

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年2月29日 (29.02.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/041653 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/115093
- (22) 国际申请日: 2023年8月25日 (25.08.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202211035342.8 2022年8月26日 (26.08.2022) CN
202310457880.4 2023年4月24日 (24.04.2023) CN
- (71) 申请人: 广州瑞风生物科技有限公司(GUANGZHOU REFORGENE MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。浙江迅识生物科技有限公司(ZHEJIANG SYNSORBIO TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国浙江省绍兴市滨海新区海天道21号1号楼211室-3, Zhejiang 312300 (CN)。
- (72) 发明人: 梁峻彬(LIANG, Junbin); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。梁兴祥(LIANG, Xingxiang); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。孙阳(SUN, Yang); 中国浙江省绍兴市滨海新区海天道21号1号楼211室-3, Zhejiang 312300 (CN)。徐辉(XU, Hui);

- 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。司凯威(SI, Kaiwei); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。李秋婷(LI, Qiuting); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。彭志琴(PENG, Zhiqin); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。皇甫德胜(HUANGFU, Desheng); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。
- (74) 代理人: 上海弼兴律师事务所(SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市徐汇区小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: CRISPR-CAS13 SYSTEM AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种CRISPR-Cas13系统及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to a CRISPR-Cas13 system and use thereof, and also relates to a Cas13 protein, a fusion protein, and a guide polynucleotide. The Cas13 protein has at least 90% sequence identity compared to SEQ ID NO: 1. The fusion protein comprises the Cas13 protein fused to a protein domain and/or a polypeptide tag. The guide polynucleotide comprises a same-direction repetition sequence and a guide sequence that has been engineered to hybridize with the target RNA. The same-direction repetition sequence has at least 70% sequence identity to any of SEQ ID NOs: 3 and 80-87. The CRISPR-Cas13 system comprises the Cas13 protein that has at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1, or a coding nucleic acid therefor, and the guide polynucleotide or a coding nucleic acid therefor.

(57) 摘要: 涉及一种CRISPR-Cas13系统及其应用, 还涉及一种Cas13蛋白、融合蛋白和指导多核苷酸。所述Cas13蛋白具有与SEQ ID NO:1相比至少90%的序列同一性。所述融合蛋白包含融合至蛋白结构域和/或多肽标签的所述Cas13蛋白。所述指导多核苷酸包含同向重复序列和工程化以与靶RNA杂交的指导序列, 所述同向重复序列与SEQ ID NO:3、80-87中任一项具有至少70%的序列同一性。所述CRISPR-Cas13系统包含与SEQ ID NO:1相比具有至少90%序列同一性的Cas13蛋白或其编码核酸, 以及指导多核苷酸或其编码核酸。

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种 CRISPR-Cas13 系统及其应用

技术领域

本披露涉及 CRISPR 基因编辑领域，具体涉及一种 CRISPR-Cas13 系统及其应用。

背景技术

CRISPR-Cas13 是一种基于细菌免疫系统的 RNA 靶向和编辑系统，可保护细菌免受病毒侵害。CRISPR-Cas13 系统类似于 CRISPR-Cas9 系统，但与靶向 DNA 的 Cas9 蛋白不同，Cas13 蛋白靶向 RNA。

CRISPR-Cas13 属于 Type VI CRISPR-Cas13 系统，它包含一个单一的效应蛋白 Cas13。目前，CRISPR-Cas13 根据系统发育可分为多个亚型（如 Cas13a、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d）。然而，目前对于发现尺寸紧凑（例如，适用于 AAV 递送）、在哺乳动物细胞中编辑效率高（例如，RNA 靶向/切割活性）和/或细胞毒性低（例如，旁式 RNA 降解引起的细胞休眠和细胞凋亡）的新 Cas13 系统仍存在迫切的需求。

发明内容

为解决现有技术中缺乏尺寸紧凑、在哺乳动物细胞中编辑效率高和/或细胞毒性低的 Cas13 系统的缺陷的技术问题，本披露提供一种靶向靶 RNA 的 CRISPR-Cas13 系统及其应用。

本披露的一方面涉及一种 Cas13 蛋白，其氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90% 的序列同一性。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化与靶 RNA 杂交。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能够与靶 RNA 序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 95% 的序列同一性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 96% 的序列同一性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有

与 SEQ ID NO: 1 相比至少 97% 的序列同一性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 98% 的序列同一性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 99% 的序列同一性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 99.5% 的序列同一性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

本披露的序列为 SEQ ID NO: 1 的 Cas13 蛋白 (即 C13-2 蛋白) 是基于 CNGB 数据库 (中国国家基因库) 中原核基因组和宏基因组的生物信息学分析以及后续的活性验证而鉴定得到。在一些实施方案中, 本披露所述 Cas13 蛋白来自包含与 CNGB 数据库中编号为 CNA0009596 所示基因组的平均核苷酸同一性 (ANI) $\geq 95\%$ 的基因组的物种 (species)。

平均核苷酸同一性 (average nucleotide identity, ANI) 是一种在核酸水平上评价两个基因组之间所有直系同源蛋白编码基因的相似性的指标, 对于细菌/古细菌一般以阈值 ANI=95% 来作为判断是否为同一物种的依据 (Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):19126-31), 因此, 本披露以上述阈值进行界定, 认为与参考基因组 ANI 值 $\geq 95\%$ 的物种均为同一物种, 其中的 Cas13 蛋白与本披露要求保护的蛋白具有同源性, 功能相似, 属于本披露的范围。ANI 分析工具包括 FastANI、JSpecies 等程序。

在一些实施方案中, 与 SEQ ID NO: 1 相比, 所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个突变, 例如单个氨基酸插入、单个氨基酸缺失、单个氨基酸取代, 或其组合。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含一个或多个突变并且具有降低的 RNA 切割活性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含一个突变并且具有降低的 RNA 切割活性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在一个或两个 HEPN 结构域中包含一个或多个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在任意一个 HEPN 结构域中包含一个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。

所述“基本上缺乏 RNA 切割活性”是指与野生型 Cas13 蛋白相比仅保留 $\leq 50\%$ 、 $\leq 40\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 20\%$ 、 $\leq 10\%$ 、 $\leq 5\%$ 或 $\leq 1\%$ 的 RNA 切割活性, 或无可检测的 RNA 切割活性。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的 RxxxxH 基序 (x 表示任意氨基酸, RxxxxH 也可记为 Rx4H 或 R4xH) 包含一个或多个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和/或 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 750-755 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序和 750-755 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 750-755 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxH、RxxxxA 或 AxxxxA。在一些实施方案中,所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxH。在一些实施方案中,所述 RxxxxH 基序突变为 RxxxxA。在一些实施方案中,所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxA。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 的对应位置包含 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 的对应位置突变为 A (丙氨酸)。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 R210 和 H215 的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 R750 和 H755 的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750 和 H755 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R750、H755、R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基

R210、H215、R785 和/或 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 R210、R750 或 R785 的对应位置突变为 A。在一些实施方案中，所述 H215、H755 或 H790 的对应位置突变为 A。在一些实施方案中，所述 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 的对应位置都突变为 A。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和/或 785-790 位 RxxxxH 基序引入突变而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 位置引入 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个突变而得到。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 位置突变为 A（丙氨酸）而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750 和 H755 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R750、H755、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过在如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 40-91 位、146-153 位、158-176 位、182-209 位、216-253 位、271-287 位、341-353 位、379-424 位、456-477 位、521-557 位、575-588 位、609-625 位、700-721 位、724-783 位、796-815 位、828-852 位或 880-893 位的对应位置包含至少一个突变。

在一些实施方案中，与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变：R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314、R320、R328、N332、R341、N346、R358、N372、N383、N390、N394、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、R308+N68、N394+N68、N87+N68、R308+N265、N394+N265、N87+N265、R308+N68+N265、N87+N68+N265、T7、A16、S260、A263、M266、N274、F288、M302、N303、L304、V305、I311、D313、H324、P326、H327、N332、N346、T353、T360、E365、A373、M380、S382、K395、Y396、D402、D411、S418。

在一些实施方案中，与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在与

如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变: R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314。

在一些实施方案中, 与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白相比, 所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变: R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、N394+N265、N87+N265、A263、M266、N274、F288、V305、I311、D313、H324、T360、E365、A373、M380、D402、D411、S418。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R11 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N34 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R35 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R47 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R58 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R63 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R64 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N68 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N87 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N274 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R276 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R290 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R294 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N299 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N303 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R308 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R314 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R320 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R328 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N332 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R341 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N346 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R358 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N372 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N383 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N390 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N394 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R47 和 R290 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R47 和 R314 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R290 和 R314 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R47、R290 和 R314 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R308 和 N68 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N394 和 N68 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N87 和 N68 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R308 和 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N394 和 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N87 和 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R308、N68 和 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N87、N68 和 N265 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 T7 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 A16 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 S260 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 A263 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 M266 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N274 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 F288 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 M302 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N303 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 L304 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 V305 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 I311 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 D313 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 H324 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 P326 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 H327 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N332 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 N346 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 T353 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 T360 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 E365 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 A373 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 M380 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 S382 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 K395 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 Y396 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 D402 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 D411 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 S418 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中，与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在表 24 或表 29 中 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的突变位点的对应位置突变为相同的氨基酸残基。

在一些实施方案中，与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在表 24 或表 29 中 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的突变位点的对应位置包含相同的突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由如 SEQ ID NO: 1 所示的序列在以下位置引入任意一种或更多种突变而得到：R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314、R320、R328、N332、R341、N346、R358、N372、N383、N390、N394、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、R308+N68、N394+N68、N87+N68、R308+N265、N394+N265、N87+N265、R308+N68+N265、N87+N68+N265、T7、A16、S260、A263、M266、N274、F288、M302、N303、L304、V305、I311、D313、H324、P326、H327、N332、N346、T353、T360、E365、A373、M380、S382、K395、Y396、D402、D411 和 S418。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由如 SEQ ID NO: 1 所示的序列在以下位置引入任意一种或更多种突变而得到：N34、R64、N68、N265、R276、R294、N299、R314、

