



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110066829 A

(43)申请公布日 2019.07.30

(21)申请号 201910361106.7

(22)申请日 2019.04.30

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72)发明人 饶志明 林春 邵明龙 张显
杨套伟 徐美娟

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 林娟

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12R 1/32(2006.01)

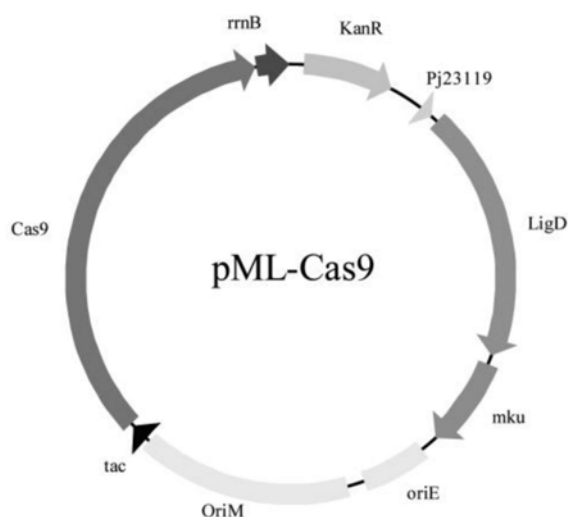
权利要求书2页 说明书9页
序列表9页 附图1页

(54)发明名称

一种CRISPR/Cas9基因编辑系统及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种CRISPR/Cas9基因编辑系统及其应用,属于基因工程技术领域以及生物工程技术领域。此系统可达到对新金色分枝杆菌进行基因编辑的目的;此系统使用的pML-Cas9质粒和pJM-sgRNA质粒就能够在新金色分枝杆菌中稳定存在、表达,不会随着新金色分枝杆菌的传代丢失,也不会被新金色分枝杆菌自身所存在的保护机制排斥;利用此系统的CRISPR/Cas9基因编辑系统系统对新金色分枝杆菌进行基因编辑,敲除效率较高,可达50%。



1. 一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,其特征在于,所述CRISPR/Cas9基因编辑系统包含pML-Cas9质粒以及pJM-sgRNA质粒;

所述pML-Cas9质粒包含pMV261表达载体、Cas9基因、Pj23119启动子以及NHEJ修复基因;所述pMV261表达载体上的Hsp60启动子被替换为了Tac启动子;所述NHEJ修复基因包含编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因;所述Cas9基因位于pMV261表达载体的Tac启动子的下游以及pMV261表达载体的rrnB终止子上游,由Tac启动子驱动表达;所述Pj23119启动子位于pMV261表达载体的KanR抗性基因的下游;所述NHEJ修复基因位于Pj23119启动子的下游以及pMV261表达载体的复制起点(ori)的上游,由Pj23119启动子驱动表达;

所述pJM-sgRNA质粒依次包含OriM复制子、pMB1复制子、Pj23119启动子、sgRNA序列、rrnB终止子以及aadA抗性基因,命名为pJM-sgRNA质粒;所述sgRNA序列是靶向序列,可特异性靶向靶序列;所述靶序列是指需编辑基因的核苷酸序列。

2. 如权利要求1所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,其特征在于,所述Cas9基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 如权利要求1或2所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,其特征在于,编码所述pML-Cas9质粒以及pJM-sgRNA质粒中的Pj23119启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

4. 如权利要求1-3任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,其特征在于,编码所述DNA末端集合蛋白mku的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

5. 如权利要求1-4任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,其特征在于,编码所述DNA连接酶LigD的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

6. 一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法,其特征在于,所述方法为使用权利要求1-5任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统。

7. 如权利要求6所述的一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法,其特征在于,所述方法为先将权利要求1-5任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统中的pML-Cas9质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pML-Cas9质粒上的Cas9基因、编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因表达,然后将权利要求1-5任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统中的pJM-sgRNA质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pJM-sgRNA质粒转录生成sgRNA序列,sgRNA序列中的Cas9handle和Terminator会形成茎环结构,Cas9基因会识别此茎环结构以与sgRNA序列结合形成复合物,此复合物会靶向需编辑基因并锚定在需编辑基因上,锚定后,Cas9基因会发挥活性切割需编辑基因使得新金色分枝杆菌中需编辑的基因被敲除,需编辑基因的敲除会使得新金色分枝杆菌基因产生DSB断裂,此时,pML-Cas9质粒上的表达的DNA末端结合蛋白mku以及DNA连接酶LigD会修复DSB断裂,完成新金色分枝杆菌基因的编辑过程。

8. 一种质粒,其特征在于,所述质粒包含pMV261表达载体、Cas9基因、Pj23119启动子以及NHEJ修复基因,命名为pML-Cas9质粒;所述pMV261表达载体上的Hsp60启动子被替换为了Tac启动子;所述NHEJ修复基因包含编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因;所述Cas9基因位于pMV261表达载体的Tac启动子的下游以及pMV261表达载体的rrnB终止子上游,由Tac启动子驱动表达;所述Pj23119启动子位于pMV261表达载体的

KanR抗性基因的下游;所述NHEJ修复基因位于Pj23119启动子的下游以及pMV261表达载体的复制起点(ori)的上游,由Pj23119启动子驱动表达。

9.一种质粒,其特征在于,所述质粒依次包含OriM复制子、pMB1复制子、Pj23119启动子、sgRNA序列、rrnB终止子以及aadA抗性基因,命名为pJM-sgRNA质粒;所述sgRNA序列是靶向序列,可特异性靶向靶序列;所述靶序列是指需编辑基因的核苷酸序列。

10.权利要求1-5任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统或权利要求6或7所述的一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法或权利要求8所述的一种质粒或权利要求9所述的一种质粒在编辑新金色分枝杆菌基因方面的应用。

一种CRISPR/Cas9基因编辑系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种CRISPR/Cas9基因编辑系统及其应用,属于基因工程技术领域以及生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 甾体药物属于激素类药物,是在研究哺乳动物内分泌系统时发现的内源性物质,具有极重要的医药价值,在维持生命、调节性功能、机体发育、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制方面均有重要的作用。这些作用使得甾体药物成为了化药工业中仅次于抗生素的第二大类药物,也使得甾体药物成为了我国药物新资源开发的重点之一,更使得甾体药物及甾体药物中间体成为了我国药物出口的重要品种。

[0003] 但是,由于我国在甾体药物的生产水平上和世界先进国家相比还有一定的差距,我国现有的甾体药物品种仅为国外已经上市的甾体药物的三分之一,且大多为中低档产品,利润较低。因此,急需提升我国甾体药物的生产水平。

