]	ccaatttagt acgaatatat ttatggtcgg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[1131]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[1132]	cagtgaactt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[1133]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180

[1134] gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc 3240
 [1135] tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attgggtcaat 3300
 [1136] aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctgttgatg 3360
 [1137] gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt 3420
 [1138] atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaagggtta atcagtaatc 3480
 [1139] gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa 3540
 [1140] tgctattaca aagggttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaatttcaat 3600
 [1141] gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct taaaaactta 3660
 [1142] cattattgat aaagttgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat 3720
 [1143] gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga 3780
 [1144] gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggtgctc 3840
 [1145] tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgtccaatt 3900
 [1146] ttcatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
 [1147] tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000
 [1148] <210> 38
 [1149] <211> 4000
 [1150] <212> DNA
 [1151] <213> Artificial Sequence
 [1152] <220>
 [1153] <223> Plasmid-8: GEiGS_ mir390a _si-PDS_2
 [1154] <400> 38
 [1155] accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat 60
 [1156] tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc 120
 [1157] attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact 180
 [1158] cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata 240
 [1159] ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa 300
 [1160] aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt 360
 [1161] ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat 420
 [1162] ccaatcctaat acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc 480
 [1163] caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag 540
 [1164] ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac 600
 [1165] ctcatctctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca 660
 [1166] agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga 720
 [1167] tatatatcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt 780
 [1168] tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttat gacaagccat 840
 [1169] tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct 900
 [1170] agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt 960
 [1171] atctgcagaa aagaaaaaaa aaggagatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa 1020
 [1172] tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tatttttactt gactagtacc gtagtcggca 1080
 [1173] ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt 1140
 [1174] cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac 1200
 [1175] ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc 1260

[1176]	taaaaatata	atdddggctg	ggaaaatata	actctgttta	attaattaaa	ttttcagtat	1320
[1177]	tgtgtaagt	taattataga	aatcaatddd	atccgcgtaa	caaaataata	taaaattata	1380
[1178]	ctttcaaate	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaataag	cattggctctt	1440
[1179]	cggccgacaa	aaaaaaaaagc	attggctctc	gaatatdddg	aatatcggac	caatgggtata	1500
[1180]	taattaataa	tatgtgggtat	ataaatacat	attdattdta	atcacaaatag	gatatgcaat	1560
[1181]	gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaaag	tccgggttaa	actgatagca	tatattataa	1620
[1182]	tagatgcate	tataattgtt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtatdddga	attaagcttc	1680
[1183]	cttcatttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
[1184]	atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaatactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
[1185]	aaattdaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaaggt	agtcacacaga	tatatatddd	1860
[1186]	ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataattdca	cgttdtaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
[1187]	cttcgaaccc	gagtdtdgtt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttctcact	1980
[1188]	tccatctddd	tagcttcact	atctctctat	aatcggtdtd	atcttdctct	aagtcacaa	2040
[1189]	ccaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	tgacaatcca	gccaatccag	catgatgatc	2100
[1190]	acattcgtda	tctattdtdt	gctggattgg	atggattgtc	agattggctc	ttcttactac	2160
[1191]	aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
[1192]	catttaagct	atcttdtata	aacgtgtctt	attdtctatc	tcttdtdgtt	aaactaagaa	2280
[1193]	actatagtat	tdtgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttdtagtct	2340
[1194]	cttdtctcgg	tgcagtcagc	caccgtcggg	taagtdtcat	ctgtattdta	tdaattaat	2400
[1195]	acaattatta	gtgttcttat	taccgttdtg	gtaaaattag	tdaattaatg	tcgggtccaaa	2460
[1196]	cattctaaac	caattattdt	gaaaagggtg	aacgccaatc	agtdtatatac	aatattdctta	2520
[1197]	cattaaagta	gaatcggaga	gtttacatac	taacccaaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580
[1198]	tdcttdtaaga	tdtgttdtagg	attdactcac	tdtdatagtgc	tcgcggttdg	ggtcagggtta	2640
[1199]	agtggggaac	agatatgtct	tgcatagaac	acgtggacca	acatgcatac	acacagttac	2700
[1200]	attdattdtd	tctagtdagg	tcatttdcaa	attdtccagt	atcttdgtatg	tdatcttdcat	2760
[1201]	ggtagtdtdt	tdggctcgcac	attdcttdgtg	attdcttdctc	tacgttdtdca	cttdcttdctt	2820
[1202]	cagagacctt	attdaatatgt	taattgcatg	aattdtatgta	acattcaaga	aaaagagatc	2880
[1203]	gaatacaaga	aaccggaaat	tdaatttdcta	attdgaattc	tatgcatgtd	tgttdcttdtg	2940
[1204]	ccaatttagt	acgaatatac	tdatggctccg	gagtdtctaac	caaagatagt	tgtctctgtat	3000
[1205]	atagaagtta	tacatctcgc	tdgttdtaaac	taaataacta	tdtagtdtdgt	cttdggtagtc	3060
[1206]	cagtgacttd	ctgcaaacat	tgggatttdat	aatatagtca	aaacgttdggg	atatgtagta	3120
[1207]	tdcatttdtcg	tdgtaaaaat	cattatattd	tgcaaaggtt	gcaacgtaaa	acgttdgtatt	3180
[1208]	gaattdtagga	gaaagtagcc	attdacaatg	aattdtdtagt	acaaactgtt	gtatacagcc	3240
[1209]	tgtgccacta	agtatgtcta	tatctaaatt	tggaaatggat	gataaccagt	attdggtdcaat	3300
[1210]	aatggataat	tdggtdattda	gaattactaa	tdtggtdattd	tagtgacaaa	ctgttdgtatg	3360
[1211]	gaattdtagga	gaacgcgttc	ccaagctata	tattatatgt	attdcattct	tdcatatgtd	3420
[1212]	atattatgaa	tdgttdataaa	aaagaccaat	gagcaacggg	tdaaggttda	atcagtaatc	3480
[1213]	gatccgacca	atcatataca	agtdcctaac	acatcttdcta	actactgagt	aaaatagtaa	3540
[1214]	tgtctattaca	aaggttdtdt	cttdtcaaaa	tacagcctaa	tgtactaca	aaattdcta	3600
[1215]	gttataaaat	aatcatagga	gaagtaaacc	ccggtattda	attdaatacct	tacaaactta	3660
[1216]	cattattdgat	aaagtdgaat	gaagagtdat	atggtdccatt	tagtdattatt	tacttdaatat	3720
[1217]	gatactagt	tdtagacgtgt	tactgtattd	caacgtgcac	aatcaggttd	tdcaaaaaga	3780

[1218]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattgt gaggtgctc 3840
[1219]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
[1220]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
[1221]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000
[1222]	<210> 39
[1223]	<211> 22
[1224]	<212> DNA
[1225]	<213> Artificial sequence
[1226]	<220>
[1227]	<223> Single strand oligonucleotide
[1228]	<400> 39
[1229]	ttcgcttgca gagagaaatc ac 22
[1230]	<210> 40
[1231]	<211> 21
[1232]	<212> DNA
[1233]	<213> Artificial sequence
[1234]	<220>
[1235]	<223> Single strand oligonucleotide
[1236]	<400> 40
[1237]	aagctcagga gggatagcgc c 21
[1238]	<210> 41
[1239]	<211> 23
[1240]	<212> DNA
[1241]	<213> Artificial sequence
[1242]	<220>
[1243]	<223> Single strand oligonucleotide
[1244]	<400> 41
[1245]	cttgacagaga gaaatcacag tgg 23
[1246]	<210> 42
[1247]	<211> 23
[1248]	<212> DNA
[1249]	<213> Artificial sequence
[1250]	<220>
[1251]	<223> Single strand oligonucleotide
[1252]	<400> 42
[1253]	gcttacacag agaatcacag agg 23
[1254]	<210> 43
[1255]	<211> 23
[1256]	<212> DNA
[1257]	<213> Artificial sequence
[1258]	<220>
[1259]	<223> Single strand oligonucleotide

[1260]	<400> 43
[1261]	aagaatctgt aaagctcagg agg 23
[1262]	<210> 44
[1263]	<211> 23
[1264]	<212> DNA
[1265]	<213> Artificial sequence
[1266]	<220>
[1267]	<223> Single strand oligonucleotide
[1268]	<400> 44
[1269]	ctatccatcc tgagtttcat tgg 23
[1270]	<210> 45
[1271]	<211> 21
[1272]	<212> DNA
[1273]	<213> Artificial sequence
[1274]	<220>
[1275]	<223> Single strand oligonucleotide
[1276]	<400> 45
[1277]	aagtcgtgct gcttcatgtg g 21
[1278]	<210> 46
[1279]	<211> 22
[1280]	<212> DNA
[1281]	<213> Artificial sequence
[1282]	<220>
[1283]	<223> Single strand oligonucleotide
[1284]	<400> 46
[1285]	ccacataagc aggacgagtt aa 22
[1286]	<210> 47
[1287]	<211> 21
[1288]	<212> DNA
[1289]	<213> Artificial sequence
[1290]	<220>
[1291]	<223> Single strand oligonucleotide
[1292]	<400> 47
[1293]	agttgtactc cagcttgtgc c 21
[1294]	<210> 48
[1295]	<211> 21
[1296]	<212> DNA
[1297]	<213> Artificial sequence
[1298]	<220>
[1299]	<223> Single strand oligonucleotide
[1300]	<400> 48
[1301]	gcaaagctgc agtacaacta a 21

[1302] <210> 49
[1303] <211> 21
[1304] <212> DNA
[1305] <213> Artificial sequence
[1306] <220>
[1307] <223> Single strand oligonucleotide
[1308] <400> 49
[1309] tatccacaca aactacctgc a 21
[1310] <210> 50
[1311] <211> 21
[1312] <212> DNA
[1313] <213> Artificial sequence
[1314] <220>
[1315] <223> Single strand oligonucleotide
[1316] <400> 50
[1317] gcagtagtta gtgtggataa a 21
[1318] <210> 51
[1319] <211> 21
[1320] <212> DNA
[1321] <213> Artificial sequence
[1322] <220>
[1323] <223> Single strand oligonucleotide
[1324] <400> 51
[1325] tgacaatcca gccaatccag c 21
[1326] <210> 52
[1327] <211> 21
[1328] <212> DNA
[1329] <213> Artificial sequence
[1330] <220>
[1331] <223> Single strand oligonucleotide
[1332] <400> 52
[1333] ctgattggca ggattgtcaa a 21
[1334] <210> 53
[1335] <211> 21
[1336] <212> DNA
[1337] <213> Artificial sequence
[1338] <220>
[1339] <223> Single strand oligonucleotide
[1340] <400> 53
[1341] taaagatcgg caacacatga t 21
[1342] <210> 54
[1343] <211> 19

- [1344] <212> DNA
[1345] <213> Artificial sequence
[1346] <220>
[1347] <223> Single strand oligonucleotide
[1348] <400> 54
[1349] tcagtgttgg cgatcttta 19
[1350] <210> 55
[1351] <211> 21
[1352] <212> DNA
[1353] <213> Artificial sequence
[1354] <220>
[1355] <223> Single strand oligonucleotide
[1356] <400> 55
[1357] tgacctttct tgggttagc c 21
[1358] <210> 56
[1359] <211> 19
[1360] <212> DNA
[1361] <213> Artificial sequence
[1362] <220>
[1363] <223> Single strand oligonucleotide
[1364] <400> 56
[1365] gctaaccat gaaaggtca 19
[1366] <210> 57
[1367] <211> 102
[1368] <212> DNA
[1369] <213> Artificial sequence
[1370] <220>
[1371] <223> Single strand oligonucleotide
[1372] <400> 57
[1373] taagtacttt cgcttcgaga gagaaatcac agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1374] gtctctttcc tctgtgattc tctgtgtaag cgaaagagct tg 102
[1375] <210> 58
[1376] <211> 102
[1377] <212> DNA
[1378] <213> Artificial sequence
[1379] <220>
[1380] <223> Single strand oligonucleotide
[1381] <400> 58
[1382] taagtactta agtcgtgctg cttcatgtgg agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1383] gtctctttcc tctccacata agcaggacga gttaagagct tg 102
[1384] <210> 59
[1385] <211> 102

- [1386] <212> DNA
[1387] <213> Artificial sequence
[1388] <220>
[1389] <223> Single strand oligonucleotide
[1390] <400> 59
[1391] taagtactta gttgtactcc agcttggtgcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1392] gtctctttcc tctggcaaag ctgcagtaca actaagagct tg 102
[1393] <210> 60
[1394] <211> 102
[1395] <212> DNA
[1396] <213> Artificial sequence
[1397] <220>
[1398] <223> Single strand oligonucleotide
[1399] <400> 60
[1400] taagtacttt atccacacaa actacctgca agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1401] gtctctttcc tcttgtagta gttagtgtgg ataaagagct tg 102
[1402] <210> 61
[1403] <211> 102
[1404] <212> DNA
[1405] <213> Artificial sequence
[1406] <220>
[1407] <223> Single strand oligonucleotide
[1408] <400> 61
[1409] taagtacttt gacaatccag ccaatccagc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1410] gtctctttcc tctgctgatt ggcaggattg tcaaagagct tg 102
[1411] <210> 62
[1412] <211> 102
[1413] <212> DNA
[1414] <213> Artificial sequence
[1415] <220>
[1416] <223> Single strand oligonucleotide
[1417] <400> 62
[1418] taagtacttt aaagatcggc aacacatgat agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[1419] gtctctttcc tctgatcagt gttggcgatc tttaagagct tg 102
[1420] <210> 63
[1421] <211> 102
[1422] <212> DNA
[1423] <213> Artificial sequence
[1424] <220>
[1425] <223> Single strand oligonucleotide
[1426] <400> 63
[1427] taagtacttt gacctttctt gggtttagcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60

- [1428] gtctctttcc tctgggctaa cccatgaaag gtcaagagct tg 102
- [1429] <210> 64
- [1430] <211> 107
- [1431] <212> DNA
- [1432] <213> Artificial sequence
- [1433] <220>
- [1434] <223> Single strand oligonucleotide
- [1435] <400> 64
- [1436] gtagagaaga atctgtaaag ctcaggaggg atagcgccat gatgatcaca ttcgttatct 60
- [1437] attttttggc gctatccatc ctgagtttca ttggctcttc ttactac 107
- [1438] <210> 65
- [1439] <211> 107
- [1440] <212> DNA
- [1441] <213> Artificial sequence
- [1442] <220>
- [1443] <223> Single strand oligonucleotide
- [1444] <400> 65
- [1445] gtagagaaga atctgtaaag tcgtgctgct tcatgtggat gatgatcaca ttcgttatct 60
- [1446] attttttcca catgaagaag cacgacttga ttggctcttc ttactac 107
- [1447] <210> 66
- [1448] <211> 107
- [1449] <212> DNA
- [1450] <213> Artificial sequence
- [1451] <220>
- [1452] <223> Single strand oligonucleotide
- [1453] <400> 66
- [1454] gtagagaaga atctgtaagt tgtactccag cttgtgccat gatgatcaca ttcgttatct 60
- [1455] attttttggc acaagcttga gtacaactga ttggctcttc ttactac 107
- [1456] <210> 67
- [1457] <211> 107
- [1458] <212> DNA
- [1459] <213> Artificial sequence
- [1460] <220>
- [1461] <223> Single strand oligonucleotide
- [1462] <400> 67
- [1463] gtagagaaga atctgtatat ccacacaaac tacctgcaat gatgatcaca ttcgttatct 60
- [1464] atttttttgc aggtagtgtg tgtggataga ttggctcttc ttactac 107
- [1465] <210> 68
- [1466] <211> 107
- [1467] <212> DNA
- [1468] <213> Artificial sequence
- [1469] <220>

- [1470] <223> Single strand oligonucleotide
[1471] <400> 68
[1472] gtagagaaga atctgtatga caatccagcc aatccagcat gatgatcaca ttcgttatct 60
[1473] attttttgct ggattggatg gattgtcaga ttggctcttc ttactac 107
[1474] <210> 69
[1475] <211> 107
[1476] <212> DNA
[1477] <213> Artificial sequence
[1478] <220>
[1479] <223> Single strand oligonucleotide
[1480] <400> 69
[1481] gtagagaaga atctgtataa agatcggcaa cacatgatat gatgatcaca ttcgttatct 60
[1482] attttttate atgtgttacc gatctttaca ttggctcttc ttactac 107
[1483] <210> 70
[1484] <211> 107
[1485] <212> DNA
[1486] <213> Artificial sequence
[1487] <220>
[1488] <223> Single strand oligonucleotide
[1489] <400> 70
[1490] gtagagaaga atctgtatga cttttcttgg gtttagccat gatgatcaca ttcgttatct 60
[1491] attttttggc taaaccccag aaaggtcaca ttggctcttc ttactac 107
[1492] <210> 71
[1493] <211> 4100
[1494] <212> DNA
[1495] <213> Artificial sequence
[1496] <220>
[1497] <223> Single strand oligonucleotide
[1498] <400> 71
[1499] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60
[1500] tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta 120
[1501] acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta 180
[1502] tgaacatggt ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt ttagcactt tagcaggcc 240
[1503] agcaaaatgg cgttcttggg aagggcatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca 300
[1504] gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg 360
[1505] ctctgttggg aaataacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag 420
[1506] aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa 480
[1507] tggaatgaat aatgaatga atgaaatagg gtttttcttg ttttagatcct gtgcacccg 540
[1508] agaataatag aagctgaatt aattgggtga gagttttatg gtggcgatgt tgtattttata 600
[1509] gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt 660
[1510] gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt 720
[1511] tgtagaccgc attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga 780

[1512]	gtagagacat cgg tcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
[1513]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
[1514]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
[1515]	gaggtggctt gatgggaagt ttcattggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcggt	1020
[1516]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1517]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
[1518]	aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[1519]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[1520]	cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[1521]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgccctca aagttgttgg atcattattt tttacgtaa	1380
[1522]	tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagt ttgcttccaac ttttttttt	1440
[1523]	tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaa	1500
[1524]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaatc aatcagttcc tccaatgtt ggcagaagcc	1560
[1525]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[1526]	aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatgtgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[1527]	attttcatcc ataaaaaat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[1528]	aacaaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[1529]	aaaaataaaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1530]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1531]	cttaaaaggc cggctctatc gtaatctcag cccaataccc tattttctc tcccctatat	1980
[1532]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[1533]	tgtgttggtg attaagtact ttcgcttgca gagagaaatc acagtgtgca aaaaagttgt	2100
[1534]	agttttctta aagtctcttt cctctgtgat tctctgtgta agcgaaagag cttgctccct	2160
[1535]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
[1536]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[1537]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
[1538]	taaaatctga ataattgatt tcaatttga gattcgggta taaaattac tgatttacga	2400
[1539]	atgacattta tatcgataga tgagtttgcg gatttggttg tttaattgat aaatcaagga	2460
[1540]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1541]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatgta agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccac	2580
[1542]	aatgataaaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[1543]	aaaaggcatc tgtacctgag ccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[1544]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[1545]	gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaataa attggccttt aattagctca	2820
[1546]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[1547]	gtacatgatt tcaaatattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1548]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagt	3000
[1549]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
[1550]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1551]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaact tactaacaca	3180
[1552]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1553]	gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300

[1554]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttggatca ctttgttcag tttgttgtgg	3360
[1555]	atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1556]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
[1557]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
[1558]	aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
[1559]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
[1560]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1561]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata	3780
[1562]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata	3840
[1563]	ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[1564]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg	3960
[1565]	attttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[1566]	ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[1567]	aaaaataact cttaatttta	4100
[1568]	<210>	72
[1569]	<211>	4100
[1570]	<212>	DNA
[1571]	<213>	Artificial sequence
[1572]	<220>	
[1573]	<223>	Single strand oligonucleotide
[1574]	<400>	72
[1575]	cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
[1576]	tttgaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[1577]	acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
[1578]	tgaacatggt ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
[1579]	agcaaaatgg cgttcttgga aagggcattg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
[1580]	gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
[1581]	ctcgtttggt aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
[1582]	aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttctttttct aagagtagaa	480
[1583]	tggaatgaat aatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
[1584]	agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtattttata	600
[1585]	gagggaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
[1586]	gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaataa atgcattttt	720
[1587]	tgtagaccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
[1588]	gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
[1589]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
[1590]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagtgtg tcattctta agtatacata	960
[1591]	gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt	1020
[1592]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1593]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
[1594]	aatagaatcc caaaattatg atatttgatc atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[1595]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260

[1596]	cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[1597]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgccctca aagttgttgg atcattatit tttacgtaaa	1380
[1598]	tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
[1599]	tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
[1600]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[1601]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[1602]	aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[1603]	attttcatcc ataaaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[1604]	aacaaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[1605]	aaaaataaaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1606]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1607]	cttaaagcgg cggctctatc gtaatctcag cccaataccc tattttctc tcccctatat	1980
[1608]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[1609]	tgtgttggtg attaagtact taagtcgtgc tgcttcatgt ggagtggta aaaaagttgt	2100
[1610]	agttttctta aagtctcttt cctctccaca taagcaggac gagttaagag cttgctccct	2160
[1611]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
[1612]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[1613]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggta	2340
[1614]	taaaatctga ataattgatt tcaatttga gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
[1615]	atgacattta tatcgataga tgagtttgc gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[1616]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1617]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatgta agttgatgtt gaaccaacaa atctgccccaa	2580
[1618]	aatgataaaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[1619]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[1620]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcaactattgt attgtatagc tacatttcaa	2760
[1621]	gcgtaattaa acctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[1622]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[1623]	gtacatgatt tcaaatatit taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1624]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagt	3000
[1625]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
[1626]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1627]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
[1628]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1629]	gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[1630]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgg	3360
[1631]	atcgtcttcc gttacgttct cacaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1632]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgctccg gaatgatcaa	3480
[1633]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
[1634]	aagatatagg aacatgtaat catgcggtc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc	3600
[1635]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgttcc ttttttctt ttttttttg tgatagtttt	3660
[1636]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1637]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata	3780

[1638] caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata 3840
 [1639] ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt 3900
 [1640] taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg 3960
 [1641] attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020
 [1642] ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
 [1643] aaaaataact ctttaattta 4100
 [1644] <210> 73
 [1645] <211> 4100
 [1646] <212> DNA
 [1647] <213> Artificial sequence
 [1648] <220>
 [1649] <223> Single strand oligonucleotide
 [1650] <400> 73
 [1651] cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca 60
 [1652] tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta 120
 [1653] acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta 180
 [1654] tgaacatggg tttaccaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc 240
 [1655] agcaaaatgg cgttcttgga aagggcatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca 300
 [1656] gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg 360
 [1657] ctcgtttggg aaataacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag 420
 [1658] aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttctttttct aagagtagaa 480
 [1659] tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcaccgc 540
 [1660] agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtattttata 600
 [1661] gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt 660
 [1662] gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaataa aatgcatttt 720
 [1663] tgtagaccgc attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga 780
 [1664] gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat 840
 [1665] cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggg 900
 [1666] caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaagttgt tccattctta agtatacata 960
 [1667] gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt 1020
 [1668] gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca 1080
 [1669] aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat 1140
 [1670] aatagaatcc caaaattatg atatttgta atcaaattg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 [1671] aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca 1260
 [1672] cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat 1320
 [1673] aactttcgaa ttcttgtttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt tttacgtaaa 1380
 [1674] tgtggcttaa tgagaattta tgtttggtgg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt 1440
 [1675] ttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct tttcttatt tcaagttaaa 1500
 [1676] catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaatc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc 1560
 [1677] aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta 1620
 [1678] aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatgtgaaa ataattgagc accgttaata 1680
 [1679] attttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatgtga tccccattaa attcattcgt 1740

[1680]	aaccaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[1681]	aaaaataaaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1682]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1683]	cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat	1980
[1684]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[1685]	tgtgttggtg attaatgact tagttgtact ccagcttggtg ccagtgggtca aaaaagttgt	2100
[1686]	agttttctta aagtctcttt cctctggcaa agctgcagta caactaagag cttgctccct	2160
[1687]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
[1688]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[1689]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactgggtta	2340
[1690]	taaaatctga ataatgtatt tcaatttga gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
[1691]	atgacattta tatcgataga tgagtttgcg gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[1692]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1693]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatga agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
[1694]	aatgataaaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[1695]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattatc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[1696]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[1697]	gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[1698]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[1699]	gtacatgatt tcaaatatit taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1700]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
[1701]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
[1702]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1703]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
[1704]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1705]	gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[1706]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgg	3360
[1707]	atcgtcttcc gttacgttct cacaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1708]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
[1709]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
[1710]	aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc	3600
[1711]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
[1712]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgatttg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1713]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
[1714]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata	3840
[1715]	ttttagaaaa ttttatittg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[1716]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgg	3960
[1717]	attttttaa ataaatittt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[1718]	ccttatacag tttatatittt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[1719]	aaaaataact cttaatttta	4100
[1720]	<210> 74	
[1721]	<211> 4100	

[1722]	<212> DNA	
[1723]	<213> Artificial sequence	
[1724]	<220>	
[1725]	<223> Single strand oligonucleotide	
[1726]	<400> 74	
[1727]	cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aattttcaaaa ctgaaattca	60
[1728]	tttghtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[1729]	acagtattat atatacacgt cgtttagtta tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
[1730]	tgaacatggt ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
[1731]	agcaaaatgg cgttcttggg aagggcatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
[1732]	gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
[1733]	ctcgtttggg aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
[1734]	aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttcttttctt aagagtagaa	480
[1735]	tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg ttttagatcct gtcgcaccgc	540
[1736]	agaataatag aagctgaatt aattgggtga gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
[1737]	gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
[1738]	gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
[1739]	tgtagaccgc attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
[1740]	gtagagacat cgggtcaactt tgttttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgat	840
[1741]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggg	900
[1742]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagtgtg tccattctta agtatacata	960
[1743]	gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt	1020
[1744]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1745]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
[1746]	aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[1747]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[1748]	cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[1749]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt ttacgtaaa	1380
[1750]	tgtggttaaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgcctccaac tttttttttt	1440
[1751]	tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
[1752]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[1753]	aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[1754]	aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[1755]	attttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[1756]	aacaaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[1757]	aaaaataaaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1758]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1759]	cttaaagcgg cggctctatc gtaatctcag cccaataccc tattttcttc tcccctatat	1980
[1760]	aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[1761]	tgtgttggtg attaagtact ttatccacac aaactacctg caagtggta aaaaagttgt	2100
[1762]	agttttctta aagtctcttt cctcttcgag tagttagtgt ggataaagag cttgctccct	2160
[1763]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220

[1764]	tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[1765]	gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
[1766]	taaaatctga ataatgtatt tcaatttga gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
[1767]	atgacattta tatcgataga tgagtttgc gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
[1768]	catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1769]	gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatga agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
[1770]	aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[1771]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc ttctactact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[1772]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[1773]	gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[1774]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[1775]	gtacatgatt tcaaatattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1776]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
[1777]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgta cagtcacgcc	3060
[1778]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1779]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
[1780]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1781]	gctaataatc gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[1782]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttggtcag ttgtttgtg	3360
[1783]	atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1784]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtccc gaatgatcaa	3480
[1785]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
[1786]	aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc	3600
[1787]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgttct ttttttctt ttctttttgg tgatagtttt	3660
[1788]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1789]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata	3780
[1790]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata	3840
[1791]	ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[1792]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
[1793]	attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[1794]	ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[1795]	aaaaataact cttaatttta	4100
[1796]	<210> 75	
[1797]	<211> 4100	
[1798]	<212> DNA	
[1799]	<213> Artificial sequence	
[1800]	<220>	
[1801]	<223> Single strand oligonucleotide	
[1802]	<400> 75	
[1803]	cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
[1804]	tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[1805]	acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180

[1806]	tgaacatggt tttaccaa	atgtaaatc atgtcattgt	tgtagcactt tagcgaggcc	240
[1807]	agcaaaatgg cgttcttgga	aagggcatgg cggcccggtg	ccgccaggga tatgtgtgca	300
[1808]	gctagaagga ttagaaggag	taacttcacc tttttgtaga	aactgtaaat tgccaagacg	360
[1809]	ctcgtttggt aaatacctta	acgcttcggt tgctggaatg	tgtaccacca ttagtagaag	420
[1810]	aaagtataat aagactatta	atgcaagaga ttttttcata	ttccttttct aagagtagaa	480
[1811]	tggaatgaat aaatgaatga	atgaaatagg gtttttcttg	tttagatcct gtcgcacccg	540
[1812]	agaataatag aagctgaatt	aattgggtgaa gagttttatg	gtggcgatgt tgtattttata	600
[1813]	gagggaaatg atttcaagtt	tacaatggga tttttaattt	gttttggtga ctattatctt	660
[1814]	gcggagagat cttgactggt	gacatgtatg tagtgtttgt	tattaaaata aatgcatttt	720
[1815]	tgtagacccg attcttaaat	atgttaggca tgggtcaaatt	gttagactgt aaaagcttga	780
[1816]	gtagagacat cgggtcaactt	tgttttacaag aattctctat	aaaatattat acaaattgat	840
[1817]	cggtagaaat tagatggaac	atgttggaatt aatgtttgac	aatgtataaa ttggtttggt	900
[1818]	caatatctag gaatgaaaac	aagagctgct tcaaagttgt	tccattctta agtatacata	960
[1819]	gaggtggctt gatgggaagt	ttcatggaag tgtagtttta	tatctacttc caaattcggt	1020
[1820]	gatctgtttc ttatctcaag	ctaaacatgt ttagaaaaga	tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1821]	aaaaaagagt caaatgtttg	gcaaacaagg tacttagatt	tttggcatct attcaaatat	1140
[1822]	aatagaatcc caaaattatg	atatttgtca atcaaatttg	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[1823]	aaagattcta caaaagatca	aacgtattgc cgtagattta	tcataatttt aattctttca	1260
[1824]	cactaccact agtccactac	catatagtga tgagataatc	cataatcata aataagatat	1320
[1825]	aactttcgaa ttcttgtttt	tgttgcctca aagttgttgg	atcattatit tttacgtaaa	1380
[1826]	tgtggcttaa tgagaattta	tgtttggtgg aattgtagtt	tgcttccaac tttttttttt	1440
[1827]	tttttttgaa cacgtagttt	gcttccaact tagtttatct	ttttcttatt tcaagttaaa	1500
[1828]	catgtaaaaa aacatgtgac	gacgaaatc aatcagttcc	tccaatgttt ggcagaagcc	1560
[1829]	aaatctttgg taaacaaagt	aatttttttg ccatttgatt	ggttagtata ggagaattta	1620
[1830]	aaaacgacga taaggtttag	gtaaattatt tcatttgaaa	ataattgagc accgttaata	1680
[1831]	attttcatcc ataaaataat	atttcaaaga tgatatttga	tccccattaa attcattcgt	1740
[1832]	aacaaaaaaa aagttatgaa	aaaagagtgg tcgtgtgagt	tgcccaagca ccattataat	1800
[1833]	aaaaataaaa ataattagca	agtaataagg aataaaatcc	tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1834]	gaaaaatatt tggagaccgt	cagattcgaa tctgaacaaa	gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1835]	cttaaaagcg cgggtctcatc	gtaatctcag cccaataccc	tattttcctc tcccctatat	1980
[1836]	aaatactttc ttcttctact	gatcttcttc tcacaaataa	acccaaatat atcaatctac	2040
[1837]	tgtgttggtg attaagtact	ttgacaatcc agccaatcca	gcagtgggtca aaaaagttgt	2100
[1838]	agttttctta aagtctcttt	cctctgctga ttggcaggat	tgtcaaagag cttgctccct	2160
[1839]	aaacttatct ctctgatgat	ttaatgtag agatcttcgt	aaatctatgt gtttgataga	2220
[1840]	tctgatgcgt tttttgagtt	gatgatttga ttatttttca	ctggaaagta tctcattagg	2280
[1841]	gtaacgataa tgttttatgg	atgttggtgt ataacagatc	catgaaatct tgactgggtta	2340
[1842]	taaaatctga ataattgatt	tcaatttgga gattcgggtga	taaaaattac tgattttacga	2400
[1843]	atgacattta tatcgataga	tgagtttgct gatttggttg	ttaaattgat aaatcaagga	2460
[1844]	catgagaaac tgtttttgta	tgctaatttg tccatggaat	aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1845]	gtgagggtag tcaggaaacc	ttaatatgga agttgatgtt	gaaccaacaa atctgcccaa	2580
[1846]	aaatgataaa agttgatgcc	gagcccacaa attttgatga	caatcgataa gcccaagccc	2640
[1847]	aaaaggcatc tgtacctgag	cccattatc tttcattact	agcaaaaagg atgcattaga	2700