R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、N394+N265、N87+N265、A263、M266、N274、F288、V305、I311、D313、H324、T360、E365、A373、M380、D402 和 D411。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由如 SEQ ID NO: 1 所示的序列引入表 24 或表 29 中任意一种或更多种突变而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 91-120 位、141-180 位、211-240 位、331-360 位、351-400 位、431-460 位、461-500 位、511-550 位、611-640 位、631-660 位、661-690 位、691-760 位、821-860 位或 861-890 位的对应位置发生序列缺失而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 348-350 位、521-556 位或 883-893 位的对应位置包含一个或多个氨基酸的缺失。

在一些实施方案中，所示序列缺失中缺失 ≤ 300 个、 ≤ 200 个、 ≤ 150 个、 ≤ 100 个、 ≤ 90 个、 ≤ 80 个、 ≤ 70 个、 ≤ 60 个、 ≤ 50 个、 ≤ 40 个、 ≤ 30 个、 ≤ 20 个或 ≤ 10 个氨基酸残基。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由如 SEQ ID NO: 1 所示的序列在 91-120 位、141-180 位、211-240 位、331-360 位、351-400 位、431-460 位、461-500 位、511-550 位、611-640 位、631-660 位、661-690 位、691-760 位、821-860 位或 861-890 位发生序列缺失而得到。

所述序列缺失为 1 个或更多个氨基酸残基的缺失。

本披露的另一方面涉及融合蛋白。

在本披露的一些实施方案中，所述融合蛋白包含本文所述的 Cas13 蛋白或其功能片段，以及与所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合的以下任意一种或更多种：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

在本披露的一些实施方案中，所述融合蛋白包含本文所述的 Cas13 蛋白或其功能片段，以及与所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合的以下任意一种或更多种：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

在本披露的一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白或其功能片段。在一些实施方案中，所述融合不改变

所述的 Cas13 蛋白和/或其功能片段的原有功能。

所述不改变 Cas13 蛋白或其功能片段的原有功能是指融合后的蛋白在与 gRNA 组合使用时仍具有识别、结合和/或切割靶 RNA 的能力。融合后的蛋白与 gRNA 组合使用时识别、结合或切割靶 RNA 的能力相比所述的 Cas13 蛋白与 gRNA 组合使用时识别、结合或切割靶 RNA 的能力可能有所提高或降低，但只要所述融合后的蛋白与 gRNA 组合使用时可有效地识别、结合或切割靶 RNA，则都属于“不改变 Cas13 蛋白的原有功能”的情况。

在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白的功能片段。例如，在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失核酸酶结构域的部分序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 HEPN-1_I、HEPN-1_II、HEPN-2、NTD、Helical-1 和/或 Helical-2 对应的序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 HEPN-1_I、HEPN-1_II和/或 HEPN-2 对应的序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 HEPN-1_I对应的序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 HEPN-1_II对应的序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 HEPN-2 对应的序列后所得的片段。在一些实施方式中，所述功能片段为所述 Cas13 蛋白缺失与 C13-2 的 NTD 和 HEPN-1_I 对应的序列后所得的片段。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合至选自以下的任意一种或更多种：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合亚细胞定位信号。在一些实施方案中，所述亚细胞定位信号任选自核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)、叶绿体定位信号或线粒体定位信号。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合至选自以下的任意一种或更多种：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合亚细胞定位信号。在一些实

实施方案中，所述亚细胞定位信号任选自核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)、叶绿体定位信号或线粒体定位信号。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源核定位信号(NLS)融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源核输出信号(NES)融合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与蛋白结构域和/或多肽标签共价连接。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与蛋白结构域和/或多肽标签直接共价连接。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与蛋白结构域和/或多肽标签通过连接序列共价连接；进一步地，在一些实施方案中，所述连接序列为氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签通过刚性连接肽序列连接。在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白部分与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签通过柔性连接肽序列连接。在一些实施方案中，所述刚性连接肽序列为 A(EAAAK)₃A (SEQ ID NO: 279)。在一些实施方案中，所述柔性连接肽序列为(GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 280)。

在一些实施方案中，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能与靶 RNA 序列特异性结合。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能与靶 RNA 序列特异性结合。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白的功能片段，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能与靶 RNA 序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白的功能片段，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能序列特异性结合并切割靶 RNA。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能够与靶 RNA 序列特异性结合。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白的功能片段，所述融合蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能与靶 RNA 序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述融合蛋白的结构为 NLS-Cas13 蛋白-SV40 NLS-nucleoplasmin（核质素）NLS。

本披露的另一方面涉及指导多核苷酸，所述指导多核苷酸包含(i)与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项具有至少 50%的序列同一性的同向重复序列，该同向重复序列连接至(ii)工程化以与靶 RNA 杂交的同源或异源指导序列，所述指导多核苷酸能够与 Cas13 蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物与所述靶 RNA 的序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白为 Cas13a、Cas13b、Cas13c 或 Cas13d。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或 100%的序列同一性。在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 80%的序列同一性。在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 85%的序列同一性。在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 90%的序列同一性。在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 95%的序列同一性。在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3、81、82、84 和 87 中任一项相比具有至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 87 中任一项相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或 100%的序列同一

性。

在一些实施方案中，所述同向重复序列在对应于 SEQ ID NO: 3 的第 26 位碱基为 A。

在一些实施方案中，所述同向重复序列为 GGAAGATN₁ACTCTACAAACCTGTAGN₂GN₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁ (SEQ ID NO: 277)；其中，N₁ 和 N₃-N₁₁ 任选自 A、C、G、T；N₂ 任选自 A 和 G。

在一些实施方案中，所述同向重复序列为 GGAAGATN₁₂ACTCTACAAACCTGTAGN₁₃GN₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁N₂₂ (SEQ ID NO: 278)；其中，N₁₂、N₁₃、N₁₉ 和 N₂₁ 任选自 A 和 G，N₁₄ 任选自 A 和 T，N₁₅ 和 N₁₆ 任选自 C 和 T，N₁₇ 和 N₁₈ 任选自 G 和 T，N₂₀ 和 N₂₂ 任选自 C 和 G。

在一些实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的 3'端。在一些实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的 5'端。

在一些实施方案中，所述指导序列包含 15-35 个核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶 RNA 杂交，错配不超过一个核苷酸。在一些实施方案中，所述同向重复序列包含 25 至 40 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸进一步包含适体序列。在一些实施方案中，所述适体序列被插入到所述指导多核苷酸的环 (loop) 中。在一些实施方案中，所述适体序列包括 MS2 适体序列、PP7 适体序列或 Q β 适体序列。

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含修饰的核苷酸。在一些实施方案中，所述修饰包含 2'-O-甲基、2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯或 2'-O-甲基-3'-硫代 PACE。

在一些实施方案中，所述的指导多核苷酸的靶 RNA 位于真核细胞的细胞核中。

在一些实施方案中，所述靶 RNA 任选自 TTR RNA、SOD1 RNA、PCSK9 RNA、VEGFA RNA、VEGFR1 RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。可选地，在一些实施方案中，所述靶 RNA 任选自 VEGFA RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。进一步地，所述指导序列任选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 42-49 所示序列 (分别用于靶向 AQp1 RNA、PTBP1 RNA、ANGPTL3 RNA)。优选地，所述指导序列任选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45-47 所示序列。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白为 Cas13a、Cas13b、Cas13c 或 Cas13d。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白为 Cas13d。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

本披露的另一方面涉及一种 CRISPR-Cas13 系统，其包含：本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白，或编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的核酸；以及指导多核苷酸或编码所述指

导多核苷酸的核酸；所述指导多核苷酸包含连接至指导序列的同向重复序列，所述指导序列被工程化以与靶 RNA 杂交；所述指导多核苷酸能够与所述 Cas13 蛋白或融合蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述靶 RNA 任选自 TTR RNA、SOD1 RNA、PCSK9 RNA、VEGFA RNA、VEGFR1 RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。可选地，在一些实施方案中，所述靶 RNA 任选自 VEGFA RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。在一些实施方案中，所述指导序列任选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 42-49 所示序列（分别用于靶向 AQp1 RNA、PTBP1 RNA、ANGPTL3 RNA）。在一些实施方案中，所述指导序列任选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45-47 所示序列。

在一些实施方案中，所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3、81、82、84 和 87 中任一项相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，所述融合蛋白包含融合至同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的本文所述的 Cas13 蛋白或其功能片段。

在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白或其功能片段部分与同源或异源核定位信号(NLS)融合。在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白或其功能片段部分与同源或异源核输出信号(NES)融合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含突变并且具有降低的 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在一个或两个 HEPN 结构域中包含突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述“基本上缺乏 RNA 切割活性”是指与野生型 Cas13 蛋白相比仅保留 $\leq 50\%$ 、 $\leq 40\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 20\%$ 、 $\leq 10\%$ 、 $\leq 5\%$ 或 $\leq 1\%$ 的 RNA 切割活性，或无可检测的 RNA 切割活性。

在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白或其功能片段部分与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签直接通过共价键连接。在一些实施方案中，所述融合蛋白的 Cas13 蛋白部分与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签通过肽序列连接。

在一些实施方案中，所述蛋白质结构域包含胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域或剪接因子结构域。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白与亲和标签或报告标签共价连接。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 95% 的序列同一性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 97% 的序列同一性。

性。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 98%的序列同一性。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 99%的序列同一性。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 99.5%的序列同一性。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白包含 SEQ ID NO: 1 所示序列。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白来自包含与 CNGB 数据库中编号为 CNA0009596 所示基因组的平均核苷酸同一性 (ANI) $\geq 95\%$ 的基因组的物种 (species)。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白用于 RNA 切割时没有原间隔区侧翼序列(PFS)的要求。

在一些实施方案中,所述指导序列位于所述同向重复序列的 3'端。在一些实施方案中,所述指导序列位于所述同向重复序列的 5'端。

在一些实施方案中,所述指导序列包含 15-35 个核苷酸。在一些实施方案中,所述指导序列与所述靶 RNA 杂交,错配不超过一个核苷酸。

在一些实施方案中,所述同向重复序列包含 25 至 40 个核苷酸。

在一些实施方案中,所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 80%的序列同一性。在一些实施方案中,所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 90%的序列同一性。在一些实施方案中,所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 95%的序列同一性。在一些实施方案中,所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有 100%的序列同一性。在一些实施方案中,所述同向重复序列任选自 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87。