[0004] 雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)是重要的甾体药物中间体,可通过结构上的化学修饰合成几乎所有的甾体类药物,在甾体药物的生产中占据重要地位,然而,由于底物投料浓度低、发酵转化周期长以及对甾体微生物代谢机理认识的不足等问题,我国在甾体微生物转化生产上也明显落后于世界先进国家。因此,急需提升我国甾体药物中间体ADD的生产水平,进而提升我国甾体药物的生产水平。

[0005] 新金色分枝杆菌(*Mycobacterium neoaurum*)可转化植物甾醇合成雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD),且具有生长快的优势,是一种极具潜力的ADD生产菌,若能对新金色分枝杆菌转化植物甾醇合成ADD过程中的3-甾酮- Δ 1-脱氢酶、胆固醇氧化酶、甾酮C27单加氧酶以及3-甾酮-9 α -羟化酶等关键酶进行研究,并结合代谢工程策略对新金色分枝杆菌的ADD合成相关途径进行改造,极有可能获得能够高效积累ADD的新金色分枝杆菌,此经改造的新金色分枝杆菌无疑是提升我国甾体药物中间体ADD生产水平的一个重要突破,也为提升我国甾体药物的生产水平提供了更多可能。

[0006] 然而,由于新金色分枝杆菌自身所存在的保护机制排他性较强,外源基因很难在新金色分枝杆菌中稳定存在并表达,这就使得可适用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法较少,例如,由于分枝杆菌同源重组的发生率比其他细菌明显低很多,仅为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$,并且,利用同源重组对新金色分枝杆菌进行基因编辑还需在基因组上带入抗性标签,因此,利用同源重组对新金色分枝杆菌进行基因编辑具有效率低、周期长、筛选量大、操作复杂等劣势;自杀载体系统(pNIL/pGOAL系列质粒)等其他基因编辑方法虽然可以对新金色分枝杆菌进行基因编辑,但效率也不高,与同源重组相比不具备任何优势。

[0007] 因此,基因编辑无疑是对新金色分枝杆菌进行代谢工程改造的一个难点,急需完善针对新金色分枝杆菌的基因编辑系统,以便更有效率地对新金色分枝杆菌进行改造。

发明内容

[0008] [技术问题]

[0009] 本发明要解决的技术问题是提供一种对新金色分枝杆菌针对性强且效率高的基因编辑系统。

[0010] [技术方案]

[0011] 为解决上述问题,本发明提供了一种CRISPR/Cas9基因编辑系统,所述CRISPR/Cas9基因编辑系统包含pML-Cas9质粒以及pJM-sgRNA质粒;

[0012] 所述pML-Cas9质粒包含pMV261表达载体、Cas9基因、Pj23119启动子以及NHEJ修复基因;所述pMV261表达载体上的Hsp60启动子被替换为了Tac启动子;所述NHEJ修复基因包含编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因;所述Cas9基因位于pMV261表达载体的Tac启动子的下游以及pMV261表达载体的rrnB终止子上游,由Tac启动子驱动表达;所述Pj23119启动子位于pMV261表达载体的KanR抗性基因的下游;所述NHEJ修复基因位于Pj23119启动子的下游以及pMV261表达载体的复制起点(ori)的上游,由Pj23119启动子驱动表达;

[0013] 所述pJM-sgRNA质粒依次包含OriM复制子、pMB1复制子、Pj23119启动子、sgRNA序列、rrnB终止子以及aadA抗性基因,命名为pJM-sgRNA质粒;所述sgRNA序列是靶向序列,可特异性靶向靶序列;所述靶序列是指需编辑基因的核苷酸序列。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述Cas9基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,编码所述pML-Cas9质粒以及pJM-sgRNA质粒中的Pj23119启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0016] 在本发明的一种实施方式中,编码所述DNA末端集合蛋白mku的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0017] 在本发明的一种实施方式中,编码所述DNA连接酶LigD的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,编码所述Tac启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0019] 在本发明的一种实施方式中,编码所述OriM复制子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0020] 在本发明的一种实施方式中,编码所述pMB1复制子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0021] 在本发明的一种实施方式中,编码所述rrnB终止子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0022] 在本发明的一种实施方式中,所述aadA抗性基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0023] 本发明还提供了一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法,所述方法为使用上述一种CRISPR/Cas9基因编辑系统。

[0024] 在本发明的一种实施方式中,所述方法为先将上述一种CRISPR/Cas9基因编辑系统中的pML-Cas9质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pML-Cas9质粒上的Cas9基因、编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因表达,然后将上述一种CRISPR/Cas9

基因编辑系统中的pJM-sgRNA质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pJM-sgRNA质粒转录生成sgRNA序列,sgRNA序列中的Cas9 handle和Terminator会形成茎环结构,Cas9基因会识别此茎环结构以与sgRNA序列结合形成复合物,此复合物会靶向需编辑基因并锚定在需编辑基因上,锚定后,Cas9基因会发挥活性切割需编辑基因使得新金色分枝杆菌中需编辑的基因被敲除,需编辑基因的敲除会使得新金色分枝杆菌基因产生DSB断裂,此时,pML-Cas9质粒上的表达的DNA末端结合蛋白mku以及DNA连接酶LigD会修复DSB断裂,完成新金色分枝杆菌基因的编辑过程。

[0025] 本发明还提供了一种质粒,所述质粒包含pMV261表达载体、Cas9基因、Pj23119启动子以及NHEJ修复基因,命名为pML-Cas9质粒;所述pMV261表达载体上的Hsp60启动子被替换为了Tac启动子;所述NHEJ修复基因包含编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因;所述Cas9基因位于pMV261表达载体的Tac启动子的下游以及pMV261表达载体的rrnB终止子上游,由Tac启动子驱动表达;所述Pj23119启动子位于pMV261表达载体的KanR抗性基因的下游;所述NHEJ修复基因位于Pj23119启动子的下游以及pMV261表达载体的复制起点(ori)的上游,由Pj23119启动子驱动表达。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述Cas9基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,编码所述Pj23119启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0028] 在本发明的一种实施方式中,编码所述DNA末端集合蛋白mku的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0029] 在本发明的一种实施方式中,编码所述DNA连接酶LigD的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0030] 在本发明的一种实施方式中,编码所述Tac启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0031] 本发明还提供了一种质粒,所述质粒依次包含OriM复制子、pMB1复制子、Pj23119启动子、sgRNA序列、rrnB终止子以及aadA抗性基因,命名为pJM-sgRNA质粒;所述sgRNA序列是靶向序列,可特异性靶向靶序列;所述靶序列是指需编辑基因的核苷酸序列。