[1848]	gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
[1849]	gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
[1850]	aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaagact	2880
[1851]	gtacatgatt tcaaatattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1852]	agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagt	3000
[1853]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgta cagtcacgcc	3060
[1854]	actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1855]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
[1856]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1857]	gctaataatc gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[1858]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttggatca ctttgttcag tttgttgg	3360
[1859]	atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1860]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtccc gaatgatcaa	3480
[1861]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagttga caaaaccgtg	3540
[1862]	aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttgtt gacaaagttc	3600
[1863]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgttcc ttttttctt ttttttttgg tgatagtttt	3660
[1864]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1865]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
[1866]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata	3840
[1867]	ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[1868]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg	3960
[1869]	attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[1870]	ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[1871]	aaaaataact ctttaattta	4100
[1872]	<210> 76	
[1873]	<211> 4100	
[1874]	<212> DNA	
[1875]	<213> Artificial sequence	
[1876]	<220>	
[1877]	<223> Single strand oligonucleotide	
[1878]	<400> 76	
[1879]	cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
[1880]	tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[1881]	acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
[1882]	tgaacatggt ttaccacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
[1883]	agcaaatggt cgttcttggg aaggcatggt cggcccggtg ccgccaggga tatgtgtgca	300
[1884]	gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
[1885]	ctcgtttggt aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
[1886]	aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
[1887]	tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttctt tttagatcct gtcgcaccg	540
[1888]	agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
[1889]	gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660

[1890]	gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
[1891]	tgtagaccgc attcttaaat atgttaggca tggtaaatt gtagactgt aaaagcttga	780
[1892]	gtagagacat cggtaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgtat	840
[1893]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
[1894]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
[1895]	gagggtgctt gatgggaagt ttcattggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcgtt	1020
[1896]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaactgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1897]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt ttggcatct attcaaatat	1140
[1898]	aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaattg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
[1899]	aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
[1900]	cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
[1901]	aactttcgaa ttcttgtttt tgttgctca aagttgttg atcattattt ttacgtaaa	1380
[1902]	tggtgcttaa tgagaattta tgtttgtgg aattgtagt tgcttccaac ttttttttt	1440
[1903]	ttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct tttcttatt tcaagttaa	1500
[1904]	catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgtt ggcagaagcc	1560
[1905]	aatcttttg taaacaaagt aattttttt ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
[1906]	aaaacgacga taaggttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
[1907]	atttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
[1908]	aacaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
[1909]	aaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
[1910]	gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
[1911]	cttaaagcgg cggctctatc gtaatctcag cccaataccc tattttctc tcccctatat	1980
[1912]	aaatactttc ttcttctact gatcttctc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
[1913]	tggttggtg attaatgact ttaagatcg gcaacacatg atagtggta aaaaagttgt	2100
[1914]	agttttctta aagtctctt cctctgatca gtgttgcca tctttaagag ctgctccct	2160
[1915]	aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttctg aaatctatgt gttgataga	2220
[1916]	tctgatgcgt ttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
[1917]	gtaacgataa tgttttatgg atttggtgt ataacagatc catgaaatct tgactggta	2340
[1918]	taaaatctga ataattgatt tcaatttga gattcggta taaaattac tgatttacga	2400
[1919]	atgacattta tatcgataga tgagtttctg gatttggtt ttaaattgat aaatcaagga	2460
[1920]	catgagaaac tgtttttga tgctaattt tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
[1921]	gtgaggtag tcaggaaacc ttaatttga agttgatgt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
[1922]	aatgataaa agttgatgcc gagccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
[1923]	aaaaggcatc tgtacctgag cccattatc ttctattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
[1924]	gaccccggtg tagtaaatg acctcacaat tcaatttgt attgtatag tacatttcaa	2760
[1925]	gcgtaattaa acctcatat ttttatagc tttaaataa attggcctt aattagctca	2820
[1926]	aataaactag atgtcgtac tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
[1927]	gtacatgatt tcaaatatt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
[1928]	agacaacaac gttactgaa cacatacaga ttgaaattc gatcatttac ttgcaaagt	3000
[1929]	ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgta cagtcacgc	3060
[1930]	actacactcg aattcaagct accatattat aatagttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
[1931]	caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaact tactaacaca	3180

[1932]	acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
[1933]	gctaataatgac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
[1934]	cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttggtcag tttgtgtgtg	3360
[1935]	atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
[1936]	taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttggtccc gaattgatcaa	3480
[1937]	gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
[1938]	aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
[1939]	ccaagacctc attctacaaa ccaatgttct ttttttctt ttttttttgg tgatagtttt	3660
[1940]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[1941]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
[1942]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata	3840
[1943]	ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[1944]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg	3960
[1945]	attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[1946]	ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[1947]	aaaaataact ctttaattta	4100
[1948]	<210>	77
[1949]	<211>	4100
[1950]	<212>	DNA
[1951]	<213>	Artificial sequence
[1952]	<220>	
[1953]	<223>	Single strand oligonucleotide
[1954]	<400>	77
[1955]	cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
[1956]	tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
[1957]	acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
[1958]	tgaacatggt tttaccaa attgtaaatc atgtcattgt ttagcactt tagcgaggcc	240
[1959]	agcaaaatgg cgttcttgga aaggcgatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
[1960]	gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
[1961]	ctcgtttggt aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
[1962]	aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
[1963]	tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
[1964]	agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
[1965]	gagggaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
[1966]	gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaataa aatgcatttt	720
[1967]	tgtagaccgg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
[1968]	gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaatgtat	840
[1969]	cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
[1970]	caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagtgtg tccattctta agtatacata	960
[1971]	gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt	1020
[1972]	gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatg ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
[1973]	aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaaggt tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140

[1974]	aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
[1975]	aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
[1976]	cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
[1977]	aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattatit	tttacgtaaa	1380
[1978]	tgtggcctaa	tgagaattta	tgtttgggg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
[1979]	tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
[1980]	catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
[1981]	aaatctttgg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggttagtata	ggagaattta	1620
[1982]	aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
[1983]	attttcatcc	ataaaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
[1984]	aacaaaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
[1985]	aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
[1986]	gaaaaatatt	tgagagccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
[1987]	cttaaagcgg	cggctctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
[1988]	aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
[1989]	tgtgttggtg	attaagtact	ttgaccttcc	ttgggtttag	ccagtgggtc	aaaaagttgt	2100
[1990]	agttttctta	aagtctcttt	cctctgggct	aacccatgaa	aggtcaagag	cttgctccct	2160
[1991]	aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
[1992]	tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
[1993]	gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactgggtta	2340
[1994]	taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttga	gattcgggtga	taaaaattac	tgattttacga	2400
[1995]	atgacattta	tatcgataga	tgagtttgc	gatttgggtg	ttaaattgat	aatcaagga	2460
[1996]	catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	gggtgaggacc	2520
[1997]	gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatgtt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
[1998]	aatgataaaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccagccc	2640
[1999]	aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattatc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
[2000]	gaccccggtg	tagtaaatg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatagc	tacatttcaa	2760
[2001]	gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaataa	attggccttt	aattagctca	2820
[2002]	aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatgggtatta	tgaaaagact	2880
[2003]	gtacatgatt	tcaaatattt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaatttga	2940
[2004]	agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
[2005]	ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
[2006]	actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
[2007]	caattttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaaact	tactaacaca	3180
[2008]	acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
[2009]	gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
[2010]	cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgg	3360
[2011]	atcgtcttcc	gttacgttct	caccaaaaat	atttcataat	gaaacaaaaa	aattaattaa	3420
[2012]	taatggtagc	ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480
[2013]	gtagagcatt	catagtgtct	tgccaatatg	gtgtgatcaa	cgaagtttga	caaaaccgtg	3540
[2014]	aagatatagg	aacatgtaat	catgcggctc	tccatacaat	acatcttggt	gacaaaagttc	3600
[2015]	ccaagacctc	attctacaaa	ccaatgttcc	ttttttcttt	ttctttttgg	tgatagtttt	3660

[2016]	tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
[2017]	ttatatatag tcattaacac tcattaccaaa tcacataatc aatagtctat ttgattata	3780
[2018]	caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata	3840
[2019]	ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
[2020]	taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg	3960
[2021]	atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
[2022]	ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
[2023]	aaaaataact ctttaattta	4100
[2024]	<210> 78	
[2025]	<211> 4000	
[2026]	<212> DNA	
[2027]	<213> Artificial sequence	
[2028]	<220>	
[2029]	<223> Single strand oligonucleotide	
[2030]	<400> 78	
[2031]	accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgatttc ttttaggaac agtaattaat	60
[2032]	tttaaatgtg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2033]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[2034]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2035]	ggggaacata atcattatit gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[2036]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
[2037]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
[2038]	ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
[2039]	caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2040]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[2041]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
[2042]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[2043]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2044]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2045]	tataacttag gtaattttgt aagtttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
[2046]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2047]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2048]	tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2049]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2050]	cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
[2051]	ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2052]	taaaaatata attttgggtg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat	1320
[2053]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
[2054]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt	1440
[2055]	cggccgacaa aaaaaaagc attggctctc gaatattttg aatatcggac caatggata	1500
[2056]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaatag gatatgcaat	1560
[2057]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620

[2058]	tagatgcac	tataattg	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
[2059]	cttcatttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
[2060]	atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaatactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
[2061]	aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaaggt	agtcacacaga	tatatatttt	1860
[2062]	ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataatttca	cgtttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
[2063]	cttcgaaccc	gagttttg	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
[2064]	tccatctttt	tagcttccact	atctctctat	aatcggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
[2065]	ccaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	aagctcagga	gggatagcgc	catgatgatc	2100
[2066]	acattcggtta	tctatttttt	ggcgtatcc	atcctgagtt	tcattggctc	ttcttactac	2160
[2067]	aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
[2068]	catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	atctttctatc	tcttttggtt	aaactaagaa	2280
[2069]	actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
[2070]	ctttctccgg	tgcagtcagc	caccgtcggg	taagtttcat	ctgtatttta	ttaattaatt	2400
[2071]	acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcgggtccaa	2460
[2072]	cattctaaac	caattattct	gaaaagggtg	aacgccaatc	agttatatac	aatattctta	2520
[2073]	cattaaagta	gaatcggaga	tgttacatac	taacccaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580
[2074]	ttctttaaga	tttgtttagg	atttactcac	tttatagtgc	tcgcggttgg	ggtcagggtta	2640
[2075]	agtggggaac	agatatgctc	tgcatagaac	acgtggacca	acatgcatat	acacagttac	2700
[2076]	atttattttt	tctagtaggt	tcatttgcaa	atcttccagt	atcttgtagt	ttatcttcat	2760
[2077]	ggtgagtttt	ttggtcgcat	attcttggtg	attcttcttc	tacgttttca	ctttcttctt	2820
[2078]	cagagacctt	attaatatgt	taattgcatg	aatttatgta	acattcaaga	aaaagagatc	2880
[2079]	gaatacaaga	aaccggaaat	ttaatttcta	atttgaattc	tatgcatggt	tgtttctttg	2940
[2080]	ccaatttagt	acgaatatat	ttatggtcg	gagttctaac	caaagatagt	tgctctgtat	3000
[2081]	atagaagtta	tacatctcgc	ttgtttaaac	taaataacta	tttagtttgt	cttggtagtc	3060
[2082]	cagtgaactt	ctgcaaacat	tgggatttat	aatatagtca	aaacgttggg	atatgtagta	3120
[2083]	ttcattttcg	ttgtaaaaat	cattatat	tgcaaagggt	gcaacgtaaa	acgttggtatt	3180
[2084]	gaatttagga	gaaagtagcc	atttacaatg	aatttttagtg	acaaactggt	gtatacagcc	3240
[2085]	tgtgccacta	agtatgtcta	tatctaaatt	tggaatggat	gataaccagt	attgggtcaat	3300
[2086]	aatggataat	ttgggtattta	gaattactaa	tttggtattt	tagtgacaaa	ctgttgtagt	3360
[2087]	gaatttagga	gaacgcgttc	ccaagctata	tatttatatg	atttcattct	ttcatatggt	3420
[2088]	atattatgaa	ttgttataaa	aaagaccaat	gagcaacggt	ttaaggttta	atcagtaatc	3480
[2089]	gatccgacca	atcatataca	agttcctaac	acatcttcta	actactgagt	aaaatagtaa	3540
[2090]	tgctattaca	aaggtttttt	cttttcaaaa	tacagcctaa	tgctactaca	aaattctaat	3600
[2091]	gttataaaaat	aatcatagga	gaagtaaacc	ccggtattta	attaatacct	tacaaactta	3660
[2092]	cattattgat	aaagttgaat	gaagagtat	atgggtccatt	tagtattatt	tacttaatat	3720
[2093]	gatactagtg	ttagacgtgt	tactgtattt	caacgtgcat	aatcaggttg	ttcaaaaaga	3780
[2094]	gagaggatag	gtcttcttct	tctgtaattt	gctgggaccg	caagtcatgt	gaggctgctc	3840
[2095]	tgctgatgct	gcacggcgtc	gcaactctct	caataaatc	ttttaactaa	cgtccaatt	3900
[2096]	ttcgatgtaa	attggctgac	ttcaattcta	tgccttactc	ttgtactcta	tgtttcttta	3960
[2097]	tctattaaaa	tccaactctg	cttttgaacc	caaaaaacaa			4000
[2098]	<210>	79					
[2099]	<211>	4000					

[2100]	<212> DNA
[2101]	<213> Artificial sequence
[2102]	<220>
[2103]	<223> Single strand oligonucleotide
[2104]	<400> 79
[2105]	accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgatttc ttttaggaac agtaattaat 60
[2106]	tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc 120
[2107]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact 180
[2108]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata 240
[2109]	ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa 300
[2110]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt 360
[2111]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat 420
[2112]	ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc 480
[2113]	caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag 540
[2114]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac 600
[2115]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca 660
[2116]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaaccaaaa caagaaaaga 720
[2117]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt 780
[2118]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat 840
[2119]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg ttccacatct 900
[2120]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caacttttagt caaattagaa actctgtttt 960
[2121]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa 1020
[2122]	tgatcatcgta tatctcttga tatgaataga tattttactt gactagtacc gtagtcggca 1080
[2123]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt 1140
[2124]	cattagttta atcattttct gttacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac 1200
[2125]	ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc 1260
[2126]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat 1320
[2127]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataataa taaaattata 1380
[2128]	ctttcaaate cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt 1440
[2129]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggctctc gaatattttg aatatcggac caatgggtata 1500
[2130]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttta atcacaatag gatatgcaat 1560
[2131]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa 1620
[2132]	tagatgcate tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attagcttc 1680
[2133]	cttcatttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg 1740
[2134]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag 1800
[2135]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagg agtcatcaga tatatatattt 1860
[2136]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc 1920
[2137]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctctctcact 1980
[2138]	tccatctttt tagcttccact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac 2040
[2139]	ccaaaaaac aaagtagaga agaactctgta aagtcgtgct gcttcatgtg gatgatgatc 2100
[2140]	acattcggtt tctatttttt ccacatgaag aagcacgact tgattggctc ttcttactac 2160
[2141]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc 2220

[2142]	catttaagct atcttttata aacgtgtcctt attttctatc tcttttggtt aaactaagaa	2280
[2143]	actatagtat ttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
[2144]	ctttctcgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2145]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtcctaaa	2460
[2146]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2147]	cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taaccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[2148]	ttctttaaga ttgttttagg atttactcac ttatagtgctc tcgcggttg ggtcagggtta	2640
[2149]	agtggggaac agatatgtc tgcatagaac acgtggacca acatgcatac acacagttac	2700
[2150]	atttatTTTT tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcat	2760
[2151]	ggtgagtttt ttggtcgcct attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
[2152]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2153]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[2154]	ccaatttagt acgaatatat ttatggtcgc gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[2155]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2156]	cagtgccttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2157]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatTT ttgcaaaggt gcaacgtaaa acgttgattt	3180
[2158]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagt acaaactgtt gtatacagcc	3240
[2159]	tggtccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
[2160]	aatggataat ttggtattta gaattactaa ttggtattt tagtgacaaa ctgttgtagt	3360
[2161]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
[2162]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2163]	gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2164]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
[2165]	gttataaaaat aatcatagga gaagtaaac cgggtattta attaatacct tacaaactta	3660
[2166]	cattattgat aaagttgaat gaagagtat atggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2167]	gatactagt ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2168]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcagt gaggtgctc	3840
[2169]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[2170]	ttcgatgtaa attggtgac ttcaattcta tgccttactc ttgtacteta tgtttcttta	3960
[2171]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[2172]	<210>	80
[2173]	<211>	4000
[2174]	<212>	DNA
[2175]	<213>	Artificial sequence
[2176]	<220>	
[2177]	<223>	Single strand oligonucleotide
[2178]	<400>	80
[2179]	accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgattc ttttaggaac agtaattaat	60
[2180]	tttaaatTT agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2181]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[2182]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2183]	ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300

[2184]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
[2185]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg ttgtctgcat	420
[2186]	ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc	480
[2187]	caacctgact gttttattct agtatittta ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2188]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[2189]	ctcattttct aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaacaaca	660
[2190]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[2191]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2192]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2193]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg ttccacatct	900
[2194]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2195]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2196]	tgatcatgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2197]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2198]	cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac	1200
[2199]	ctgaattttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2200]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat	1320
[2201]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataataa taaaattata	1380
[2202]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt	1440
[2203]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggctctc gaatatattt aatatcggac caatgggtata	1500
[2204]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacatag gatatgcaat	1560
[2205]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[2206]	tagatgcata tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attagcttc	1680
[2207]	cttcattttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[2208]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[2209]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaaggt agtcatacaga tatatatattt	1860
[2210]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[2211]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctccctcact	1980
[2212]	tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[2213]	ccaaaaaac aaagtagaga agaactctga agttgtactc cagcttgtgc catgatgatc	2100
[2214]	acattcggtta tctatttttt ggcacaagct tgagtacaac tgattggctc ttcttactac	2160
[2215]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[2216]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
[2217]	actatagtat ttgtctctaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
[2218]	ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2219]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcgggtccaa	2460
[2220]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2221]	cattaaagta gaatcggaga gtgtacatac taacaaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[2222]	ttctttaaga ttgttttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggctcaggga	2640
[2223]	agtggggaac agatatgctc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
[2224]	atttatattt tctagtaggt tcatattgaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcat	2760
[2225]	ggtgagtttt ttggtcgcat attcttgggt attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820

[2226]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2227]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg	2940
[2228]	ccaatttagt acgaatatat ttatggtcgg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[2229]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2230]	cagtgcacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2231]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatTT tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
[2232]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc	3240
[2233]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attgggtcaat	3300
[2234]	aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggatttt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
[2235]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt	3420
[2236]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2237]	gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2238]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaat	3600
[2239]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaactta	3660
[2240]	cattattgat aaagttgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2241]	gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2242]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggtgctc	3840
[2243]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[2244]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[2245]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[2246]	<210> 81	
[2247]	<211> 4000	
[2248]	<212> DNA	
[2249]	<213> Artificial sequence	
[2250]	<220>	
[2251]	<223> Single strand oligonucleotide	
[2252]	<400> 81	
[2253]	accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgattc ttttaggaac agtaattaat	60
[2254]	tttaaatTTg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2255]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[2256]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2257]	ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[2258]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat ttttttctgt	360
[2259]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgtgcat	420
[2260]	ccaatcta atacaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc	480
[2261]	caacctgact gttttattct agtatTTta ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2262]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[2263]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
[2264]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[2265]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2266]	tcgacaaaa atcattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2267]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg ttccacatct	900

[2268]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2269]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2270]	tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2271]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2272]	cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac	1200
[2273]	ctgaattttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2274]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat	1320
[2275]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
[2276]	ctttcaaadc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattgggtctt	1440
[2277]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggctctc gaatatattg aatatcggac caatgggtata	1500
[2278]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaaatag gatatgcaat	1560
[2279]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[2280]	tagatgcadc tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaaagcttc	1680
[2281]	cttcattttct gtgaatcaaa aggccctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[2282]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[2283]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagg agtcatcaga tatatatattt	1860
[2284]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgttttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[2285]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
[2286]	tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[2287]	ccaaaaaac aaagtagaga agaattctgta tatccacaca aactacctgc aatgatgac	2100
[2288]	acattcggtta tctatttttt tgcaggtagt gtgtgtggat agattggctc ttcttactac	2160
[2289]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[2290]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
[2291]	actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttttagtct	2340
[2292]	ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2293]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcgggtccaa	2460
[2294]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2295]	cattaaagta gaatcggaaga gtgtacatac taacccaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[2296]	ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggta	2640
[2297]	agtggggaac agatatgtc tgcatagaac acgtggacca acatgcatac acacagttac	2700
[2298]	atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
[2299]	ggtgagtttt ttggtcgcac attccttgggt attccttctc tacgttttca ctttcttctt	2820
[2300]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2301]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[2302]	ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[2303]	atagaagtta tacatctcgc ttgttttaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2304]	cagtgaactt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2305]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatat tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
[2306]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagt acaaactgtt gtatacagcc	3240
[2307]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attgggtcaat	3300
[2308]	aatggataat ttggatttta gaattactaa tttggatttt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
[2309]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420

[2310]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2311]	gatccgacca atcatatata agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2312]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaatttcta	3600
[2313]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct taaaaactta	3660
[2314]	cattattgat aaagttgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2315]	gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2316]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggtgctc	3840
[2317]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[2318]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[2319]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[2320]	<210>	82
[2321]	<211>	4000
[2322]	<212>	DNA
[2323]	<213>	Artificial sequence
[2324]	<220>	
[2325]	<223>	Single strand oligonucleotide
[2326]	<400>	82
[2327]	accctcattg attttgggtg ccaaaactct gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
[2328]	tttaaatgtg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2329]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[2330]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2331]	ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[2332]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat ttttttctg	360
[2333]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
[2334]	ccaatcta atacacgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaatctga tcatctattc	480
[2335]	caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2336]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggc aaaccacga aaacttttac	600
[2337]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
[2338]	agccatgat tacagtitta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[2339]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2340]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2341]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
[2342]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2343]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2344]	tgatcatgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2345]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2346]	cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac	1200
[2347]	ctgaattttac ctatttgggt agaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2348]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat	1320
[2349]	tgtgtaagt taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataata taaaattata	1380
[2350]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctct	1440
[2351]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatatattg aatatcggac caatggtata	1500

[2352]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaatag gatatgcaat	1560
[2353]	gtgtgtatat atacatatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[2354]	tagatgcac tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaagcttc	1680
[2355]	cttcatttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[2356]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[2357]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagg agtcatcaga tatatatattt	1860
[2358]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[2359]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttctcact	1980
[2360]	tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[2361]	ccaaaaaac aaagtagaga agaattctgt tgacaatcca gccaatccag catgatgac	2100
[2362]	acattcgtta tctatttttt gctggatttg atggattgtc agattggctc ttcttactac	2160
[2363]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[2364]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
[2365]	actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
[2366]	ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2367]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcgggtccaa	2460
[2368]	cattctaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2369]	cattaaagta gaatcgga tgttacatac taacaaaag ttacatatatac tagtatcatt	2580
[2370]	ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggtg	2640
[2371]	agtggggaac agatatgtc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatac acacagttac	2700
[2372]	atttattttt tctagtaggt tcat ttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
[2373]	ggtgagtttt ttggtcgc atctcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
[2374]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2375]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[2376]	ccaatttagt acgaatatat ttatgggtcc gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[2377]	atagaagtta tacatctcgc ttgttttaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2378]	cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2379]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
[2380]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactgtt gtatacagcc	3240
[2381]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
[2382]	aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
[2383]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
[2384]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggg ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2385]	gatccgacca atcatatata agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2386]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
[2387]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaac ccggtattta attaatacct tacaaactta	3660
[2388]	cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2389]	gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2390]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggtgtc	3840
[2391]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[2392]	ttcgaatgaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[2393]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

[2394]	<210> 83	
[2395]	<211> 4000	
[2396]	<212> DNA	
[2397]	<213> Artificial sequence	
[2398]	<220>	
[2399]	<223> Single strand oligonucleotide	
[2400]	<400> 83	
[2401]	accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgatttc ttttaggaac agtaattaat	60
[2402]	tttaaatattg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2403]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
[2404]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2405]	ggggaacata atcattatatt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[2406]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
[2407]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
[2408]	ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
[2409]	caacctgact gttttattct agtatatttaa ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2410]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[2411]	ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
[2412]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
[2413]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2414]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2415]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
[2416]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2417]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2418]	tgtcatcgta tatctcttga tatgaataca tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2419]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2420]	cattagttaa atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
[2421]	ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2422]	taaaaatata attttggtcg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat	1320
[2423]	tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
[2424]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggtctt	1440
[2425]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatatattg aatatcggac caatggtata	1500
[2426]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaatag gatatgcaat	1560
[2427]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[2428]	tagatgcac tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attagcttc	1680
[2429]	cttcatttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[2430]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[2431]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaaggt agtcacaga tatatatattt	1860
[2432]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgttttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[2433]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctctctact	1980
[2434]	tccatctttt tagcttccact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[2435]	ccaaaaaac aaagtagaga agaatctgta taaagatcgg caacacatga tatgatgac	2100

[2436]	acattcgtta tctatTTTT atcatgtgtt accgatcttt acattggctc ttcttactac	2160
[2437]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[2438]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
[2439]	actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttttagtct	2340
[2440]	ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2441]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
[2442]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2443]	cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[2444]	ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggtta	2640
[2445]	agtggggaac agatatgtc tgcatagaac acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
[2446]	atttatTTTT tctagtaggt tcatttgcga attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
[2447]	ggtgagtttt ttggtcgcgt attcttgggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
[2448]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2449]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
[2450]	ccaatttagt acgaatatat ttatggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
[2451]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2452]	cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2453]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatTT tgcgaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
[2454]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagt acaaaactgt gtatacagcc	3240
[2455]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
[2456]	aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggatttt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
[2457]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
[2458]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2459]	gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2460]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaat	3600
[2461]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaactta	3660
[2462]	cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2463]	gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2464]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggtgtc	3840
[2465]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgtccaatt	3900
[2466]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[2467]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[2468]	<210>	84
[2469]	<211>	4000
[2470]	<212>	DNA
[2471]	<213>	Artificial sequence
[2472]	<220>	
[2473]	<223>	Single strand oligonucleotide
[2474]	<400>	84
[2475]	accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
[2476]	tttaaatTTT agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
[2477]	attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180

[2478]	cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
[2479]	ggggaacata atcattatit gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
[2480]	aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
[2481]	ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
[2482]	ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
[2483]	caacctgact gttttattct agtatittta ggccagggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
[2484]	ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
[2485]	ctcattttct aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
[2486]	agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga	720
[2487]	tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
[2488]	tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
[2489]	tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
[2490]	agagtataaa acacatatat attgaccgta caacttttagt caaattagaa actctgtttt	960
[2491]	atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaa tacttcagga ttagaaataa	1020
[2492]	tgatcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
[2493]	ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
[2494]	cattagttaa atcattttct gttacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
[2495]	ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
[2496]	taaaaatata attttggctg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat	1320
[2497]	tgtgtaagt taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
[2498]	ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctctt	1440
[2499]	cggccgacaa aaaaaaaagc attggctctc gaatatittg aatatcggac caatggtata	1500
[2500]	taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaaatg gatatgcaat	1560
[2501]	gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
[2502]	tagatgcata tataattgtt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaagcttc	1680
[2503]	cttcattttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
[2504]	atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
[2505]	aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagggt agtcatcaga tatatatitt	1860
[2506]	ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
[2507]	cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctctctcact	1980
[2508]	tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
[2509]	ccaaaaaac aaagtagaga agaactctga tgacctttct tgggttttagc catgatgatc	2100
[2510]	acattcgtaa tctatttttt ggctaaaccc cagaaaggtc acattggctc ttcttactac	2160
[2511]	aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
[2512]	catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgitt aaactaagaa	2280
[2513]	actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttttagtct	2340
[2514]	ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
[2515]	acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcgggtccaaa	2460
[2516]	cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
[2517]	cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taaccaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
[2518]	ttctttaaga tttgttttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggctcagggt	2640
[2519]	agtggggaac agatatgctc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatac acacagttac	2700

[2520]	atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcat	2760
[2521]	ggtgagtttt ttggtcgcat attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
[2522]	cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
[2523]	gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg	2940
[2524]	ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caagatagt tgctctgtat	3000
[2525]	atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
[2526]	cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
[2527]	ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatat tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
[2528]	gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc	3240
[2529]	tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
[2530]	aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctgttgtagt	3360
[2531]	gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt	3420
[2532]	atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
[2533]	gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
[2534]	tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
[2535]	gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc cgggtattta attaatacct taaaaacta	3660
[2536]	cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
[2537]	gatactagt ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
[2538]	gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcagt gaggtgctc	3840
[2539]	tgctgatgct gcacggcgtc gcaactctct caataaatc ttttaactaa cgctccaatt	3900
[2540]	ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
[2541]	tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000
[2542]	<210>	85
[2543]	<211>	19
[2544]	<212>	DNA
[2545]	<213>	Artificial sequence
[2546]	<220>	
[2547]	<223>	Single strand oligonucleotide
[2548]	<400>	85
[2549]	acaccctggg aattggttt	19
[2550]	<210>	86
[2551]	<211>	20
[2552]	<212>	DNA
[2553]	<213>	Artificial sequence
[2554]	<220>	
[2555]	<223>	Single strand oligonucleotide
[2556]	<400>	86
[2557]	gtatgcgcca ataagaccac	20
[2558]	<210>	87
[2559]	<211>	20
[2560]	<212>	DNA
[2561]	<213>	Artificial sequence

[2562] <220>
[2563] <223> Single strand oligonucleotide
[2564] <400> 87
[2565] gtactgctgg tcctttgcag 20
[2566] <210> 88
[2567] <211> 20
[2568] <212> DNA
[2569] <213> Artificial sequence
[2570] <220>
[2571] <223> Single strand oligonucleotide
[2572] <400> 88
[2573] aggagcacta cggaaggatg 20
[2574] <210> 89
[2575] <211> 22
[2576] <212> DNA
[2577] <213> Artificial sequence
[2578] <220>
[2579] <223> Single strand oligonucleotide
[2580] <400> 89
[2581] gttgagagtg ttggagaagg ag 22
[2582] <210> 90
[2583] <211> 21
[2584] <212> DNA
[2585] <213> Artificial sequence
[2586] <220>
[2587] <223> Single strand oligonucleotide
[2588] <400> 90
[2589] ctcggtgttg atcctgagaa g 21
[2590] <210> 91
[2591] <211> 23
[2592] <212> DNA
[2593] <213> Artificial sequence
[2594] <220>
[2595] <223> Single strand oligonucleotide
[2596] <400> 91
[2597] agcttccttc atttctgtga atc 23
[2598] <210> 92
[2599] <211> 21
[2600] <212> DNA
[2601] <213> Artificial sequence
[2602] <220>
[2603] <223> Single strand oligonucleotide

[2604]	<400> 92
[2605]	ctgttcccca cttaccctga c 21
[2606]	<210> 93
[2607]	<211> 21
[2608]	<212> DNA
[2609]	<213> Artificial sequence
[2610]	<220>
[2611]	<223> Single strand oligonucleotide
[2612]	<400> 93
[2613]	ctcctcatct gattccttct c 21
[2614]	<210> 94
[2615]	<211> 21
[2616]	<212> DNA
[2617]	<213> Artificial sequence
[2618]	<220>
[2619]	<223> Single strand oligonucleotide
[2620]	<400> 94
[2621]	ctgttcccca cttaccctga c 21
[2622]	<210> 95
[2623]	<211> 23
[2624]	<212> DNA
[2625]	<213> Artificial sequence
[2626]	<220>
[2627]	<223> Single strand oligonucleotide
[2628]	<400> 95
[2629]	gtgtgtggaa agtttatcaa cac 23
[2630]	<210> 96
[2631]	<211> 27
[2632]	<212> DNA
[2633]	<213> Artificial sequence
[2634]	<220>
[2635]	<223> Single strand oligonucleotide
[2636]	<400> 96
[2637]	gttagtatgt aacatctccg attctac 27
[2638]	<210> 97
[2639]	<211> 20
[2640]	<212> DNA
[2641]	<213> Artificial sequence
[2642]	<220>
[2643]	<223> Single strand oligonucleotide
[2644]	<400> 97
[2645]	agagtggtcg tgtgagttgc 20