在一些实施方案中,所述指导多核苷酸进一步包含适体序列。在一些实施方案中,所述适体序列被插入到指导多核苷酸的环中。在一些实施方案中,所述适体序列包括 MS2 适体序列、PP7 适体序列或 Q β 适体序列。

在一些实施方案中,所述 CRISPR-Cas13 系统包括包含接头蛋白 (Adaptor protein) 和同源或异源蛋白结构域的融合蛋白,或编码所述融合蛋白的核酸,所述接头蛋白能够结合所述适体序列。

在一些实施方案中,所述接头蛋白包括 MS2 噬菌体外壳蛋白、PP7 噬菌体外壳蛋白或 Q β 噬菌体外壳蛋白。在一些实施方案中,所述蛋白结构域包含胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、报告标签和亲和标签。

在一些实施方案中,所述指导多核苷酸包含修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述修饰的核苷酸包含 2'-O-甲基、2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯或 2'-O-甲基-3'-硫代 PACE。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或融合蛋白和所述指导多核苷酸并非天然共同存在。

本披露的另一方面涉及一种 CRISPR-Cas13 系统，其特征在于，其包含任何一种 Cas13 蛋白、其融合蛋白或编码其的核酸，以及本文所述的指导多核苷酸或编码其的核酸。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的载体系统，所述载体系统包含一个或多个载体，所述载体包含编码本文所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和编码指导多核苷酸的多核苷酸序列。

本披露的另一方面涉及包含本文所述 CRISPR-Cas13 系统的腺相关病毒(AAV)载体，其中所述 AAV 载体包含编码本文所述 Cas13 蛋白或融合蛋白和所述指导多核苷酸的 DNA 序列。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含本文所述的指导多核苷酸和编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的慢病毒载体，所述慢病毒载体包含本文所述的指导多核苷酸和编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA。在一些实施方案中，所述慢病毒载体是用同源或异源包膜蛋白如 VSV-G 假型化的。在一些实施方案中，编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA 与适体序列连接。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的核糖核蛋白复合物，其中所述核糖核蛋白复合物由本文所述的指导多核苷酸和本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白形成。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的病毒样颗粒，所述病毒样颗粒包含由本文所述的指导多核苷酸和本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白形成的核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或融合蛋白与 gag 蛋白融合。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的真核细胞。在一些实施方案中，所述真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述真核细胞是人细胞。

本披露的另一方面涉及一种药物组合物，其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞。

本披露的另一方面涉及一种药物组合物，其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统。

本披露的另一方面涉及一种体外组合物，其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统，以及不能与本文所述的指导多核苷酸杂交或被所述指导多核苷酸靶向的标记的 detector

RNA。

本披露的另一方面涉及编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白的分离的核酸。

本披露的另一方面涉及编码本文所述的指导多核苷酸的分离的核酸。

本披露的另一方面涉及一种 CRISPR-Cas13 系统，其包含任何一种 Cas13 蛋白或编码其的核酸，以及本文所述的指导多核苷酸或编码其的分离的核酸。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在检测疑似包含靶 RNA 的核酸样品中的靶 RNA 或制备检测疑似包含靶 RNA 的核酸样品中的靶 RNA 的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在以下任一项或制备实现以下任一项方案的试剂的用途：

切割一种或多种靶 RNA 分子或使一种或多种靶 RNA 分子产生切口（nicking），激活或上调一种或多种靶 RNA 分子，激活或抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译，使一种或多种靶 RNA 分子失活，可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子，结合一种或多种靶 RNA 分子，运输一种或多种靶 RNA 分子，以及掩蔽一种或多种靶 RNA 分子。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在切割一种或多种靶 RNA 分子或制备切割一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在结合一种或多种靶 RNA 分子中的用途。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在制备结合或切割一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在切割或编辑哺乳动物细胞的靶 RNA 中

的用途，所述编辑为碱基编辑。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在制备切割或编辑哺乳动物细胞的靶 RNA 的试剂中的用途，所述编辑为碱基编辑。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在激活或上调一种或多种靶 RNA 分子或制备激活或上调一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译或制备抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在使一种或多种靶 RNA 分子失活或制备使一种或多种靶 RNA 分子失活的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子或制备可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在运输一种或多种靶 RNA 分子或制备运输一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在掩蔽一种或多种靶 RNA 分子或制备掩

蔽一种或多种靶 RNA 分子的试剂中的用途。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症中的用途。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症中的用途。

本披露的另一方面涉及一种诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的方法，所述方法为：在有需要的受试者的样品或向有需要的受试者施用根据本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的 CRISPR-Cas13 系统或本文所述的分离的核酸。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒或本文所述的真核细胞在制备用于诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的药物中的用途。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在制备用于诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的药物中的用途。在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本披露各较佳实例。

本披露所用试剂和原料均市售可得。

附图说明

图 1 示出了 CRISPR-Cas13 系统的 CRISPR 基因座，包括 CRISPR 阵列和 C13-2 蛋白的编码序列。

图 2 示出了 C13-2 指导多核苷酸的结构，其由同向重复序列和指导序列组成。在此图中骨架序列与同向重复序列相同；指导序列由数量可变的多个核苷酸组成，图中 N 表示任意核苷酸。将同向重复序列（SEQ ID NO: 3）用 RNAfold 预测得到其二级结构，示于图中，可见茎环结构，茎区含有多个互补碱基对。

图 3 示出了重组 C13-2 蛋白的表达和纯化。

图 4 显示 C13-2 在下调 293T 细胞中的 PTBP1（聚嘧啶束结合蛋白 1）RNA 方面具有高活性。

图 5 显示与 CasRx 和 shRNA 相比, C13-2 在下调 293T 细胞中的 AQP1 (水通道蛋白 1) RNA 方面具有更高的活性。

图 6 显示与 C13-113 和 C13-114 相比, C13-2 在下调 293T 细胞中的 PTBP1 RNA 方面具有更高的活性。

图 7 显示 C13-2 可下调 293T 细胞中的 ANGPTL3 (血管生成素样 3) RNA。

图 8 示出了计算方法预测的 C13-2 结构域; 图中第 1-95 位为 NTD 域, 第 96-255 位为 HEPN-1_I 域, 第 256-417 位为 Helical-1 域, 第 418-504 位为 HEPN-1_II 域, 第 505-651 位为 Helical-2 域, 第 652-893 位为 HEPN-2 域。

图 9 示出了使用不同 DR 时靶向 VEGFA RNA 的编辑效果。

图 10 示出了使用不同 DR 时靶向 PTBP1 RNA 的编辑效果。

图 11 示出了 C13-2 与已知 Cas13 工具靶向 VEGFA RNA 的效果对比。

图 12 示出了 C13-2 与已知 Cas13 工具靶向 PTBP1 RNA 的效果对比。

图 13 示出了 dC13-2 单碱基编辑后的测序峰图。

图 14 示出了 qPCR 测试突变体靶向编辑后的 VEGFA RNA 水平。

图 15 示出了 RNAseq 测试编辑后的 VEGFA RNA 水平。

图 16 示出了 qPCR 测试突变体对 AR RNA 的编辑效率。

图 17 示出了 RNAseq 测得的编辑后 AR RNA 水平。

图 18 示出了同向重复序列 DRrc、DR-hf2、DR2rc 的序列比对结果。

图 19 示出了 RNAfold 预测的同向重复序列 DR-hf2 (SEQ ID NO: 87) 的 RNA 二级结构。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本披露, 但并不因此将本披露限制在所述的实施例范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 按照常规方法和条件, 或按照商品说明书选择。

如本文中所使用的, 术语“序列同一性”(identity 或 percent identity) 用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如, 两个 DNA 分子中的每一个的某个位置都被腺嘌呤占据, 或两个多肽中的每一个的某个位置都被赖氨酸占据), 那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分比序列同一性”(percent identity) 是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100\%$ 的函数。例如, 如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配, 那么这两个序列具有 60% 的序列同一性。通常, 在将两个序列比对以产

生最大序列同一性时进行比较。这样的比对可通过使用已公开和可商购的比对算法和程序，诸如但不限于 Clustal Ω 、MAFFT、Probcons、T-Coffee、Probalign、BLAST，本领域的普通技术人员可合理选择使用。本领域技术人员能确定用于比对序列的适宜参数，例如包括对所比较序列全长实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法，以及对所比较序列的局部实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法。

如本文中所使用的，术语“指导多核苷酸”用于指 CRISPR-Cas 系统中与 Cas 蛋白形成 CRISPR 复合物并将 CRISPR 复合物引导至靶序列的分子。通常情况下，指导多核苷酸包含与指导序列连接的骨架序列，指导序列可以与靶序列杂交。骨架序列通常包含同向重复序列，有时还可包含 tracrRNA 序列。当骨架序列不包含 tracrRNA 序列时，指导多核苷酸包含指导序列和同向重复序列，此时指导多核苷酸也可称为 crRNA。

CRISPR-Cas13 系统

2 类 CRISPR-Cas 系统赋予微生物多种适应性免疫机制。本文提供了对原核基因组和宏基因组的分析，以鉴定包含 C13-2（也称为 CasRfg.4）的先前未表征的 RNA 引导的、靶向 RNA 的 CRISPR-Cas13 系统，其被归类为 VI 型系统。基于 C13-2 的工程化 CRISPR-Cas13 系统在人体细胞中具有强大的活性。作为一种紧凑的单效应子 Cas13 酶，C13-2 也可以灵活地包装到 AAV 载体中。本文的结果展示了将 C13-2 作为一种可编程的 RNA 结合模块，用于有效靶向细胞 RNA，从而为转录组工程以及治疗和诊断方法提供通用平台。