[0032] 在本发明的一种实施方式中,编码所述OriM复制子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0033] 在本发明的一种实施方式中,编码所述pMB1复制子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0034] 在本发明的一种实施方式中,编码所述Pj23119启动子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0035] 在本发明的一种实施方式中,编码所述rrnB终止子的基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0036] 在本发明的一种实施方式中,所述aadA抗性基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0037] 权利要求1-5任一所述的一种CRISPR/Cas9基因编辑系统或权利要求6或7所述的一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法或权利要求8所述的一种质粒或权利要求9所述的一种质粒在编辑新金色分枝杆菌基因方面的应用

[0038] 本发明还提供了上述一种CRISPR/Cas9基因编辑系统或上述一种可用于新金色分枝杆菌的基因编辑方法或上述一种pML-Cas9质粒或上述一种pJM-sgRNA质粒在编辑新金色分枝杆菌基因方面的应用。

[0039] [有益效果]

[0040] (1) 本发明提供了一种基于双质粒的CRISPR/Cas9基因编辑系统,此系统可达到对新金色分枝杆菌进行基因编辑的目的,其工作机制如下:先将pML-Cas9质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pML-Cas9质粒上的Cas9基因、编码DNA末端结合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因表达,然后将pJM-sgRNA质粒导入新金色分枝杆菌中,使得pJM-sgRNA质粒转录生成sgRNA序列,sgRNA序列中的Cas9 handle和Terminator会形成茎环结构,Cas9基因会识别此茎环结构以与sgRNA序列结合形成复合物,此复合物会靶向需编辑基因并锚定在需编辑基因上,锚定后,Cas9基因会发挥活性切割需编辑基因使得新金色分枝杆菌中需编辑的基因被敲除,需编辑基因的敲除会使得新金色分枝杆菌基因产生DSB断裂,此时,pML-Cas9质粒上的表达的DNA末端结合蛋白mku以及DNA连接酶LigD会修复DSB断裂,完成新金色分枝杆菌基因的编辑过程;

[0041] (2) 本发明的CRISPR/Cas9基因编辑系统使用的pML-Cas9质粒和pJM-sgRNA质粒就能够在新金色分枝杆菌中稳定存在、表达,不会随着新金色分枝杆菌的传代丢失,也不会被新金色分枝杆菌自身所存在的保护机制排斥;

[0042] (3) 利用本发明的CRISPR/Cas9基因编辑系统系统对新金色分枝杆菌进行基因编辑,敲除效率较高,可达50%。

附图说明

[0043] 图1:pML-Cas9质粒图谱。

[0044] 图2:pJM-sgRNA质粒图谱。

具体实施方式

[0045] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步的限定。

[0046] 下述实施例中涉及的pMD18T载体、pMV261表达载体、ptrc99A表达载体购自优宝生物;下述实施例中涉及的ClonExpress II One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技有限公司;下述实施例中涉及的新金色分枝杆菌 (*Mycobacterium neoaurum*) 购自北纳生物,资源编号为ATCC 25795。

[0047] 下述实施例中涉及的培养基如下:

[0048] LB液体培养基:葡萄糖10g/L、酵母粉5g/L、NaCl 10g/L。

[0049] 斜面/固体培养基:葡萄糖10g/L、胰蛋白胨6g/L、酵母粉5g/L、NaCl 10g/L、琼脂粉20g/L,pH 7.5。

[0050] 种子培养基:葡萄糖20g/L、胰蛋白胨10g/L、酵母粉6g/L、NaCl 10g/L,pH 7.5。

[0051] 发酵培养基:植物甾醇1g/L、葡萄糖20g/L、胰蛋白胨10g/L、酵母粉6g/L、NaCl 10g/L、K₂HPO₄3g/L、MgSO₄0.3g/L、MnCl₂5×10⁻⁴g/L、β-环糊精3g/L,pH 7.5。

[0052] 感受态培养基:葡萄糖20g/L、胰蛋白胨10g/L、酵母粉6g/L、NaCl 10g/L、Tween-80 0.2% (V/V),pH 7.5。

[0053] 下述实施例中涉及的检测方法如下:

[0054] 3-甾酮- Δ 1-脱氢酶酶活的检测方法:

[0055] 最适KSDD测定体系(3mL)包含:粗酶液(100 μ L),终浓度50mM的Tris-HCl(pH 7.0),终浓度40 μ M的DCPIP,终浓度1.5mM的PMS,终浓度500 μ M甾体底物雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)(溶于100%异丙醇);于30℃下反应2h,检测获得的反应液于600nm处的吸光值变化;

[0056] 3-甾酮- Δ 1-脱氢酶的酶活定义为:将在1min内还原1 μ mol DCPIP所需的酶量定义为一个酶活单位,单位为U。

[0057] 基因敲除效率的检测方法:

[0058] 基因敲除效率的计算公式如下:基因敲除效率=(验证敲除成功的菌落数量/挑取转化子的总数量) $\times$ 100%。

[0059] 新金色分枝杆菌JC-12感受态细胞的制备方法如下:

[0060] 将冻管中的新金色分枝杆菌JC-12接种至于10mL LB液体培养基中,30℃摇床培养48h,得到种子液;以1%的接种量将种子液转接至50mL感受态培养基中,30℃摇床培养4~6h,得到菌液;将菌液、10%甘油、干燥无菌的电击杯及灭菌的50mL离心管置于冰上预冷30min;于超净工作台将预冷的菌液装入离心管中,8000rpm、4℃冷冻离心5min,弃去上清,加入10mL10%甘油并将菌体悬浮起来,8000rpm、4℃冷冻离心5min,重复上一步骤,弃去上清,加入2mL 10%甘油并将菌体悬浮起来,分装至EP管中,每管80 μ L,得到JC-12感受态细胞。

[0061] 新金色分枝杆菌JC-12的转化方法如下:

[0062] 于无菌的超净工作台在JC-12感受态细胞中加入需转化质粒(双蒸无菌水脱),混匀,冰上放置30min;30min后,将感受态细胞全部转入预冷的电击杯中,迅速擦干杯外壁,置于电穿孔仪中,2200V,5ms电击转化;电击结束后,向电击杯中加入1mL种子培养基,混匀,全部转移至EP管中,30℃摇床复苏4~6h;复苏后,离心收集细胞,去除部分上清,涂布于含抗性的斜面/固体培养基上,30℃培养箱倒置培养5~7天,得到转化后的新金色分枝杆菌JC-12。

[0063] 实施例1:CRISPR/Cas9基因编辑系统的构建及使用

[0064] 具体步骤如下:

[0065] 1、CRISPR/Cas9基因编辑系统的构建

[0066] (1)通过限制性内切酶Xba I和BamH I和T4连接酶将pMV261表达载体上的Hsp60启动子替换为Tac启动子,并通过限制性内切酶Xba I和Hind III对pMV261表达载体酶切进行线性化,获得基本骨架;

[0067] (2)通过化学合成得到Cas9基因(核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示),即Frag1;

[0068] (3)通过化学合成得到编码DNA末端集合蛋白mku的基因(核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示)以及编码DNA连接酶LigD的基因(核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示);以化学合成得到的编码DNA末端集合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因为模板,分别使用表1中的P1引物、P2引物以及P3引物、P4引物进行克隆,获得线性化的编码DNA末端集合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因;将获得的线性化的编码DNA末端集合蛋白mku的基因以及编码DNA连接酶LigD的基因通过P1和P4引物PCR融合,得到融合片段NHEJ修复基因;将得到的NHEJ修复基因通过ClonExpress II One Step Cloning Kit C112连接到

pMD18T载体上,得到重组pMD18T-LigD::mku载体;以得到的重组pMD18T-LigD::mku载体为模板,使用表1中的P5引物和P6引物进行克隆,获得Pj23119-LigD::mku表达框架,即Frag2;

[0069] (4) 将(1)中获得的基本骨架与(2)中获得的Frag1通过ClonExpress II One Step Cloning Kit C112组装(Gibson组装连接反应体系见表3),得到环形载体;通过限制性内切酶Spe I对获得的环形载体酶切进行线性化,得到线性载体;将获得的线性载体与(3)中获得的Frag2通过ClonExpress II One Step Cloning Kit C112组装(Gibson组装连接反应体系见表3),得到pML-Cas9质粒(质粒图谱见图1),其中,Cas9基因位于pMV261表达载体的Hsp60启动子的下游以及pMV261表达载体的rrnB终止子上游,由Hsp60启动子驱动表达;Pj23119启动子位于pMV261表达载体的KanR抗性基因的下游;NHEJ修复基因位于Pj23119启动子的下游以及pMV261表达载体的复制起点(ori)的上游,由Pj23119启动子驱动表达;

[0070] (5) 以pMV261表达载体为模板,使用表1中的P9引物和P10引物进行克隆得到OriM复制子,即Frag3;

[0071] (6) 以ptrc99A载体为模板,使用表1中的P7引物和P8引物进行克隆得到pMB1复制子和aadA抗性基因,即Frag4;

[0072] (7) 以新金色分枝杆菌中需编辑基因的序列为靶序列,设计可特异性靶向靶序列的靶向序列,得到sgRNA序列;由金维智生物科技公司合成此sgRNA序列并连接到pMD18T载体上,得到重组pMD18T-sgRNA载体;以得到的重组pMD18T-sgRNA载体为模板,使用表1中的P11引物和P12引物进行克隆,获得Pj23119-sgRNA-rrnB表达框架,即Frag5;

[0073] (8) 将(6)得到的Frag4、(7)得到的Frag5通过ClonExpress II One Step Cloning Kit C112组装(Gibson组装连接反应体系见表3)后与(5)得到的Frag3通过ClonExpress II One Step Cloning Kit C112组装(Gibson组装连接反应体系见表3),得到pJM-sgRNA质粒(质粒图谱见图2),其中,pJM-sgRNA质粒依次包含OriM复制子、pMB1复制子、Pj23119启动子、sgRNA序列、rrnB终止子以及aadA抗性基因。

[0074] 2、CRISPR/Cas9基因编辑系统的使用

[0075] CRISPR/Cas9基因编辑系统同时含有pML-Cas9质粒以及pJM-sgRNA质粒,此CRISPR/Cas9基因编辑系统在使用时,需先将pML-Cas9质粒导入新金色分枝杆菌中,待筛选验证成功后,再以筛选出来的新金色分枝杆菌转化子做感受态,将pJM-sgRNA质粒导入该转化子中。

[0076] 表1引物及其序列

[0077]

引物名称	引物序列(5'-3')
P1	SEQ ID NO:10: ATGGGTTCGGCGTCGGAGCAACGGGTGAC
P2	SEQ ID NO:11: CTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGTATCATTCGCGCACCACCTCACTG G
P3	SEQ ID NO:12: ATTAAAGAGGAGAATACTAGATGCGAGCCATTGGACGGGTTCGATCG CCT
P4	SEQ ID NO:13: TCACGGAGGCGTTGGGACGTTTGAGTTGG
P5	SEQ ID NO:14: TCTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTACTAGAG AAAGAGGAGAAATACTAGATGGGTTCGGCGTCGGAGCA
P6	SEQ ID NO:15: TTCGAATTCTGCAGCTTCACGGAGGCGTTGGGACGTTTGAGTTGGCCT
P7	SEQ ID NO:16: ATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCG
P8	SEQ ID NO:17: TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG
P9	SEQ ID NO:18: GTGAGCCCACCAGCTCCGTAAGTTCGGG

[0078]

P10	SEQ ID NO:19: GCCACGGATGCCACCACAGGCACT
P11	SEQ ID NO:20: GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG TATAAT
P12	SEQ ID NO:21: CATGATTACGAATTCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT

[0079] 表2 PCR扩增反应体系

[0080]

ddH ₂ O	up to 50μL
2×Phanta Max Master Mix	25μL
上游引物	2μL
下游引物	2μL
模板DNA	1μL

[0081] 表3 Gibson组装连接反应体系

[0082]

线性化载体	90ng
插入片段	180ng
5×CE II Buffer	4μL
Exnase II	2μL
ddH ₂ O	add to 20μL

[0083] 实施例2:CRISPR/Cas9基因编辑系统的应用

[0084] 具体步骤如下:

[0085] (1) CRISPR/Cas9基因编辑系统的构建

[0086] 以新金色分枝杆菌JC-12的ksdd基因作为需敲除基因,以需敲除基因的核苷酸序列为靶序列,根据靶序列设计用于特异性靶向靶序列sgRNA(核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示);按照实施例1,根据设计得到的sgRNA构建得到CRISPR/Cas9基因编辑系统;