[2646]	<210> 98
[2647]	<211> 25
[2648]	<212> DNA
[2649]	<213> Artificial sequence
[2650]	<220>
[2651]	<223> Single strand oligonucleotide
[2652]	<400> 98
[2653]	ccagtcaaga tttcatggat ctgtt 25
[2654]	<210> 99
[2655]	<211> 28
[2656]	<212> DNA
[2657]	<213> Artificial sequence
[2658]	<220>
[2659]	<223> Single strand oligonucleotide
[2660]	<400> 99
[2661]	ctaacataat cgagaacaga tggaagac 28
[2662]	<210> 100
[2663]	<211> 32
[2664]	<212> DNA
[2665]	<213> Artificial sequence
[2666]	<220>
[2667]	<223> Single strand oligonucleotide
[2668]	<400> 100
[2669]	ttctcatgtc cttgatttat caatttaaca ac 32
[2670]	<210> 101
[2671]	<211> 20
[2672]	<212> DNA
[2673]	<213> Artificial sequence
[2674]	<220>
[2675]	<223> Single strand oligonucleotide
[2676]	<400> 101
[2677]	agagtgggtcg tgtgagttgc 20
[2678]	<210> 102
[2679]	<211> 26
[2680]	<212> DNA
[2681]	<213> Artificial sequence
[2682]	<220>
[2683]	<223> Single strand oligonucleotide
[2684]	<400> 102
[2685]	cgcatacagat ctatcaaaca cataga 26
[2686]	<210> 103
[2687]	<211> 277

- [2688] <212> DNA
- [2689] <213> Artificial sequence
- [2690] <220>
- [2691] <223> Single strand oligonucleotide
- [2692] <400> 103
- [2693] gcuacucugg ugaaccaucg uuggccaugc uugccuuauu cucccauggc aaucuuacua 60
- [2694] cggccguagg aaacuucucc ggacaagcga auaggcuuca cagacucuaac gaaaaccccu 120
- [2695] aaaacaaaca cuaacaaagg gacugaagag ccuaccacca cccaugcgu cgauuacuga 180
- [2696] cgcacguacg uggucagcga aggcgcugag cucgugguau uggcagcggg gaacagaaua 240
- [2697] aucaacaag ccaacggugg uaucauccag aacaucu 277
- [2698] <210> 104
- [2699] <211> 110
- [2700] <212> DNA
- [2701] <213> Artificial sequence
- [2702] <220>
- [2703] <223> Single strand oligonucleotide
- [2704] <400> 104
- [2705] cgcaaagaaa gaggaggagg augaugagua aacaaugca cucugcaugu ucgaugcaca 60
- [2706] ugcaucucuu gcuugcucuu ugauccaucu uucuugcucc ggcaccgagu 110
- [2707] <210> 105
- [2708] <211> 277
- [2709] <212> DNA
- [2710] <213> Artificial sequence
- [2711] <220>
- [2712] <223> Single strand oligonucleotide
- [2713] <400> 105
- [2714] gaaucuguuc ucaucuuuuc cuuaggggug uuuaccuguu cugccacguu aucucuucuu 60
- [2715] uccuugauuc cgacggaacc aaauaaugu ggccaggaca gacagacaac gaaaacccaa 120
- [2716] aaaacaaaca cgaacaaugu uagucaauuc uggcguccaa cauaacgcau gcaacacgua 180
- [2717] ugcgcggacg uugggagugg aagcauucgc cggaaggaaa cagcaaaggu gaagagaaua 240
- [2718] gagagugcgu ugaggaggag gaugaugagu aaugacg 277
- [2719] <210> 106
- [2720] <211> 277
- [2721] <212> DNA
- [2722] <213> Artificial sequence
- [2723] <220>
- [2724] <223> Single strand oligonucleotide
- [2725] <400> 106
- [2726] gaccagguua ugaccccug gguucaagac augccacuag cagccgagcu aagccugccg 60
- [2727] ucacuaaaca accuuugucu agagaauacg cuaugcuaca aaauagcgac gaaaaccua 120
- [2728] caaacaauuc ccaacaacgc ucguuaauag uauacugccg cgaauugcgc uaaacacuag 180
- [2729] cgcaugcaag cggcgagcuu acgagcuccg augacgguaa cgccaagguc gaagugcugg 240

- [2730] uucauuuugg gauucguggg guucacuaau ccgccc 277
- [2731] <210> 107
- [2732] <211> 277
- [2733] <212> DNA
- [2734] <213> Artificial sequence
- [2735] <220>
- [2736] <223> Single strand oligonucleotide
- [2737] <400> 107
- [2738] ggcccaggua cgauggaguc cauucaggac uugcuagcaa cgcacgcgag gggcgauugg 60
- [2739] ugugucauug aggcuuagcg acagauaaua uauaacauaa gacguccuac gaaaaaccua 120
- [2740] caaacaaca cuaacaaagg aagucaagug uuaucaaccu caucuagcuu cuagaacaga 180
- [2741] agcucccacg aggugagugu aggcuuucgc aaauuugaua gguaacuggc gaauuguugc 240
- [2742] uccaaucag gauggauucu auucgauuuu uagagaa 277
- [2743] <210> 108
- [2744] <211> 110
- [2745] <212> DNA
- [2746] <213> Artificial sequence
- [2747] <220>
- [2748] <223> Single strand oligonucleotide
- [2749] <400> 108
- [2750] cgcaaagaaa cucaaagaaa auuuucgaua aacaaugca cuucgcauga acgaugcguu 60
- [2751] ugcaucccuu gcuuguugaa guauuuauu uugaggcucc ggcaccgauu 110
- [2752] <210> 109
- [2753] <211> 208
- [2754] <212> DNA
- [2755] <213> Artificial sequence
- [2756] <220>
- [2757] <223> Single strand oligonucleotide
- [2758] <400> 109
- [2759] uuggugggag ggcuaaggcug gcgguacguu auucugaaaa aaauuuacgg acgugaugca 60
- [2760] agcacauaug gauguugcau gacacggccg gugcauguga aaaaaaaca aaccaaggca 120
- [2761] aaagagcgag agagagagca ugcauugcaa aucugucgug uuuuuuuuug gguggcagcc 180
- [2762] acccuggaug cggcauccuu cagaccga 208
- [2763] <210> 110
- [2764] <211> 277
- [2765] <212> DNA
- [2766] <213> Artificial sequence
- [2767] <220>
- [2768] <223> Single strand oligonucleotide
- [2769] <400> 110
- [2770] gcuacgguaa ugccccuacg gguacgagac gagcugaugu cacccgagu acuccuacau 60
- [2771] acgcuguauc caacggaucc agagacaaua ggggucaaga uuacgagaua gaaaaccag 120

- [2772] cacacaauau ugaacauuuu uuuagaguug auccacacca caucgugcag uuaacacaau 180
- [2773] ugcaagcacg uggugagcgc agacguucga cuguanguaa agacaaaguc gaaugaugu 240
- [2774] uucucaucgg uauucguggg guucacuaau ccuaucc 277
- [2775] <210> 111
- [2776] <211> 277
- [2777] <212> DNA
- [2778] <213> Artificial sequence
- [2779] <220>
- [2780] <223> Single strand oligonucleotide
- [2781] <400> 111
- [2782] gcaucuugc guccgucuuc cgugcucgac uugccggua ccccaugac aaaccuccga 60
- [2783] gcuangugua gugccuaccc auauaacacc caucucuaaa cguauucuaa gaaaaaccac 120
- [2784] aaaacaaucg cgaacaaggg aggcgacuag agauccaccu caucgagcuu ugacuacuaa 180
- [2785] agcugcuacg gggucgggua agggcccag gaguuuggaa aguaaguggu gaaggggugc 240
- [2786] uacagauuug uauggaagau gagacugcaa aaguacc 277
- [2787] <210> 112
- [2788] <211> 105
- [2789] <212> DNA
- [2790] <213> Artificial sequence
- [2791] <220>
- [2792] <223> Single strand oligonucleotide
- [2793] <400> 112
- [2794] gaagagaaga aucuguaaag uuuagaaagg auaaacaaac cacgaucaca cacaucgaua 60
- [2795] uacuuuuguu uguccauucu gagcuucacu ggcucuucuu acuuc 105
- [2796] <210> 113
- [2797] <211> 208
- [2798] <212> DNA
- [2799] <213> Artificial sequence
- [2800] <220>
- [2801] <223> Single strand oligonucleotide
- [2802] <400> 113
- [2803] ucggucgggu aguuacgcug gcaucgauug auggauagua auauaaaagu cagucuugcg 60
- [2804] agcacagaug gauguaucan cacaccaccu guggaugacu acaaaaagaa aaccaaggca 120
- [2805] aaagagcgag agagagagcc cgcagggcaa cgguuucguu guuacuauac cguugcagcc 180
- [2806] accguaaaac cuccucugc cgaaccga 208
- [2807] <210> 114
- [2808] <211> 277
- [2809] <212> DNA
- [2810] <213> Artificial sequence
- [2811] <220>
- [2812] <223> Single strand oligonucleotide
- [2813] <400> 114

- [2814] gagucgguaa ugccccugug aaucagguc augcguccu cugccuagug aagccacccc 60
- [2815] ugcugggga ugucguccac agagaacaga acggucugca gacgcacuac gaaaaccuu 120
- [2816] gaaacuagcc caaacaagu gggucaccag auugccagcu cgcggugcuc acagaacgug 180
- [2817] agcaggaaag gguugaggcc auggucucgu ccgaggggua agccacagug gaaaagaggg 240
- [2818] aacuaaugg gauucguggg guucacuaau ccuugca 277
- [2819] <210> 115
- [2820] <211> 341
- [2821] <212> DNA
- [2822] <213> Artificial sequence
- [2823] <220>
- [2824] <223> Single strand oligonucleotide
- [2825] <400> 115
- [2826] aacgagauc caacuucua agauugcaa agcaaccagc uaguacguug guacacacca 60
- [2827] augggauaac cggucagcaa uuagaucug uuaccauaa caggauccga gggcucaucc 120
- [2828] ccgaugagga aucggauccg ccaucagauc ucgagcaaga accaagaggu cugccggua 180
- [2829] aucuccuag aauccaaaca cgaccaggu uggacccguu ccuuccucgc ccccaaaaag 240
- [2830] uaaggcgga ggaaugagu ccugguugu ucaggagag aaucagcauc aucggcguug 300
- [2831] auugguaccg gcuuugcagc uggaggggu ggcaacucgc c 341
- [2832] <210> 116
- [2833] <211> 103
- [2834] <212> DNA
- [2835] <213> Artificial sequence
- [2836] <220>
- [2837] <223> Single strand oligonucleotide
- [2838] <400> 116
- [2839] agagagagcu acaggccggc gcuggagagc auacgcaggu aauiuuauua gaaaauaacu 60
- [2840] uugcaggugc gugcucucua agcgucggcc ugcgccauc ugg 103
- [2841] <210> 117
- [2842] <211> 341
- [2843] <212> DNA
- [2844] <213> Artificial sequence
- [2845] <220>
- [2846] <223> Single strand oligonucleotide
- [2847] <400> 117
- [2848] ugggggaggg uccaggcauc agggauaaa agcaagcagc uaccuguug agacaguucg 60
- [2849] acauacuac ccuaaagcag ugugauugaa uuacugagaa uuugaucuu ggacucguug 120
- [2850] caagcgagca aaaguuggg auguaacuuc gcgaggaagc aggaagcgga gucauggguu 180
- [2851] aucgccagau aaaccaagca cuucgucagc ccagggguga ccuaugugc cccgaaaau 240
- [2852] uaaggccua ggucacguug ugacggagu uacugguggg uuugaugagc ucaguaugc 300
- [2853] aagggacca ugguucguga uagugucugg accuacccg u 341
- [2854] <210> 118
- [2855] <211> 341

- [2856] <212> DNA
[2857] <213> Artificial sequence
[2858] <220>
[2859] <223> Single strand oligonucleotide
[2860] <400> 118
[2861] agagugauuu auucgugggg uucacuaauc cguaagcaac gcugaugcca ucuaaggaug 60
[2862] guaaugaagc cggauagaua caaguugcua uuuccaauaa uagcaaccuau ggaggcugcg 120
[2863] cagcagcuca aaugguucgg ggucagauca ucgggcaaug acgaagauga ucuaaggggu 180
[2864] agcgcgugag aagccaacca cgcucugcga ucgagccuua acucgagcgc ccacaaaaag 240
[2865] gaagggugga guuaagccuu guagagcguu uccgcgcgug guaguacagc cgcgcaguau 300
[2866] uacgacuccu gugguuagua aguccgcgag uaagacacug g 341
[2867] <210> 119
[2868] <211> 239
[2869] <212> DNA
[2870] <213> Artificial sequence
[2871] <220>
[2872] <223> Single strand oligonucleotide
[2873] <400> 119
[2874] gcggagguca aguuccuc auuauaaaca ugaagguguc ucucguccua acacacagcg 60
[2875] aucaacaaaa aguaacuaac ccacacauau gguagaaacc aaaaccuuaa cguggauacc 120
[2876] cuuauucugc guauaaguuu gacaaaauuc gggggaagga accauguuug uauugggcgg 180
[2877] agcaagcgcg uggcuccuag agcacgucgg ccacaaagca cguuggggac caagaacgg 239
[2878] <210> 120
[2879] <211> 94
[2880] <212> DNA
[2881] <213> Artificial sequence
[2882] <220>
[2883] <223> Single strand oligonucleotide
[2884] <400> 120
[2885] gggaagucuu ggauugugga gaauuuaaaa agaaauaacu uucgucacga acgaaagcaa 60
[2886] uuauuuuuua acaccaccac agccuaagau uuuc 94
[2887] <210> 121
[2888] <211> 225
[2889] <212> DNA
[2890] <213> Artificial sequence
[2891] <220>
[2892] <223> Single strand oligonucleotide
[2893] <400> 121
[2894] caacagaaga gacacccccg aggagagaac cugcucaucu uuaauguuuu uuuugaaaac 60
[2895] cugaccagcg ccgcuccugc cugcaacaac cauccaucag aacaaaaagu ucguauggcg 120
[2896] aaaggccaau gauggggggc aggucucucc uuggggaagu cuagcgucua cgagcugggg 180
[2897] ucugaugguu ucacaauugc uaaaacuugu gcuucaggug acaaa 225

- [2898] <210> 122
[2899] <211> 239
[2900] <212> DNA
[2901] <213> Artificial sequence
[2902] <220>
[2903] <223> Single strand oligonucleotide
[2904] <400> 122
[2905] ggggagagca uggauucgug guuccugugg auagccccgc acauaaucgc acuucguccc 60
[2906] auaaacaaaa acaaaagaaa ccacacaacc uguagaaacc aaaacaggug gcaccgauca 120
[2907] cgacccggug ccgccgcuca gacaugaguu auguguacac agauucgugg gguucacuaa 180
[2908] uccuaaccac ccagcucgua gcgggucggg cguaucacuu gggaucggcu caagaucgg 239
[2909] <210> 123
[2910] <211> 341
[2911] <212> DNA
[2912] <213> Artificial sequence
[2913] <220>
[2914] <223> Single strand oligonucleotide
[2915] <400> 123
[2916] accgugagau uuuugaggug agcgagggua gucaaacaga cgauggucag uaauuuuuu 60
[2917] ggcgcuacgc ccuuuaugua ccauggugcg ggccgggauu cguaucaccu ggaucuuuu 120
[2918] cgaauauga aaggggaggg auuagaacgu acgaccaacu agcaagugug uugagggauc 180
[2919] aucuccuuua gcuccaauc cuagcacagg auguccuugc ucuauucugc ccccaaaaau 240
[2920] aaagggcaua ggguaaagac uguguuagug cuaggagac auucuuaagc gcugcauagg 300
[2921] aaucgguccu ucuaccucu ugaucuaaa gaucacacgu a 341
[2922] <210> 124
[2923] <211> 96
[2924] <212> DNA
[2925] <213> Artificial sequence
[2926] <220>
[2927] <223> Single strand oligonucleotide
[2928] <400> 124
[2929] gacaacuggu uauuggugcg gggcguaag aaaacggugc ucaauacuuu uugagcuccg 60
[2930] cuuucugaac guucuguauu gauaacgagu gccacg 96
[2931] <210> 125
[2932] <211> 341
[2933] <212> DNA
[2934] <213> Artificial sequence
[2935] <220>
[2936] <223> Single strand oligonucleotide
[2937] <400> 125
[2938] cgugggagau aaaauuuuu uugauacacu agagagcauc uacaguuaaa auaaagauuu 60
[2939] ugaguagcac cccacagguu ucaguacuuu uggcuaaaau aaaguaccag guuuucuuuc 120

- [2940] cuaaagaaua auuggugggg gacuaagauc ucgcgcauu augaagaggu cugugggau 180
- [2941] agcucccucg aagccaaucg cgcuaaaggg cccaacuaga ucgucucggc ccccuaaaac 240
- [2942] gaaggguuac gguuuacuug cuugagcguu ucagggggug augcguuacc aacggagacg 300
- [2943] uauggguccc gcaguguggg augguguuu uauuacccaa g 341
- [2944] <210> 126
- [2945] <211> 341
- [2946] <212> DNA
- [2947] <213> Artificial sequence
- [2948] <220>
- [2949] <223> Single strand oligonucleotide
- [2950] <400> 126
- [2951] gcugggaggg guuaguggag uuacacggau gggaaccacc cuaccuugau auaaacauau 60
- [2952] uaaccuauaga cagagaggga gaaggucucu ggcaugcuc agagacccaa ggggucuuu 120
- [2953] cuauagacga auugcuuugu agguguuggc ucgcgaaacu aaaaagaguu gagucgggaa 180
- [2954] aucgccagau ugaccaauu cacacauugg gguaacggga ccauccucgc ccacaaaaag 240
- [2955] gaagggcggu gguccuauua gguguguggc gacuggcgag gguucgcagc uacgcagugg 300
- [2956] aucguucccg acauucgugg gguucacuaa uccuaccac a 341
- [2957] <210> 127
- [2958] <211> 193
- [2959] <212> DNA
- [2960] <213> Artificial sequence
- [2961] <220>
- [2962] <223> Single strand oligonucleotide
- [2963] <400> 127
- [2964] ggguuuuucc agaaggcgga acaaccaacg gcgaccgccc ccuagggacc ccaggcgga 60
- [2965] guuaaguuag gauuuuccau uuacauucgg augggaugug ggcgagccgc cgucacgaaa 120
- [2966] acggcggcag cgccaagagc gcuggacguu cgcagaagac agaaccuggu ugcucgcucu 180
- [2967] ucuggaagaa ccu 193
- [2968] <210> 128
- [2969] <211> 193
- [2970] <212> DNA
- [2971] <213> Artificial sequence
- [2972] <220>
- [2973] <223> Single strand oligonucleotide
- [2974] <400> 128
- [2975] ggguuuuuuc agaagggugg acauccaucg ccaucuccg cuugugcccc ccaggagaag 60
- [2976] gguacgccag gauuucggau agagugaccu auucgaggag uuuccgccgc ugccucgaaa 120
- [2977] gcagcggcug cuccaacuga gcagaagaag cucuuaaaac agaaccugga ugcucgcucu 180
- [2978] ucuggaagaa ccu 193
- [2979] <210> 129
- [2980] <211> 193
- [2981] <212> DNA

- [2982] <213> Artificial sequence
[2983] <220>
[2984] <223> Single strand oligonucleotide
[2985] <400> 129
[2986] ggguuuuuuc aggaggguga acaucccacg ccgaccucuc auuauugccc ccaggaggau 60
[2987] gguacaacug gucgucuauu ugaagugcua aguggaggug ccccggcugc ugacccgaaa 120
[2988] ucagcagcag cuccaaaaga gcuggggggg cgcugaaucc agaaccggga ugcucgcucu 180
[2989] ucuggaagaa ccu 193
[2990] <210> 130
[2991] <211> 193
[2992] <212> DNA
[2993] <213> Artificial sequence
[2994] <220>
[2995] <223> Single strand oligonucleotide
[2996] <400> 130
[2997] gcggugguau ugcuuuuuca ucagccugcg cccaucacac cagggggcag acaugugaag 60
[2998] ggcaauacag gacuacuagc uuaaagacgg gcugguuggg uagcagcugc aggcgcgaaa 120
[2999] ucugcagccg ccccaaaagg gcgggggcug cccacaaggc agaacaaggc uguuggaggg 180
[3000] guaaugccau ugc 193
[3001] <210> 131
[3002] <211> 216
[3003] <212> DNA
[3004] <213> Artificial sequence
[3005] <220>
[3006] <223> Single strand oligonucleotide
[3007] <400> 131
[3008] gggaauacaga cauggcgaga uuucaucggg aucuggggcg agggcgaggg cgugacagug 60
[3009] gggagcgcag ucgauacaug caccaggcac acccaguauc gccuuggaaa gcaaggcgca 120
[3010] cuggguccgc cggaugcaug ugacgagugc aacgcgcccc cugcaagcau cgcgacucgu 180
[3011] uccagauucc gaugauucuc cgucgcacug augccc 216
[3012] <210> 132
[3013] <211> 89
[3014] <212> DNA
[3015] <213> Artificial sequence
[3016] <220>
[3017] <223> Single strand oligonucleotide
[3018] <400> 132
[3019] caugcuauugc gugcuucgua cgguauuugc agagagcaca ucgaacaccg auggccuccg 60
[3020] uggaugucgu auguggugcc guuaguaug 89
[3021] <210> 133
[3022] <211> 142
[3023] <212> DNA

- [3024] <213> Artificial sequence
[3025] <220>
[3026] <223> Single strand oligonucleotide
[3027] <400> 133
[3028] gcggccugaa acaccguuug auuggugugc ugagggucaac guguccaauug ccagaagacg 60
[3029] ucagcaaggg aagaacaggu guuccugggc gaugaacgcg uuggugcuuc uacaucaacc 120
[3030] gaagguaaac uuucacgcaa cg 142
[3031] <210> 134
[3032] <211> 186
[3033] <212> DNA
[3034] <213> Artificial sequence
[3035] <220>
[3036] <223> Single strand oligonucleotide
[3037] <400> 134
[3038] guggcgugac cugagcaagu auucgugggg uucacuaauc cugaccgacc cuugcgcagg 60
[3039] ccagcgcucc augauuggua agucacccca caaagugcaa gaccagaaug gacagccagg 120
[3040] uugccuuuac cagcagaggg ucggcgagcg uuggugagga ccgccgaugc augaccacca 180
[3041] cgccac 186
[3042] <210> 135
[3043] <211> 216
[3044] <212> DNA
[3045] <213> Artificial sequence
[3046] <220>
[3047] <223> Single strand oligonucleotide
[3048] <400> 135
[3049] uggauacacg cgugggaaga ucuggucuuc uugaccgguc uugguuaggu caugacgggg 60
[3050] guccgcgcag uccacucagg cgcucggcac ccccgcuacc uucacggaaa gugugaagcg 120
[3051] gcggggcagc cagucgccug agaggagugc aacgcagccc ccgcaagaau aacagaggac 180
[3052] uggucaagaa gacuauucug uuucggagug uagcca 216
[3053] <210> 136
[3054] <211> 83
[3055] <212> DNA
[3056] <213> Artificial sequence
[3057] <220>
[3058] <223> Single strand oligonucleotide
[3059] <400> 136
[3060] uacguauauu guguaguuaa uuuacucagg uguguguggg guuacggugc accuccaaua 60
[3061] gugaagacua ucagcaucac gua 83
[3062] <210> 137
[3063] <211> 140
[3064] <212> DNA
[3065] <213> Artificial sequence

- [3066] <220>
[3067] <223> Single strand oligonucleotide
[3068] <400> 137
[3069] cccggaguuu gugggcaagu cgcucguac gacuucaagg aacagccucc gaaaacagga 60
[3070] guacauguga gauagaauaa uuccugggcc ggcucccugu ugucuuguug ugcgaacaag 120
[3071] acaugccggg agcucccggg 140
[3072] <210> 138
[3073] <211> 186
[3074] <212> DNA
[3075] <213> Artificial sequence
[3076] <220>
[3077] <223> Single strand oligonucleotide
[3078] <400> 138
[3079] aaggugggag uggagagaga auucgugggg uucacuaauc cucacuagcu cuggcccuag 60
[3080] aggugacacc cggauaugga aaguccaca cggugagaca gccguaacgg gugcucaacu 120
[3081] ugggcagagc cagccgggag cuagccagag uugguggaag ccgccaguuc acuagcugcc 180
[3082] caccuu 186
[3083] <210> 139
[3084] <211> 375
[3085] <212> DNA
[3086] <213> Artificial sequence
[3087] <220>
[3088] <223> Single strand oligonucleotide
[3089] <400> 139
[3090] uuugcgagc uagcaacugg auucuacuau auaaaaacac agacuuggaa ucaugucacc 60
[3091] caccaggacu cuccgagaau ccccguccga aagacaugaa cggguggaaa aagacucuca 120
[3092] aucaucgacg acaagcuaac acaagguauc caguaaggua cucuaaagga gguugaugug 180
[3093] auggagcacu guagaacacg ugcuaaacuc acaucgacua aagaugagug uucaaggucg 240
[3094] ucaaguaucc gagccaggau acaaacgacu cacacauauu gguccuauac ccuaaaggau 300
[3095] acccuccgaa agggcaauuc ggacagcaaa agcuguguuu uccuauaugg uagauguggu 360
[3096] uguuagccac gcaaa 375
[3097] <210> 140
[3098] <211> 99
[3099] <212> DNA
[3100] <213> Artificial sequence
[3101] <220>
[3102] <223> Single strand oligonucleotide
[3103] <400> 140
[3104] ucagcguaug uaguaggcuc ugcuucauca aguggucuug uguucaaauu cagcuccaag 60
[3105] cacaugguca acuggauucu acuaauaauug ugaauauaa 99
[3106] <210> 141
[3107] <211> 375

- [3108] <212> DNA
- [3109] <213> Artificial sequence
- [3110] <220>
- [3111] <223> Single strand oligonucleotide
- [3112] <400> 141
- [3113] cuugcgaggu cagcgugucc auccaacuua uguaaugcuc ccaugcaaug uuuguccacc 60
- [3114] ccagaggccu uauuuuaag cugaugcuac cagggcacaa aauggugaaa aacccaucua 120
- [3115] gacaauuccg auauccaacu ucaaggcuuc cagguaguau cacgaaacgu gaaacacgug 180
- [3116] aaggauuuu gcagagcaug ggauaaaauc acguguuuug gucuggaguu uccaugaca 240
- [3117] ucaagucgca gagccaugcg acaaauguua cagauaaaau gcagugaaua cgacaaggaa 300
- [3118] gccuccuga cgguuaauca gggcgggccc uagggggguu uccauucggg cucuuaugcg 360
- [3119] cguugaccac gcaau 375
- [3120] <210> 142
- [3121] <211> 375
- [3122] <212> DNA
- [3123] <213> Artificial sequence
- [3124] <220>
- [3125] <223> Single strand oligonucleotide
- [3126] <400> 142
- [3127] aaagagaggg auucgugggg uucacuaauc cguuagccuc acaccccuua uucccucacc 60
- [3128] ucucaugccu uagaaugaag caccagucac uagagggaaa aaaggcgaaa aaccuuucca 120
- [3129] aacaauagug agcaccaaac ccaagguaag cagcugguag cuugaagcaa guuauacggg 180
- [3130] gcggaaaaca gaagaucucg uuuuaaaccc ccguauaaga accaagagcg cucacuggcc 240
- [3131] ccaaguuuu gagccaagaa acaaggguca cagcuguguu guugcuacua caagaaguuu 300
- [3132] acccaccaga aggccaauu gguuagcacg ggguggggcu accacggguu aguaagucug 360
- [3133] cggaucacac ucuuc 375
- [3134] <210> 143
- [3135] <211> 375
- [3136] <212> DNA
- [3137] <213> Artificial sequence
- [3138] <220>
- [3139] <223> Single strand oligonucleotide
- [3140] <400> 143
- [3141] auugugaggc caaacagaag auuaaggggu ugucuaccgc ucaccuauua cugucacacc 60
- [3142] uagcaugccc agaaccugug caccuccac aagugauagc aauggcgaaa aaaccaucca 120
- [3143] accaacagug cuccagaaaa ccaaggcuuc caggacggau cucuaaggga gacaauaggg 180
- [3144] ugggauauau gaagaucau guauaaaggu ccuguugugc caguagguuc cacaccucu 240
- [3145] ccauagguu gagccaagcu uaaagagagg ccgacggaac guauacaauu cauuaaggaa 300
- [3146] gccacuagu agcgcaagcu agucaccaga gggagcggua gccacaauuc cuuauguuuu 360
- [3147] guuuggucac aaaa 375
- [3148] <210> 144
- [3149] <211> 125

- [3150] <212> DNA
- [3151] <213> Artificial sequence
- [3152] <220>
- [3153] <223> Single strand oligonucleotide
- [3154] <400> 144
- [3155] cacugugcgg ucucuaauac gacuguucag agugaugaac cgguuuccgc gcggaacgga 60
- [3156] ggagcgggcg ccggcgccga auuggaucgu uccucugagc agcuguaucg gaggccgagg 120
- [3157] ugaac 125
- [3158] <210> 145
- [3159] <211> 375
- [3160] <212> DNA
- [3161] <213> Artificial sequence
- [3162] <220>
- [3163] <223> Single strand oligonucleotide
- [3164] <400> 145
- [3165] uuugagaggc caggaaggau auuacgauga ugaauccac auacuugauu guuacucacc 60
- [3166] uugcaagccc accgugugag cuccaccacu uagaguaacu guaggggaaa aaaccuagac 120
- [3167] uucaacugac cuucacaaac acaagguuuc cagucggauu cacuaacggu gaaaaaguu 180
- [3168] ucgguaccuu cuagaagaug gguaaaaaaaa acuuuuuuuug auuuagagca aacacuuuuu 240
- [3169] gcaaugguca gagccaugac caauauugga cagacuuguu guaacaaua cggaaaggaa 300
- [3170] acccaccaca agggcaaugu gguagcaaaa agaugggga uccucauugu cguggcuccu 360
- [3171] ucuuggucac ucaac 375
- [3172] <210> 146
- [3173] <211> 375
- [3174] <212> DNA
- [3175] <213> Artificial sequence
- [3176] <220>
- [3177] <223> Single strand oligonucleotide
- [3178] <400> 146
- [3179] gaugagaggu uuggaggggu aaugccauug cguugcacac auacuuccac uuugcccacc 60
- [3180] ccucauggcg ccgacggcac caccagcaaa uagggcaaac agagaccaa aaauucuaua 120
- [3181] cacaacacac cgcggaauu acaagguaac cagugagggc gaccaaaggu uugucuagcg 180
- [3182] agggucucg gcagagcuag gguaaaaguu gcuggacacg uaacugacau cgaaagauc 240
- [3183] gcaagugucu gagccaagac auauuagau cggaggauu ggguccagcu cccaaaggu 300
- [3184] acccaccagg aggacaacuu ggucaucaua agauggugc gccauguggu ggcuucucuu 360
- [3185] uccaaaccac ucaua 375
- [3186] <210> 147
- [3187] <211> 375
- [3188] <212> DNA
- [3189] <213> Artificial sequence
- [3190] <220>
- [3191] <223> Single strand oligonucleotide

- [3192] <400> 147
- [3193] aacgagaggu augauaaaac augcuuauga augaaucac ucacugcgcc cauucccaac 60
- [3194] ccggaugccu uaugaugaag cacgcgauuc gagggaauga auuagggaau aagcuaacua 120
- [3195] cgcaaacuua uaccacaaag ucaagguugc cagaggggaa cacgaaccgu gauaagagag 180
- [3196] gaggcucgcc guagaacgcg ugggaaaacu ucucuuauga gacuugugag aacaauuacc 240
- [3197] acaagaucac gagccaggga ucaauaggga ccgagucuua ggagcaauuc cacuaaggua 300
- [3198] acccacccga agggcaauug gguaaucaac aggagugguu ugccauuugu aagaucuuuu 360
- [3199] gucguaucac ucguc 375
- [3200] <210> 148
- [3201] <211> 111
- [3202] <212> DNA
- [3203] <213> Artificial sequence
- [3204] <220>
- [3205] <223> Single strand oligonucleotide
- [3206] <400> 148
- [3207] cauguuugga uacuaguuaa uauuaauguu uaaagcuacu cuacaaaaaa uauaugauau 60
- [3208] auuuccggua gaguagcuuu aaauauugau auuggcuaugu auccaaacag a 111
- [3209] <210> 149
- [3210] <211> 375
- [3211] <212> DNA
- [3212] <213> Artificial sequence
- [3213] <220>
- [3214] <223> Single strand oligonucleotide
- [3215] <400> 149
- [3216] uuugggaggu cuaguuaaua uuaauguuua auuuuauuc agacuauuau uugucacacc 60
- [3217] acuaaugccu gaggcuaag caccagaaau aagugacaac auugguguaa aauccagccu 120
- [3218] cccaagucua aucgaacaau ucaaggcugc cagauagucu cacuaagggu gguuaaagcg 180
- [3219] aggguggcgu guagaacacc gucaaaaau gcuuuagcgc gucgagauuu cgcaauaucu 240
- [3220] ucaagucucu gagccaagag auaaaagaua cccaagaaau gucguaaaga ccauaaggca 300
- [3221] gccaccuga agggcaauca gguuaucuu agcugggguu gccaguugug cuccacguug 360
- [3222] aguggaucac ccaac 375
- [3223] <210> 150
- [3224] <211> 375
- [3225] <212> DNA
- [3226] <213> Artificial sequence
- [3227] <220>
- [3228] <223> Single strand oligonucleotide
- [3229] <400> 150
- [3230] gacgugaggu uuggaggggu aaugccauug cguaaaccac cgacucagaa uucucccacc 60
- [3231] gcacagcgca agcuccuuac guccugacaa gagggagaac auuggggaaa aagccagcca 120
- [3232] cacaaguaac uaaagcaaaa ugaagguguc cagaaacuuc cccaagggg guaaaacgug 180
- [3233] uggguugcc gaagaucgug cgacaaagac acguuuuagg guuucgagcg cgcauuuacu 240