如实验例 1 所述，基于 NCBI GenBank 和 CNGB 数据库中原核基因组和宏基因组的生物信息学分析，鉴定了包含 C13-2 的 CRISPR-Cas13 系统，随后实验验证了在人类细胞中的靶向 RNA 切割活性。包含 C13-2 的 CRISPR-Cas13 系统是 VI 型 CRISPR-Cas 系统。图 1 显示了包含 C13-2 的 CRISPR-Cas13 系统的 CRISPR 基因座。野生型 C13-2 的蛋白质序列为 SEQ ID NO: 1。C13-2 的野生型 DNA 编码序列为 SEQ ID NO: 9。图 8 显示了计算预测的 C13-2 的结构域，其包括 NTD、HEPN-1_I、HEPN-1_II 和 HEPN-2，NTD 为 N terminus domain，在 HEPN-1_I 与 HEPN-1_II 之间、HEPN-1_II 与 HEPN-2 之间分别为 Helical-1 和 Helical-2 结构域。C13-2 指导多核苷酸的同向重复序列为 SEQ ID NO: 3。图 2 显示了 RNAfold 预测的 C13-2 指导多核苷酸的同向重复序列的 RNA 二级结构。本文描述的工程化 CRISPR-Cas13 系统可以有效地敲低人类细胞中的内源性靶 RNA，为作为转录组工程工具箱的一部分的 RNA 靶向应用铺平了道路。在一些实施方案中，C13-2 介导的跨多种内源性转录物的敲低能够比 CasRx、PspCas13b、Cas13X.1 和/或 Cas13Y.1 介导的敲低实现更高的效率和/或特异性。

因此，本披露的一个方面涉及 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒，其包含：与 SEQ ID NO: 1 相比具有至少 90% 序列同一性的 Cas13 蛋白或融合蛋白，或编码所述 Cas13

蛋白的核酸；以及指导多核苷酸或编码所述指导多核苷酸的核酸；所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以与靶 RNA 杂交，所述指导多核苷酸能够与所述 Cas13 蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物与所述靶 RNA 的序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以与靶 RNA 杂交，所述指导多核苷酸能够与所述 Cas13 蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物序列特异性地结合并切割所述靶 RNA。

在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和/或所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列的调控序列与所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列的调控序列相同或不同。

在一些实施方案中，本文所述的 Cas13 蛋白具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或至少 99.5%的序列同一性。在一些实施方案中，本文所述的 Cas13 蛋白具有与 SEQ ID NO: 9 编码的蛋白序列相比至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。当所述 CRISPR-Cas13 系统包括包含所述 Cas13 蛋白与蛋白结构域和/或多肽标签的融合蛋白时，计算融合蛋白的 Cas13 部分与参考序列之间的序列同一性百分比。

在一些实施方案中，本文所述 Cas13 蛋白来自包含与 CNGB 数据库中编号为 CNA0009596 所示基因组的平均核苷酸同一性 (ANI) $\geq 95\%$ 的基因组的物种 (species)。

在一些实施方案中，本文所述的 Cas13 蛋白包含一个或多个(例如 1 个或 2 个)天然 HEPN 结构域，每个天然 HEPN 结构域包含 RX₄H 氨基酸基序(其中 X 表示任意氨基酸，下标“4”表示为 4 个连续的氨基酸)。在一些实施方案中，第一催化 RX₄H 基序位于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 210-215，第二催化 RX₄H 基序位于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 785-790，第三 RX₄H 基序位于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 750-755。在一些实施方案中，本文所述的 Cas13 蛋白包含一个或多个突变的 HEPN 结构域。在一些实施方案中，所述突变 Cas13 蛋白可以加工其指导多核苷酸，但不能切割靶 RNA。

在一些实施方案中，本文所述的 Cas13 蛋白用于 RNA 切割时没有原间隔区侧翼序列 (Protospacer Flanking Sequence, PFS)的要求。

本文所述的 CRISPR-Cas13 系统可以以多种非限制性方式引入细胞(或无细胞系统): (i) 作为 Cas13 mRNA 和指导多核苷酸, (ii) 作为单个载体或质粒的一部分, 或分为多个载体或质粒, (iii) 作为单独的 Cas13 蛋白和指导多核苷酸, 或 (iv) 作为 Cas13 蛋白和指导多核苷酸的 RNP 复合物。

在一些实施方案中, 所述 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒包含编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子, 其中编码序列被密码子优化以在真核细胞中表达。在一些实施方案中, 所述 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒包含编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子, 其中编码序列被密码子优化以在哺乳动物细胞中表达。在一些实施方案中, 所述 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒包含编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子, 其中编码序列被密码子优化以在人细胞中表达。

在一些实施方案中, 编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子是质粒。在一些实施方案中, 编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子是病毒载体基因组的一部分, 例如侧翼为 ITR 的 AAV 载体的 DNA 基因组。在一些实施方案中, 编码所述 Cas13 蛋白的核酸分子是 mRNA。

指导多核苷酸

在一些实施方案中, 所述 CRISPR-Cas13 系统的所述指导多核苷酸是指导 RNA。在一些实施方案中, 所述指导多核苷酸是化学修饰的指导多核苷酸。在一些实施方案中, 所述指导多核苷酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方案中, 所述指导多核苷酸是杂合 RNA-DNA 指导。在一些实施方案中, 所述指导多核苷酸是杂合 RNA-LNA (锁核酸) 指导。

在一些实施方案中, 所述指导多核苷酸包含与至少一个同向重复序列(direct repeat, DR)连接的至少一个指导序列(guide sequence, 也称为间隔序列 spacer sequence)。在一些实施方案中, 所述指导序列位于同向重复序列的 3'端。在一些实施方案中, 所述指导序列位于同向重复序列的 5'端。

在一些实施方案中, 所述指导序列包含至少 15 个核苷酸、至少 16 个核苷酸、至少 17 个核苷酸、至少 18 个核苷酸、至少 19 个核苷酸、至少 20 个核苷酸、至少 21 个核苷酸、至少 22 个核苷酸、至少 23 个核苷酸、至少 24 个核苷酸、至少 25 个核苷酸、至少 26 个核苷酸、至少 27 个核苷酸、至少 28 个核苷酸、至少 29 个核苷酸、或至少 30 个核苷酸。在一些实施方案中, 所述指导序列包含不超过 60 个核苷酸、不超过 55 个核苷酸、不超过 50 个核苷酸、不超过 45 个核苷酸、不超过 40 个核苷酸、不超过 35 个核苷酸、或不超过 30 个核苷酸。在一些实施方案中, 所述指导序列包含 15-20 个核苷酸、20-25 个核苷酸、25-30 个核苷酸、30-35 个核苷酸或 35-40 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶 RNA 序列具有足够的互补性以与所述靶 RNA 杂交并指导所述 CRISPR-Cas13 复合物与所述靶 RNA 的序列特异性结合。在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶 RNA（或要靶向的 RNA 的区域）具有 100% 的互补性，但所述指导序列可以与所述靶 RNA 具有小于 100% 的互补性，例如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的互补性。

在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶 RNA 杂交，错配不超过两个核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶 RNA 杂交，且错配不超过一个核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶 RNA 杂交，有或没有错配。

在一些实施方案中，所述同向重复序列包含至少 20 个核苷酸、至少 21 个核苷酸、至少 22 个核苷酸、至少 23 个核苷酸、至少 24 个核苷酸、至少 25 个核苷酸，至少 26 个核苷酸，至少 27 个核苷酸，至少 28 个核苷酸，至少 29 个核苷酸，至少 30 个核苷酸，至少 31 个核苷酸，至少 32 个核苷酸，至少 33 个核苷酸、至少 34 个核苷酸、至少 35 个核苷酸或至少 36 个核苷酸。在一些实施方案中，所述同向重复序列包含不超过 60 个核苷酸、不超过 55 个核苷酸、不超过 50 个核苷酸、不超过 45 个核苷酸、不超过 40 个核苷酸或不超过 35 个核苷酸。在一些实施方案中，所述同向重复序列包含 20-25 个核苷酸、25-30 个核苷酸、30-35 个核苷酸或 35-40 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述同向重复序列被修饰，以用不同的互补碱基对替换图 2 所示的茎区（stem region）中的至少一个互补碱基对。在一些实施方案中，所述同向重复序列被修饰以改变图 2 所示的茎区中互补碱基对的数目。在一些实施方案中，所述同向重复序列被修饰以改变图 2 所示的环区（loop region）中的核苷酸数目（例如，环中 3、4 或 5 个核苷酸）。在一些实施方案中，所述同向重复序列被修饰以改变环区中的核苷酸序列。在一些实施方案中，适体（aptamer）序列插入或附加到同向重复序列的末端。在一些实施方案中，所述同向重复序列具有与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，所述 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒包含至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 10 个或至少 20 个不同的指导多核苷酸。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸靶向至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 10 个或至少 20 个不同的靶 RNA 分子，或靶向一个或多个靶 RNA 分子的至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 10 个或至少 20 个不同区域。

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包括位于可变指导序列上游的恒定同向重复序列。在一些实施方案中，多个指导多核苷酸是阵列的一部分（其可以是载体的一部分，例如病毒载体或质粒）。例如，包括序列 DR-间隔区-DR-间隔区-DR-间隔区的指导阵列可以包括三个独特的未加工指导多核苷酸（每个 DR-间隔区序列一个）。一旦被引入细胞或无细胞系统，阵列就会被所述 Cas13 蛋白加工成三个单独的成熟指导多核苷酸。这允许多路复用，例如将多个指导多核苷酸递送至细胞或系统以靶向多个靶 RNA 或单个靶 RNA 内的多个区域。

指导多核苷酸指导 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合的能力可以通过任何合适的测定来评估。例如，可以将足以形成 CRISPR 复合物的 CRISPR 系统的组分，包括待测试的指导多核苷酸，提供给具有相应靶 RNA 分子的宿主细胞，例如通过编码 CRISPR 复合物的组分的载体的转染，然后评估靶序列内的优先切割。类似地，可以在试管中评估靶 RNA 序列的切割，方法是提供靶 RNA、CRISPR 复合物的组分，包括待测试的指导多核苷酸和不同于测试指导多核苷酸的对照指导多核苷酸，并比较待测试和对照指导多核苷酸之间结合靶 RNA 的能力或切割靶 RNA 的速率。