[0087] (2) 新金色分枝杆菌JC-12的基因编辑

[0088] 以未使用CRISPR/Cas9基因编辑系统编辑的新金色分枝杆菌JC-12作为空白对照,将(1)得到的CRISPR/Cas9基因编辑系统中的pML-Cas9质粒转化到新金色分枝杆菌JC-12感受态细胞中,涂布在斜面/固体培养基(含50μg/mL卡那霉素)上,30℃培养3~4天;挑取转化子,用表4的P13引物和P14引物进行PCR初步验证,挑取验证成功的转化子做感受态,在制备感受态的同时加入0.5mM IPTG于30℃诱导,将(1)得到的方案一的CRISPR/Cas9基因编辑系统中的pJM-sgRNA质粒转化到转化子感受态细胞中,涂布在斜面/固体培养基(含50μg/mL卡那霉素和50μg/mL链霉素)上,30℃培养3~4天;挑取转化子,用表4的P13引物和P14引物进行PCR初步验证,挑取验证成功的转化子测序验证。

[0089] 检测使用CRISPR/Cas9基因编辑系统对新金色分枝杆菌JC-12基因进行编辑的基因编辑效率,检测结果为:ksdd的敲除效率可达到50%。

[0090] 挑取空白对照组的新金色分枝杆菌JC-12以及使用CRISPR/Cas9基因编辑系统敲除ksdd基因后的新金色分枝杆菌JC-12/ksdd的单菌落,分别接种于种子培养基中于30℃培养48h,得到种子液;将种子液按照10%的接种量接种至发酵培养基中于30℃、160rpm培养168h,得到发酵液;将发酵液离心收集菌体;将菌体通过细胞破碎仪破碎,获取粗酶液;将粗酶液离心取沉淀,得到3-甾酮-Δ¹-脱氢酶,检测空白对照组的新金色分枝杆菌JC-12发酵得到的粗酶液以及使用CRISPR/Cas9基因编辑系统敲除ksdd基因后的新金色分枝杆菌JC-12/ksdd发酵得到的粗酶液的酶活,检测结果为:使用的CRISPR/Cas9基因编辑系统敲除ksdd基因后的新金色分枝杆菌JC-12/ksdd发酵得到的粗酶液的3-甾酮-Δ¹-脱氢酶酶活较空白对照组的新金色分枝杆菌JC-12发酵得到的粗酶液的3-甾酮-Δ¹-脱氢酶酶活下降了

80%。

[0091] 表4引物及其序列

[0092]	引物名称	引物序列(5'-3')
	P13	SEQ ID NO:22: CGGCTCATTGAGCAACCGATAC
	P14	SEQ ID NO:23: CGCCCGACACAGCCTTTCA

[0093] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种CRISPR/Cas9基因编辑系统及其应用

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4107

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

atggataaaa agtattccat tggcctggac atcggcacca attctgtggg ttgggcagtc 60
atcaccgacg aatacaaggt cccatccaag aagttcaagg tgctcggtaa taccgatcgc 120
cactctatca agaaaaacct gatcggcgcc ctgctcttcg actccggcga aaccgcagaa 180
gcaacccgtc tcaagcgtac cgcacgtcgc cgctacaccc gccgtaagaa tcgcatctgc 240
tacctccagg aaatcttctc taatgagatg gcaaaggtgg atgactcctt tttccaccgc 300
ctcgaagagt ccttcctggt ggaagaggac aagaaacacg agcgccatcc tatcttcggc 360
aatattgtcg atgaagtcgc atatcatgaa aaatacccaa ccatttacca tctccgtaaa 420
aaactcgtcg attccaccga taaggcagat ctccgcctga tctatctggc actggcccac 480
atgatcaagt ttcgtggcca cttcctgatc gaaggtgacc tcaatccaga caattccgac 540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcaa acctacaacc agctctttga ggaaaaccca 600
atcaacgcat ctggcgtcga cgcaaaagcc atcctgtccg cccgtctctc caagtctcgt 660
cgccctgaaa acctcattgc ccagctccct ggcgagaaga aaaacggtct gtteggcaat 720
ctgatcgccc tgtctctggg tctgaccca aatttcaaat ccaactttga tctcgcaaaa 780
gatgccaagc tgcagctctc taaggacacc tacgatgatg acctggataa cctcctcgcc 840
cagatcggcg accagtacgc cgatctcttc ctgcgagcca agaacctctc tgacgcaatt 900
ctgctgtccg acatcctgcg cgtgaacacc gaaatcacta aggcaccact ctctgcctcc 960
atgattaagc gctacgacga gcatcatcag gatctcactc tcctcaaagc cctggtccgc 1020
cagcagctcc cagagaagta caaggaaatc ttttcgacc aatccaaaaa cggctacgca 1080
ggttacatcg atggcggcgc ctctcaggaa gagttttaca aattcattaa gccaatcctc 1140
gaaaagatgg acggcaccga ggaactgctg gtgaaactca accgtgaaga tctcctgcgc 1200
aaacagcgca ccttcgacaa cggttccatt cctcaccaga tccacctggg cgaactgcac 1260
gcaatcctcc gccgtcaaga ggactttctac ccattcctga aggacaaccg tgaaaagatc 1320
gaaaagattc tcaccttcg catcccttac tacgtgggtc ctctcgcccg tggcaattcc 1380
cgcttcgcct ggatgactcg caaatctgaa gagaccatca ccccttgga ctttgaggaa 1440
gtcgtcgata aaggcgctc tgcccaatcc ttcacgagc gcatgaccaa cttecgacaag 1500
aacctcccaa acgagaaaag gctgcctaag cattccctcc tgtacgagta ctttactgtc 1560
tacaatgagc tgactaaggt gaagtatgtc actgaaggca tgcgtaagcc agcctttctc 1620
tccggcgagc agaaaaaggc aatcgtcgac ctctgttta aaaccaaccg caaagtgact 1680

```