- [3234] ccaagugacu gagccaaguu auaagaguga ccgaagcguu ggaaugagga gcuuaggggc 300
- [3235] acccgccugg agggcaaccg ggcaagcagg agcggggguu uccacgcggu ggcuucuccc 360
- [3236] ucugaaucac acgug 375
- [3237] <210> 151
- [3238] <211> 375
- [3239] <212> DNA
- [3240] <213> Artificial sequence
- [3241] <220>
- [3242] <223> Single strand oligonucleotide
- [3243] <400> 151
- [3244] guagcgaggu cgaauucuugu uuauaacuua aguuugucgc uaaccuggcg cagucucacc 60
- [3245] ucaccagcca uagacuauag cuccugucan aagagauuga aaugguuaaa aaccacauaca 120
- [3246] uacaaaucug auacccaaac ucaaggauuc caggaaguau ggccaauugu caauucaguc 180
- [3247] augggucaca gcagagcucg uggcaaacug acuggauuac acuuagguuu cccagucacg 240
- [3248] ucaacugucc gagccaggac agaaacguga ggcacgaagc guaaccggaua caucaaggaa 300
- [3249] ucccuccuga aggacaauua gggcaacaaa gguagcggca gccacuuggg uugaaccgag 360
- [3250] guucgaucac gcuag 375
- [3251] <210> 152
- [3252] <211> 102
- [3253] <212> DNA
- [3254] <213> Artificial sequence
- [3255] <220>
- [3256] <223> Single strand oligonucleotide
- [3257] <400> 152
- [3258] gugaagccac uggauggauc gguucaaucc ucucuuccgg aaucguuguu gaacauaaga 60
- [3259] accuagaaucc gaggaauuaa cuuauuuuuu uagcgcucac uc 102
- [3260] <210> 153
- [3261] <211> 375
- [3262] <212> DNA
- [3263] <213> Artificial sequence
- [3264] <220>
- [3265] <223> Single strand oligonucleotide
- [3266] <400> 153
- [3267] guugugaggg cgaauucuugu uuauaacuua acuaaaucac ccacucaagu cugcgucacc 60
- [3268] acucauauuu uaggcuagg uaccaggcca uagacguagu aauggagaaa aaaccaucga 120
- [3269] aucaaaacua cccuacaaaa ccaagguuuc cgaugaguau cacuacgagu gaaaauagcu 180
- [3270] ggggaguuuu gaagaucugg ggcuaaaacg gcuguuuugc ccuuugagua uacauugucu 240
- [3271] gcaagagucu gagccaagac ucaacagaua ccgagauacu ggaaugaaua cccaaaggaa 300
- [3272] acccuccua agggcaauag gggcaccacg aggggugguu uccaguuggg uugggugaag 360
- [3273] auucgcucac gcaaa 375
- [3274] <210> 154
- [3275] <211> 375

- [3276] <212> DNA
- [3277] <213> Artificial sequence
- [3278] <220>
- [3279] <223> Single strand oligonucleotide
- [3280] <400> 154
- [3281] gaugugagua auucgugggg uucacuaauc cgguuaccac agacagccua augacacacc 60
- [3282] acacaugcca agccgcuuag caccugccac aaguguuaua aacgccgaaa aaugcgucua 120
- [3283] cacaaccauu ugaaccaag acaagguacc cagcaaguau cuccaaagga ggaauaagug 180
- [3284] aggguguccg agagacucgg ggcaaaaauu acuuguucag cguugguguu cgcauucua 240
- [3285] ccaagcuccu gagccaagga gcaagugaga cucaggaaca guaaaaaaua ccugaagggu 300
- [3286] accuccacg aggacaacgu gggcaugacc ugcuguggua gcuccggguu gguaagucug 360
- [3287] cggauuacac gcaua 375
- [3288] <210> 155
- [3289] <211> 367
- [3290] <212> DNA
- [3291] <213> Artificial sequence
- [3292] <220>
- [3293] <223> Single strand oligonucleotide
- [3294] <400> 155
- [3295] aguaccgagg gaaacgagau gcugcuaaua uaauggcgga uagccccaac uucacaacua 60
- [3296] ucgggccuuc cggugcacga gcggagguuc uuagagcuag caagucccuc gguaagauuc 120
- [3297] cacagccugu gggacagcua cucacagggc ccuaccggac agcuggaagu agacuuggua 180
- [3298] ugcugacgu aacagaccag uuacucagac agccaaaucc auaucguaca aaugauagga 240
- [3299] aagagggauc uuaccgaggg aaccauuuaa cucuaagaac ccucacuaag ugaccgggag 300
- [3300] agcugguagu uauggauuga gggcuaaaag cuauuguauug gguagcauuc uguuucccuc 360
- [3301] gauacug 367
- [3302] <210> 156
- [3303] <211> 87
- [3304] <212> DNA
- [3305] <213> Artificial sequence
- [3306] <220>
- [3307] <223> Single strand oligonucleotide
- [3308] <400> 156
- [3309] cagcucagca cgacaggaug ccaaugcaaa aaaacguguc cuugagggcg cguuuuuuug 60
- [3310] cauuggcauc cugucacgcu gacgugg 87
- [3311] <210> 157
- [3312] <211> 168
- [3313] <212> DNA
- [3314] <213> Artificial sequence
- [3315] <220>
- [3316] <223> Single strand oligonucleotide
- [3317] <400> 157

- [3318] ggaggacaac augccaugc aaaaaaaguu uugguagaag gagacgguac gcagagcaga 60
- [3319] agaggaacgg uggacuuaac ugagaccauc uucuccuaga uaagaucuca caaacccuc 120
- [3320] uccaugcaga ucuacuaagg aucugcugcg uugguguguu guccucc 168
- [3321] <210> 158
- [3322] <211> 372
- [3323] <212> DNA
- [3324] <213> Artificial sequence
- [3325] <220>
- [3326] <223> Single strand oligonucleotide
- [3327] <400> 158
- [3328] guggacgguc auucgugggg uucacuauc caaaagaaga ccgcagauc aaaggacaag 60
- [3329] uuaagggeca uguugcccu agacacagag gauggcccgg cggugucacu ggguuagggg 120
- [3330] aggaccucug ggcgaaggaa aucagagcac acggccuggc ucuaucuaa acccgugcau 180
- [3331] aguaaacggc agauggggg aagaacacca cauuaugcac ggguggaga cggaccagg 240
- [3332] ccaaaaucg gaacauggc cccuaaccu ggugacaccg ccaggccaua ggggcaaac 300
- [3333] augaccuua aucaucua uggguccgc agcuccuac ggauuaguga acuuugcggu 360
- [3334] ugaccgugca cc 372
- [3335] <210> 159
- [3336] <211> 367
- [3337] <212> DNA
- [3338] <213> Artificial sequence
- [3339] <220>
- [3340] <223> Single strand oligonucleotide
- [3341] <400> 159
- [3342] cguaccacgg uggcaggag aagagaacga uauugcaaa uugcccugc gucucgcau 60
- [3343] acgggcuaaa cuguuccgc uaguaggac aaugagcuag caagucuauc uguguuaga 120
- [3344] aacaccugc acuaaggca aguacggac cagacauggc agcgugacuc agacggggca 180
- [3345] cgccaguagu uucagcccag agacacugac ggcccaacg acauaaaaca auuuugcgu 240
- [3346] aaauuucua cuacagauag aaccaacua cucauuguuc ccacgagaac ggauaguug 300
- [3347] agccguggug caagaccaga gggcaaaagg caauugucgu ucucuuuuug uugccgccgu 360
- [3348] gauacga 367
- [3349] <210> 160
- [3350] <211> 101
- [3351] <212> DNA
- [3352] <213> Artificial sequence
- [3353] <220>
- [3354] <223> Single strand oligonucleotide
- [3355] <400> 160
- [3356] guugcaaca gaagauaag ggguuagaug auggcgugca aucaggaguc uugaagcau 60
- [3357] gcauccacu ccuuggucu cuugaugcu cuguuuucac c 101
- [3358] <210> 161
- [3359] <211> 214

- [3360] <212> DNA
- [3361] <213> Artificial sequence
- [3362] <220>
- [3363] <223> Single strand oligonucleotide
- [3364] <400> 161
- [3365] ggcugucggc cucgcuaggu auguuuaaca auguuauGCC aagcgguggg ccaaaaacuc 60
- [3366] gaaaaacaac ccuuugagg aguaggcgcu gcagucaaac ccuguacucc ccgacgggau 120
- [3367] cuccgaugag aucggagaca aaacacgggu cuaaaaccga gcuaagacac cagggcacia 180
- [3368] uauuguuaag uguccuuggu ggcaccagcc gccc 214
- [3369] <210> 162
- [3370] <211> 367
- [3371] <212> DNA
- [3372] <213> Artificial sequence
- [3373] <220>
- [3374] <223> Single strand oligonucleotide
- [3375] <400> 162
- [3376] ugggccaagg uauucguggg guucacuaau ccucggcaca acgccccuuc uccgcugaaa 60
- [3377] accggcguaa cauuaccugu acgcaugccc auagagcgag ccagccgcac ugucucuacg 120
- [3378] aacagccagu uuuacagcua aaaacugggc cccaucggc agcggaagga auaccaggca 180
- [3379] ugccguagg aacagucuag uuccagcgac agccugaaca cguucauaca agugaaugu 240
- [3380] aaauaucguag agacagugcg gaccaacucc cucuaugggc gcgccuaaaa ggaguguuac 300
- [3381] agcgguuuuc gauggaaaga gggcguaaag cugaggguuug gugaguccuu uggauaccuu 360
- [3382] gacucau 367
- [3383] <210> 163
- [3384] <211> 367
- [3385] <212> DNA
- [3386] <213> Artificial sequence
- [3387] <220>
- [3388] <223> Single strand oligonucleotide
- [3389] <400> 163
- [3390] gguaccaugg ugcacagcag uauuugugua uaugugccga acgccccuc aucucugggc 60
- [3391] aggggcaau cauucagagg ucguauagguc ucugugccag ccagccuuc agccguccua 120
- [3392] aaauaccagg uugacaguc caaucugggc accacucguc agcgagagga acacggggua 180
- [3393] ugccaauguu gacaggaag ucagauugcc ggcccuaaca acuucuuaca aaagaagugu 240
- [3394] aagauuagga cggcugaaag gaccaauuga cgcggggacc acacaauau cuauugauuu 300
- [3395] agccugcca caagguagga gggcguaaug cacauguaca cgaauacugg ugugcaccuu 360
- [3396] gauacca 367
- [3397] <210> 164
- [3398] <211> 101
- [3399] <212> DNA
- [3400] <213> Artificial sequence
- [3401] <220>

- [3402] <223> Single strand oligonucleotide
- [3403] <400> 164
- [3404] gcuguugggu ggaguuccag aguaaagau agggagugca auuaggaguc uugaagcaau 60
- [3405] gcauccccgu ccuuuuugcu cuggaaucuu caucaucac c 101
- [3406] <210> 165
- [3407] <211> 148
- [3408] <212> DNA
- [3409] <213> Artificial sequence
- [3410] <220>
- [3411] <223> Single strand oligonucleotide
- [3412] <400> 165
- [3413] agaggagccc cuggucgauc augguacgca augaacgucg ucauguaucg accuaaggac 60
- [3414] aaucggcagu gauuaacuuu cuuaaacaga cccgagcaug acacauggcg acccucauag 120
- [3415] ugugcuuggg uccguuacgg acuccgac 148
- [3416] <210> 166
- [3417] <211> 372
- [3418] <212> DNA
- [3419] <213> Artificial sequence
- [3420] <220>
- [3421] <223> Single strand oligonucleotide
- [3422] <400> 166
- [3423] ggggucggcc auucgugggg uucacuaaau caacguguga ccggcggggc ggagcucaca 60
- [3424] uauagugccu gguagccuca agagucggag guuugccua cugucgguca guguuugggg 120
- [3425] gggaccuccu uacgaaggaa aaaggagcaa gcggccaggc uguauaaaaga acccuuggga 180
- [3426] uuaacauggc acuagcgggu aagaacaccg cuaauucaa ggguuguuuu cauaccuugg 240
- [3427] ccaaaagacc aaacacauc ccccaaacgu ugacuggcgg ugaggcaguu gaggcuaaac 300
- [3428] cagacgcuaug augcaagcac ugucuccucg agcagacgac ggguuggugg guccugugau 360
- [3429] uggccgagcc cc 372
- [3430] <210> 167
- [3431] <211> 206
- [3432] <212> DNA
- [3433] <213> Artificial sequence
- [3434] <220>
- [3435] <223> Single strand oligonucleotide
- [3436] <400> 167
- [3437] gggugccgaa gcaauccgag gcuuuuuacu ugggugcuug gucggcaggg aaucaaacuc 60
- [3438] ucgcgugaau uaugccguug ucgucgccc aucucguucc ggggagcccu aaaaccugac 120
- [3439] uaaaauuuu uagccuucua ugugaugagu ugugaugaua gccgaaccaa gggccugauc 180
- [3440] aagaaguucc ggacauuucg gcaccc 206
- [3441] <210> 168
- [3442] <211> 104
- [3443] <212> DNA

- [3444] <213> Artificial sequence
[3445] <220>
[3446] <223> Single strand oligonucleotide
[3447] <400> 168
[3448] ggcgcgagcu accacaagau guacggcaaa cggccgggcg ugacggcacc ggcggucgug 60
[3449] ccgucgcggc cgcuugcugu augaucuuug ugguagccgg ugcc 104
[3450] <210> 169
[3451] <211> 139
[3452] <212> DNA
[3453] <213> Artificial sequence
[3454] <220>
[3455] <223> Single strand oligonucleotide
[3456] <400> 169
[3457] aagguccgga accgaacggc aagagagcuc ggcaagggcc ugaucagaagaa cucuuggauc 60
[3458] ucaagccaag gagugggugg cugauggggg uucuugguuc uguccuuauc gagcgggcca 120
[3459] aguucacgcu aucagccuu 139
[3460] <210> 170
[3461] <211> 206
[3462] <212> DNA
[3463] <213> Artificial sequence
[3464] <220>
[3465] <223> Single strand oligonucleotide
[3466] <400> 170
[3467] gggggcccau ccaaucugag gauucguggg guucacuaau ccccccuaaa agugacucac 60
[3468] acguccgggc gagccuuuuc gcgaugaccg aucucgagcc gguguucacg caaaaacauc 120
[3469] ccacgaaagc uugaauccag gguguaguga gcucacgucu ggggaggguu gaugagccau 180
[3470] gcgggucccc agacagaugg gcccc 206
[3471] <210> 171
[3472] <211> 206
[3473] <212> DNA
[3474] <213> Artificial sequence
[3475] <220>
[3476] <223> Single strand oligonucleotide
[3477] <400> 171
[3478] gggagccccg ccaagaugag gaucgaaau uauguaccuu aucgucaccc gauuacgcuc 60
[3479] acgggagucg ccagcuugac uauuucacca agccagaucg agugaucgcg aaaaucgaaa 120
[3480] cgaagucacu ggccagacau uccguagagc gcugaugccg gaugaauagg gagcaugauc 180
[3481] ucggaucccc auccagcggg gcuccc 206
[3482] <210> 172
[3483] <211> 99
[3484] <212> DNA
[3485] <213> Artificial sequence

- [3486] <220>
- [3487] <223> Single strand oligonucleotide
- [3488] <400> 172
- [3489] ggaauggggc uggcugucac gucgacacuc aucuagagca acaaacuucu gcgagagguu 60
- [3490] gccuaugaug gauguugaug uuacagccaa cuuuauucc 99
- [3491] <210> 173
- [3492] <211> 165
- [3493] <212> DNA
- [3494] <213> Artificial sequence
- [3495] <220>
- [3496] <223> Single strand oligonucleotide
- [3497] <400> 173
- [3498] ugggggcggg gcggguacgg gaacacguua gcugugaucg uugauguuac agccaacuuu 60
- [3499] aaggguccgg cgggcaguac ucagcggggg uucuuccucc acccccgggg auggucggau 120
- [3500] cgagggaaca ugcacgucg cccccggcg caacccccgc ccua 165
- [3501] <210> 174
- [3502] <211> 206
- [3503] <212> DNA
- [3504] <213> Artificial sequence
- [3505] <220>
- [3506] <223> Single strand oligonucleotide
- [3507] <400> 174
- [3508] gggagccagu gcaaucugag gauucguggg guucacuaau ccccucgacg aaaugcucac 60
- [3509] accuacuua gcuucggcgc uagaucgcc auccaggucc ccugaccacg caaaaggau 120
- [3510] agaagcgcaa gugaauagc ugggugguga gacguugacg gaggaggguu gaugagucaa 180
- [3511] acgagucucc agacacacug gcucc 206
- [3512] <210> 175
- [3513] <211> 206
- [3514] <212> DNA
- [3515] <213> Artificial sequence
- [3516] <220>
- [3517] <223> Single strand oligonucleotide
- [3518] <400> 175
- [3519] gggagccuau caaaaggau ugggauuau cugggguuug gccuacuucg aguuaggcac 60
- [3520] acggguggca ucccguagac ggguuagccg cgaacgauug uccaauccu aaacuguagc 120
- [3521] aggcgucugg gaucagccaa ccgucgucg ugugacgucu guagagcuua aguuuaguua 180
- [3522] aaucuuaacc cuucagaugg gcucc 206
- [3523] <210> 176
- [3524] <211> 165
- [3525] <212> DNA
- [3526] <213> Artificial sequence
- [3527] <220>

- [3528] <223> Single strand oligonucleotide
 [3529] <400> 176
 [3530] uuggggcggg gcgggaucga gcuaugaaa ggcgagauug aggucuggau agaguugca 60
 [3531] cacggcgcgg cgccagcca ucggcgggau gccugccccc gccgcgugca agcugcuauu 120
 [3532] ccagauuuua ucucucauca cuccucccg cccccccgc cccga 165
 [3533] <210> 177
 [3534] <211> 139
 [3535] <212> DNA
 [3536] <213> Artificial sequence
 [3537] <220>
 [3538] <223> Single strand oligonucleotide
 [3539] <400> 177
 [3540] aaggacucgu acaggccggc uagagagcgu aaacuuuua uauuguuuua cucuuggggc 60
 [3541] acauuccuug gcgugauagg aggccggggg uggggcgguc ugaggagaug acgcgugcca 120
 [3542] agggccucg cccuccuu 139
 [3543] <210> 178
 [3544] <211> 206
 [3545] <212> DNA
 [3546] <213> Artificial sequence
 [3547] <220>
 [3548] <223> Single strand oligonucleotide
 [3549] <400> 178
 [3550] gggagccgag ccaucagag guuggagggg uaugccauu gccgacgagu auccaccggc 60
 [3551] ucgugugauc gcuccauagc uggucuccg aggcagugcg cgggcacgaa caaacaggc 120
 [3552] agaagcuaga gucagucua cgugauguug gauggggaag gucgagcgau gacguugcaa 180
 [3553] cuucaacccc ugacaguucg gcucc 206
 [3554] <210> 179
 [3555] <211> 292
 [3556] <212> DNA
 [3557] <213> Artificial sequence
 [3558] <220>
 [3559] <223> Single strand oligonucleotide
 [3560] <400> 179
 [3561] gaaccaaugc ggaagauacc aaucacggu cgcauguaaa auugggcagu uggucaguuu 60
 [3562] uguuggggug aagucuugcc ccaguuagcc gggaggaaag auauuacacc cgacucauuc 120
 [3563] ugacgaacgc cucagguagu augcaaccug auacugaggu gaacggcaga augaugcggg 180
 [3564] uguauauauc caccuccgu aacugggcga agacuucacu ccaacauaac ggaccgcguc 240
 [3565] ucaccggccc auaccgacg uauugggcuc uuugguaaca guggucgggu uc 292
 [3566] <210> 180
 [3567] <211> 84
 [3568] <212> DNA
 [3569] <213> Artificial sequence

- [3570] <220>
- [3571] <223> Single strand oligonucleotide
- [3572] <400> 180
- [3573] auaccgagau aagcagagga agaauaaaua ggugcuaauu ggaagcugca ccuacauucc 60
- [3574] uuuuuauucug uuuauguuug guag 84
- [3575] <210> 181
- [3576] <211> 199
- [3577] <212> DNA
- [3578] <213> Artificial sequence
- [3579] <220>
- [3580] <223> Single strand oligonucleotide
- [3581] <400> 181
- [3582] agggcguacc aggagguaug aagccucgca ugggagauu gcgagguaau gggguagacu 60
- [3583] ucguaaaagg cgaaacaag cucgcacaaa agcgugagga ugauguagcu aaagaugcau 120
- [3584] aaaucaacag cgauucacgc acccaggug auucguggac cucuuguuga gacguguacu 180
- [3585] uuggauagua agaccccu 199
- [3586] <210> 182
- [3587] <211> 292
- [3588] <212> DNA
- [3589] <213> Artificial sequence
- [3590] <220>
- [3591] <223> Single strand oligonucleotide
- [3592] <400> 182
- [3593] cgccccauga guuagaaacg aguucggggc caaaguucua acacguaggu uggaaagggu 60
- [3594] uuggugaacc uugcggacac ggaggucgug gucggaggag aaauaucgcc cgacgcuugc 120
- [3595] ccgcuaaccc gugaggugcc aggaaacgcg auacucacgg gaaggagggu agguugcggg 180
- [3596] cgauaaaauuc gguccggacg accuccgcau ucgugggguu cacuaauccc guuccuaccu 240
- [3597] accccgguca cugaauggcg aacuugguuc uaaaauacaa ggagaacggg ug 292
- [3598] <210> 183
- [3599] <211> 292
- [3600] <212> DNA
- [3601] <213> Artificial sequence
- [3602] <220>
- [3603] <223> Single strand oligonucleotide
- [3604] <400> 183
- [3605] gccccacuaa gcuugaagcc auucccgcg cuaggagaa aagcgggcu gggauuuua 60
- [3606] guugugcuga caugucuagc aacggaugac gaagguaag aaauaucgcc cgacucgucc 120
- [3607] ucacaaacgc cagagcacga acgcaaccgu acacucuggc gaauggggg acgaagcggg 180
- [3608] cgauaaaauuc acgccuuuca uccguugagg gacauguuag cauaauaaaa aguccagcgc 240
- [3609] ccuacggugc ccacaagacg gaauggaguc gagauaaaa ugggacgggg gc 292
- [3610] <210> 184
- [3611] <211> 91

- [3612] <212> DNA
- [3613] <213> Artificial sequence
- [3614] <220>
- [3615] <223> Single strand oligonucleotide
- [3616] <400> 184
- [3617] aaggcuugcu acuguggagc aaucuuucug aacgauagag aaaaugggau uuaauuuuau 60
- [3618] ggucagaaug auacuccaca auacuaagcc u 91
- [3619] <210> 185
- [3620] <211> 195
- [3621] <212> DNA
- [3622] <213> Artificial sequence
- [3623] <220>
- [3624] <223> Single strand oligonucleotide
- [3625] <400> 185
- [3626] ggaggguacc uagccggcug uaacuugugg acuaucggcg ggguaauggg gggcaacuag 60
- [3627] cugccgaccc auuccuccau cccguccgug guacgagag ggugggcgcg acuuggaug 120
- [3628] agggaugga gcgggagaua guuggagucc ccgcccugc cuauccuuuu cagguuguag 180
- [3629] ccucugauga gcucu 195
- [3630] <210> 186
- [3631] <211> 292
- [3632] <212> DNA
- [3633] <213> Artificial sequence
- [3634] <220>
- [3635] <223> Single strand oligonucleotide
- [3636] <400> 186
- [3637] gccccacucu gacagagacc augucgcgca auaugaacaa acggggcuga gggagguggc 60
- [3638] uugguggacc uugcgaaccc auagguagac gagguuaccg aaaagacgcc cgacucuggc 120
- [3639] auacaaaccc gguuggaucc aagaaaugau aaacgaccgg gaaugggugc cagaagcggg 180
- [3640] uguuauuuuc ucgcccuuu aucugugcau ucgugggguu cacuaaucca gcuccaucag 240
- [3641] ccgacagcau cgccaauugg acauggguuc uguaggacua agugcagggg gc 292
- [3642] <210> 187
- [3643] <211> 292
- [3644] <212> DNA
- [3645] <213> Artificial sequence
- [3646] <220>
- [3647] <223> Single strand oligonucleotide
- [3648] <400> 187
- [3649] ggccccgagg ucuugugccc aaagacaugu cugagacucc agggggaagu ggguaauuuu 60
- [3650] guuuaggug uauccacuc ucagguaggc gaagguuagg auugcccccc cgacgcaggc 120
- [3651] uuacaaacgc ggauggguug acggaagaac agacauccgu gaaugagagu cugucacggg 180
- [3652] ggggacaauc gcaccuuccu aucugagcuu ggcauauuu uuaauaaaa cuaccaacuu 240
- [3653] ucgaagacuu cugaaagacu uuuuggcggc agguucuaaa ggugagcggg uc 292

- [3654] <210> 188
 [3655] <211> 84
 [3656] <212> DNA
 [3657] <213> Artificial sequence
 [3658] <220>
 [3659] <223> Single strand oligonucleotide
 [3660] <400> 188
 [3661] uugggauaug uuaggaaaua agaaaaucga ggugcuaauu ggaagcugca ccuaggucc 60
 [3662] ucuugauucc uagccguauc ucau 84
 [3663] <210> 189
 [3664] <211> 199
 [3665] <212> DNA
 [3666] <213> Artificial sequence
 [3667] <220>
 [3668] <223> Single strand oligonucleotide
 [3669] <400> 189
 [3670] agggcuuucg cgggcuucgu aggccuugcu aagagauuuu uaaaaauuaa cuggaugacu 60
 [3671] uagaaaaaua cgcaacaag uagaaauaaa cgcaugugug gugcguugcc aaagaagugu 120
 [3672] uccacaaaag auacgcaugc uccaucuuag uuugggggac uuucuuacga gagcccgaag 180
 [3673] cuagagggag agaagcccu 199
 [3674] <210> 190
 [3675] <211> 292
 [3676] <212> DNA
 [3677] <213> Artificial sequence
 [3678] <220>
 [3679] <223> Single strand oligonucleotide
 [3680] <400> 190
 [3681] guccccaacc aguuguagcc aaucggaug cugauggaca acacguaaga aggauguggc 60
 [3682] uuggugagcu ccgcggaccc guagguuuuu gugggaguug aucgugauc cgacucaugc 120
 [3683] acgcaaacgc aacgggcugu acgaaucag agaccguugc gaaugagugu augacgcggg 180
 [3684] auugucgauc uauccagga accugcgcau ucgugggguu cacuaaucg aguccgucuu 240
 [3685] accucgccgc guaaaaguag aaugggggc aacggguaua gacgagagg gc 292
 [3686] <210> 191
 [3687] <211> 237
 [3688] <212> DNA
 [3689] <213> Artificial sequence
 [3690] <220>
 [3691] <223> Single strand oligonucleotide
 [3692] <400> 191
 [3693] cugaccgga cauauagga guugucuggc ccgccacagc ccuagcaaa ucucgucgcg 60
 [3694] gagccacgcg uaguauguc gcgagccacg cccgaagcua aaccagaagc accgaaggcu 120
 [3695] acgcguccu uauacacugu aacggcacc cgaacacggg aagagggcuc cgaaggccga 180

- [3696] cgagauuucc uaggggcugu ggcggguugg acaacuuugg auaugugccg gucaggg 237
- [3697] <210> 192
- [3698] <211> 64
- [3699] <212> DNA
- [3700] <213> Artificial sequence
- [3701] <220>
- [3702] <223> Single strand oligonucleotide
- [3703] <400> 192
- [3704] cgcugcggag cucaagaaga acccucuucg aaauaaccag gguucuuuaa gggcuuugcg 60
- [3705] guau 64
- [3706] <210> 193
- [3707] <211> 110
- [3708] <212> DNA
- [3709] <213> Artificial sequence
- [3710] <220>
- [3711] <223> Single strand oligonucleotide
- [3712] <400> 193
- [3713] aaaguuaggg gagcacuagg guugauuggu cgucacaguu agaucuuucu gaccuagag 60
- [3714] acgaaaaagc uguggcgggu uggacaacuu cauaccuccc aaccuagcg 110
- [3715] <210> 194
- [3716] <211> 237
- [3717] <212> DNA
- [3718] <213> Artificial sequence
- [3719] <220>
- [3720] <223> Single strand oligonucleotide
- [3721] <400> 194
- [3722] cgggacaguu cauugcgggg guuggugac cccacaguu cccaagcagg aguaggcgca 60
- [3723] gaguagcuug acgcaaggua ccggcccacg gacgaccuca aacaguagag accuaacgcg 120
- [3724] ucaggcuccu auggaacca uacgaaaccc ccagcagggg aagaguacuc uguagaccgu 180
- [3725] cuacuccucc uugggaauuc gugggguuca cuaaucccg cagugagccg ucccggg 237
- [3726] <210> 195
- [3727] <211> 237
- [3728] <212> DNA
- [3729] <213> Artificial sequence
- [3730] <220>
- [3731] <223> Single strand oligonucleotide
- [3732] <400> 195
- [3733] cugaaccgau cgcaacggag ugguaucuu cacugccugu cacuuucaua uuguggcgca 60
- [3734] ggucugccug uggcaugggc gugcuccaca cagaauucau aaccucuuga uccaaacgcu 120
- [3735] gcgggugacg cauugaaaau guuucuggcc cgaacucggg gaaaaggacc uggaggcugu 180
- [3736] cgcaauauca aagugacagg cggugaauga uguuauucgg uugcgauccg uucaggg 237
- [3737] <210> 196

- [3738] <211> 64
[3739] <212> DNA
[3740] <213> Artificial sequence
[3741] <220>
[3742] <223> Single strand oligonucleotide
[3743] <400> 196
[3744] accggaagag guaaaugaau uaccuuuccg aaauaauccag gugguuuaua ugccuuuuucc 60
[3745] ggau 64
[3746] <210> 197
[3747] <211> 110
[3748] <212> DNA
[3749] <213> Artificial sequence
[3750] <220>
[3751] <223> Single strand oligonucleotide
[3752] <400> 197
[3753] aaggcggggg aagcaucugg acgccggaag agguaaauga agaucuucca cauugguggg 60
[3754] acgaaaaucg uuugcuauugu aucaucgucc cauaacuucc aaauaggaca 110
[3755] <210> 198
[3756] <211> 237
[3757] <212> DNA
[3758] <213> Artificial sequence
[3759] <220>
[3760] <223> Single strand oligonucleotide
[3761] <400> 198
[3762] cugaucagag cauugcgagg guugguggac cccgcggaua cacucucugu caagggcccu 60
[3763] gagucgcuug gcggaugguu cgcagcccgc gcguaggaca aacuggaguc accaaacccg 120
[3764] ccagguccau aagcgacguu uacggaaccc caagcauggg cagaggacuc aggaggcggu 180
[3765] ccuugauaca gaguguauuc guggggauca cuaauccugg caaugcuccg gucaggg 237
[3766] <210> 199
[3767] <211> 237
[3768] <212> DNA
[3769] <213> Artificial sequence
[3770] <220>
[3771] <223> Single strand oligonucleotide
[3772] <400> 199
[3773] cagaacagau ccggacgguu guguugugcu uuugcuggaa cacuagcuuu uguaggccca 60
[3774] gcguuccaag gcgcaaggug acacgcucug uacgaaccua aacccaaagg accuaacgcg 120
[3775] ucuuggagac ucuagacuag ggccuuauug caagcaugcg cggacgacgc ugaagacggc 180
[3776] cuauagaacc uaguguucca gcaaaaguac agcacaacgg uccggaucgg uucuggg 237
[3777] <210> 200
[3778] <211> 52
[3779] <212> DNA