Cas13 突变体

在一些实施方案中，与野生型 C13-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 相比，本文提供的 Cas13 蛋白包含一个或多个突变，例如单个氨基酸插入、单个氨基酸缺失、单个氨基酸取代，或其组合。在一些实例中，与野生型 C13-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 相比所述 Cas13 蛋白包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、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、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89 或 90 个氨基酸变化（例如插入、缺失或取代），但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶 RNA 分子的能力，和/或保留将指导阵列 RNA 转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。在一些实例中，与野生型 C13-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 相比所述 Cas13 蛋白包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、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、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89 或 90 个氨基酸变化（例如插入、缺失或取代），但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶 RNA 分子的能力。在一些实例中，与野生型 C13-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 相比所述 Cas13 蛋白包含 1、2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸变化（例如插入、缺失或取代），但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶 RNA 分子的能力，和/或保留将指导阵列 RNA 转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含一个或多个突变并且具有降低的 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含一个突变并且具有降低的 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在一个或两个 HEPN 结构域中包含一个或多个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在一个或两个 HEPN 结构域中包含突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。在一些实施方案中，所述“基本上缺乏 RNA 切割活性”是指与野生型 Cas13 蛋白相比仅保留 $\leq 50\%$ 、 $\leq 40\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 20\%$ 、 $\leq 10\%$ 、 $\leq 5\%$ 或 $\leq 1\%$ 的 RNA 切割活性，或无可检测的 RNA 切割活性。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99% 的序列同一性。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白具有与 SEQ ID NO: 9 编码的蛋白质序列相比至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。当所述 CRISPR- Cas13 系统包含所述 Cas13 与蛋白结构域和/或多肽标签的融合蛋白时，计算融合蛋白的 Cas13 部分与参考序列之间的序列同一性百分比。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白能与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述 CRISPR 复合物能与靶 RNA 序列特异性结合。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白能与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

一种类型的修饰或突变包括用氨基酸取代具有相似生化性质的氨基酸残基，即保守取代（例如 1-4、1-8、1-10 或 1-20 个氨基酸的保守取代）。通常，保守取代对所得蛋白或肽的活性影响很小或没有影响。例如，保守取代是 Cas13 蛋白中的氨基酸取代，其基本上不影响 Cas13 蛋白和与 gRNA 分子指导序列互补的靶 RNA 分子的结合，和/或加工指导阵列 RNA 转录物成 gRNA 分子的过程。丙氨酸扫描可用于鉴定 Cas13 蛋白中的哪些氨基酸残基可以耐受氨基酸取代。在一个实例中，当丙氨酸或其他保守氨基酸被 1-4、1-8、1-10 或 1-20 个天然氨基酸取代后，变体 Cas13 蛋白在 CRISPR-Cas 系统中修饰基因表达的能力的改变不超过 25%，例如不超过 20%，例如不超过 10%。可以被取代并且被

认为是保守取代的氨基酸的例子包括：用 Ser 替换 Ala；用 Lys 替换 Arg；用 Gln 或 His 替换 Asn；用 Glu 替换 Asp；用 Ser 替换 Cys；用 Asn 替换 Gln；用 Asp 替换 Glu；用 Pro 替换 Gly；用 Asn 或 Gln 替换 His；用 Leu 或 Val 替换 Ile；用 Ile 或 Val 替换 Leu；用 Arg 或 Gln 替换 Lys；用 Leu 或 Ile 替换 Met；用 Met,Leu 或 Tyr 替换 Phe；用 Thr 替换 Ser；用 Ser 替换 Thr；用 Tyr 替换 Trp；用 Trp 或 Phe 替换 Tyr；用 Ile 或 Leu 替换 Val。

可以通过使用保守性较低的取代来进行更实质性的改变，例如，选择在维持以下效果方面差异更大的残基：(a) 取代发生区域中多肽骨架的结构，例如，作为一个螺旋或折叠构象；(b)与靶位点相互作用的区域的电荷或疏水性；或(c)侧链的体积。通常预期会在多肽功能中产生最大变化的取代是(a)：亲水残基（例如丝氨酸或苏氨酸）与疏水残基（例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸）之间的取代；(b)半胱氨酸或脯氨酸与任何其他残基之间的取代；(c)带正电侧链的残基（例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸）与带负电残基（例如谷氨酸或天冬氨酸）之间的取代；或(d)具有庞大侧链的残基（例如苯丙氨酸）与不具有侧链的残基（例如甘氨酸）之间的取代。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 40-91 处（即 SEQ ID NO: 1 序列中第 40 个氨基酸到第 91 个氨基酸的区域，包括第 40 个氨基酸和第 91 个氨基酸）包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 146-153 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 158-176 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 182-209 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 216-253 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 271-287 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 341-353 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 379-424 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 456-477 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 521-557 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 575-588 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 609-625 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 700-721 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 724-783 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 796-815 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在

SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 828-852 处包含一个或多个突变。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 880-893 处包含一个或多个突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白包含在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 348-350 处 (即 SEQ ID NO: 1 序列中第 348 个氨基酸、第 349 个氨基酸和第 350 个氨基酸) 的一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白包含在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 521-556 处的一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白包含在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置 883-893 处的一个或多个氨基酸的缺失。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白的 RxxxxH 基序 (x 表示任意氨基酸, RxxxxH 也可记为 Rx4H 或 R4xH) 包含一个或多个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和/或 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 750-755 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序和 750-755 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 750-755 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和 785-790 位 RxxxxH 基序的对应位置包含突变。

在一些实施方案中, 所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxH、RxxxxA 或 AxxxxA。在一些实施方案中, 所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxH。在一些实施方案中, 所述 RxxxxH 基序突变为 RxxxxA。在一些实施方案中, 所述 RxxxxH 基序突变为 AxxxxA。

在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 的对应位置包含 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个突变。在一些实施方案中, 所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 的对应位置突变为 A (丙氨

酸)。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210 和 H215 的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R750 和 H755 的对应位置包含突变。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750 和 H755 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R750、H755、R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R785 和/或 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 的对应位置包含突变。

在一些实施方案中,所述 R210、R750 或 R785 的对应位置突变为 A。在一些实施方案中,所述 H215、H755 或 H790 的对应位置突变为 A。在一些实施方案中,所述 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 的对应位置都突变为 A。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 210-215 位 RxxxxH 基序、750-755 位 RxxxxH 基序和/或 785-790 位 RxxxxH 基序引入突变而得到。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 位置引入 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个突变而得到。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和/或 H790 位置突变为 A (丙氨酸) 而得到。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750 和 H755 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R750、H755、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白通过在 SEQ ID NO: 1 所示序列的 R210、H215、R750、H755、R785 和 H790 位置突变为 A 而得到。

在一些实施方案中,所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 40-91 位、146-153 位、158-176 位、182-209 位、216-253 位、271-287 位、341-353 位、379-424 位、456-477 位、521-557 位、575-588 位、609-625 位、700-721 位、724-783 位、

796-815 位、828-852 位或 880-893 位的对应位置包含至少一个突变。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 348-350 位、521-556 位或 883-893 位的对应位置包含一个或多个氨基酸的缺失。

在一些实施方案中，与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变：R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314、R320、R328、N332、R341、N346、R358、N372、N383、N390、N394、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、R308+N68、N394+N68、N87+N68、R308+N265、N394+N265、N87+N265、R308+N68+N265、N87+N68+N265、T7、A16、S260、A263、M266、N274、F288、M302、N303、L304、V305、I311、D313、H324、P326、H327、N332、N346、T353、T360、E365、A373、M380、S382、K395、Y396、D402、D411、S418。

在一些实施方案中，与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在表 24 中 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的突变位点的对应位置突变为相同的氨基酸残基。在一些实施方案中，与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白相比，所述 Cas13 蛋白在表 24 中 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的突变位点的对应位置包含相同的突变。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由 SEQ ID NO: 1 所示序列在以下位置引入任意一种或更多种突变而得到：R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314、R320、R328、N332、R341、N346、R358、N372、N383、N390、N394、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、R308+N68、N394+N68、N87+N68、R308+N265、N394+N265、N87+N265、R308+N68+N265、N87+N68+N265、T7、A16、S260、A263、M266、N274、F288、M302、N303、L304、V305、I311、D313、H324、P326、H327、N332、N346、T353、T360、E365、A373、M380、S382、K395、Y396、D402、D411、S418。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由 SEQ ID NO: 1 所示序列引入表 24 中任意一种或更多种突变而得到。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白在与 SEQ ID NO: 1 所示参比蛋白的氨基酸残基 91-120 位、141-180 位、211-240 位、331-360 位、351-400 位、431-460 位、461-500 位、511-550 位、611-640 位、631-660 位、661-690 位、691-760 位、821-860 位或 861-890 位的对应位置发生序列缺失而得到。

在一些实施方案中，所示序列缺失中缺失 ≤ 300 个、 ≤ 200 个、 ≤ 150 个、 ≤ 100 个、 ≤ 90 个、 ≤ 80 个、 ≤ 70 个、 ≤ 60 个、 ≤ 50 个、 ≤ 40 个、 ≤ 30 个、 ≤ 20 个或 ≤ 10 个氨

基酸残基。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白由 SEQ ID NO: 1 所示序列在 91-120 位、141-180 位、211-240 位、331-360 位、351-400 位、431-460 位、461-500 位、511-550 位、611-640 位、631-660 位、661-690 位、691-760 位、821-860 位或 861-890 位发生序列缺失而得到。

亚细胞定位信号（或称定位信号）

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少一种同源或异源亚细胞定位信号融合。示例性的亚细胞定位信号包括细胞器定位信号，例如核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)或线粒体定位信号。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 1 个同源或异源 NLS 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 2 个 NLS 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 3 个 NLS 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 1 个 N-末端 NLS 和至少 1 个 C-末端 NLS 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 2 个 C-末端 NLS 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少 2 个 N-末端 NLS 融合。

在一些实施例中，所述 NLS 独立地选自 SPKKKRKVEAS (SEQ ID NO: 53)、GPKKKRKVAAA (SEQ ID NO: 54)、PKKKRKV (SEQ ID NO: 55)、KRPAATKKA GQA KKKK (SEQ ID NO: 56)、PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 57)、RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 58)、NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 59)、RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO: 60)、VSRKRPRP (SEQ ID NO: 61)、PPKKARED (SEQ ID NO: 62)、POPKKKPL (SEQ ID NO: 63)、SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 64)、DRLRR (SEQ ID NO: 65)、PKQKKRK (SEQ ID NO: 66)、RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 67)、REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 68)、KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK (SEQ ID NO: 69)、RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 70) 和 PAAKKKKLD (SEQ ID NO: 71)。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源 NES 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少两个 NES 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少三个 NES 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少一个 N-末端 NES 和至少一个 C-末端 NES 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少两个 C-末端 NES 融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与至少两个 N-末端 NES 融合。