```

gtgaaacagc tcaaggaaga ttactttaaa aaaatcgaat gcttcgattc tgtggaaatc 1740
tccggcgtgg aggatcgttt caacgcctcc ctgggtacct atcacgacct cctgaagatt 1800
atcaaggaca aagattttct ggataacgag gaaaacgagg acattctcga ggacattgtg 1860
ctgaccctga ccctcttcga ggaccgag atgatcgagg agcgcctgaa gacctatgcc 1920
cacctctttg acgacaaggt catgaagcaa ctcaagcgcc gccgctatac cggttggggc 1980
cgtctctccc gtaagctcat caatgggtatc cgcgacaagc aatccggcaa gactatcctg 2040
gactttctga agtctgacgg cttcgccaac cgcaatttta tgcaactgat ccacgacgat 2100
tccctgacct tcaaagagga catccagaaa gcccaagtgt ccggtcaagg cgactccctg 2160
cacgaacaca tcgccaatct ggaggttcc ccagcaatca agaaggcat cctgcagacc 2220
gtcaagggtg tggacgaact cgtcaaagt atgggtcgcc acaaaccaga aaacatcgctc 2280
atcgagatgg cccgtgagaa ccagaccacc cagaaaggcc agaaaaactc ccgtgagcgc 2340
atgaagcgca ttgaagaagg cattaaagag ctcggtcttc agatcctgaa agagcatcct 2400
gtcgagaaca cccaactgca gaatgagaag ctgtatctgt attatctcca gaacggccgc 2460
gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aaccgtctct ctgattacga tgtggacat 2520
atcgtccctc agtctttcct gaaagacgac tctattgaca acaaagtcct caccgcctcc 2580
gacaagaacc gcggcaagtc cgataacgtg ccatccgagg aggtcgtgaa gaagatgaag 2640
aactactggc gccagctgct caacgccaag ctgatcactc agcgcaagtt cgataacctg 2700
accaaggccg aacgtggtgg tctctccgag ctcgacaagg caggctttat caagcgccaa 2760
ctcgtggaga ctgccaaat cactaaacac gtcgcccaga tcctcgactc ccgcatgaat 2820
accaagtacg atgaaaatga caagctcatc cgcgaagtga aagtcattac cctgaagtcc 2880
aaactggtct ctgactttcg caaggatttc cagttctaca aggtccgcga gattaataac 2940
tatcatcatg cacacgatgc atacctcaac gcagtcgtgg gtaccgcact gatcaagaag 3000
taccctaaac tggagtccga gttcgtctat ggcgactaca aggtgtacga cgtccgcaaa 3060
atgattgcca agtccgagca ggagatcggc aaagcaactg ccaaattttt cttttactcc 3120
aacatcatga acttcttcaa gaccgaaatc accctcgcca acggtgaaat ccgcaaactg 3180
ccactcatcg agactaatgg tgaaaccggc gagatcgtct gggacaaggg ccgtgacttc 3240
gcaaccgtcc gcaaggctct ctccatgcca caggtcaaca tcgtgaaaaa gaccgaggtg 3300
caaaccggcg gcttctccaa ggagtctatc ctgcctaaac gcaattccga taagtcatt 3360
gcacgcaaaa aggactggga ccctaaaaaa tacggcggtt tcgactcccc aactgtcgca 3420
tattctgtgc tcgtggtcgc caaagtggaa aaggcgaaat ccaaaaagct caagtccgtc 3480
aaggaactcc tgggtatcac catcatggaa cgctctctct ttgagaagaa ccctatcgat 3540
ttcctcgaag caaaagggtt caaggaggtg aagaaagatc tgatcatcaa gctccctaaa 3600
tactccctct tcgagctcga gaacggccgc aagcgtatgc tggcctccgc aggtgaactg 3660
caaaaaggta acgagctggc actcccatcc aagtatgtca actttctcta cctggcctcc 3720
cactacgaaa agctgaaagg ttccccagaa gacaacgagc agaaacagct gtctgtggag 3780
cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gagcagatct ccgagttctc taaacgcgtc 3840
attctggccg atgccaacct cgataaagt ctctccgctt acaataagca tcgtgataag 3900
ccaatccgtg agcaggcaga gaacatcatt cacctgttca ctctaccaaa cctgggtgca 3960
ccagccgcct ttaagtactt cgacaccacc atcgaccgca agcgctatac ctccactaag 4020

```

gaggtgctcg atgcaaccct gatccaccag tctatcacgc gcctctacga gactcgcac 4080
gatctctccc agctgggtgg cgactaa 4107

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ttgacagcta gctcagtcct aggtataatg ctage 35

<210> 3

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atgcgagcca tttggacggg ttcgatcgcc ttcgggctgg tgaacgtgcc ggtcaaggtg 60
tacacgcta ccgacagcca cgacatcagg ttccaccagg tgcacgcca ggacaacgga 120
cgcatccggc acaagcgcgt ctgcgaggcg tgtggcgagg tggtcgacta ccgcgatctt 180
gcccgggcct acgagtccgg cgacggccaa atggtggcga tcaccgacga cgacatcgcc 240
agcttgccctg aagaacgcag ccgggagatc gaggtgttgg agttcgtccc cgccgccgac 300
gtggaccgga tgatgttcga ccgcagctac tttttggagc ctgattcgaa gtcgtcgaaa 360
tcgtatgtgc tgctggctaa gacactcgcc gagaccgacc ggatggcgat cgtgcatttc 420
acgctgcgca acaagaccag gctggcgggc ttgcgcgtca aggatttcgg caagcgagag 480
gtgatgatgg tgcacacgtt gctgtggccc gatgagatcc gcgacccgga cttcccgggtg 540
ctggaccaga aggtggagat caaacccgcg gaactcaaga tggccggcca ggtggtggac 600
tcgatggccg acgacttcaa tccggaccgc taccacgaca cctaccagga gcagttacag 660
gagctgatcg acaccaaact cgaaggtggg caggcattta ccgccgagga ccaaccgagg 720
ttgctggacg agcccgaaga cgtctccgac ctgctcgcca agctggaggc cagcgtgaag 780
gcgcgctcga aggccaactc aaacgtccca acgcctccgt ga 822

<210> 4

<211> 2280

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atgggttcgg cgtcggagca acgggtgacg ctgaccaacg ccgacaaggt gctctatccc 60
gccaccggga ccacaaagtc cgatatcttc gactactacg ccggtgttgc cgaagtcatg 120