- [3780] <213> Artificial sequence
[3781] <220>
[3782] <223> Single strand oligonucleotide
[3783] <400> 200
[3784] uuugguccca uguuggagcu ggucgcaccc agcuccacau ggaagacuua cc 52
[3785] <210> 201
[3786] <211> 118
[3787] <212> DNA
[3788] <213> Artificial sequence
[3789] <220>
[3790] <223> Single strand oligonucleotide
[3791] <400> 201
[3792] aaacaggaaa ugggaagcgg cagaaaugcc auucuccguu uacguucuuc gacgcuuccc 60
[3793] gcuuuccugg gacgugagua gggaauagug uuuuucccac uucucaagac cgacccgc 118
[3794] <210> 202
[3795] <211> 237
[3796] <212> DNA
[3797] <213> Artificial sequence
[3798] <220>
[3799] <223> Single strand oligonucleotide
[3800] <400> 202
[3801] ccgagccgau caugucgcgg auuggugagc cccacgggug caccuacguc auuugucgcu 60
[3802] gaguaacaug cugcaaguga cgcgcccugc ggauauuaca aacuagagua uacuaacgcg 120
[3803] gcauguucgg aagcaacgcu ucagaaaccc cgaucacggg cagaguacuc gggagcccgg 180
[3804] caaaugaucu aggugcauuc guggggguca cuaauccggg auauagguccg cucgggg 237
[3805] <210> 203
[3806] <211> 193
[3807] <212> DNA
[3808] <213> Artificial sequence
[3809] <220>
[3810] <223> Single strand oligonucleotide
[3811] <400> 203
[3812] gguggugugu caaagguucg cugccucugc aucuaccuc uaauugccau augagaccu 60
[3813] aaacuacca agccacugga auaaaaauga ggccgccguu ccaacaaaa cgauaacaua 120
[3814] acaaauguua uuacaaggu gaaaaggcg aaggggggug ggugcacggg cgacgcaccg 180
[3815] gacgcaccgc cac 193
[3816] <210> 204
[3817] <211> 111
[3818] <212> DNA
[3819] <213> Artificial sequence
[3820] <220>
[3821] <223> Single strand oligonucleotide

- [3822] <400> 204
- [3823] gccgugcacc cacuagcagu uacaguguuc augaaauccu uaacuuccuu ccugucggg 60
- [3824] aggauagaua gggguuuuug ggugcuguac cuguuguugg gaucacgaag a 111
- [3825] <210> 205
- [3826] <211> 138
- [3827] <212> DNA
- [3828] <213> Artificial sequence
- [3829] <220>
- [3830] <223> Single strand oligonucleotide
- [3831] <400> 205
- [3832] gaacgccga gcguaaaaag cugccucugc cucugcaucu aucuucgguu agaaggugaa 60
- [3833] gggggcgcc aagaccggg uucuaaccu agcuaggugu agcccgagg agccagcucc 120
- [3834] ugccggcuug gggcccca 138
- [3835] <210> 206
- [3836] <211> 193
- [3837] <212> DNA
- [3838] <213> Artificial sequence
- [3839] <220>
- [3840] <223> Single strand oligonucleotide
- [3841] <400> 206
- [3842] gcaggcgug ccagggcgug uuggaggggu aaugccauug caauggcuaa aaggacuga 60
- [3843] auacuaccga gagcgcgau gccaaacca agagacagca ucuagacaa cgaagaacca 120
- [3844] auaagguucu uaaaucggu aaaaagagcc aagcgguugu auugccauuc cauaacca 180
- [3845] guggcgccug cac 193
- [3846] <210> 207
- [3847] <211> 351
- [3848] <212> DNA
- [3849] <213> Artificial sequence
- [3850] <220>
- [3851] <223> Single strand oligonucleotide
- [3852] <400> 207
- [3853] caggggagug aagcgagug aucuucuuuc aucgaagcau gcaccuucac auucggaaaa 60
- [3854] aucccccagg cuggaaccgu ccaccaaca cuaggcagag ucgagccgc gcgguaccaa 120
- [3855] aucugguug gagaauaagu cccgggggua gccuccaga gggggcccaa ggccacauga 180
- [3856] gggaugcgug caaggaggg acacagcaug gaccggccug acuacuauug aaagccgaac 240
- [3857] guggaucaga gucgccgaa ggggcagaau cuacggccg aaucugauc caaacccau 300
- [3858] agagucagg cgccaugggu ggugaaauc cacucguuc acaccccccac a 351
- [3859] <210> 208
- [3860] <211> 93
- [3861] <212> DNA
- [3862] <213> Artificial sequence
- [3863] <220>

- [3864] <223> Single strand oligonucleotide
- [3865] <400> 208
- [3866] aaaaccaagc uggugcuaua augcacaaua aggaucaauc agcaccugga ucugagauuc 60
- [3867] gaguugugcg uuggcgcacc cacguggauc cua 93
- [3868] <210> 209
- [3869] <211> 351
- [3870] <212> DNA
- [3871] <213> Artificial sequence
- [3872] <220>
- [3873] <223> Single strand oligonucleotide
- [3874] <400> 209
- [3875] gcugggaggu cagcguacaa cucaugaaua uuugaauuc ccaccauccc gaaccucucu 60
- [3876] gaccccaugc ccgguaucga ccaccgauc acgaagacag accaggccgc ccgauuccca 120
- [3877] auuugugauc gauaaauggg cucgggguuu ucccuagca gggggacca gucccuagga 180
- [3878] uggauggggg aauggguggu aaaagccagg gcuaggucug uaaucauac aaaccccaac 240
- [3879] ggggcuagua gucagcugag gggggaaaac ucauagccug aaauccuagc cuaacaccau 300
- [3880] aguuacaggg cuccugagg uguucauauug ugugcguuga ucaccaccc a 351
- [3881] <210> 210
- [3882] <211> 351
- [3883] <212> DNA
- [3884] <213> Artificial sequence
- [3885] <220>
- [3886] <223> Single strand oligonucleotide
- [3887] <400> 210
- [3888] uuugagaggc uggaggggu aaugccauug cgugaaacau caaccggucc cagcaucgaa 60
- [3889] uggcgcaagu cagggccgc ccaccguucc uuugcgauac uccaggccgc ccgauagcca 120
- [3890] ggcaaagaac gagaaaugg cacgcgucac guccaacug ggaguugcca cgacgaagac 180
- [3891] cggauuggug uaaggggggc agagaacagg guggugaccu uccaucacu aaagacuaac 240
- [3892] gggguaucga cucagcugag gugguagaaa ccacagccug aaucagauac cuaacgacau 300
- [3893] ggggagggug accccugacg ugguggcuuu ucuuuccgag ccacucacgc a 351
- [3894] <210> 211
- [3895] <211> 351
- [3896] <212> DNA
- [3897] <213> Artificial sequence
- [3898] <220>
- [3899] <223> Single strand oligonucleotide
- [3900] <400> 211
- [3901] gaugagaggu auggguuuug agacaaaauu ugagaaccga accccauccc accgauaaag 60
- [3902] ggaccgaagu cgguacaua gcaccgucuc uacagaauag uccaggccgc ccguagccca 120
- [3903] gcuguaagac gagaacaua ugccgguccg ccccauuug gggagaucga aucucuagga 180
- [3904] uggagguucg gacggcgac agagauggcg gugaggacgg gccaccagua aaaauccaac 240
- [3905] ggggcguuaa guuagcguag ugggcagaau gcaacgccua aguucaaugc cuaacaccuu 300

- [3906] gggguuugug cuccgccuca aguuuugcug ggagcccgua ccacucacgc a 351
- [3907] <210> 212
- [3908] <211> 91
- [3909] <212> DNA
- [3910] <213> Artificial sequence
- [3911] <220>
- [3912] <223> Single strand oligonucleotide
- [3913] <400> 212
- [3914] caguagcagu uggcgccaug aucaagaaga aaacuucccu aaacaagcca aggaaagauc 60
- [3915] uuuucuuguc guggccucac cuguugaugg g 91
- [3916] <210> 213
- [3917] <211> 351
- [3918] <212> DNA
- [3919] <213> Artificial sequence
- [3920] <220>
- [3921] <223> Single strand oligonucleotide
- [3922] <400> 213
- [3923] aucgagagug cagauucuuc uggcgaaau agugaagcua acaccuucuc agccaccaca 60
- [3924] gaccccaggc cgggacccgu ccaccgauc accacaagag cccaggccgc ccgucgcaa 120
- [3925] cguggugauc gagaauucgg cgcgggguca aaauccgacg aaugguucga agcccaagga 180
- [3926] gggauguuag caaggcggu aaauaacaug gugagggucg uuugcauuu uaacucuaac 240
- [3927] gugguuaua uuucgcugag gagguagaau ccacagccga acuacuaac cgaacuccau 300
- [3928] ugagaugacg uuccaugacu aguucgggcu ggggaucugu acacucgcuc a 351
- [3929] <210> 214
- [3930] <211> 351
- [3931] <212> DNA
- [3932] <213> Artificial sequence
- [3933] <220>
- [3934] <223> Single strand oligonucleotide
- [3935] <400> 214
- [3936] aaagagagga auucgugggg uucacuaauc cuaaaaacu ccaccuacc gaacaucucu 60
- [3937] gucucggcgu cuggauacgu ccacugagcc ugaucgaaag accagaccgc ucgcuuccca 120
- [3938] agaucagcuc accacggagg cugcgaggcu agucaaacgu gacggacca guccacaggu 180
- [3939] gggauggggg uauacguguu auagagauug gaguugccug ucugcgacca aaauccaaac 240
- [3940] gcggguuuuc ggcagcugag ggggaacaac ccuagccug cagacaaacc cgaacgccgu 300
- [3941] cgagauaggg aaccauagg gguuaguagg uccgcgaaau ucacucucgc a 351
- [3942] <210> 215
- [3943] <211> 351
- [3944] <212> DNA
- [3945] <213> Artificial sequence
- [3946] <220>
- [3947] <223> Single strand oligonucleotide

- [3948] <400> 215
- [3949] aacccgaguu cagaauuca cuugagauuc ugugaacgau gcaccucgc cccuauucc 60
- [3950] gacccagga ccggaccgu ccaccgucca cggaauaaag gccacuccgc agaaccceca 120
- [3951] cuuucgggac gacaaauggu cacggggucu cuggucauuu ccguguaugu ugcaauugug 180
- [3952] gggauccguu gagaauaggc aaauaccug gcggugugug uuucagauca caaagcgaac 240
- [3953] gggguucuga gugugccgag ggggcauac ucauggccac agucaagaac cuaaccccau 300
- [3954] uuagauacgg acccaggaua gggucucggc gggguuuuga acacgggcgc a 351
- [3955] <210> 216
- [3956] <211> 100
- [3957] <212> DNA
- [3958] <213> Artificial sequence
- [3959] <220>
- [3960] <223> Single strand oligonucleotide
- [3961] <400> 216
- [3962] aacaguugag uggggcucug ucugcgucua gaccacucgc accaaguaca gacauaauu 60
- [3963] gaauaucua ggcgcagauu ccaccccauc caacucaaca 100
- [3964] <210> 217
- [3965] <211> 351
- [3966] <212> DNA
- [3967] <213> Artificial sequence
- [3968] <220>
- [3969] <223> Single strand oligonucleotide
- [3970] <400> 217
- [3971] uauccagagg cagaauuca cuugagauuc ugugaaaca acaccagcuc auucuguuca 60
- [3972] aacccacgu cugguaacga ccaccggacc gugaucacag uucaggccgc ccgauacca 120
- [3973] agucgcgucc gaaaaguagg cccggguug gcgcuccaaa gcgggaccga guccuaaggu 180
- [3974] uggauguuug uaaggguagg auacaucagg gugagggcug ucugcuuuu aaaaccaac 240
- [3975] gcggguuugu cagucgugag ucgggacaag acacagccau uagcaaaacc cgaacgcga 300
- [3976] agagauagcg uucccugaua gggucucggc gaugauuggu ucagucacgc a 351
- [3977] <210> 218
- [3978] <211> 351
- [3979] <212> DNA
- [3980] <213> Artificial sequence
- [3981] <220>
- [3982] <223> Single strand oligonucleotide
- [3983] <400> 218
- [3984] gaugagagcu auucgugggg uucacuaauc ccugaauac acaccugccc ucccagucc 60
- [3985] gccccuagu cagaugacga ucccggccgc ugaucuuag cccaaccgc gugcagccca 120
- [3986] cgucgacgu caaaacuug cacggggguu ccgccgaug gcgggguuca acccgaggc 180
- [3987] aggaugugug aaauaggagg aagcaccag gcgagggcug uauucuugau aaaaccaac 240
- [3988] cuggagugca cuugcgagg uuggaagaaa gcauugccca auugccacuc cgaacgcca 300
- [3989] agauauagug cuccgugagg gguuaguaag ccugcgagua gcacucacac a 351

- [3990] <210> 219
- [3991] <211> 351
- [3992] <212> DNA
- [3993] <213> Artificial sequence
- [3994] <220>
- [3995] <223> Single strand oligonucleotide
- [3996] <400> 219
- [3997] ccggggacgu caccuguggc uucuaccgca agagaacugc aauccguauc acgccggaau 60
- [3998] aaccacaggu uugggagcgc ccaccgucca gcuguuaaag uccaggccgc ccgucgcca 120
- [3999] ugcagcggac gaaaauaag cacgugguuc gcccuuacua gggggcucga agccauaaua 180
- [4000] cggaauugcg gacggggggc acauaucacg gaacggcccu acggcguga gaacacuaag 240
- [4001] gcgguacuug auaagcccag ugggaaaaau gcaggccuu accacgguac cgaaagcaa 300
- [4002] ugcguagggg cgccguguuu ugugguaaac ucacggguga ugaccucucc a 351
- [4003] <210> 220
- [4004] <211> 99
- [4005] <212> DNA
- [4006] <213> Artificial sequence
- [4007] <220>
- [4008] <223> Single strand oligonucleotide
- [4009] <400> 220
- [4010] guuuuagag gugaaugcug gauggcucgu cgcauacaca uaagaagaag aaauaauagu 60
- [4011] gaaggcugcg aaucgcucuu cguuuauuc uauauaca 99
- [4012] <210> 221
- [4013] <211> 351
- [4014] <212> DNA
- [4015] <213> Artificial sequence
- [4016] <220>
- [4017] <223> Single strand oligonucleotide
- [4018] <400> 221
- [4019] cacgugaggu ccaagccacc auccaagcca agcgaaaca acacaagccc auuagcccu 60
- [4020] uacccacagg cugggucgc ccacaguucc acuacgaaag gacaggcagc ccggaccca 120
- [4021] aguagugaac uagaauaagu cccgggguac ccgcguauac gcgugaucua aucagcaggu 180
- [4022] uugauguuug uaaggaggu auacaacuug gcgguugagu uccacuguuc uaacacuauc 240
- [4023] gggguccuaa uucagccgau ggggaaaaau uaacggccug auuucaggac ccaacgucac 300
- [4024] aggaguuug acccagggc ugguuuccuu guggcuugga ucacgcgcgc a 351
- [4025] <210> 222
- [4026] <211> 351
- [4027] <212> DNA
- [4028] <213> Artificial sequence
- [4029] <220>
- [4030] <223> Single strand oligonucleotide
- [4031] <400> 222

- [4032] agugugagga auucgugggg uucacuaauc cgggaaacug ucgccuucac uuacugcccg 60
- [4033] uacccaagu caggaacagu ccacagggcc agugcgaaag accaugccgc cagccuccca 120
- [4034] ggcauugccc uacaacgugg ccagggguaa agacuaucga guugggcccga gcccuauga 180
- [4035] aggauggcag ucaaggcagg aaauacacgg gaggcguccg caccaugucc caauacgaac 240
- [4036] gggguucauc auacgcugag ccgguagaag gcuaagccgu aggacugaac cuaacaccac 300
- [4037] gugugugggg gucccguucg gguugguaag ucugcgaaau ccacacaauc a 351
- [4038] <210> 223
- [4039] <211> 213
- [4040] <212> DNA
- [4041] <213> Artificial sequence
- [4042] <220>
- [4043] <223> Single strand oligonucleotide
- [4044] <400> 223
- [4045] ugauugugug gcuugagguc cggggucagc gucccccgcu ccgaccgaa cuagaaguga 60
- [4046] guagaagcua gagugaacgg uaccacacag acccgcaucu cggaccaacc cuccgccugc 120
- [4047] aaccccuucc accccgaccc ccucucgag guccgagaca gggcgugggg agacgagggg 180
- [4048] gcaagaacuc cguacuuuau uucacguaac caa 213
- [4049] <210> 224
- [4050] <211> 100
- [4051] <212> DNA
- [4052] <213> Artificial sequence
- [4053] <220>
- [4054] <223> Single strand oligonucleotide
- [4055] <400> 224
- [4056] aggauugcc ugggcuacag uauggcacuc accuagagca acgacagcuu gggaggguug 60
- [4057] ccuaauaggu ggaugccgua cuuuuuuca cguaaaucuc 100
- [4058] <210> 225
- [4059] <211> 167
- [4060] <212> DNA
- [4061] <213> Artificial sequence
- [4062] <220>
- [4063] <223> Single strand oligonucleotide
- [4064] <400> 225
- [4065] cggcgccag aaugcgcga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcggcgccg gacugcaccu 60
- [4066] guggacggcc gccc aaagc gacggagaga cggguuccua accaaggugu aggagcagcc 120
- [4067] gccggcguu uuuuuuagua gcuuuucucu ugucagucuc uccucca 167
- [4068] <210> 226
- [4069] <211> 213
- [4070] <212> DNA
- [4071] <213> Artificial sequence
- [4072] <220>
- [4073] <223> Single strand oligonucleotide

- [4074] <400> 226
- [4075] ugaggauucg uggguuucac uauucccaga cgccgccgcu ccccccugag cagggacauc 60
- [4076] gccagaccu gaggcaacgc ggcgccacca accaccacu cguucccgca cugaaacauc 120
- [4077] caccacaacg uacguagccc ccccccacag gagcgaguuc uggcgggcgg agacgagcgg 180
- [4078] cggagagggg ugaugagccg aguggauccc caa 213
- [4079] <210> 227
- [4080] <211> 213
- [4081] <212> DNA
- [4082] <213> Artificial sequence
- [4083] <220>
- [4084] <223> Single strand oligonucleotide
- [4085] <400> 227
- [4086] cgauuuuuua ugcuuuuugg uucggucagc cgccgccgcg ccagcccacc ucguaccccc 60
- [4087] agaccacacg acgcccacgc agcggcaaca aggcccagcc cgagcccccg caccucguc 120
- [4088] uuccacauca accgcagccc cccaccccag gcucggggccc gcccgguagg ugacgagcgg 180
- [4089] cguagaaccg aggcaaagau aauaaaaaac cga 213
- [4090] <210> 228
- [4091] <211> 76
- [4092] <212> DNA
- [4093] <213> Artificial sequence
- [4094] <220>
- [4095] <223> Single strand oligonucleotide
- [4096] <400> 228
- [4097] ugguuaugac gagcgugccg uacgagccac ggcugcugcu gcgccgccgc gggcuacggc 60
- [4098] acucuuuua uaauua 76
- [4099] <210> 229
- [4100] <211> 155
- [4101] <212> DNA
- [4102] <213> Artificial sequence
- [4103] <220>
- [4104] <223> Single strand oligonucleotide
- [4105] <400> 229
- [4106] auggccgccc gcuuagagag ugaaaaaaua uauuucugca aaaggccac cgcccguggg 60
- [4107] cggcagaauug ccgauuucug cgccugggag agagggggccc gcgcagcgau aaagcuuuug 120
- [4108] ugggugugua uuuuuacaac ccucucuagc cuaca 155
- [4109] <210> 230
- [4110] <211> 213
- [4111] <212> DNA
- [4112] <213> Artificial sequence
- [4113] <220>
- [4114] <223> Single strand oligonucleotide
- [4115] <400> 230

- [4116] cgaggauucg ugggguucac uaaucggcg cgccuccgcg ccgcccggcc gcuuacucc 60
- [4117] uucauccaag cacaugacgc gaaaugaccc acuccaagcc cuaccccacg aaccugcgac 120
- [4118] gacugcuaca ccuuccgacc ccccccccg gguagggccc gagagggggg ugacgagagg 180
- [4119] ugaacaggau ugaugagccg gaugagucc cga 213
- [4120] <210> 231
- [4121] <211> 213
- [4122] <212> DNA
- [4123] <213> Artificial sequence
- [4124] <220>
- [4125] <223> Single strand oligonucleotide
- [4126] <400> 231
- [4127] acauugguuu uacugagucc gcggggcaga gcccggccg augaagaucc aguauaacc 60
- [4128] aucuagcuac ucgaguacc ugccucccg acaccaagcu cgaccccucg cuccaacgua 120
- [4129] aacaacagau ccccagccc ccccaccug ggucgagccc gugcuuuggu ggacgagcgg 180
- [4130] gcgagauuc gcagauuac aaaaacuaac gua 213
- [4131] <210> 232
- [4132] <211> 74
- [4133] <212> DNA
- [4134] <213> Artificial sequence
- [4135] <220>
- [4136] <223> Single strand oligonucleotide
- [4137] <400> 232
- [4138] gugcaggauu gugagggagc auuuccccag cucgaucau gcaugauuag aagaguuuu 60
- [4139] ucauguuccu gcau 74
- [4140] <210> 233
- [4141] <211> 213
- [4142] <212> DNA
- [4143] <213> Artificial sequence
- [4144] <220>
- [4145] <223> Single strand oligonucleotide
- [4146] <400> 233
- [4147] ugagggugcu cgaucacggc ccugggcca cgccggcgcu cccgccccu aucgccucuc 60
- [4148] cacacaccga ucagcaacac gccgcuacc acuccuacg cgagcccacc cguccacuuc 120
- [4149] uucuuaacc gccgcgacc ccccccccg gcucgugucc gagcgugcg agacgagugg 180
- [4150] uggagaucca ggauugugag ggagcauuuc caa 213
- [4151] <210> 234
- [4152] <211> 213
- [4153] <212> DNA
- [4154] <213> Artificial sequence
- [4155] <220>
- [4156] <223> Single strand oligonucleotide
- [4157] <400> 234

- [4158] agaggauucg uggguuucac uauccccgc cuccgccgc ccaaccaua gcuacagguc 60
[4159] gagaauauag caugcuaacc gccgcaacca acgcccuauc cgugccagcc ccacaccaug 120
[4160] ccuccuaca gccucagaca cccaacagg guacgagacc gcgcggucgg agacgagcgg 180
[4161] agcaaaggau ugaugaguca gauggauc ccua 213
[4162] <210> 235
[4163] <211> 23
[4164] <212> DNA
[4165] <213> Artificial sequence
[4166] <220>
[4167] <223> Single strand oligonucleotide
[4168] <400> 235
[4169] agaaataggc aagtcaccc tgg 23
[4170] <210> 236
[4171] <211> 23
[4172] <212> DNA
[4173] <213> Artificial sequence
[4174] <220>
[4175] <223> Single strand oligonucleotide
[4176] <400> 236
[4177] agaagagagt gagcacacaa agg 23
[4178] <210> 237
[4179] <211> 23
[4180] <212> DNA
[4181] <213> Artificial sequence
[4182] <220>
[4183] <223> Single strand oligonucleotide
[4184] <400> 237
[4185] agaaataggc aagtcaccc tgg 23
[4186] <210> 238
[4187] <211> 23
[4188] <212> DNA
[4189] <213> Artificial sequence
[4190] <220>
[4191] <223> Single strand oligonucleotide
[4192] <400> 238
[4193] agaaataggc aagtcaccc tgg 23
[4194] <210> 239
[4195] <211> 23
[4196] <212> DNA
[4197] <213> Artificial sequence
[4198] <220>
[4199] <223> Single strand oligonucleotide

[4200] <400> 239
[4201] agaaataggc aagtcacct tgg 23
[4202] <210> 240
[4203] <211> 23
[4204] <212> DNA
[4205] <213> Artificial sequence
[4206] <220>
[4207] <223> Single strand oligonucleotide
[4208] <400> 240
[4209] agaagagagt gagcacacaa agg 23
[4210] <210> 241
[4211] <211> 23
[4212] <212> DNA
[4213] <213> Artificial sequence
[4214] <220>
[4215] <223> Single strand oligonucleotide
[4216] <400> 241
[4217] acagaagata gagagcacta agg 23
[4218] <210> 242
[4219] <211> 23
[4220] <212> DNA
[4221] <213> Artificial sequence
[4222] <220>
[4223] <223> Single strand oligonucleotide
[4224] <400> 242
[4225] agaaataggc aagtcacct tgg 23
[4226] <210> 243
[4227] <211> 23
[4228] <212> DNA
[4229] <213> Artificial sequence
[4230] <220>
[4231] <223> Single strand oligonucleotide
[4232] <400> 243
[4233] agaaataggc aagtcacct tgg 23
[4234] <210> 244
[4235] <211> 23
[4236] <212> DNA
[4237] <213> Artificial sequence
[4238] <220>
[4239] <223> Single strand oligonucleotide
[4240] <400> 244
[4241] aagaatctgt aaagtcagg agg 23

[4242] <210> 245
[4243] <211> 23
[4244] <212> DNA
[4245] <213> Artificial sequence
[4246] <220>
[4247] <223> Single strand oligonucleotide
[4248] <400> 245
[4249] acagaagata gagagcacta agg 23
[4250] <210> 246
[4251] <211> 23
[4252] <212> DNA
[4253] <213> Artificial sequence
[4254] <220>
[4255] <223> Single strand oligonucleotide
[4256] <400> 246
[4257] agaaataggc aagtcacct tgg 23
[4258] <210> 247
[4259] <211> 23
[4260] <212> DNA
[4261] <213> Artificial sequence
[4262] <220>
[4263] <223> Single strand oligonucleotide
[4264] <400> 247
[4265] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4266] <210> 248
[4267] <211> 23
[4268] <212> DNA
[4269] <213> Artificial sequence
[4270] <220>
[4271] <223> Single strand oligonucleotide
[4272] <400> 248
[4273] aaaaatgacg ctgacagaag agg 23
[4274] <210> 249
[4275] <211> 23
[4276] <212> DNA
[4277] <213> Artificial sequence
[4278] <220>
[4279] <223> Single strand oligonucleotide
[4280] <400> 249
[4281] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4282] <210> 250
[4283] <211> 23

[4284] <212> DNA
[4285] <213> Artificial sequence
[4286] <220>
[4287] <223> Single strand oligonucleotide
[4288] <400> 250
[4289] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4290] <210> 251
[4291] <211> 23
[4292] <212> DNA
[4293] <213> Artificial sequence
[4294] <220>
[4295] <223> Single strand oligonucleotide
[4296] <400> 251
[4297] aaggtgccgc ggtcatgatg ggg 23
[4298] <210> 252
[4299] <211> 23
[4300] <212> DNA
[4301] <213> Artificial sequence
[4302] <220>
[4303] <223> Single strand oligonucleotide
[4304] <400> 252
[4305] aatcttaggg atgggaggtg tgg 23
[4306] <210> 253
[4307] <211> 23
[4308] <212> DNA
[4309] <213> Artificial sequence
[4310] <220>
[4311] <223> Single strand oligonucleotide
[4312] <400> 253
[4313] aggagtgaac ctgagaacag agg 23
[4314] <210> 254
[4315] <211> 23
[4316] <212> DNA
[4317] <213> Artificial sequence
[4318] <220>
[4319] <223> Single strand oligonucleotide
[4320] <400> 254
[4321] aaggtgccgc ggtcatgatg ggg 23
[4322] <210> 255
[4323] <211> 23
[4324] <212> DNA
[4325] <213> Artificial sequence

[4326] <220>
[4327] <223> Single strand oligonucleotide
[4328] <400> 255
[4329] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4330] <210> 256
[4331] <211> 23
[4332] <212> DNA
[4333] <213> Artificial sequence
[4334] <220>
[4335] <223> Single strand oligonucleotide
[4336] <400> 256
[4337] agtggcacgt gatattggca cgg 23
[4338] <210> 257
[4339] <211> 23
[4340] <212> DNA
[4341] <213> Artificial sequence
[4342] <220>
[4343] <223> Single strand oligonucleotide
[4344] <400> 257
[4345] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4346] <210> 258
[4347] <211> 23
[4348] <212> DNA
[4349] <213> Artificial sequence
[4350] <220>
[4351] <223> Single strand oligonucleotide
[4352] <400> 258
[4353] cgtagatgaa tggttccatc agg 23
[4354] <210> 259
[4355] <211> 23
[4356] <212> DNA
[4357] <213> Artificial sequence
[4358] <220>
[4359] <223> Single strand oligonucleotide
[4360] <400> 259
[4361] catcatcaag attctcatcc tgg 23
[4362] <210> 260
[4363] <211> 23
[4364] <212> DNA
[4365] <213> Artificial sequence
[4366] <220>
[4367] <223> Single strand oligonucleotide

[4368] <400> 260
[4369] catcatcaag attctcatcc tgg 23
[4370] <210> 261
[4371] <211> 23
[4372] <212> DNA
[4373] <213> Artificial sequence
[4374] <220>
[4375] <223> Single strand oligonucleotide
[4376] <400> 261
[4377] catcatcaag attctcatcc tgg 23
[4378] <210> 262
[4379] <211> 23
[4380] <212> DNA
[4381] <213> Artificial sequence
[4382] <220>
[4383] <223> Single strand oligonucleotide
[4384] <400> 262
[4385] catcatcaag attctcatcc tgg 23
[4386] <210> 263
[4387] <211> 23
[4388] <212> DNA
[4389] <213> Artificial sequence
[4390] <220>
[4391] <223> Single strand oligonucleotide
[4392] <400> 263
[4393] ccgctgcttg tatttcccat tgg 23
[4394] <210> 264
[4395] <211> 23
[4396] <212> DNA
[4397] <213> Artificial sequence
[4398] <220>
[4399] <223> Single strand oligonucleotide
[4400] <400> 264
[4401] caaatggcat acaggagacc agg 23
[4402] <210> 265
[4403] <211> 23
[4404] <212> DNA
[4405] <213> Artificial sequence
[4406] <220>
[4407] <223> Single strand oligonucleotide
[4408] <400> 265
[4409] ctgaatgatg atctcgacc agg 23

[4410] <210> 266
[4411] <211> 23
[4412] <212> DNA
[4413] <213> Artificial sequence
[4414] <220>
[4415] <223> Single strand oligonucleotide
[4416] <400> 266
[4417] aaggtgtgag ttgagcaaga tgg 23
[4418] <210> 267
[4419] <211> 23
[4420] <212> DNA
[4421] <213> Artificial sequence
[4422] <220>
[4423] <223> Single strand oligonucleotide
[4424] <400> 267
[4425] ccgctgcttg tatttcccat tgg 23
[4426] <210> 268
[4427] <211> 23
[4428] <212> DNA
[4429] <213> Artificial sequence
[4430] <220>
[4431] <223> Single strand oligonucleotide
[4432] <400> 268
[4433] ctggcagctt caactatttg agg 23
[4434] <210> 269
[4435] <211> 23
[4436] <212> DNA
[4437] <213> Artificial sequence
[4438] <220>
[4439] <223> Single strand oligonucleotide
[4440] <400> 269
[4441] ggaggcaggc aagtcacct tgg 23
[4442] <210> 270
[4443] <211> 23
[4444] <212> DNA
[4445] <213> Artificial sequence
[4446] <220>
[4447] <223> Single strand oligonucleotide
[4448] <400> 270
[4449] aaggtgtgag ttgagcaaga tgg 23
[4450] <210> 271
[4451] <211> 23

[4452] <212> DNA
[4453] <213> Artificial sequence
[4454] <220>
[4455] <223> Single strand oligonucleotide
[4456] <400> 271
[4457] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4458] <210> 272
[4459] <211> 23
[4460] <212> DNA
[4461] <213> Artificial sequence
[4462] <220>
[4463] <223> Single strand oligonucleotide
[4464] <400> 272
[4465] cctcaagcac atggtaacc agg 23
[4466] <210> 273
[4467] <211> 23
[4468] <212> DNA
[4469] <213> Artificial sequence
[4470] <220>
[4471] <223> Single strand oligonucleotide
[4472] <400> 273
[4473] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4474] <210> 274
[4475] <211> 23
[4476] <212> DNA
[4477] <213> Artificial sequence
[4478] <220>
[4479] <223> Single strand oligonucleotide
[4480] <400> 274
[4481] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4482] <210> 275
[4483] <211> 23
[4484] <212> DNA
[4485] <213> Artificial sequence
[4486] <220>
[4487] <223> Single strand oligonucleotide
[4488] <400> 275
[4489] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4490] <210> 276
[4491] <211> 23
[4492] <212> DNA
[4493] <213> Artificial sequence

[4494]	<220>
[4495]	<223> Single strand oligonucleotide
[4496]	<400> 276
[4497]	cctccattcc gcgcgaaaac cgg 23
[4498]	<210> 277
[4499]	<211> 23
[4500]	<212> DNA
[4501]	<213> Artificial sequence
[4502]	<220>
[4503]	<223> Single strand oligonucleotide
[4504]	<400> 277
[4505]	tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4506]	<210> 278
[4507]	<211> 23
[4508]	<212> DNA
[4509]	<213> Artificial sequence
[4510]	<220>
[4511]	<223> Single strand oligonucleotide
[4512]	<400> 278
[4513]	tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4514]	<210> 279
[4515]	<211> 23
[4516]	<212> DNA
[4517]	<213> Artificial sequence
[4518]	<220>
[4519]	<223> Single strand oligonucleotide
[4520]	<400> 279
[4521]	tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4522]	<210> 280
[4523]	<211> 23
[4524]	<212> DNA
[4525]	<213> Artificial sequence
[4526]	<220>
[4527]	<223> Single strand oligonucleotide
[4528]	<400> 280
[4529]	gaagctctca aaagagctta tgg 23
[4530]	<210> 281
[4531]	<211> 23
[4532]	<212> DNA
[4533]	<213> Artificial sequence
[4534]	<220>
[4535]	<223> Single strand oligonucleotide