在一些实施方案中，所述 NES 独立地选自腺病毒 5 型 E1B NES、HIV Rev NES、MAPK NES 和 PTK2 NES。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源的 NLS 和 NES 融合，在所述 NLS 和所述 NES 之间存在一个可切割接头。在一些实施方案中，在生产细胞系中所述 NES 促进产生包含所述 Cas13 蛋白或其功能片段的递送颗粒(例如，病毒样颗粒)。在一些实施方案中，靶细胞中所述接头的切割可以暴露所述 NLS 并促进靶细胞中所述 Cas13 蛋白或其功能片段的核定位。

蛋白结构域及多肽标签

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签共价连接或融合。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签融合。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域和多肽标签任选自：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核糖核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域和亲和域。在一些实施方案中，所述多肽标签包含报告标签和亲和标签。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域的氨基酸序列的长度为 ≥ 40 个氨基酸、 ≥ 50 个氨基酸、 ≥ 60 个氨基酸、 ≥ 70 个氨基酸、 ≥ 80 个氨基酸、 ≥ 90 个氨基酸、 ≥ 100 个氨基酸、 ≥ 150 个氨基酸、 ≥ 200 个氨基酸、 ≥ 250 个氨基酸、 ≥ 300 个氨基酸、 ≥ 350 个氨基酸或 ≥ 400 个氨基酸。

示例性的蛋白结构域包括可以切割 RNA 的结构域(例如，PIN 内切核酸酶结构域、NYN 结构域、来自 SOT1 的 SMR 结构域，或来自葡萄球菌核酸酶的 RNase 结构域)，可以影响 RNA 稳定性的结构域(例如，tristetraprolin(TTP)或来自 UPF1、EXOSC5 和 STAU1 的结构域)，可以编辑核苷酸或核糖核苷酸的结构域(例如，胞嘧啶脱氨酶、PPR 蛋白、腺苷脱氨酶、ADAR 家族蛋白或 APOBEC 家族蛋白)，可以激活翻译的结构域(例如，eIF4E 和其他翻译起始因子，酵母多聚(A)结合蛋白或 GLD2 的结构域)，可以抑制翻译的结构域(例如，Pumilio 或 FBF PUF 蛋白，去腺苷酶，CAF1，Argonaute 蛋白)，可以甲基化 RNA 的结构域(例如，来自 m6A 甲基转移酶因子(如 METTL14、METTL3 或 WTAP)的结构域)，可以使 RNA 去甲基化的结构域(例如，人类烷基化修复同源物

5)，可以影响剪接的结构域（例如，SRSF1 的富含 RS 的结构域，hnRNPA1 的富含 Gly 的结构域，RBM4 的富含丙氨酸的基序，或 DAZAP1 的富含脯氨酸的基序），可以实现亲和纯化或免疫沉淀的结构域，以及可以实现邻近依赖（proximity-based）蛋白质标记和识别的结构域（例如，生物素连接酶(如 BirA)或过氧化物酶(如 APEX2)，以使靶 DNA 相互作用蛋白被生物素化)。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含腺苷脱氨酶结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与腺苷脱氨酶结构域共价连接或融合以指导哺乳动物细胞中 RNA 转录物的 A-to-I 脱氨酶活性。Cox et al., *Science* 358(6366):1019-1027 (2017)中描述了基于 ADAR2 工程化的用于靶向 A-to-I RNA 编辑的腺苷脱氨酶结构域，其通过引用整体并入本文。在其他实施方案中，腺苷脱氨酶结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加到所述指导多核苷酸内的适体序列，从而允许所述腺苷脱氨酶结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含胞嘧啶脱氨酶结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与胞嘧啶脱氨酶结构域共价连接或融合以指导哺乳动物细胞中 RNA 转录物的 C-to-U 脱氨酶活性。Abudayyeh et al., *Science* 365(6451):382-386 (2019)中描述了从 ADAR2 进化而来的用于靶向 C-to-U RNA 编辑的胞嘧啶脱氨酶结构域，该文献通过引用整体并入本文。在其他实施方案中，所述胞嘧啶脱氨酶结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加至所述指导多核苷酸的适体序列，从而允许所述胞嘧啶脱氨酶结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含剪接因子结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与剪接因子结构域共价连接或融合以指导哺乳动物细胞中靶 RNA 的可变剪接。Konermann et al., *Cell* 173(3):665-676 (2018)中描述了用于靶向选择性剪接的剪接因子结构域，其通过引用整体并入本文。剪接因子结构域的非限制性实例包括 SRSF1 的富含 RS 的结构域、hnRNPA1 的富含 Gly 的结构域、RBM4 的富含丙氨酸的基序或 DAZAP1 的富含脯氨酸的基序。在其他实施方案中，所述剪接因子结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加至所述指导多核苷酸的适体序列，从而允许所述剪接因子结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含翻译激活结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与

翻译激活结构域共价连接或融合以激活或增加靶 RNA 的表达。翻译激活结构域的非限制性实例包括 eIF4E 和其他翻译起始因子、酵母聚(A)结合蛋白或 GLD2 的结构域。在其他实施方案中，所述翻译激活结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加至所述指导多核苷酸的适体序列，从而允许所述翻译激活结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含翻译抑制结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与翻译抑制结构域共价连接或融合以抑制或降低靶 RNA 的表达。翻译抑制结构域的非限制性实例包括 Pumilio 或 FBF PUF 蛋白、去腺苷酶、CAF1、Argonaute 蛋白。在其他实施方案中，所述翻译抑制结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加到所述指导多核苷酸内的适体序列，从而允许所述翻译抑制结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含 RNA 甲基化结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与 RNA 甲基化结构域共价连接或融合以用于靶 RNA 的甲基化。RNA 甲基化结构域的非限制性例子包括 m6A 结构域，例如 METTL14、METTL3 或 WTAP。在其他实施方案中，所述 RNA 甲基化结构域与接头蛋白共价连接或融合，该接头蛋白能够结合插入或附加至所述指导多核苷酸的适体序列，从而允许所述 RNA 甲基化结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含 RNA 去甲基化结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白或其功能片段与 RNA 去甲基化结构域共价连接或融合以用于靶 RNA 的去甲基化。RNA 去甲基化结构域的非限制性实例包括人烷基化修复同源物 5 或 ALKBH5。在其他实施方案中，所述 RNA 去甲基化结构域共价连接或融合至接头蛋白，该接头蛋白能够结合插入或附加至所述指导多核苷酸的适体序列，从而允许所述 RNA 去甲基化结构域非共价连接到与所述指导多核苷酸复合的所述 Cas13 蛋白或其功能片段上。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含核糖核酸酶结构域。在一些实施方案中，具有突变 HEPN 结构域的所述 Cas13 蛋白、催化失活的所述 Cas13 蛋白、或其功能片段与核糖核酸酶结构域共价连接或融合以切割靶 RNA。核糖核酸酶结构域的非限制性实例包括 PIN 内切核酸酶结构域、NYN 结构域、来自 SOT1 的 SMR 结构域或来自葡萄球菌核酸酶的 RNase 结构域。

在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含亲和结构域（亲和域）和/或报告结构域（报告域）。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白或其功能片段共价连接或融合至报告结构域，例如荧光蛋白。报告域的非限制性例子包括 GST、HRP、CAT、GFP、HcRed、DsRed、CFP、YFP、BFP。

在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白与多肽标签共价连接或融合。在一些实施方案中，所述多肽标签的实例是小多肽序列。在一些实施方案中，所述多肽标签的氨基酸序列的长度为≤50 个氨基酸、≤40 个氨基酸、≤30 个氨基酸、≤25 个氨基酸、≤20 个氨基酸、≤15 个氨基酸、≤10 个氨基酸或≤5 个氨基酸。在一些实施方案中，Cas13 蛋白与亲和标签如纯化标签共价连接或融合。亲和标签的非限制性实例包括 HA-标签、His-标签(例如 6-His)、Myc-标签、E-标签、S-标签、钙调蛋白标签、FLAG-标签、GST-标签、MBP-标签、Halo 标签或生物素。

在一些实施方案中，C13-2 失活突变体（R210A+H215A+R750A+H755A+R785A+H790A）与蛋白结构域和/或多肽标签融合。

在一些实施方案中，Cas13 蛋白与 ADAR 融合。

在一些实施方案中，C13-2 失活突变体（R210A+H215A+R750A+H755A+R785A+H790A）与胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶融合。

在一些实施方案中，C13-2 失活突变体（R210A+H215A+R750A+H755A+R785A+H790A）与胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶直接共价连接、通过刚性连接肽序列 A(EAAAK)3A 连接，或通过柔性连接肽序列(GGGGS)3 连接。

适体序列（Aptamer Sequence）

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸进一步包含适体（aptamer）序列。在一些实施方案中，所述适体序列被插入到指导多核苷酸的环（loop）中。在一些实施方案中，所述适体序列被插入到指导多核苷酸的 tetra loop 中。指导多核苷酸的示例性 tetra loop 显示在图 2 中。在一些实施方案中，所述适体序列附加到所述指导多核苷酸的末端。

Konermann et al., Nature 517:583–588 (2015)中描述了将适体序列插入到 CRISPR-Cas 系统的指导多核苷酸上，该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中，所述适体序列包括 MS2 适体序列、PP7 适体序列或 Q β 适体序列。

接头蛋白（Adaptor protein）

在一些实施方案中，所述 CRISPR-Cas13 系统进一步包含含有接头蛋白以及同源或异源蛋白结构域和/或多肽标签的融合蛋白，或编码该融合蛋白的核酸，其中所述接头蛋白能够结合适体序列。

Konermann et al., Nature 517:583-588 (2015)中描述了接头蛋白和蛋白结构域的融合蛋白，该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中，所述接头蛋白包括 MS2 噬菌体外壳蛋白(MCP)、PP7 噬菌体外壳蛋白(PCP)或 Q β 噬菌体外壳蛋白(QCP)。在一些实施方案中，所述蛋白结构域包含胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、亲和域或报告域。