ctcggccaca tcgcgggacg gccggcgacg cgcaagcgtt ggcctaacgg cgtcgaccaa 180
cccgcgttct tcgaaaagca gttggcgctt tcggcgccgc cttggctgtc acgtgcaacg 240
gtggcgacc ggtccgggac gacgacctat ccgatcatcg atagcgcaac cgggctggcc 300
tggatcgccc aacaggcggc gctggaggtg cacgtgccgc agtggcggtt tgcgcccag 360
cccggatcag gtgagttaaa tccgggcccc gcaacgcgtt tgggtgttcga cctggaccgc 420

ggccaaggcg tgatgatggc ccagctggcc gaggtggcgc gcgcggttcg tgatcttctc 480
 gccgatatcg gggtgggtcac cttcccggtc accagcggca gcaagggatt gcatctgtac 540
 acaccgctgg atgagccggt gagcagcagg ggagccacgg tgttggccaa gcgcgtcgcg 600
 cagcgattgg agcaggcgat gcccgcgttg gtcacctga ccatgaccaa aagcctgcgg 660
 gccgggaagg tgtttgtgga ctggagccag aacagcggct cgaagaccac catcgcgccg 720
 tactcactac gtggccggac gcatccgacc gtcgcggcgc cacgcacctg ggcgagctc 780
 gacgaccccg cactgcgtca gctctcctac gacgaggtgc tgacctggat tgcccgcgac 840
 ggcgatctgc tcgagcggct ggatgccgac gctccggtag cggaccgggt gaccgatac 900
 cgccgcatgc gcgacgcac gaaaactccc gagccgattc ccacggcgaa acccgttacc 960
 ggagacggca atacgttcgt catccaggag catcacgcgc gtcggccgca ctacgatttc 1020
 cggctggaat gcgacggcgt gctggtctcg tgggcggtac cgaaaaacct gcccgacaac 1080
 acatcggtta accatctagc gatacacacc gaggaccacc cgctggaata cgccacgttc 1140
 gagggcgcca ttcccagcgg ggagtacggc gccggcaagg tgatcatctg ggactccggc 1200
 acttacgaca ccgagaagtt ccacgatgac ccgcacacgg gggaggtcat cgtgaatctg 1260
 caccgcggcc ggatctctgg gcgttatgcg ctgattcgga ccaacggcga tcggtggctg 1320
 gcgcaccgcc taaagaatca gaaagaccag aaggtgttcg agttcgacaa tctggcccca 1380
 atgcttgcca cgcacggcac ggtggccggt ctaaaggcca gccagtgggc gttcgaaggc 1440
 aagtgggacg gctaccggtt gctggttgag gctgaccacg gcgccgtgcg gctgcggtcc 1500
 cgcagcgggc gcgatgtcac cgccgagtat ccgcaattgc gggcattggc ggaggatctc 1560
 gccgatcacc acgtggtgct ggacggcgag gccgtcgtac ttgactcctc tgggtgtgcc 1620
 agcttcagcc agatgcagaa tcggggccgc gacaccctg tcgagttctg ggcgttcgac 1680
 ctgctctacc tcgacggccg cgcgctgcta ggcaccctg accaagaccg gcgtaagctg 1740
 ctcgaaaccc tagctaacgc aaccagtctc accgttccc agctgctgcc cggtgacggc 1800
 gcccaagcgt ttgcgtgctc gcgcaagcac ggctgggagg gcgtgatcgc caagaggcgt 1860
 gactcgcgct atcagccggg ccggcgctgc gcgtcgtggg tcaaggacaa gactggaac 1920
 acccaggaag tcgtcattgg tggctggcgc gccggggaag gcgggcgcag cagtggcgctc 1980
 gggctcgtgc tcatgggcat ccccgtcca ggtgggctgc agttcgccgg gcgggtcggt 2040
 accggcctca gcgaacgcga actggccaac ctcaaggaga tgctggcgcc gctgcatacc 2100
 gacgagtccc cttcgcagct accactgccc gcgcgtgacg ccaaggcat cacatatgtc 2160
 aagccggcgc tggttgcaga ggtgcgctac agcgagtgga ctccggaggg ccggctgcgt 2220
 caatcaagct ggcgtgggct gcggccggac aagaaacca gtgaggtggt gcgcgaatga 2280
 <210> 5
 <211> 165
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 5
 aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg ttttttgcgc cgacatcata 60
 acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc tcgtataatg 120
 tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gaatt 165

<210> 6

<211> 1896

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

gtgagccac cagctccgta agttcgggtg ctgtgtggct cgtacccgcg cattcaggcg 60
gcagggggtc taacgggtct aaggcggcgt gtacggccgc cacagcggct cttagcggcc 120
cggaacgctc ctcgaaacga cgcattgtgtt cctcctgggtt ggtacagggtg gttgggggtg 180
ctcggctgtc gctgggtgtt catcatcagg gctcgacggg agagcggggg agtgtgcagt 240
tgtgggggtg cccctcagcg aaatatctga cttggagctc gtgtcggacc atacaccggt 300
gattaatcgt ggtttattat caagcgtgag ccacgtcgcc gacgaatttg agcagctctg 360
gctgccgtac tggtccttgg caagcgacga tctgtctgag gggatctacc gccaaagccg 420
cgcgctggcc ctaggccgcc ggtacatcga ggccaaccca acagcgttg caaacctgct 480
ggctgtggac gtagaccatc cagacgcagc gctccgagcg ctcagcgcgc gggggtccca 540
tccgtgccc aacgcgatcg tgggcaatcg cgccaacggc cacgcacacg cagtgtgggc 600
actcaacgcc cctgttccac gcaccgaata cgcgcgcggt aagccgctcg catacatggc 660
ggcgtgcgcc gaaggccttc ggcgcgccgt cgatggcgac cgagttact caggcctcat 720
gacaaaaaac cccggccaca tcgcctggga aacggaatgg ctccactcag atctctacac 780
actcagccac atcgaggccg agtcggcgcg gaacatgcc aacgcgcgct ggcgtcagca 840
gaccacgtac aaagcggctc cgacgccgct agggcggaat tgcgcactgt tcgattccgt 900
caggttgttg gcctatcttc ccgccctcat gcggatctac ctgccgacc ggaacgtgga 960
cggactcggc cgcgcgatct atgccgagtg ccacgcgcga aacgccgaat ttccgtgcaa 1020
cgacgtgtgt cccggaccgc taccggacag cgaggtccgc gccatcgcca acagcatttg 1080
gcgttggatc acaaccaagt cgcgcatatt ggcgacggg atcgttgtct acgaggccac 1140