[4536] <400> 281
[4537] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4538] <210> 282
[4539] <211> 23
[4540] <212> DNA
[4541] <213> Artificial sequence
[4542] <220>
[4543] <223> Single strand oligonucleotide
[4544] <400> 282
[4545] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4546] <210> 283
[4547] <211> 23
[4548] <212> DNA
[4549] <213> Artificial sequence
[4550] <220>
[4551] <223> Single strand oligonucleotide
[4552] <400> 283
[4553] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4554] <210> 284
[4555] <211> 23
[4556] <212> DNA
[4557] <213> Artificial sequence
[4558] <220>
[4559] <223> Single strand oligonucleotide
[4560] <400> 284
[4561] gaggtttatc gatcgattca tgg 23
[4562] <210> 285
[4563] <211> 23
[4564] <212> DNA
[4565] <213> Artificial sequence
[4566] <220>
[4567] <223> Single strand oligonucleotide
[4568] <400> 285
[4569] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23
[4570] <210> 286
[4571] <211> 23
[4572] <212> DNA
[4573] <213> Artificial sequence
[4574] <220>
[4575] <223> Single strand oligonucleotide
[4576] <400> 286
[4577] tgtgatttac cagatcatgc tgg 23

[4578] <210> 287
[4579] <211> 23
[4580] <212> DNA
[4581] <213> Artificial sequence
[4582] <220>
[4583] <223> Single strand oligonucleotide
[4584] <400> 287
[4585] agcaatccga ctctcaatac agg 23
[4586] <210> 288
[4587] <211> 23
[4588] <212> DNA
[4589] <213> Artificial sequence
[4590] <220>
[4591] <223> Single strand oligonucleotide
[4592] <400> 288
[4593] gcacgacttg ctgacgtgga agg 23
[4594] <210> 289
[4595] <211> 23
[4596] <212> DNA
[4597] <213> Artificial sequence
[4598] <220>
[4599] <223> Single strand oligonucleotide
[4600] <400> 289
[4601] ggacaactaa gtgaagaaag agg 23
[4602] <210> 290
[4603] <211> 23
[4604] <212> DNA
[4605] <213> Artificial sequence
[4606] <220>
[4607] <223> Single strand oligonucleotide
[4608] <400> 290
[4609] ggtctcggat cttcaaacgg tgg 23
[4610] <210> 291
[4611] <211> 23
[4612] <212> DNA
[4613] <213> Artificial sequence
[4614] <220>
[4615] <223> Single strand oligonucleotide
[4616] <400> 291
[4617] agcaatccga ctctcaatac agg 23
[4618] <210> 292
[4619] <211> 23

[4620] <212> DNA
[4621] <213> Artificial sequence
[4622] <220>
[4623] <223> Single strand oligonucleotide
[4624] <400> 292
[4625] aagatagaga gcacagatga tgg 23
[4626] <210> 293
[4627] <211> 23
[4628] <212> DNA
[4629] <213> Artificial sequence
[4630] <220>
[4631] <223> Single strand oligonucleotide
[4632] <400> 293
[4633] accggaccct ctaacagtgg agg 23
[4634] <210> 294
[4635] <211> 23
[4636] <212> DNA
[4637] <213> Artificial sequence
[4638] <220>
[4639] <223> Single strand oligonucleotide
[4640] <400> 294
[4641] agcaatccga ctctcaatac agg 23
[4642] <210> 295
[4643] <211> 23
[4644] <212> DNA
[4645] <213> Artificial sequence
[4646] <220>
[4647] <223> Single strand oligonucleotide
[4648] <400> 295
[4649] agcaatccga ctctcaatac agg 23
[4650] <210> 296
[4651] <211> 23
[4652] <212> DNA
[4653] <213> Artificial sequence
[4654] <220>
[4655] <223> Single strand oligonucleotide
[4656] <400> 296
[4657] aagatagaga gcacagatga tgg 23
[4658] <210> 297
[4659] <211> 23
[4660] <212> DNA
[4661] <213> Artificial sequence

[4662] <220>
[4663] <223> Single strand oligonucleotide
[4664] <400> 297
[4665] caacattcta gccctacttc tgg 23
[4666] <210> 298
[4667] <211> 23
[4668] <212> DNA
[4669] <213> Artificial sequence
[4670] <220>
[4671] <223> Single strand oligonucleotide
[4672] <400> 298
[4673] ggtctcggat cttcaaacgg tgg 23
[4674] <210> 299
[4675] <211> 23
[4676] <212> DNA
[4677] <213> Artificial sequence
[4678] <220>
[4679] <223> Single strand oligonucleotide
[4680] <400> 299
[4681] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[4682] <210> 300
[4683] <211> 23
[4684] <212> DNA
[4685] <213> Artificial sequence
[4686] <220>
[4687] <223> Single strand oligonucleotide
[4688] <400> 300
[4689] gacagaagag agtgagcaca cgg 23
[4690] <210> 301
[4691] <211> 23
[4692] <212> DNA
[4693] <213> Artificial sequence
[4694] <220>
[4695] <223> Single strand oligonucleotide
[4696] <400> 301
[4697] catggattgg gctacatgag tgg 23
[4698] <210> 302
[4699] <211> 23
[4700] <212> DNA
[4701] <213> Artificial sequence
[4702] <220>
[4703] <223> Single strand oligonucleotide

[4704] <400> 302
[4705] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[4706] <210> 303
[4707] <211> 23
[4708] <212> DNA
[4709] <213> Artificial sequence
[4710] <220>
[4711] <223> Single strand oligonucleotide
[4712] <400> 303
[4713] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[4714] <210> 304
[4715] <211> 23
[4716] <212> DNA
[4717] <213> Artificial sequence
[4718] <220>
[4719] <223> Single strand oligonucleotide
[4720] <400> 304
[4721] agtttgttgc tctagatgag tgg 23
[4722] <210> 305
[4723] <211> 23
[4724] <212> DNA
[4725] <213> Artificial sequence
[4726] <220>
[4727] <223> Single strand oligonucleotide
[4728] <400> 305
[4729] aaagaggagc gagcacgcgg cgg 23
[4730] <210> 306
[4731] <211> 23
[4732] <212> DNA
[4733] <213> Artificial sequence
[4734] <220>
[4735] <223> Single strand oligonucleotide
[4736] <400> 306
[4737] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[4738] <210> 307
[4739] <211> 23
[4740] <212> DNA
[4741] <213> Artificial sequence
[4742] <220>
[4743] <223> Single strand oligonucleotide
[4744] <400> 307
[4745] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23

[4746] <210> 308
[4747] <211> 23
[4748] <212> DNA
[4749] <213> Artificial sequence
[4750] <220>
[4751] <223> Single strand oligonucleotide
[4752] <400> 308
[4753] tgagagatgc tgacagaaag agg 23
[4754] <210> 309
[4755] <211> 23
[4756] <212> DNA
[4757] <213> Artificial sequence
[4758] <220>
[4759] <223> Single strand oligonucleotide
[4760] <400> 309
[4761] catggattgg gctacatgag tgg 23
[4762] <210> 310
[4763] <211> 23
[4764] <212> DNA
[4765] <213> Artificial sequence
[4766] <220>
[4767] <223> Single strand oligonucleotide
[4768] <400> 310
[4769] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[4770] <210> 311
[4771] <211> 23
[4772] <212> DNA
[4773] <213> Artificial sequence
[4774] <220>
[4775] <223> Single strand oligonucleotide
[4776] <400> 311
[4777] ttatctgtgc ttggactgaa ggg 23
[4778] <210> 312
[4779] <211> 23
[4780] <212> DNA
[4781] <213> Artificial sequence
[4782] <220>
[4783] <223> Single strand oligonucleotide
[4784] <400> 312
[4785] gatagagagc acgaataatg agg 23
[4786] <210> 313
[4787] <211> 23

[4788] <212> DNA
[4789] <213> Artificial sequence
[4790] <220>
[4791] <223> Single strand oligonucleotide
[4792] <400> 313
[4793] aagccttgct gaagtgttg ggg 23
[4794] <210> 314
[4795] <211> 23
[4796] <212> DNA
[4797] <213> Artificial sequence
[4798] <220>
[4799] <223> Single strand oligonucleotide
[4800] <400> 314
[4801] ttatctgtgc ttgactgaa ggg 23
[4802] <210> 315
[4803] <211> 23
[4804] <212> DNA
[4805] <213> Artificial sequence
[4806] <220>
[4807] <223> Single strand oligonucleotide
[4808] <400> 315
[4809] ttatctgtgc ttgactgaa ggg 23
[4810] <210> 316
[4811] <211> 23
[4812] <212> DNA
[4813] <213> Artificial sequence
[4814] <220>
[4815] <223> Single strand oligonucleotide
[4816] <400> 316
[4817] ctacgcagga gagatgatgc tgg 23
[4818] <210> 317
[4819] <211> 23
[4820] <212> DNA
[4821] <213> Artificial sequence
[4822] <220>
[4823] <223> Single strand oligonucleotide
[4824] <400> 317
[4825] agctcccttc agtccaagca agg 23
[4826] <210> 318
[4827] <211> 23
[4828] <212> DNA
[4829] <213> Artificial sequence

[4830] <220>
[4831] <223> Single strand oligonucleotide
[4832] <400> 318
[4833] ttatctgtgc ttgactgaa ggg 23
[4834] <210> 319
[4835] <211> 23
[4836] <212> DNA
[4837] <213> Artificial sequence
[4838] <220>
[4839] <223> Single strand oligonucleotide
[4840] <400> 319
[4841] ttatctgtgc ttgactgaa ggg 23
[4842] <210> 320
[4843] <211> 23
[4844] <212> DNA
[4845] <213> Artificial sequence
[4846] <220>
[4847] <223> Single strand oligonucleotide
[4848] <400> 320
[4849] gatagagagc acgaataatg agg 23
[4850] <210> 321
[4851] <211> 23
[4852] <212> DNA
[4853] <213> Artificial sequence
[4854] <220>
[4855] <223> Single strand oligonucleotide
[4856] <400> 321
[4857] aagccttgct gaagtgttg ggg 23
[4858] <210> 322
[4859] <211> 23
[4860] <212> DNA
[4861] <213> Artificial sequence
[4862] <220>
[4863] <223> Single strand oligonucleotide
[4864] <400> 322
[4865] ttatctgtgc ttgactgaa ggg 23
[4866] <210> 323
[4867] <211> 23
[4868] <212> DNA
[4869] <213> Artificial sequence
[4870] <220>
[4871] <223> Single strand oligonucleotide

[4872] <400> 323
[4873] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4874] <210> 324
[4875] <211> 23
[4876] <212> DNA
[4877] <213> Artificial sequence
[4878] <220>
[4879] <223> Single strand oligonucleotide
[4880] <400> 324
[4881] acaccctgga ttattcgaaa agg 23
[4882] <210> 325
[4883] <211> 23
[4884] <212> DNA
[4885] <213> Artificial sequence
[4886] <220>
[4887] <223> Single strand oligonucleotide
[4888] <400> 325
[4889] gatatgggca tgggcggtgt agg 23
[4890] <210> 326
[4891] <211> 23
[4892] <212> DNA
[4893] <213> Artificial sequence
[4894] <220>
[4895] <223> Single strand oligonucleotide
[4896] <400> 326
[4897] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4898] <210> 327
[4899] <211> 23
[4900] <212> DNA
[4901] <213> Artificial sequence
[4902] <220>
[4903] <223> Single strand oligonucleotide
[4904] <400> 327
[4905] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4906] <210> 328
[4907] <211> 23
[4908] <212> DNA
[4909] <213> Artificial sequence
[4910] <220>
[4911] <223> Single strand oligonucleotide
[4912] <400> 328
[4913] acaccctgga ttattcgaaa agg 23

[4914] <210> 329
[4915] <211> 23
[4916] <212> DNA
[4917] <213> Artificial sequence
[4918] <220>
[4919] <223> Single strand oligonucleotide
[4920] <400> 329
[4921] gatatgggca tgggcggtgt agg 23
[4922] <210> 330
[4923] <211> 23
[4924] <212> DNA
[4925] <213> Artificial sequence
[4926] <220>
[4927] <223> Single strand oligonucleotide
[4928] <400> 330
[4929] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4930] <210> 331
[4931] <211> 23
[4932] <212> DNA
[4933] <213> Artificial sequence
[4934] <220>
[4935] <223> Single strand oligonucleotide
[4936] <400> 331
[4937] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4938] <210> 332
[4939] <211> 23
[4940] <212> DNA
[4941] <213> Artificial sequence
[4942] <220>
[4943] <223> Single strand oligonucleotide
[4944] <400> 332
[4945] cgcaccgggc ttgcctagaa cgg 23
[4946] <210> 333
[4947] <211> 23
[4948] <212> DNA
[4949] <213> Artificial sequence
[4950] <220>
[4951] <223> Single strand oligonucleotide
[4952] <400> 333
[4953] gagagacgga attgagaaga ggg 23
[4954] <210> 334
[4955] <211> 23

[4956] <212> DNA
[4957] <213> Artificial sequence
[4958] <220>
[4959] <223> Single strand oligonucleotide
[4960] <400> 334
[4961] ggaaggaga atatccagga tgg 23
[4962] <210> 335
[4963] <211> 23
[4964] <212> DNA
[4965] <213> Artificial sequence
[4966] <220>
[4967] <223> Single strand oligonucleotide
[4968] <400> 335
[4969] gaggctatgt gctgcagcca agg 23
[4970] <210> 336
[4971] <211> 23
[4972] <212> DNA
[4973] <213> Artificial sequence
[4974] <220>
[4975] <223> Single strand oligonucleotide
[4976] <400> 336
[4977] gaaggaagtt tagatcatgc tgg 23
[4978] <210> 337
[4979] <211> 23
[4980] <212> DNA
[4981] <213> Artificial sequence
[4982] <220>
[4983] <223> Single strand oligonucleotide
[4984] <400> 337
[4985] ctgccagcat gatctatctt tgg 23
[4986] <210> 338
[4987] <211> 23
[4988] <212> DNA
[4989] <213> Artificial sequence
[4990] <220>
[4991] <223> Single strand oligonucleotide
[4992] <400> 338
[4993] gaggctatgt gctgcagcca agg 23
[4994] <210> 339
[4995] <211> 23
[4996] <212> DNA
[4997] <213> Artificial sequence

[4998]	<220>
[4999]	<223> Single strand oligonucleotide
[5000]	<400> 339
[5001]	ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5002]	<210> 340
[5003]	<211> 23
[5004]	<212> DNA
[5005]	<213> Artificial sequence
[5006]	<220>
[5007]	<223> Single strand oligonucleotide
[5008]	<400> 340
[5009]	taaaccatgc tggagaagca ggg 23
[5010]	<210> 341
[5011]	<211> 23
[5012]	<212> DNA
[5013]	<213> Artificial sequence
[5014]	<220>
[5015]	<223> Single strand oligonucleotide
[5016]	<400> 341
[5017]	ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5018]	<210> 342
[5019]	<211> 23
[5020]	<212> DNA
[5021]	<213> Artificial sequence
[5022]	<220>
[5023]	<223> Single strand oligonucleotide
[5024]	<400> 342
[5025]	ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5026]	<210> 343
[5027]	<211> 23
[5028]	<212> DNA
[5029]	<213> Artificial sequence
[5030]	<220>
[5031]	<223> Single strand oligonucleotide
[5032]	<400> 343
[5033]	ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5034]	<210> 344
[5035]	<211> 23
[5036]	<212> DNA
[5037]	<213> Artificial sequence
[5038]	<220>
[5039]	<223> Single strand oligonucleotide

[5040] <400> 344
[5041] tagggaagtt gagatcatgc tgg 23
[5042] <210> 345
[5043] <211> 23
[5044] <212> DNA
[5045] <213> Artificial sequence
[5046] <220>
[5047] <223> Single strand oligonucleotide
[5048] <400> 345
[5049] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5050] <210> 346
[5051] <211> 23
[5052] <212> DNA
[5053] <213> Artificial sequence
[5054] <220>
[5055] <223> Single strand oligonucleotide
[5056] <400> 346
[5057] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5058] <210> 347
[5059] <211> 23
[5060] <212> DNA
[5061] <213> Artificial sequence
[5062] <220>
[5063] <223> Single strand oligonucleotide
[5064] <400> 347
[5065] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5066] <210> 348
[5067] <211> 23
[5068] <212> DNA
[5069] <213> Artificial sequence
[5070] <220>
[5071] <223> Single strand oligonucleotide
[5072] <400> 348
[5073] aatctgaatg atctcggacc agg 23
[5074] <210> 349
[5075] <211> 23
[5076] <212> DNA
[5077] <213> Artificial sequence
[5078] <220>
[5079] <223> Single strand oligonucleotide
[5080] <400> 349
[5081] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23

[5082] <210> 350
[5083] <211> 23
[5084] <212> DNA
[5085] <213> Artificial sequence
[5086] <220>
[5087] <223> Single strand oligonucleotide
[5088] <400> 350
[5089] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5090] <210> 351
[5091] <211> 23
[5092] <212> DNA
[5093] <213> Artificial sequence
[5094] <220>
[5095] <223> Single strand oligonucleotide
[5096] <400> 351
[5097] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5098] <210> 352
[5099] <211> 23
[5100] <212> DNA
[5101] <213> Artificial sequence
[5102] <220>
[5103] <223> Single strand oligonucleotide
[5104] <400> 352
[5105] ataagtgaag gtgtcggacc agg 23
[5106] <210> 353
[5107] <211> 23
[5108] <212> DNA
[5109] <213> Artificial sequence
[5110] <220>
[5111] <223> Single strand oligonucleotide
[5112] <400> 353
[5113] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5114] <210> 354
[5115] <211> 23
[5116] <212> DNA
[5117] <213> Artificial sequence
[5118] <220>
[5119] <223> Single strand oligonucleotide
[5120] <400> 354
[5121] ttgaagctgc cagcatgatac tgg 23
[5122] <210> 355
[5123] <211> 23

[5124] <212> DNA
[5125] <213> Artificial sequence
[5126] <220>
[5127] <223> Single strand oligonucleotide
[5128] <400> 355
[5129] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5130] <210> 356
[5131] <211> 23
[5132] <212> DNA
[5133] <213> Artificial sequence
[5134] <220>
[5135] <223> Single strand oligonucleotide
[5136] <400> 356
[5137] agggttgcct ataagatgga tgg 23
[5138] <210> 357
[5139] <211> 23
[5140] <212> DNA
[5141] <213> Artificial sequence
[5142] <220>
[5143] <223> Single strand oligonucleotide
[5144] <400> 357
[5145] agaagagagt gagcacgcat cgg 23
[5146] <210> 358
[5147] <211> 23
[5148] <212> DNA
[5149] <213> Artificial sequence
[5150] <220>
[5151] <223> Single strand oligonucleotide
[5152] <400> 358
[5153] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5154] <210> 359
[5155] <211> 23
[5156] <212> DNA
[5157] <213> Artificial sequence
[5158] <220>
[5159] <223> Single strand oligonucleotide
[5160] <400> 359
[5161] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5162] <210> 360
[5163] <211> 23
[5164] <212> DNA
[5165] <213> Artificial sequence

[5166]	<220>
[5167]	<223> Single strand oligonucleotide
[5168]	<400> 360
[5169]	cagccgtggc tcgttcggac cgg 23
[5170]	<210> 361
[5171]	<211> 23
[5172]	<212> DNA
[5173]	<213> Artificial sequence
[5174]	<220>
[5175]	<223> Single strand oligonucleotide
[5176]	<400> 361
[5177]	agaaggttgt gatattggca cgg 23
[5178]	<210> 362
[5179]	<211> 23
[5180]	<212> DNA
[5181]	<213> Artificial sequence
[5182]	<220>
[5183]	<223> Single strand oligonucleotide
[5184]	<400> 362
[5185]	aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5186]	<210> 363
[5187]	<211> 23
[5188]	<212> DNA
[5189]	<213> Artificial sequence
[5190]	<220>
[5191]	<223> Single strand oligonucleotide
[5192]	<400> 363
[5193]	aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5194]	<210> 364
[5195]	<211> 23
[5196]	<212> DNA
[5197]	<213> Artificial sequence
[5198]	<220>
[5199]	<223> Single strand oligonucleotide
[5200]	<400> 364
[5201]	gctggggatg tgaatcttga tgg 23
[5202]	<210> 365
[5203]	<211> 23
[5204]	<212> DNA
[5205]	<213> Artificial sequence
[5206]	<220>
[5207]	<223> Single strand oligonucleotide

[5208] <400> 365
[5209] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5210] <210> 366
[5211] <211> 23
[5212] <212> DNA
[5213] <213> Artificial sequence
[5214] <220>
[5215] <223> Single strand oligonucleotide
[5216] <400> 366
[5217] aggggaatgt tgtctggctc ggg 23
[5218] <210> 367
[5219] <211> 22
[5220] <212> DNA
[5221] <213> Artificial sequence
[5222] <220>
[5223] <223> Single strand oligonucleotide
[5224] <400> 367
[5225] gttgagagtg ttggagaagg ag 22
[5226] <210> 368
[5227] <211> 21
[5228] <212> DNA
[5229] <213> Artificial sequence
[5230] <220>
[5231] <223> Single strand oligonucleotide
[5232] <400> 368
[5233] ctcggtgttg atcctgagaa g 21
[5234] <210> 369
[5235] <211> 20
[5236] <212> DNA
[5237] <213> Artificial sequence
[5238] <220>
[5239] <223> Single strand oligonucleotide
[5240] <400> 369
[5241] gtactgctgg tcctttgcag 20
[5242] <210> 370
[5243] <211> 20
[5244] <212> DNA
[5245] <213> Artificial sequence
[5246] <220>
[5247] <223> Single strand oligonucleotide
[5248] <400> 370
[5249] aggagcacta cggaaggatg 20

[5250]	<210> 371
[5251]	<211> 19
[5252]	<212> DNA
[5253]	<213> Artificial sequence
[5254]	<220>
[5255]	<223> Single strand oligonucleotide
[5256]	<400> 371
[5257]	acaccctggg aattggttt 19
[5258]	<210> 372
[5259]	<211> 20
[5260]	<212> DNA
[5261]	<213> Artificial sequence
[5262]	<220>
[5263]	<223> Single strand oligonucleotide
[5264]	<400> 372
[5265]	gtatgcgcca ataagaccac 20
[5266]	<210> 373
[5267]	<211> 95
[5268]	<212> DNA
[5269]	<213> Artificial sequence
[5270]	<220>
[5271]	<223> Single strand oligonucleotide
[5272]	<400> 373
[5273]	accagaagcg aacatctctt tttagtgtg ttttgttacg acaaagtaga gcttttgtag 60
[5274]	gcattggggtt gctttagttt cttctcctgc ccttc 95
[5275]	<210> 374
[5276]	<211> 22
[5277]	<212> DNA
[5278]	<213> Artificial sequence
[5279]	<220>
[5280]	<223> Single strand oligonucleotide
[5281]	<400> 374
[5282]	ttcgettgc gagagaaatc ac 22
[5283]	<210> 375
[5284]	<211> 95
[5285]	<212> DNA
[5286]	<213> Artificial sequence
[5287]	<220>
[5288]	<223> Single strand oligonucleotide
[5289]	<400> 375
[5290]	aacttcttca gcacgacgaa gtacaccagc cccatcgccg acttcgtgac gtgcggcatc 60
[5291]	cagtcccacc agtgetccca cccgtcccg tgecc 95

[5292] <210> 376
[5293] <211> 21
[5294] <212> DNA
[5295] <213> Artificial sequence
[5296] <220>
[5297] <223> Single strand oligonucleotide
[5298] <400> 376
[5299] aagtcgtgct gcttcatgtg g 21
[5300] <210> 377
[5301] <211> 95
[5302] <212> DNA
[5303] <213> Artificial sequence
[5304] <220>
[5305] <223> Single strand oligonucleotide
[5306] <400> 377
[5307] acaacatcaa catgaggteg aacacgggt cctacaacgg caggaggaac ttcagctacg 60
[5308] ggaagtcgag ctacgccaag tgggtcccaca gcggg 95
[5309] <210> 378
[5310] <211> 21
[5311] <212> DNA
[5312] <213> Artificial sequence
[5313] <220>
[5314] <223> Single strand oligonucleotide
[5315] <400> 378
[5316] agttgtactc cagcttgtgc c 21
[5317] <210> 379
[5318] <211> 95
[5319] <212> DNA
[5320] <213> Artificial sequence
[5321] <220>
[5322] <223> Single strand oligonucleotide
[5323] <400> 379
[5324] aaccttatag gtgtgtttga tggacgttc ctggctgtca tgaggaggag gaacaagaac 60
[5325] agaattcgcg aactcttcac ccttgggatt tcgat 95
[5326] <210> 380
[5327] <211> 21
[5328] <212> DNA
[5329] <213> Artificial sequence
[5330] <220>
[5331] <223> Single strand oligonucleotide
[5332] <400> 380
[5333] tatccacaca aactacctgc a 21

- [5334] <210> 381
[5335] <211> 95
[5336] <212> DNA
[5337] <213> Artificial sequence
[5338] <220>
[5339] <223> Single strand oligonucleotide
[5340] <400> 381
[5341] acgtcaactg ttaggtcggg taggtcgtgg tcgttaatgt tgaaagtttc cgaatcgtcc 60
[5342] tgctcctcgt gatgccttcc tacgtctatt tgatc 95
[5343] <210> 382
[5344] <211> 21
[5345] <212> DNA
[5346] <213> Artificial sequence
[5347] <220>
[5348] <223> Single strand oligonucleotide
[5349] <400> 382
[5350] tgacaatcca gccaatccag c 21
[5351] <210> 383
[5352] <211> 94
[5353] <212> DNA
[5354] <213> Artificial sequence
[5355] <220>
[5356] <223> Single strand oligonucleotide
[5357] <400> 383
[5358] gaggccatth ctagccgttg tgtactagag gaccgacttc tagtcagtga ggaagaggtt 60
[5359] gtgagagttg ttagggaggt cgaagtaccg gctt 94
[5360] <210> 384
[5361] <211> 21
[5362] <212> DNA
[5363] <213> Artificial sequence
[5364] <220>
[5365] <223> Single strand oligonucleotide
[5366] <400> 384
[5367] taaagatcgg caacacatga t 21
[5368] <210> 385
[5369] <211> 94
[5370] <212> DNA
[5371] <213> Artificial sequence
[5372] <220>
[5373] <223> Single strand oligonucleotide
[5374] <400> 385
[5375] tgtgaaactg gaaagaaccc aaatcgggtg aagtttcaac gaggattggg tcactctgtt 60

- [5376] ggtgttgact gttatgtctg gaacagttct cctc 94
[5377] <210> 386
[5378] <211> 21
[5379] <212> DNA
[5380] <213> Artificial sequence
[5381] <220>
[5382] <223> Single strand oligonucleotide
[5383] <400> 386
[5384] tgacctttct tgggttttagc c 21
[5385] <210> 387
[5386] <211> 87
[5387] <212> DNA
[5388] <213> Artificial sequence
[5389] <220>
[5390] <223> Single strand oligonucleotide
[5391] <400> 387
[5392] ctgattttcg agtctatcct attgtggcga aatagtaact ttgaccttac ggcttctttt 60
[5393] tgagttacag agtcgtgtcg cctaggt 87
[5394] <210> 388
[5395] <211> 21
[5396] <212> DNA
[5397] <213> Artificial sequence
[5398] <220>
[5399] <223> Single strand oligonucleotide
[5400] <400> 388
[5401] aagctcagga gggatagcgc c 21
[5402] <210> 389
[5403] <211> 87
[5404] <212> DNA
[5405] <213> Artificial sequence
[5406] <220>
[5407] <223> Single strand oligonucleotide
[5408] <400> 389
[5409] aactttctca gcacgacgaa gtacaccagc cccatcgccg acttcgtgac gtgcggcatc 60
[5410] cagtcccacc agtgctccca cccggtc 87
[5411] <210> 390
[5412] <211> 21
[5413] <212> DNA
[5414] <213> Artificial sequence
[5415] <220>
[5416] <223> Single strand oligonucleotide
[5417] <400> 390

[5418] aagtcgtgct gcttcatgtg g 21
[5419] <210> 391
[5420] <211> 87
[5421] <212> DNA
[5422] <213> Artificial sequence
[5423] <220>
[5424] <223> Single strand oligonucleotide
[5425] <400> 391
[5426] acaacatcaa catgaggtcg aacacggggt cctacaacgg caggaggaaac ttcagctacg 60
[5427] ggaagtcgag ctacgccaag tgggtccc 87
[5428] <210> 392
[5429] <211> 21
[5430] <212> DNA
[5431] <213> Artificial sequence
[5432] <220>
[5433] <223> Single strand oligonucleotide
[5434] <400> 392
[5435] agttgtactc cagcttgtgc c 21
[5436] <210> 393
[5437] <211> 87
[5438] <212> DNA
[5439] <213> Artificial sequence
[5440] <220>
[5441] <223> Single strand oligonucleotide
[5442] <400> 393
[5443] aaccttatag gtgtgtttga tggacgtttc ctggtcgtca tgaggaggag gaacaagaac 60
[5444] agaattcgcg aactcttcac ccttggg 87
[5445] <210> 394
[5446] <211> 21
[5447] <212> DNA
[5448] <213> Artificial sequence
[5449] <220>
[5450] <223> Single strand oligonucleotide
[5451] <400> 394
[5452] tatccacaca aactacctgc a 21
[5453] <210> 395
[5454] <211> 87
[5455] <212> DNA
[5456] <213> Artificial sequence
[5457] <220>
[5458] <223> Single strand oligonucleotide
[5459] <400> 395

- [5460] acgtcaactg ttaggtcggg taggtcgtgg tcgttaatgt tgaaagtttc cgaatcggtcc 60
- [5461] tgctcctcgt gatgccttcc tacgtct 87
- [5462] <210> 396
- [5463] <211> 21
- [5464] <212> DNA
- [5465] <213> Artificial sequence
- [5466] <220>
- [5467] <223> Single strand oligonucleotide
- [5468] <400> 396
- [5469] tgacaatcca gccaatccag c 21
- [5470] <210> 397
- [5471] <211> 87
- [5472] <212> DNA
- [5473] <213> Artificial sequence
- [5474] <220>
- [5475] <223> Single strand oligonucleotide
- [5476] <400> 397
- [5477] gaggccattt ctagccgttg tgtactagag gaccgacttc tagtcagtga ggaagagggt 60
- [5478] gtgagagttg ttagggaggt cgaagta 87
- [5479] <210> 398
- [5480] <211> 21
- [5481] <212> DNA
- [5482] <213> Artificial sequence
- [5483] <220>
- [5484] <223> Single strand oligonucleotide
- [5485] <400> 398
- [5486] taaagatcgg caacacatga t 21
- [5487] <210> 399
- [5488] <211> 89
- [5489] <212> DNA
- [5490] <213> Artificial sequence
- [5491] <220>
- [5492] <223> Single strand oligonucleotide
- [5493] <400> 399
- [5494] tgtgaaactg gaaagaaccc aaatcgggtg aagtttcaac gaggattggg tcattctgttt 60
- [5495] ggtgttgact gttatgtctg gaacagttc 89
- [5496] <210> 400
- [5497] <211> 21
- [5498] <212> DNA
- [5499] <213> Artificial sequence
- [5500] <220>
- [5501] <223> Single strand oligonucleotide

[5502] <400> 400
 [5503] tgacctttct tgggttttagc c 21
 [5504] <210> 401
 [5505] <211> 416
 [5506] <212> DNA
 [5507] <213> Artificial sequence
 [5508] <220>
 [5509] <223> Single strand oligonucleotide
 [5510] <400> 401
 [5511] aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat 60
 [5512] gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct 120
 [5513] tcattgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt 180
 [5514] tctgtcctat tgaattattc tattctcttg tccatgttcg acccatccct ttcaaagtat 240
 [5515] ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg 300
 [5516] tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tctgagcta 360
 [5517] atgtttgcat cttcttgttg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa 416
 [5518] <210> 402
 [5519] <211> 416
 [5520] <212> DNA
 [5521] <213> Artificial sequence
 [5522] <220>
 [5523] <223> Single strand oligonucleotide
 [5524] <400> 402
 [5525] aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat 60
 [5526] gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct 120
 [5527] tcattgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt 180
 [5528] tctgtcctat tgaattattc tattggtcac ttgaccgcca tgacatccct ttcaaagtat 240
 [5529] ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg 300
 [5530] tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tctgagcta 360
 [5531] atgtttgcat cttcttgttg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa 416
 [5532] <210> 403
 [5533] <211> 416
 [5534] <212> DNA
 [5535] <213> Artificial sequence
 [5536] <220>
 [5537] <223> Single strand oligonucleotide
 [5538] <400> 403
 [5539] aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat 60
 [5540] gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct 120
 [5541] tcattgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt 180
 [5542] tctgtcctat tgaattattc tattttcttg acctgtgaag acccatccct ttcaaagtat 240
 [5543] ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg 300