修饰的指导多核苷酸

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含修饰的核苷酸。在一些实施方案中，修饰的核苷酸包含 2'-O-甲基、2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯或 2'-O-甲基-3'-硫代 PACE。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸是化学修饰的指导多核苷酸。Hendel et al., Nat. Biotechnol. 33(9):985-989 (2015)中描述了化学修饰的指导多核苷酸，其全文以引用方式并入本文。

在一些实施方案中，所述指导多核苷酸是杂合 RNA-DNA 指导、杂合 RNA-LNA(锁核酸)指导、杂合 DNA-LNA 指导或杂合 DNA-RNA-LNA 指导。在一些实施方案中，所述同向重复序列包含一个或多个被相应脱氧核糖核苷酸取代的核糖核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列包含一种或多种被相应脱氧核糖核苷酸取代的核糖核苷酸。杂合 RNA-DNA 指导多核苷酸在 WO2016/123230 中进行了描述，其通过引用整体并入本文。

载体系统

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的载体系统，所述载体系统包含一个或多个载体，所述载体包含编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述载体系统包含至少一个质粒或病毒载体(例如，逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或单纯疱疹病毒)。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列位于同一载体上。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列位于多个载体上。

在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列和/或所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的多核苷酸序列的调控序列与所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列的调控序列相同或不同。在一些实施方案中，所述调控序列任选自启动子、增强子、内部核糖体进入位点 (IRES) 和其他表达控制元件 (例如，转录终止信号，如

多腺苷酸化信号和 poly-U 序列)。在一些实施方案中,所述调控序列包括使核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中组成型表达的调控序列,以及使核苷酸序列仅在某些宿主细胞中表达的调控序列(例如,组织特异性调节序列)。组织特异性启动子可以主要在所需的感兴趣组织中直接表达,例如肌肉、神经元、骨、皮肤、血液、特定器官(例如肝脏、胰腺)、或特定的细胞类型(例如淋巴细胞)。调控序列还可以以时间依赖性方式指导表达,例如以细胞周期依赖性 or 发育阶段依赖性方式,其也可能是或可能不是组织或细胞类型特异性的。在一些实施例中,所述调控序列是增强子元件,例如 WPRE、CMV 增强子、HTLV-1 的 LTR 中的 R-U5 区段、SV40 增强子、或兔 β -珠蛋白外显子 2 和 3 之间的内含子序列。

在一些实施方案中,所述载体包含 pol III 启动子(例如, U6 和 H1 启动子)、pol II 启动子(例如,逆转录病毒 Rous 肉瘤病毒(RSV)LTR 启动子(任选地带有 RSV 增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地带有 CMV 增强子)、SV40 启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子、或 EF1 α 启动子),或 pol III 启动子和 pol II 启动子。

在一些实施方案中,所述启动子是组成型启动子,其是连续活性的并且不受外部信号或分子的调节。合适的组成型启动子包括但不限于 CMV、RSV、SV40、EF1 α 、CAG 和 β -肌动蛋白启动子。在一些实施方案中,所述启动子是受外部信号或分子(例如,转录因子)调节的诱导型启动子。

在一些实施方案中,所述启动子是组织特异性启动子,其可用于驱动所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的组织特异性表达。合适的肌肉特异性启动子包括但不限于 CK8、MHCK7、肌红蛋白启动子(Mb)、结蛋白(Desmin)启动子、肌肉肌酸激酶启动子(MCK)及其变体,以及 SPc5-12 合成启动子。合适的免疫细胞特异性启动子包括但不限于 B29 启动子(B 细胞)、CD14 启动子(单核细胞)、CD43 启动子(白细胞和血小板)、CD68(巨噬细胞)和 SV40/CD43 启动子(白细胞和血小板)。合适的血细胞特异性启动子包括但不限于 CD43 启动子(白细胞和血小板)、CD45 启动子(造血细胞)、INF- β (造血细胞)、WASP 启动子(造血细胞)、SV40/CD43 启动子(白细胞和血小板),和 SV40/CD45 启动子(造血细胞)。合适的胰腺特异性启动子包括但不限于弹性蛋白酶-1 启动子。合适的内皮细胞特异性启动子包括但不限于 Fit-1 启动子和 ICAM-2 启动子。合适的神经元组织/细胞特异性启动子包括但不限于 GFAP 启动子(星形胶质细胞)、SYN1 启动子(神经元)和 NSE/RU5' (成熟神经元)。合适的肾特异性启动子包括但不限于 NphsI 启动子(足细胞)。合适的骨特异性启动子包括但不限于 OG-2 启动子(成骨细胞、成牙本质细胞)。

合适的肺特异性启动子包括但不限于 SP-B 启动子(肺)。合适的肝脏特异性启动子包括但不限于 SV40/Alb 启动子。合适的心脏特异性启动子包括但不限于 α -MHC。

AAV 载体

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的腺相关病毒(AAV)载体, 其中所述腺相关病毒(AAV)载体包含编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白以及指导多核苷酸的 DNA。

通过 AAV 载体递送 CRISPR-Cas 系统在 Maeder et al., *Nature Medicine* 25:229-233 (2019) 中进行了描述, 其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中, 所述 AAV 载体包含 ssDNA 基因组, 该基因组包含 Cas13 蛋白或融合蛋白以及侧接 ITR 的指导多核苷酸的编码序列。

在一些实施方案中, 本文所述的 CRISPR-Cas13 系统被包装在 AAV 载体中, 例如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9 和 AAVrh74。在一些实施方案中, 本文所述的 CRISPR-Cas13 系统被包装在 AAV 载体中, 该 AAV 载体包含具有组织嗜性的工程化衣壳, 例如工程化肌肉嗜性衣壳。Tabebordbar et al., *Cell* 184:4919-4938 (2021)中描述了通过定向进化对具有组织趋向性的 AAV 衣壳进行工程改造, 该文献通过引用整体并入本文。

脂质纳米粒

本披露的另一方面涉及脂质纳米粒(LNP), 其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统, 其中所述 LNP 包含本文所述的指导多核苷酸, 以及编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA。

Gillmore et al., *N. Engl. J. Med.*, 385:493-502 (2021)中描述了 CRISPR-Cas 系统的 LNP 递送, 其全文以引用方式并入本文。在一些实施方案中, 除了 RNA 有效负载(Cas13 mRNA 和指导多核苷酸)之外, 脂质纳米粒(LNP)还包含四种组分: 阳离子或可电离脂质、胆固醇、辅助脂质和 PEG-脂质。在一些实施方案中, 所述阳离子或可电离脂质包括 cKK-E12、C12-200、ALC-0315、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、FTT5、Moderna SM-102 和 Intellia LP01。在一些实施方案中, 所述 PEG-脂质包含 PEG-2000-C-DMG、PEG-2000-DMG 或 ALC-0159。在一些实施方案中, 所述辅助脂质包括 DSPC。LNP 的组分在 Paunovska et al., *Nature Reviews Genetics* 23:265-280 (2022)中进行了描述, 该文献通过引用整体并入本文。

慢病毒载体

本披露的另一方面涉及包含本文所述 CRISPR-Cas13 系统的慢病毒载体, 其中所述慢病毒载体包含本文所述的指导多核苷酸, 以及编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白

的 mRNA。在一些实施方案中，所述慢病毒载体是用同源或异源包膜蛋白如 VSV-G 假型化的。在一些实施方案中，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA 与适体序列连接。

RNP 复合物

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的核糖核蛋白复合物，其中所述核糖核蛋白复合物由本文所述的指导多核苷酸以及 Cas13 蛋白或融合蛋白形成。在一些实施方案中，可以通过显微注射或电穿孔将所述核糖核蛋白复合物递送至真核细胞、哺乳动物细胞或人类细胞。在一些实施方案中，所述核糖核蛋白复合物可以包装在病毒样颗粒中并在体内递送至哺乳动物或人类受试者。

病毒样颗粒

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的病毒样颗粒(VLP)，其中所述病毒样颗粒包含：本文所述的指导多核苷酸，以及 Cas13 蛋白或融合蛋白；或由所述指导多核苷酸以及 Cas13 蛋白或融合蛋白组成的核糖核蛋白复合物。

Banskota et al. *Cell* 185(2):250-265 (2022)、Mangeot et al., *Nature Communications* 10(1):1-15 (2019)、Campbell, et al., *Molecular Therapy* 27:151-163 (2019)、Campbell, et al., *Molecular Therapy*, 27 (2019): 151-163 和 Mangeot et al. *Molecular Therapy*, 19(9):1656-1666 (2011)描述了工程化 VLP，其全文以引用方式并入本文。在一些实施方案中，工程化的病毒样颗粒(VLP)是用同源或异源包膜蛋白例如 VSV-G 假型化的。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白通过可切割连接子与 gag 蛋白(例如 MLVgag)融合，其中靶细胞中接头的切割暴露了位于连接子和 Cas13 蛋白之间的 NLS。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含(例如，从 5'到 3')gag 蛋白(例如，MLVgag)、一种或多种 NES、可切割连接子、一种或多种 NLS、和 Cas13，如 Banskota et al. *Cell* 185(2):250-265(2022)所述。在一些实施方案中，所述 Cas13 蛋白与第一二聚化结构域融合，所述第一二聚化结构域能够与融合至膜蛋白的第二二聚化结构域二聚化或异二聚化，其中配体的存在促进所述二聚化并富集 Cas13 蛋白或融合蛋白至 VLP 中，如 Campbell, et al., *Molecular Therapy* 27:151-163 (2019)中所述。

细胞

本披露的另一方面涉及包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统的细胞。细胞(例如，其可用于产生无细胞系统)可以是真核或原核的。此类细胞的实例包括但不限于细菌、古细菌、植物、真菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞，例如乳杆菌、乳球菌、芽孢杆菌(例如枯草芽孢杆菌)、埃希氏菌属(例如大肠杆菌)、梭菌属、酵母菌属或毕赤酵母属(如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母)，乳酸克鲁维酵母、鼠伤寒沙门氏菌、果蝇细胞、秀丽隐杆线虫