actcagtcgc cgccatgcgg ccatctcgcg gaaggcgca gcagcgcgc cggcggcgag 1200
cacagttgcg cggcgcgcaa agtccgcgtc agccatggag gatttgctat gagcgacggc 1260
tacagcgacg gctacagcga cggctacaac tggcagccga ctgtccgcaa aaagcggcg 1320
gtgaccgccg ccgaaggcgc tcgaatcacc ggactatccg aacgccacgt cgtccggctc 1380
gtggcgagc aacgcagcga gtggttcgcc gagcaggtg cacgccgcga acgcatccgc 1440
gcctatcacg acgacgagg ccactcttg ccgcaaacgg ccaaacattt cgggctgcat 1500
ctggacaccg ttaagcgact cggctatcgg gcgaggaaag agcgtgcggc agaacaggaa 1560
gcggctcaaa agggccacaa cgaagccgac aatccaccgc tgttctaacg caattgggga 1620
gcgggtgtcg cgggggttcc gtggggggtt ccgttgcaac gggtcggaca ggtaaaagtc 1680
ctggtagacg ctagttttct ggtttgggcc atgcctgtct cgttgctgtt ttcgttgccg 1740
ccgttttgaa taccagccag acgagacggg gttctacgaa tcttggtcga taccaagcca 1800
tttccgtga atatcgggga gtcaccgcc agaatcgggt gttgtggtga tgtacgtggc 1860
gaactccgtt gtagtgcctg tggtagcatc cgtggc 1896

<210> 7

<211> 589

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60
agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 240
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 360
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420
gagaaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact 540
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 8

<211> 792

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

atgaggggaag cggatgatcg cgaagtatcg actcaactat cagaggtagt tggcgtcatc 60
gagcgccatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt acggctccgc agtggatggc 120
ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg tgaccgtaag gcttgatgaa 180
acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttggaaactt cggcttcccc tggagagagc 240
gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcacg acgacatcat tccgtggcgt 300
tatccagcta agcgcgaact gcaatttggg gaatggcagc gcaatgacat tcttgcaggt 360
atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct tgctgacaaa agcaagagaa 420
catagcgttg ccttggttagg tccagcggcg gaggaactct ttgatccggg tcctgaacag 480
gatctatttg aggcgctaaa tgaaacctta acgctatgga actcgccgcc cgactgggct 540
ggcgtatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt ggtacagcgc agtaaccggc 600
aaaatcgcg cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg agcgccctgcc ggcccagtat 660
cagcccgtca tacttgaagc tagacaggct tatcttggac aagaagaaga tcgcttggcc 720
tcgcgcgcag atcagttgga agaatttgtc cactacgtga aaggcgagat caccaaggta 780
gtcggcaaat aa 792

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gtttt 45

<210> 10

<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
atgggttcgg cgtcggagca acgggtgac 29
<210> 11
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
ctagtattct cctctttaat ctctagtatc attcgcgcac cacctcactg g 51
<210> 12
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12
attaaagagg agaatactag atgcgagcca tttggacggg ttcgatcgcc t 51
<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 13
tcacggaggc gttgggacgt ttgagttgg 29
<210> 14
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 14
tctagattga cagctagctc agtcctaggt ataatgctag ctactagaga aagaggagaa 60
atactagatg ggttcggcgt cggagca 87
<210> 15
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 15
ttcgaattct gcagcttcac ggaggcgttg ggacgtttga gttggcct 48
<210> 16
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列
<400> 16
atgagggaag cggatgatcgc cgaagtatcg 30
<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 17
tttccatagg ctccgcccc ctgacgag 28
<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 18
gtgagccac cagctccgta agttcggg 28
<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 19
gccacggatg ccaccacagg cact 24
<210> 20
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 20
gcctgcaggt cgactctaga ggatccttga cagctagctc agtcctaggt ataata 55
<210> 21
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 21
catgattacg aattcaaaaa aagcaccgac tcggtgccac tt 42
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 22
cggtcattg agcaaccgat ac 22

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

cgccccgacac agcctttca 19

<210> 24

<211> 102

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

ctcgacagta gtcgttgaga gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgctttt tt 102

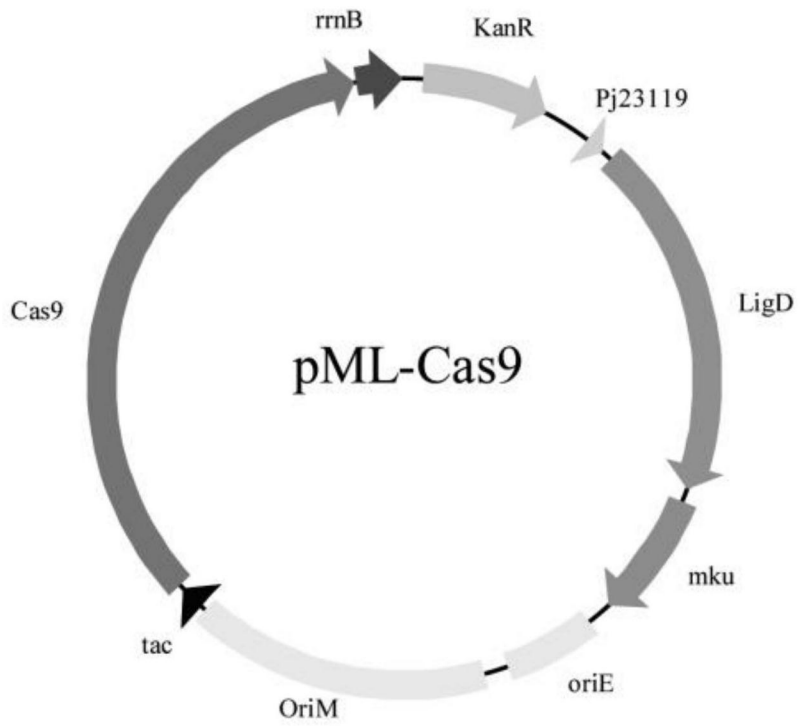


图1

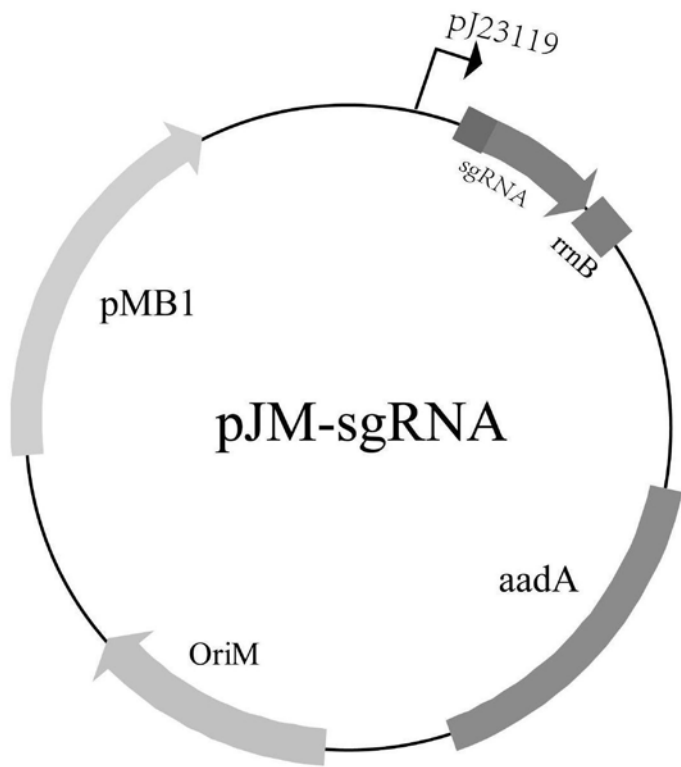


图2