- [5544] tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tctgagcta 360
[5545] atgtttgcat cttcttggtg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa 416
[5546] <210> 404
[5547] <211> 107
[5548] <212> DNA
[5549] <213> Artificial sequence
[5550] <220>
[5551] <223> Single strand oligonucleotide
[5552] <400> 404
[5553] gtagagaaga atctgtaaag ctcaggaggg atagcgccat gatgatcaca ttcgttatct 60
[5554] attttttggc gctatccatc ctgagtttca ttgctcttc ttactac 107
[5555] <210> 405
[5556] <211> 107
[5557] <212> DNA
[5558] <213> Artificial sequence
[5559] <220>
[5560] <223> Single strand oligonucleotide
[5561] <400> 405
[5562] gtagagaaga atctgtaaag tcgtgctgct tcatgtggat gatgatcaca ttcgttatct 60
[5563] attttttcca catgaagaag cagacttga ttgctcttc ttactac 107
[5564] <210> 406
[5565] <211> 107
[5566] <212> DNA
[5567] <213> Artificial sequence
[5568] <220>
[5569] <223> Single strand oligonucleotide
[5570] <400> 406
[5571] gtagagaaga atctgtaagt tgtactccag cttgtgccat gatgatcaca ttcgttatct 60
[5572] attttttggc acaagcttga gtacaaactga ttgctcttc ttactac 107
[5573] <210> 407
[5574] <211> 107
[5575] <212> DNA
[5576] <213> Artificial sequence
[5577] <220>
[5578] <223> Single strand oligonucleotide
[5579] <400> 407
[5580] gtagagaaga atctgtatat ccacacaaac tacctgcaat gatgatcaca ttcgttatct 60
[5581] attttttggc aggtagtgtg tgtggataga ttgctcttc ttactac 107
[5582] <210> 408
[5583] <211> 107
[5584] <212> DNA
[5585] <213> Artificial sequence

- [5586] <220>
[5587] <223> Single strand oligonucleotide
[5588] <400> 408
[5589] gtagagaaga atctgtatga caatccagcc aatccagcat gatgatacaca ttcgttatct 60
[5590] attttttgct ggattggatg gattgtcaga ttggctcttc ttactac 107
[5591] <210> 409
[5592] <211> 107
[5593] <212> DNA
[5594] <213> Artificial sequence
[5595] <220>
[5596] <223> Single strand oligonucleotide
[5597] <400> 409
[5598] gtagagaaga atctgtataa agatcggcaa cacatgatat gatgatacaca ttcgttatct 60
[5599] attttttate atgtgttacc gatctttaca ttggctcttc ttactac 107
[5600] <210> 410
[5601] <211> 107
[5602] <212> DNA
[5603] <213> Artificial sequence
[5604] <220>
[5605] <223> Single strand oligonucleotide
[5606] <400> 410
[5607] gtagagaaga atctgtatga cttttcttgg gtttagccat gatgatacaca ttcgttatct 60
[5608] attttttggc taaaccccag aaaggtcaca ttggctcttc ttactac 107
[5609] <210> 411
[5610] <211> 102
[5611] <212> DNA
[5612] <213> Artificial sequence
[5613] <220>
[5614] <223> Single strand oligonucleotide
[5615] <400> 411
[5616] taagtacttt cgcttgcaga gagaaatcac agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5617] gtctctttcc tctgtgattc tctgtgtaag cgaaagagct tg 102
[5618] <210> 412
[5619] <211> 102
[5620] <212> DNA
[5621] <213> Artificial sequence
[5622] <220>
[5623] <223> Single strand oligonucleotide
[5624] <400> 412
[5625] taagtactta agtcgtgctg cttcatgtgg agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5626] gtctctttcc tctccacata agcaggacga gttaagagct tg 102
[5627] <210> 413

- [5628] <211> 102
[5629] <212> DNA
[5630] <213> Artificial sequence
[5631] <220>
[5632] <223> Single strand oligonucleotide
[5633] <400> 413
[5634] taagtactta gttgtactcc agcttgtgcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5635] gtctctttcc tctggcaaag ctgcagtaca actaagagct tg 102
[5636] <210> 414
[5637] <211> 102
[5638] <212> DNA
[5639] <213> Artificial sequence
[5640] <220>
[5641] <223> Single strand oligonucleotide
[5642] <400> 414
[5643] taagtacttt atccacacaa actacctgca agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5644] gtctctttcc tcttgacagta gttagtgtgg ataaagagct tg 102
[5645] <210> 415
[5646] <211> 102
[5647] <212> DNA
[5648] <213> Artificial sequence
[5649] <220>
[5650] <223> Single strand oligonucleotide
[5651] <400> 415
[5652] taagtacttt gacaatccag ccaatccagc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5653] gtctctttcc tctgctgatt ggcaggattg tcaaagagct tg 102
[5654] <210> 416
[5655] <211> 102
[5656] <212> DNA
[5657] <213> Artificial sequence
[5658] <220>
[5659] <223> Single strand oligonucleotide
[5660] <400> 416
[5661] taagtacttt aaagatcggc aacacatgat agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5662] gtctctttcc tctgatcagt gttggcgatc tttaagagct tg 102
[5663] <210> 417
[5664] <211> 102
[5665] <212> DNA
[5666] <213> Artificial sequence
[5667] <220>
[5668] <223> Single strand oligonucleotide
[5669] <400> 417

[5670] taagtacttt gacctttctt gggtttagcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa 60
[5671] gtctctttcc tctgggctaa cccatgaaag gtcaagagct tg 102

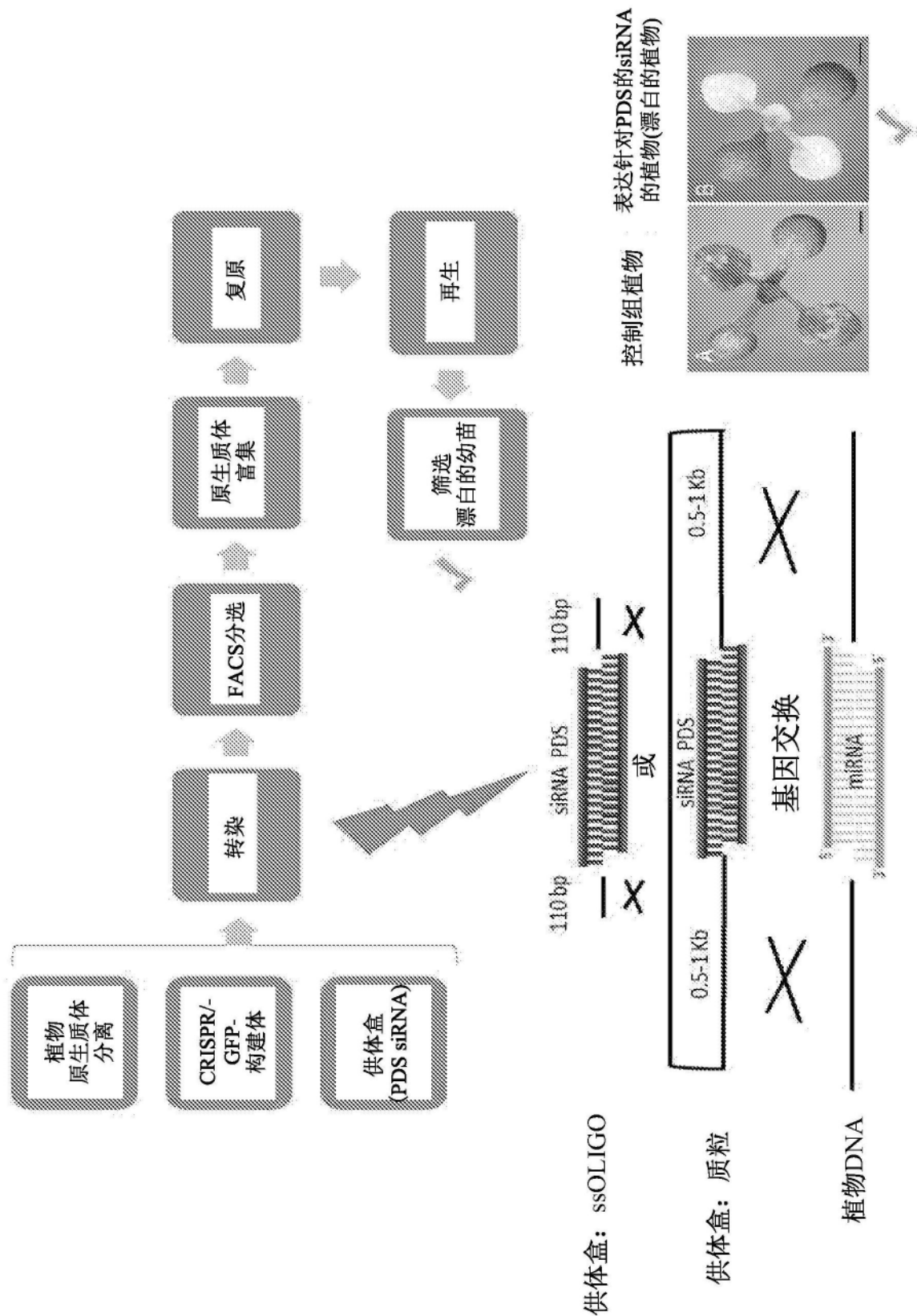


图1

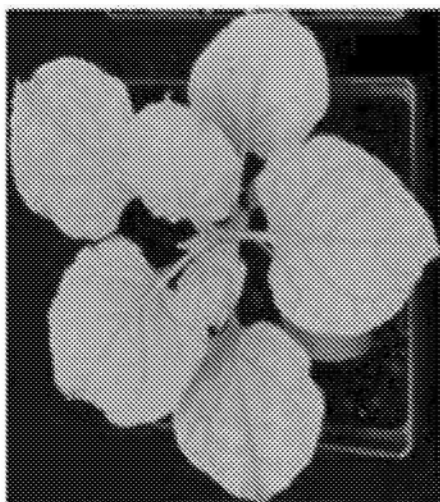


图2A



图2B

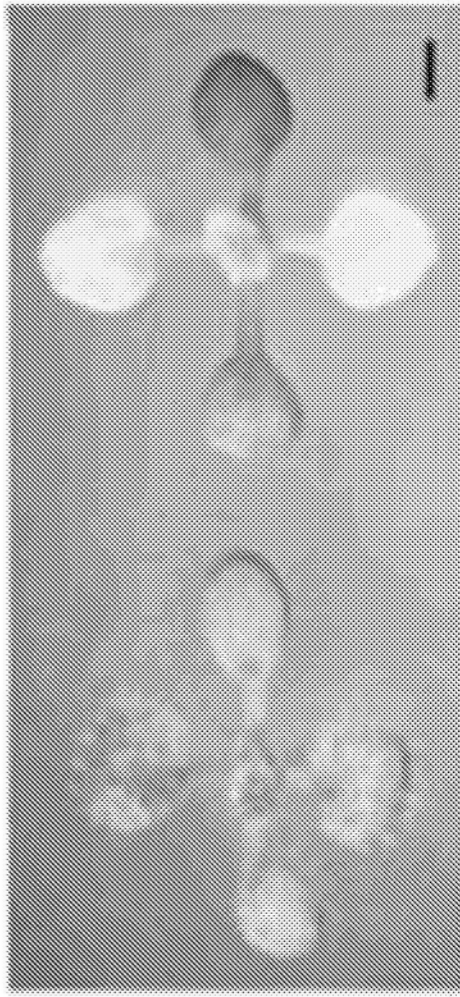


图2C

图3B

GFP

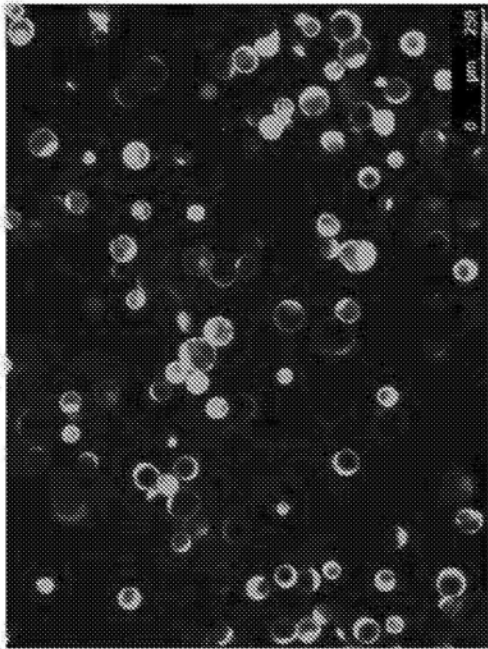


图3D

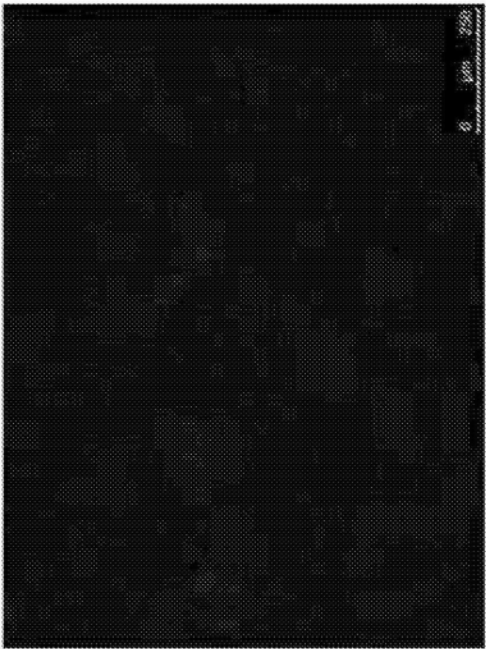
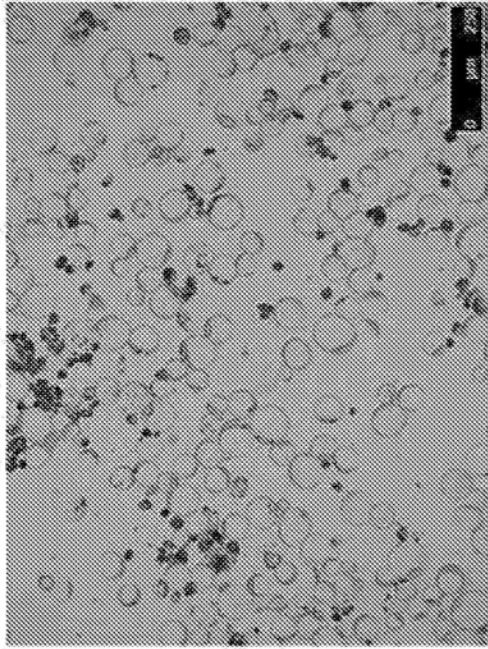


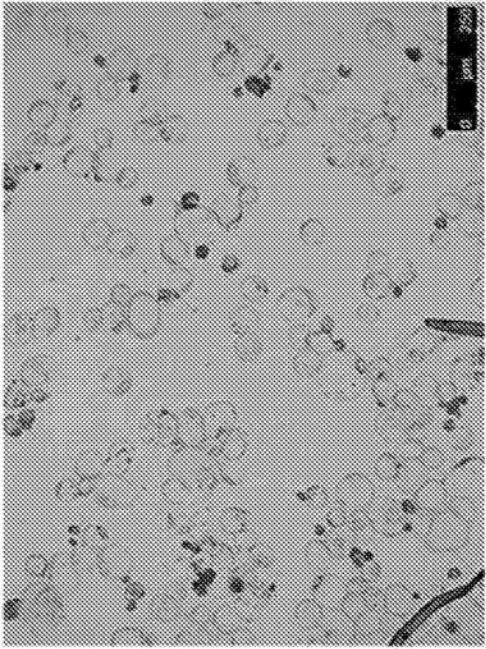
图3A

光



A. 控制组

图3C



B. GEIGS

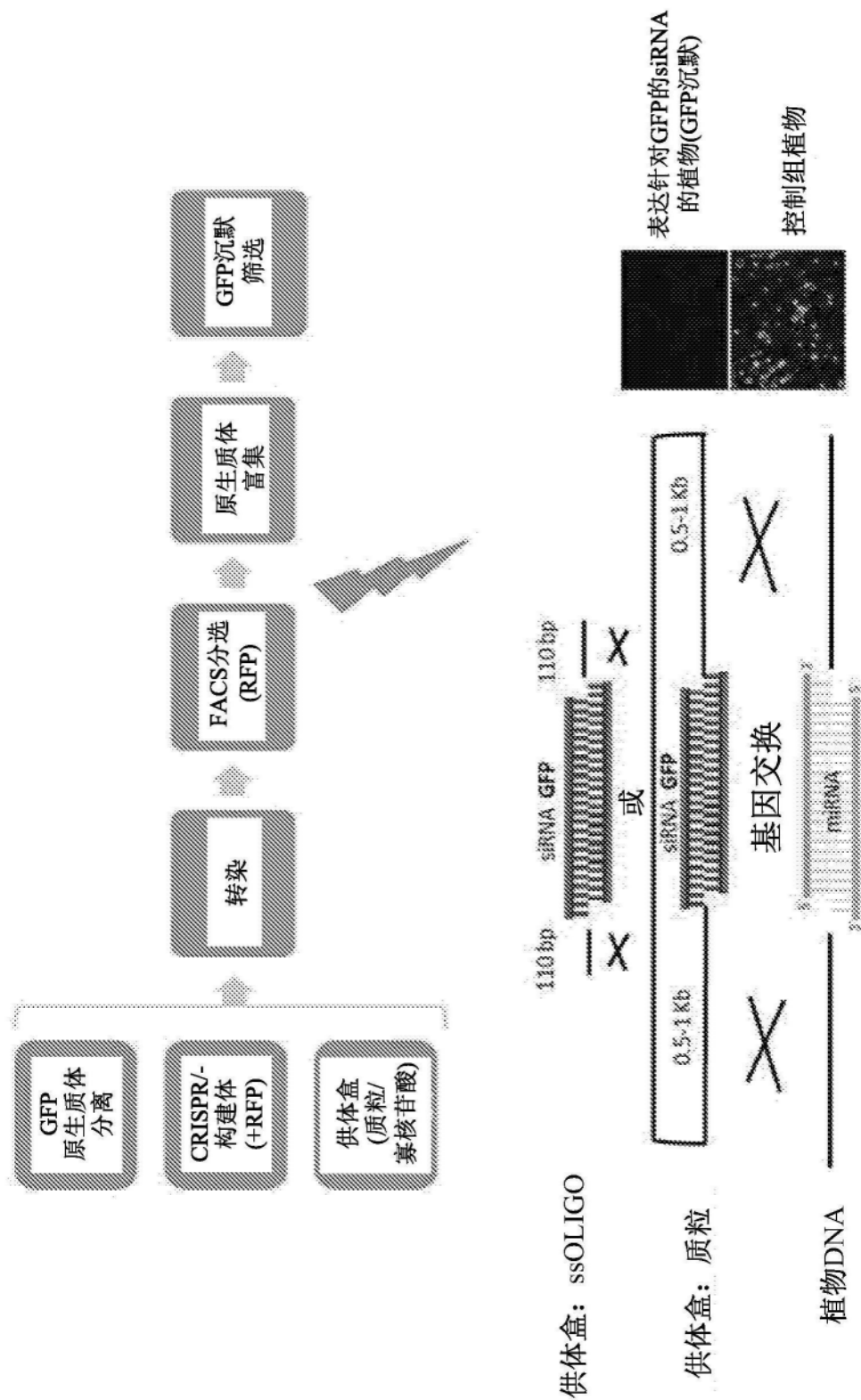


图4

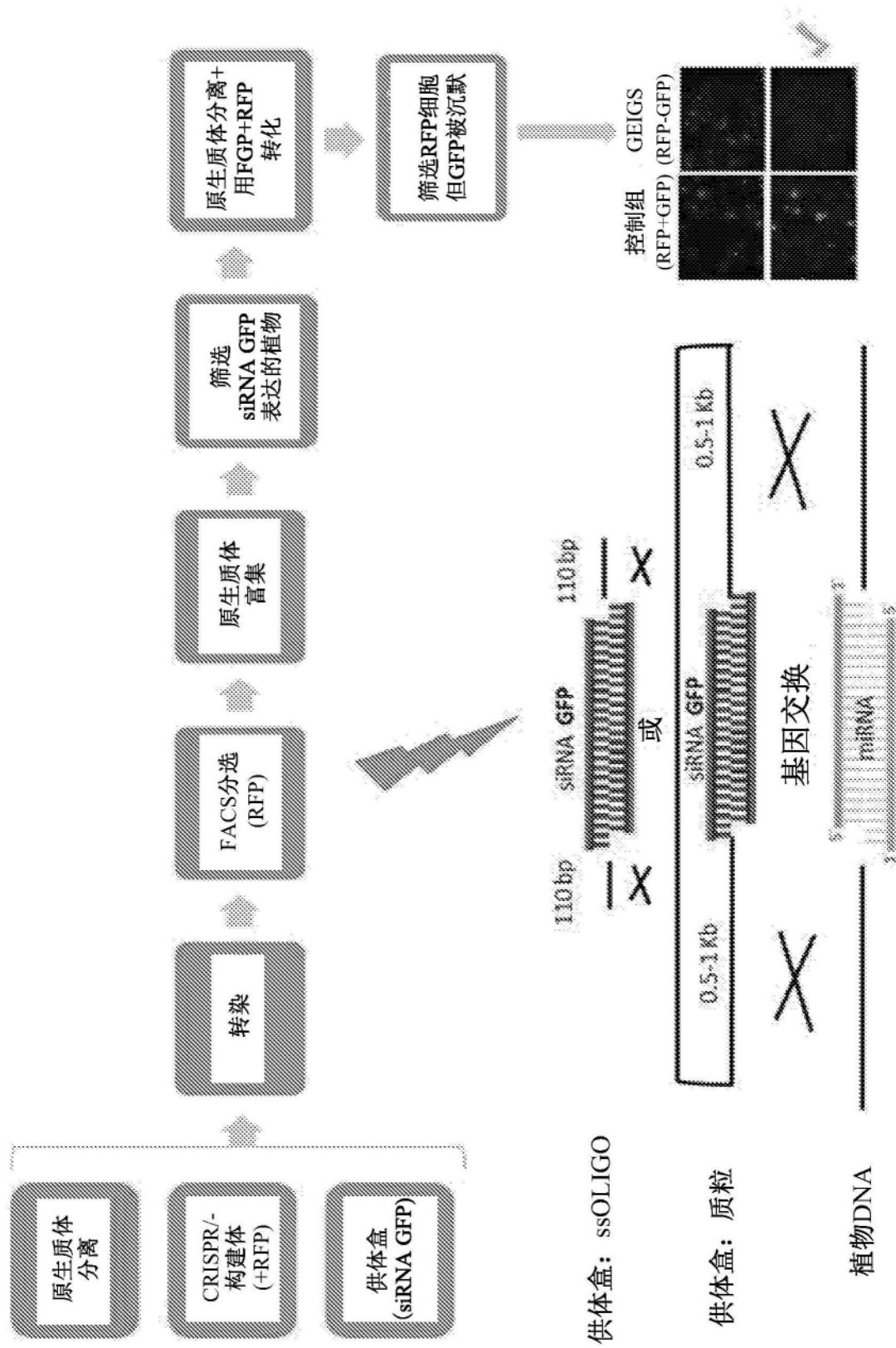


图5

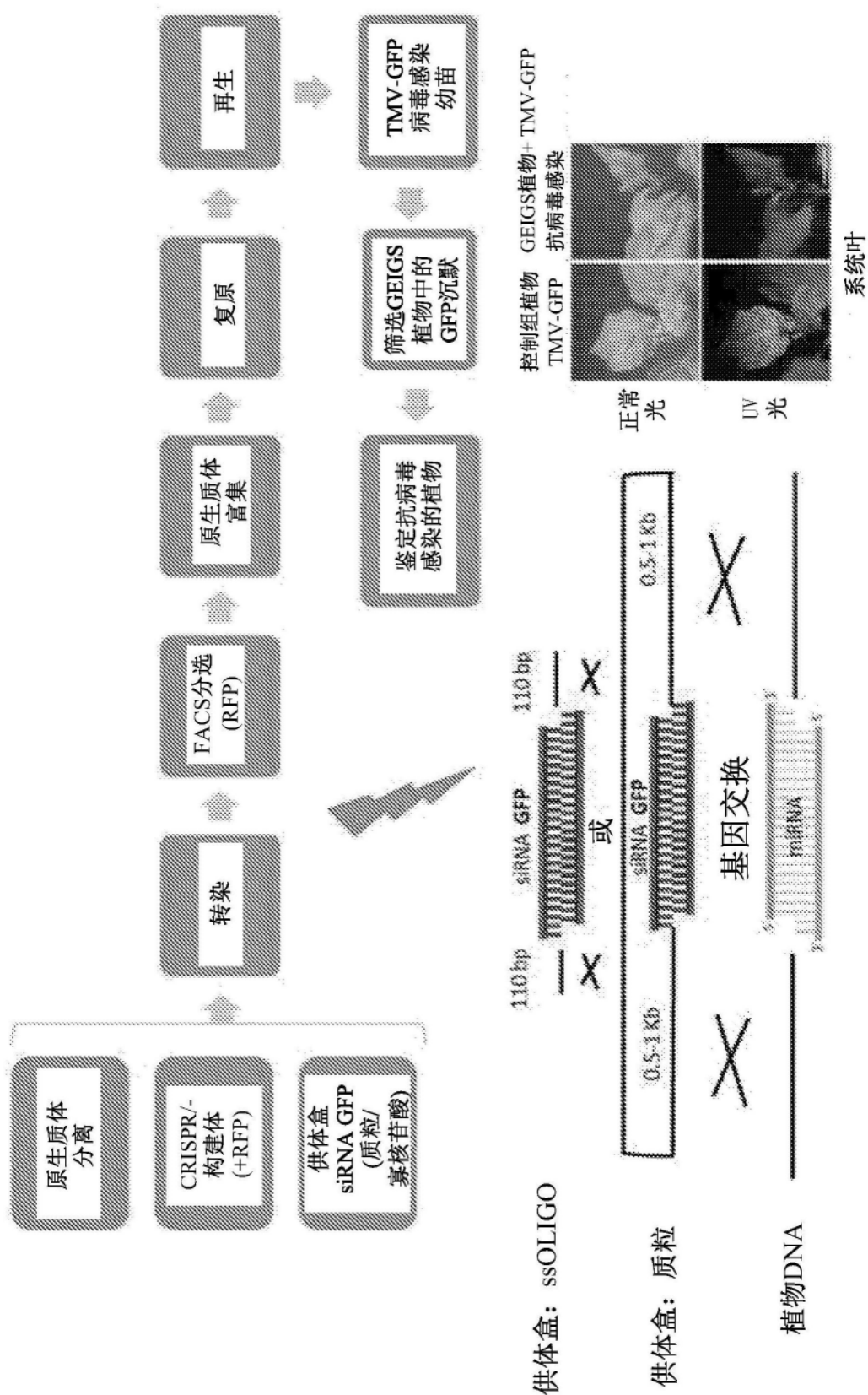


图6



图7

作物	Dak Lak				Gla Lai				Kon Tum			
	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫	香蕉穿孔线虫	咖啡根腐线虫
香蕉	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0
咖啡	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
辣椒	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
榴梿	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
柑橘	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
菠萝	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0
姜	0	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0
龙眼	0	+	+	+	0	-	0	-	0	0	0	0
芒果	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
发现线虫	0: 未发现线虫				0: 未收集样品							

图8

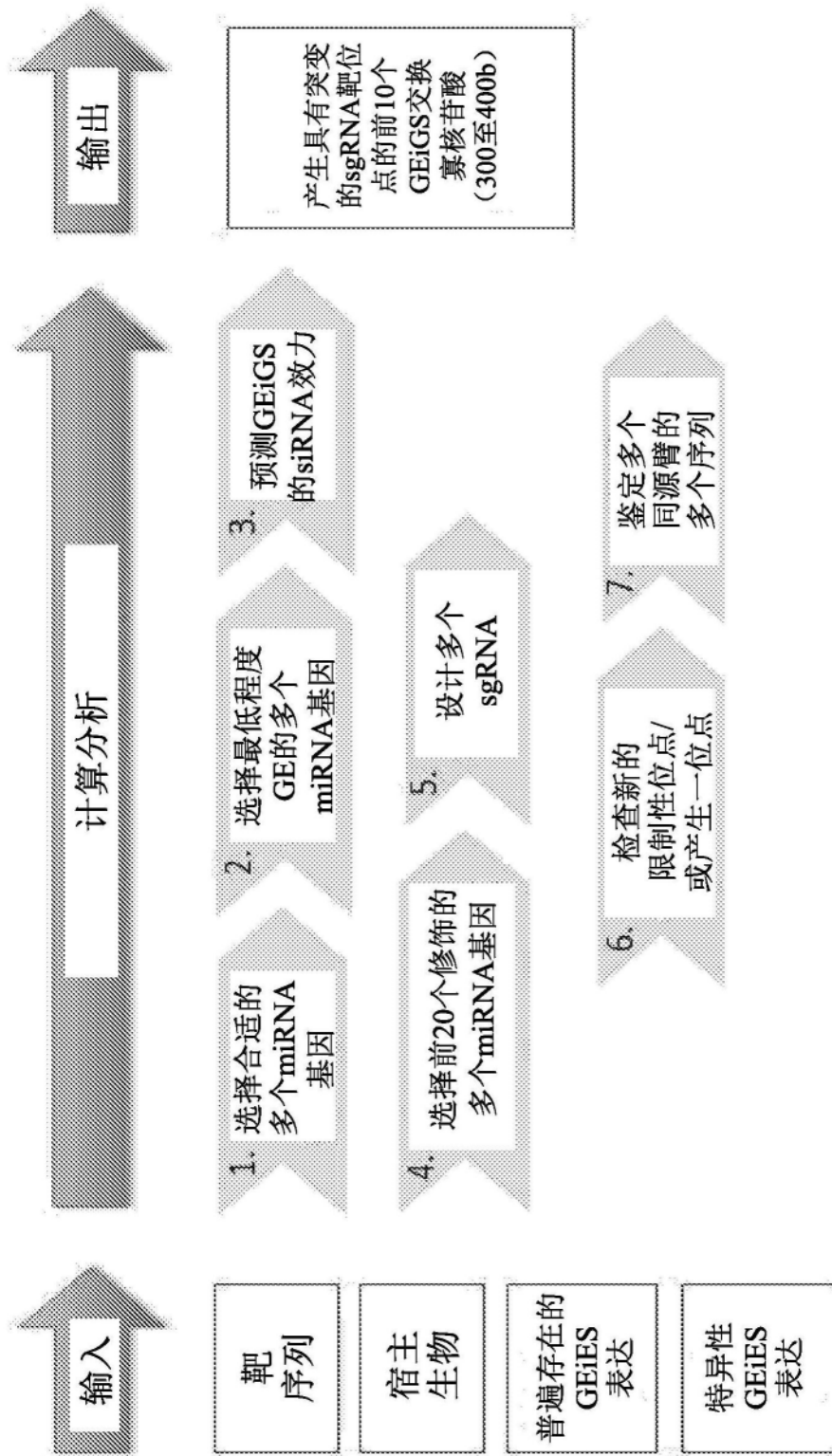


图9

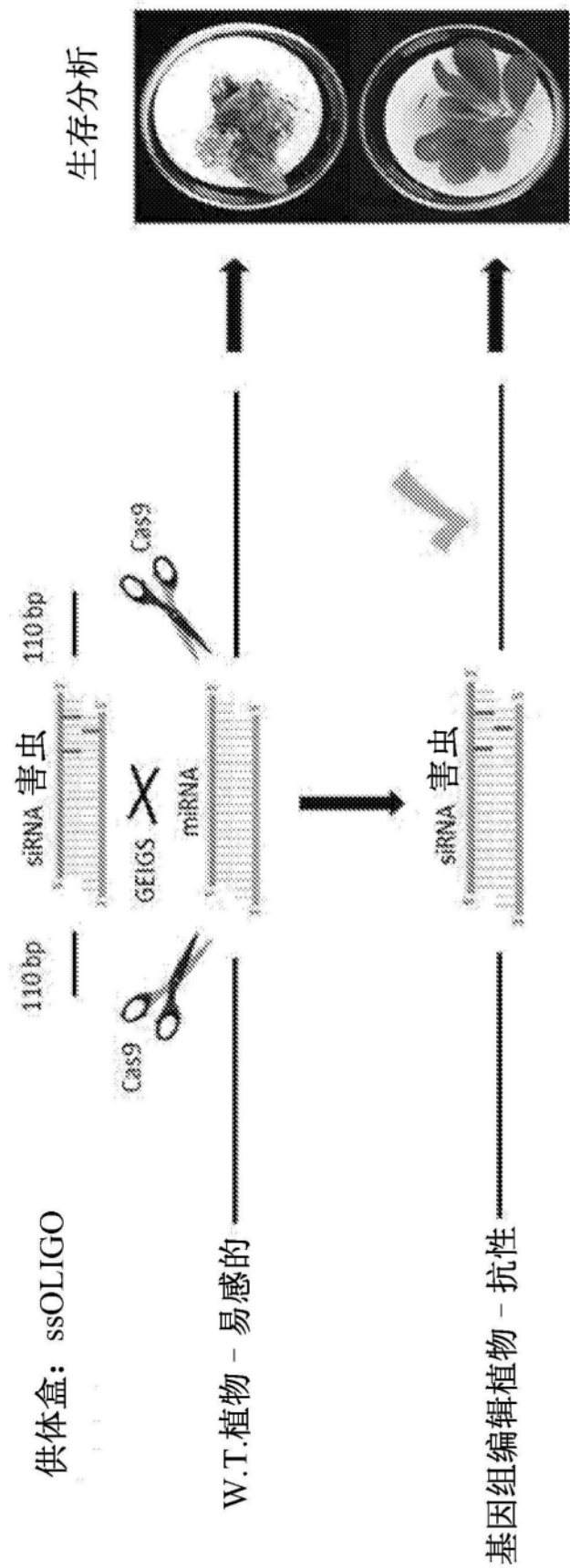


图10

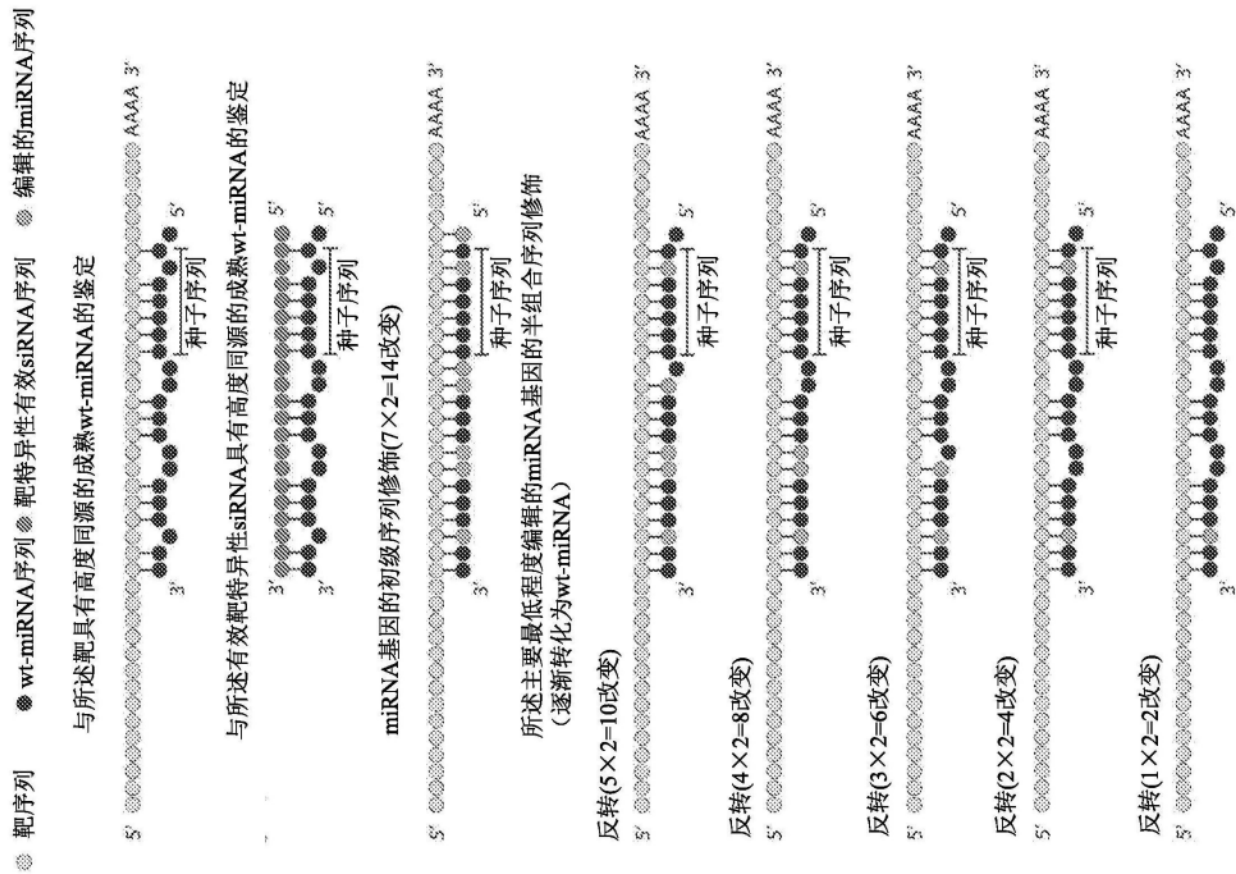
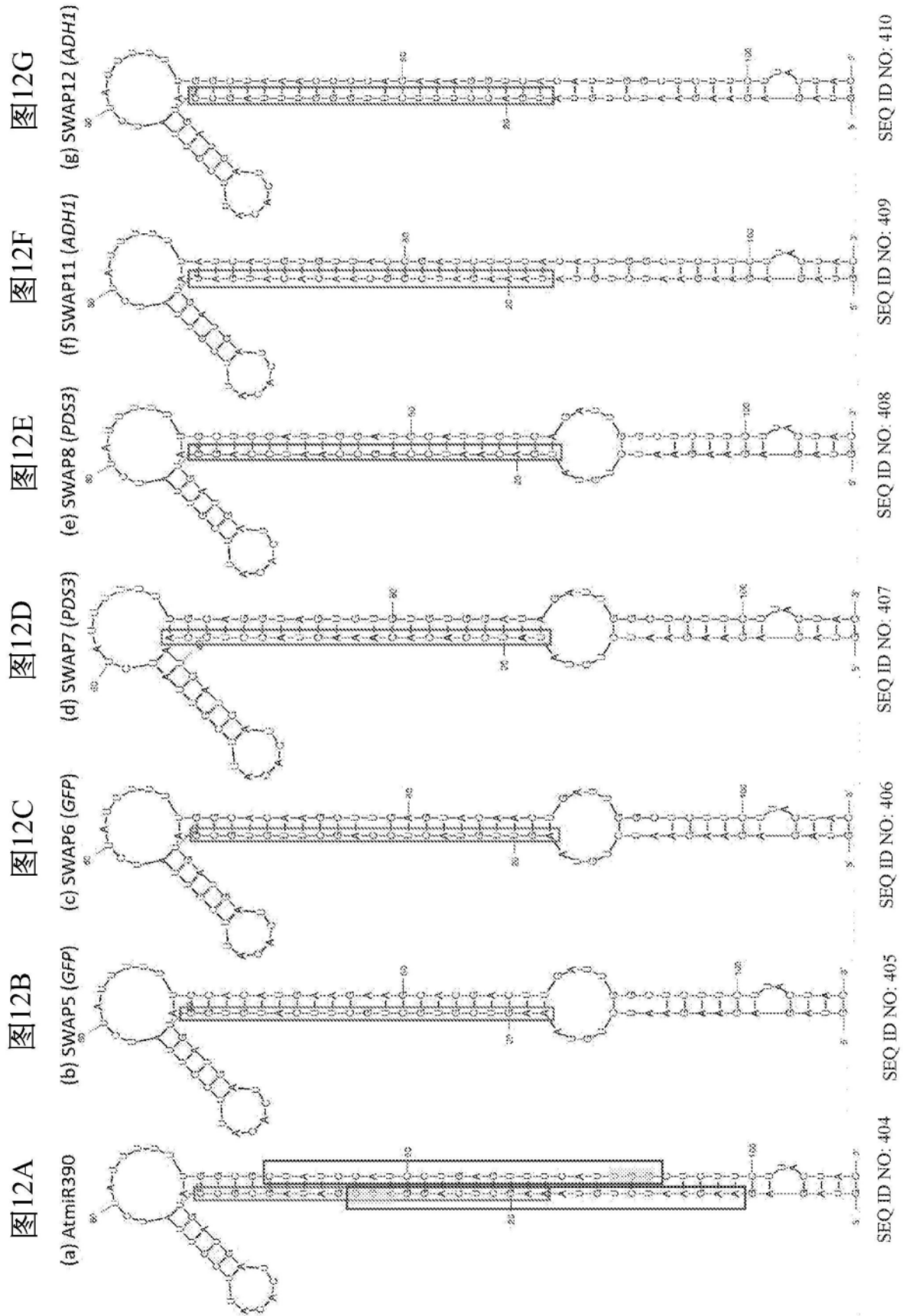


图11



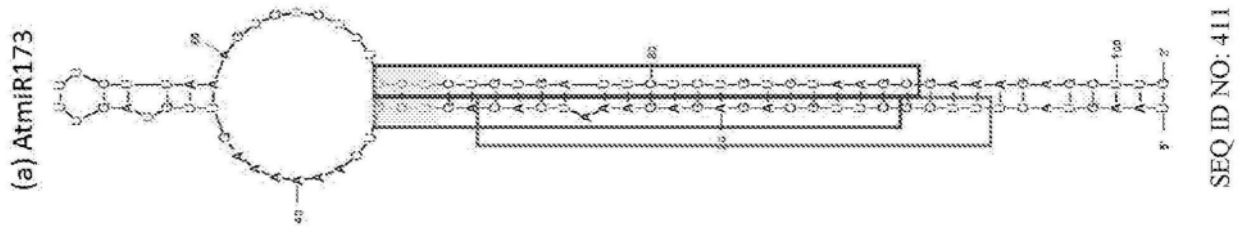


图13A

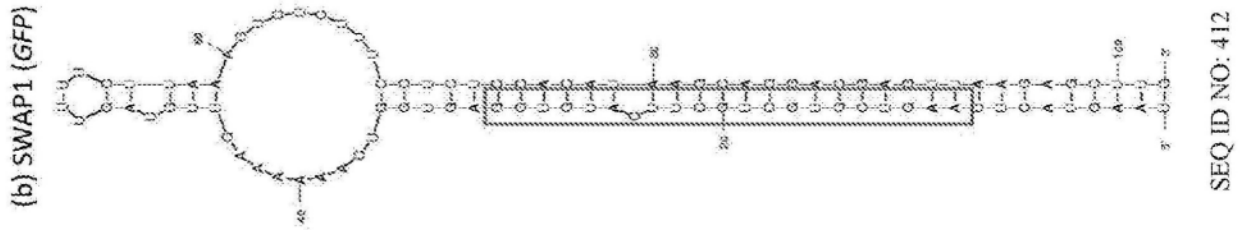


图13B

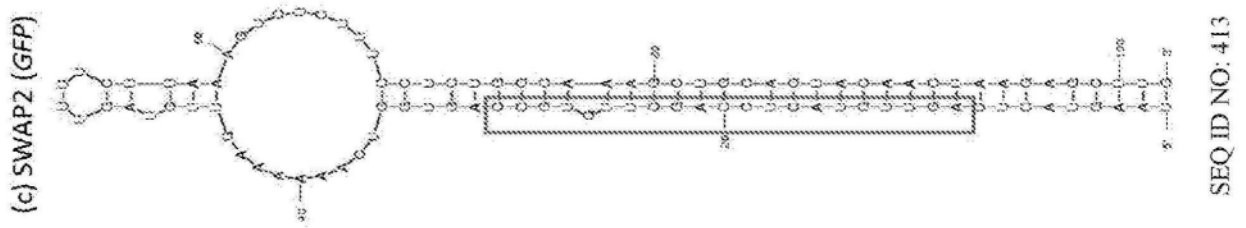


图13C

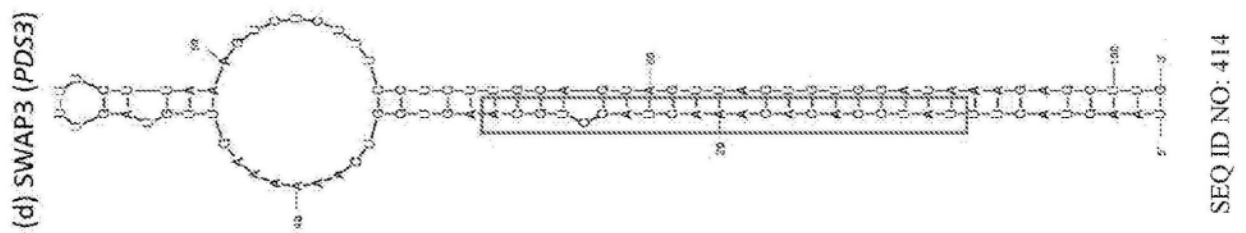


图13D

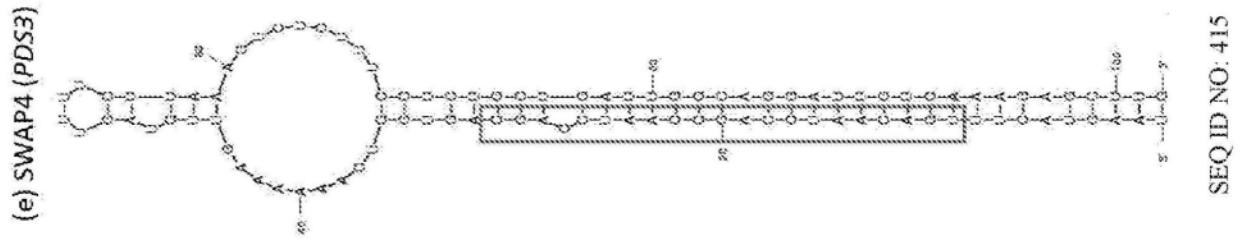


图13E

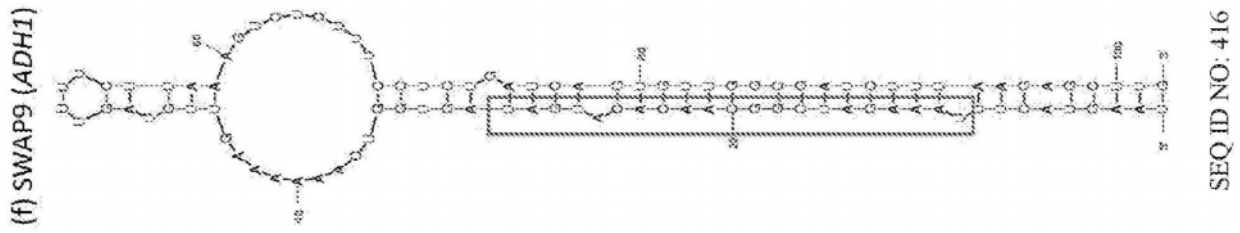


图13F

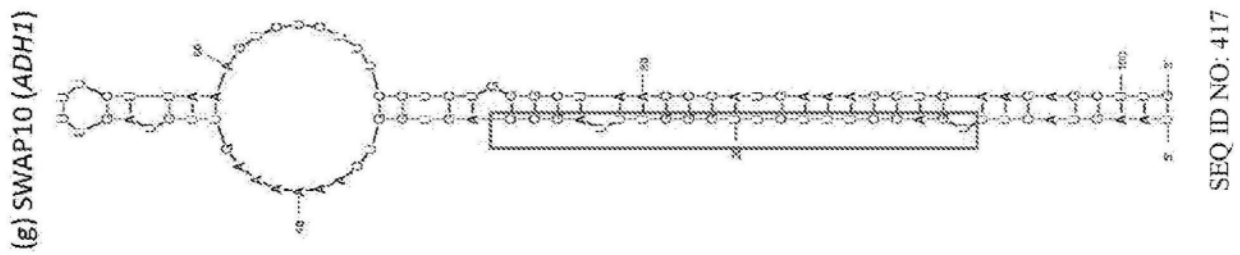


图13G



图13H



图14A

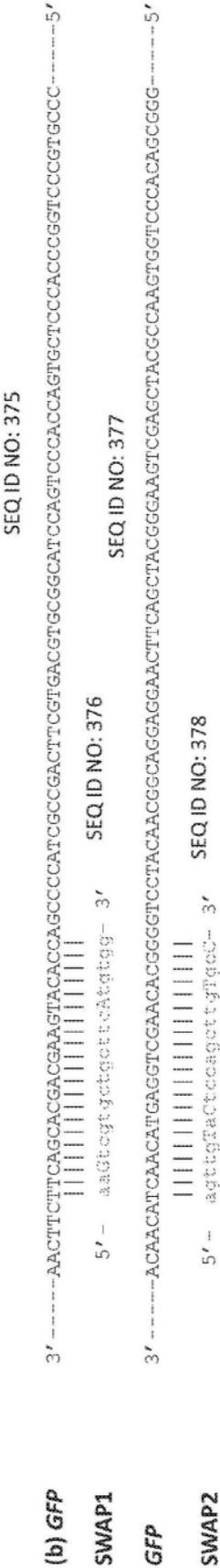


图14B

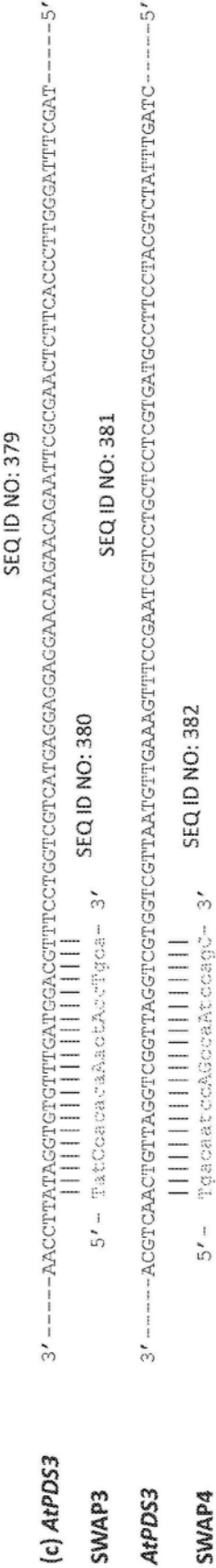


图14C

(d) AtADH1

SWAP9

AtADH1

SWAP10

3'-----GAGGCCATTCTCTAGCCGTTGTGTACTAGAGGACCGACTTCTAGTCAGTGAGGAAGAGGTTGTGAGAGTTGTTAGGGAGGTCGAAGTACCGGCTT-----5'

|||||

5'--Taaagatcggcaacacatgat--3'

3'-----TGTGAAACTGGAAGAACCACAAATCGGTGTAAGTTCAACGAGGATTTGGGTCATCTGTTTGGTGTGACITGTTATGTTCTGTGGAACAGTTCCTCCTC-----5'

|||||

5'--TgaCcttctcttggttttagcc--3'

SEQ ID NO: 383

SEQ ID NO: 384

SEQ ID NO: 385

SEQ ID NO: 386

图14D



图15A



图15B

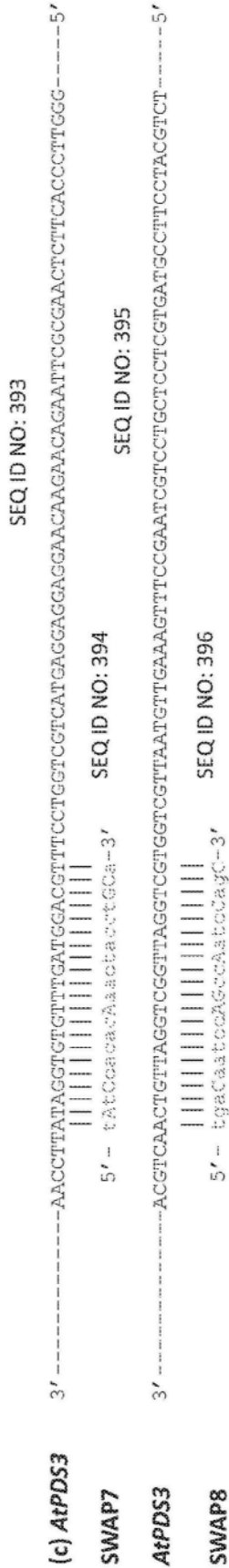


图15C

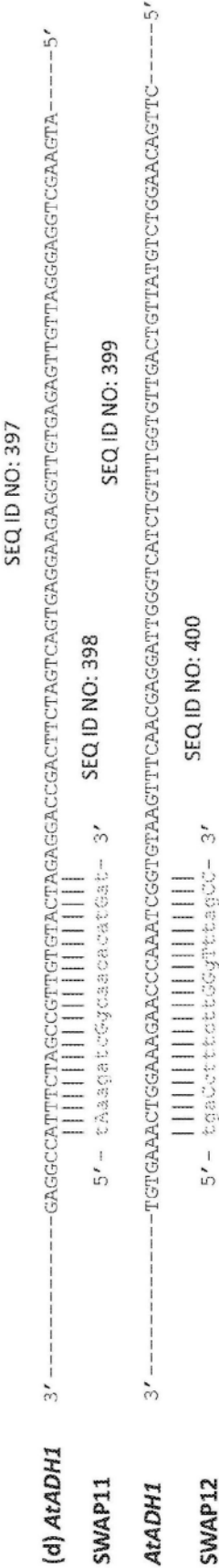


图15D

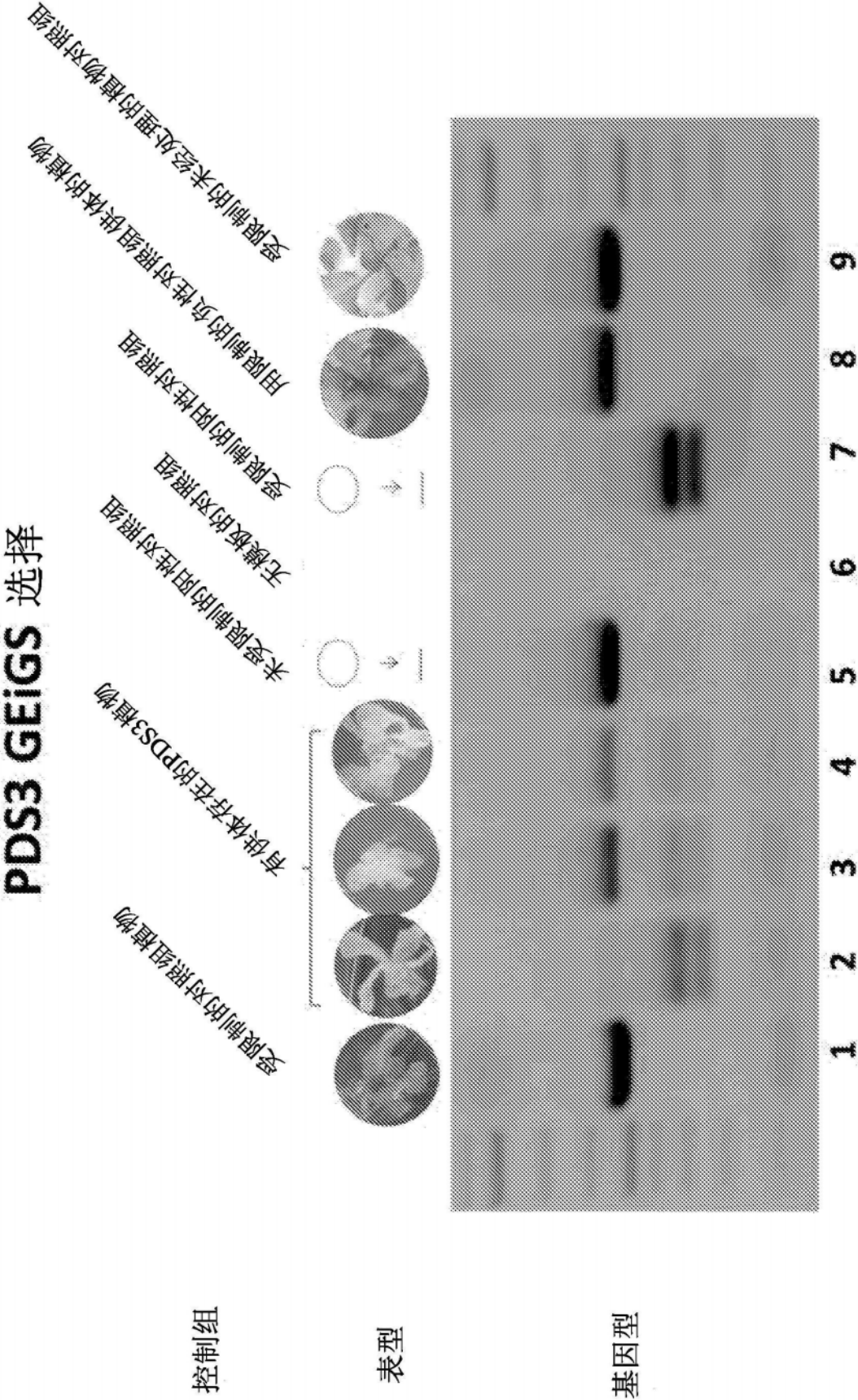


图16

ADH1 GEiGS 选择

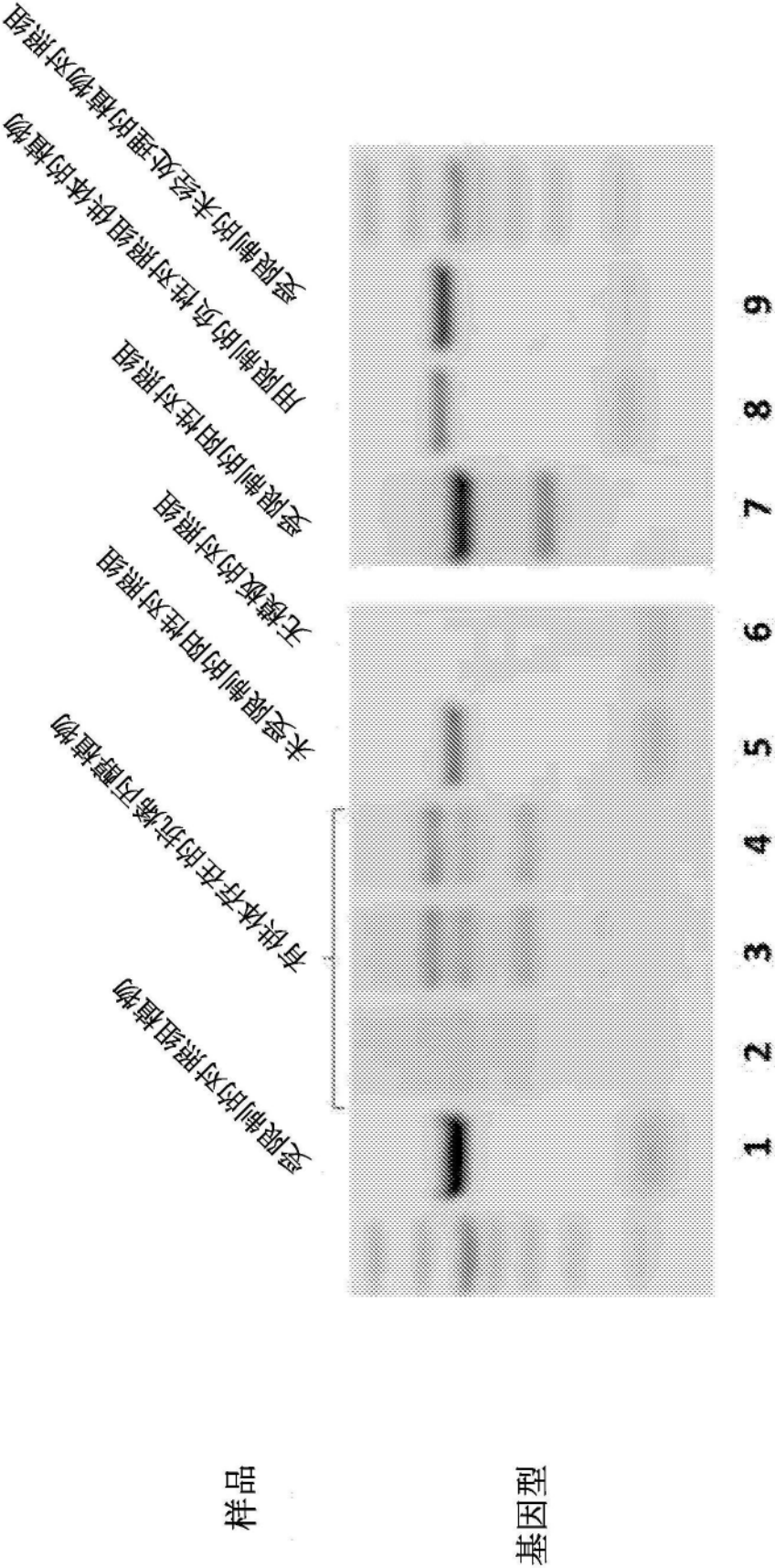


图17

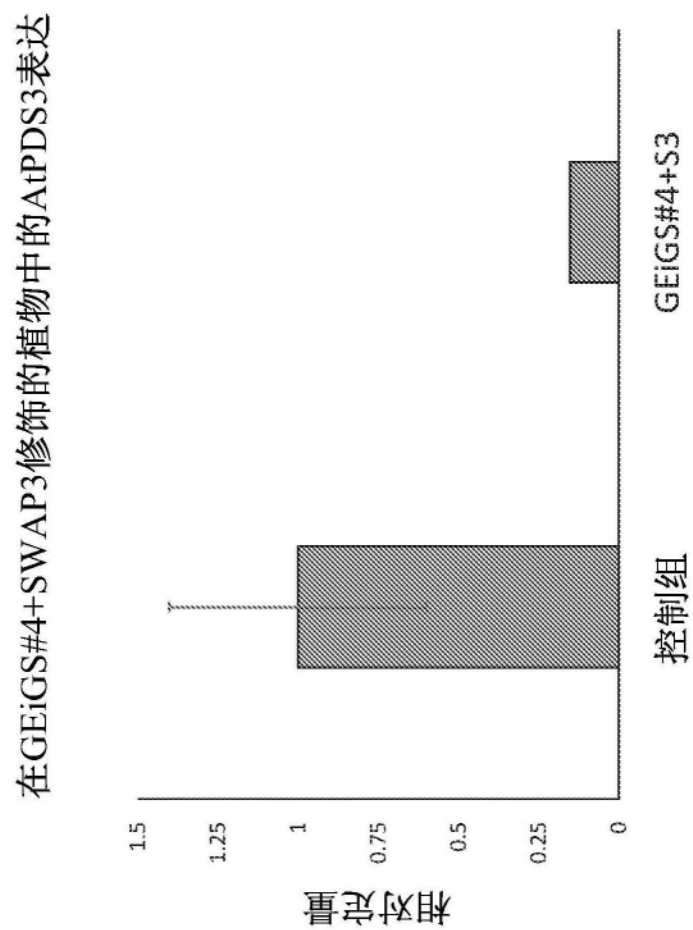


图18

在GEiGS#1+SWAP11修饰的植物中的AtADH1表达

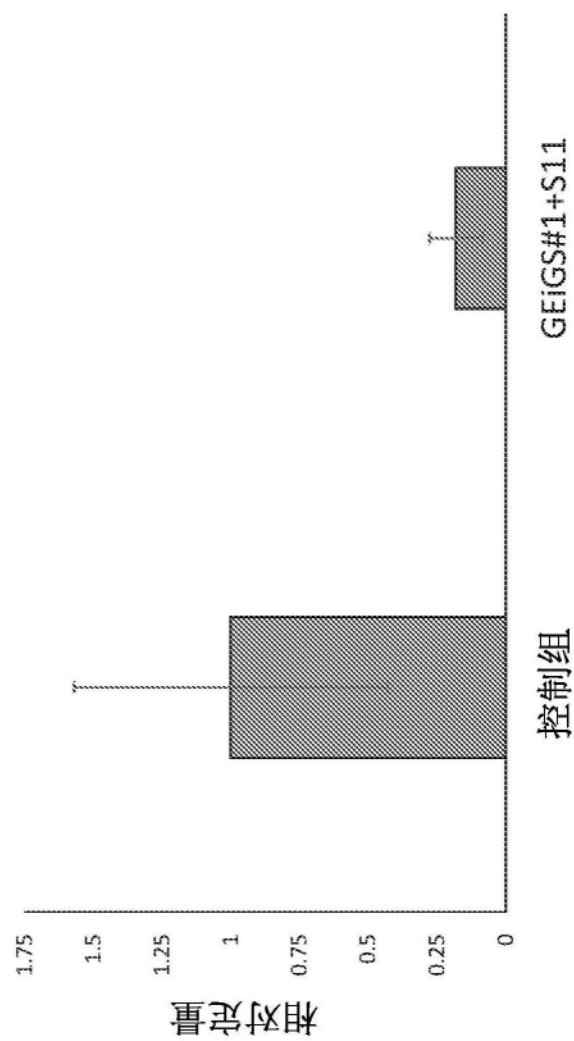


图19