细胞、非洲爪蟾细胞、SF9 细胞、C129 细胞、293 细胞、脉孢菌和永生化哺乳动物细胞系（例如，Hela 细胞、骨髓细胞系和淋巴样细胞系）。

在一些实施方案中，所述细胞是原核细胞，例如细菌细胞，例如大肠杆菌。在一些实施方案中，细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞或人类细胞。在一些实施方案中，细胞是原代真核细胞、干细胞、肿瘤/癌细胞、循环肿瘤细胞（CTC）、血细胞（例如，T 细胞、B 细胞、NK 细胞、Tregs 等）、造血干细胞、特化免疫细胞（如肿瘤浸润淋巴细胞或肿瘤抑制淋巴细胞）、肿瘤微环境中的基质细胞（如癌症相关成纤维细胞等）。在一些实施方案中，细胞是中枢或外周神经系统的脑或神经元细胞（例如，神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞、视网膜神经节细胞、视杆/视锥细胞等）。

靶 RNA 分子

本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可用于靶向一种或多种靶 RNA 分子，例如存在于生物样品、环境样品（例如土壤、空气或水样品）等中的靶 RNA 分子。在一些实施方案中，所述靶 RNA 是编码 RNA，例如 pre-mRNA 或成熟 mRNA。在一些实施方案中，所述靶 RNA 是核 RNA。在一些实施方案中，所述靶 RNA 是位于真核细胞核中的 RNA 转录物。在一些实施方案中，所述靶 RNA 是非编码 RNA，例如功能性 RNA、siRNA、microRNA、snRNA、snoRNA、piRNA、scaRNA、tRNA、rRNA、lncRNA 或 lincRNA。

在一些实施方案中，除了靶向靶 RNA 分子之外，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒对靶 RNA 执行以下功能中的一种或多种：切割一种或多种靶 RNA 分子或使一种或多种靶 RNA 分子产生切口（nicking），激活或上调一种或多种靶 RNA 分子，激活或抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译，使一种或多种靶 RNA 分子失活，可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子，结合一种或多种靶 RNA 分子，编辑一种或多种靶 RNA 分子，运输一种或多种靶 RNA 分子，以及掩蔽一种或多种靶 RNA 分子。在一些实例中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒修饰一种或多种靶 RNA 分子，所述修饰一种或多种靶 RNA 分子包括以下中的一种或多种：RNA 碱基取代、RNA 碱基缺失、RNA 碱基插入、靶 RNA 的断裂、RNA 甲基化和 RNA 去甲基化。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以靶向一种或多种靶 RNA 分子。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以结合一种或多种靶 RNA 分子。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以切割一种或多种靶 RNA 分子。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以激活一种或多种靶 RNA 分子的翻译。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以检测一种或多

种靶 RNA 分子。在一些实施方案中，本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、组合物或试剂盒可以编辑一种或多种靶 RNA 分子。

在一些实施方案中，所述靶 RNA 是 AQP1 RNA。使用本文所述的 CRISPR-Cas13 系统敲低 Aqp1 RNA 水平可以减少房水的产生并降低眼压，可用于治疗青光眼等疾病。在一些实施方案中，靶 RNA 是 AQP1 RNA，指导多核苷酸的指导序列为 SEQ ID NO: 5。

在一些实施方案中，靶 RNA 是 PTBP1 RNA。使用本文所述的 CRISPR-Cas13 系统敲低 PTBP1 RNA 的水平可以促进脑星形胶质细胞转分化为神经元，这可用于治疗帕金森病等疾病。在一些实施方案中，靶 RNA 是 PTBP1 RNA，指导多核苷酸的指导序列为 SEQ ID NO: 6。

在一些实施方案中，靶 RNA 是 VEGFA RNA。使用本文所述的 CRISPR-Cas13 系统降低 VEGFA RNA 的水平可以防止脉络膜新生血管形成，这可以用于治疗诸如年龄相关性黄斑变性等疾病。

在一些实施方案中，靶 RNA 是 ANGPTL3 RNA。使用本文所述的 CRISPR-Cas13 系统敲低 ANGPTL3 RNA 水平可以降低低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）等血脂，可用于治疗高脂血症、家族性高胆固醇血症等动脉粥样硬化性心血管疾病。在一些实施方案中，靶 RNA 是 ANGPTL3 RNA，指导多核苷酸的指导序列选自 SEQ ID NO: 42-49 中的一种或几种。

治疗应用

本披露的另一方面涉及一种药物组合物，其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞。所述药物组合物可以包含例如编码本文所述的 Cas13 蛋白或融合蛋白以及指导多核苷酸的 AAV 载体。所述药物组合物可以包含例如脂质纳米粒，该脂质纳米粒包含本文所述的指导多核苷酸和编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA。所述药物组合物可以包含例如包含本文所述的指导多核苷酸和编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA 的慢病毒载体。所述药物组合物可以包含例如：包含本文所述的指导多核苷酸以及 Cas13 蛋白或融合蛋白的病毒样颗粒；或由所述指导多核苷酸以及 Cas13 蛋白或融合蛋白形成的核糖核蛋白复合物。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文

所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞在切割或编辑哺乳动物细胞中的靶 RNA 中的用途。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞在以下任一项的用途：切割一种或多种靶 RNA 分子或使一种或多种靶 RNA 分子产生切口（nicking），激活或上调一种或多种靶 RNA 分子，激活或抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译，使一种或多种靶 RNA 分子失活，可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子，结合一种或多种靶 RNA 分子，运输一种或多种靶 RNA 分子，以及掩蔽一种或多种靶 RNA 分子。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞在哺乳动物细胞中修饰一种或多种靶 RNA 分子的用途，所述修饰一种或多种靶 RNA 分子包括以下中的一种或多种：RNA 碱基取代、RNA 碱基缺失、RNA 碱基插入、靶 RNA 的断裂、RNA 甲基化和 RNA 去甲基化。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞在诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症中的用途。在一些实施方案中，所述疾病或病症是帕金森病。在一些实施方案中，所述疾病或病症是帕金森病，并且靶 RNA 是 PTBP1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是青光眼。在一些实施方案中，所述疾病或病症是青光眼，并且靶 RNA 是 AQP1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是肌萎缩侧索硬化症。在一些实施方案中，所述疾病或病症是肌萎缩侧索硬化症，并且靶 RNA 是超氧化物歧化酶 1 (SOD1) RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性，并且靶 RNA 是 VEGF RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性，并且靶 RNA 是 VEGF RNA 或 VEGFR1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是血浆 LDL 胆固醇水平升高。在一些实施方案中，所述疾病或病症是血浆 LDL 胆固醇水平升高，并且靶 RNA 是 PCSK9 RNA 或 ANGPTL3 RNA。

本披露的另一方面涉及涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统、本文所述的 Cas13 蛋白、本文所述的融合蛋白、本文所述的指导多核苷酸、本文所述的核酸、本文所述的载体

系统、本文所述的脂质纳米粒、本文所述的慢病毒载体、本文所述的核糖核蛋白复合物、本文所述的病毒样颗粒、或本文所述的真核细胞在制备用于诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述疾病或病症是帕金森病。在一些实施方案中，所述疾病或病症是青光眼。在一些实施方案中，所述疾病或病症是肌萎缩侧索硬化症。在一些实施方案中，所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性。在一些实施方案中，所述疾病或病症是血浆 LDL 胆固醇水平升高。在一些实施方案中，所述疾病或病症是帕金森病，并且靶 RNA 是 PTBP1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是青光眼，并且靶 RNA 是 AQP1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是肌萎缩侧索硬化症，并且靶 RNA 是超氧化物歧化酶 1(SOD1)RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性，并且靶 RNA 是 VEGFA RNA 或 VEGFR1 RNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症是血浆 LDL 胆固醇水平升高，并且靶 RNA 是 PCSK9 RNA 或 ANGPTL3 RNA。

在一些实施方案中，将药物组合物体内递送至人类受试者。所述药物组合物可以通过任何有效途径递送。示例性给药途径包括但不限于静脉内输注、静脉内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、瘤内注射、皮下注射、皮内注射、心室内注射、血管内注射、小脑内注射、眼内注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、前房内注射、鼓室内注射、鼻内给药和吸入。

在一些实施方案中，靶向 RNA 的方法导致编辑靶 RNA 的序列。例如，通过使用具有非突变 HEPN 结构域的 Cas13 蛋白或融合蛋白以及包含对靶 RNA 特异的指导序列的指导多核苷酸，可以在精确位置切割靶 RNA 或使靶 RNA 形成切口(nick，例如在靶 RNA 以双链型核酸分子存在时切割其中任一条单链)。在一些实例中，这种方法用于降低靶 RNA 的表达，这将降低相应蛋白质的翻译。这种方法可以用于不需要增加 RNA 表达的细胞中。在一个实例中，RNA 与诸如囊性纤维化、亨廷顿氏病、Tay-Sachs、脆性 X 综合征、脆性 X 相关性震颤/共济失调综合征、肌营养不良、强直性肌营养不良、脊髓性肌萎缩、脊髓小脑共济失调、年龄相关性黄斑变性，或家族性 ALS 等疾病有关。在另一个例子中，RNA 与癌症（例如肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、骨癌、脑癌、皮肤癌（例如黑素瘤）或肾癌）相关。靶 RNA 的实例包括但不限于与癌症相关的那些（例如，PD-L1、BCR-ABL、Ras、Raf、p53、BRCA1、BRCA2、CXCR4、 β -连环蛋白、HER2 和 CDK4）。编辑这样的靶 RNA 可以产生治疗效果。

在一些实施方案中，RNA 在免疫细胞中表达。例如，靶 RNA 可以编码导致抑制所需免疫反应（例如肿瘤浸润）的蛋白质。敲低这种 RNA 可以促进这种需要的免疫反应（例如，PD1、CTLA4、LAG3、TIM3）。在另一个例子中，靶 RNA 编码导致不希望的免疫

反应激活的蛋白质，例如在自身免疫疾病如多发性硬化、克罗恩病、狼疮或类风湿性关节炎的情况下。

诊断应用

本披露的另一方面涉及一种体外组合物，其包含本文所述的 CRISPR-Cas13 系统和不能与本文所述的指导多核苷酸杂交的标记的 detector RNA。

本披露的另一方面涉及本文所述的 CRISPR-Cas13 系统在检测疑似包含靶 RNA 的核酸样品中的靶 RNA 的用途。

在一些实施方案中，检测靶 RNA 的方法包括与荧光蛋白或其他可检测标记融合的 Cas13 蛋白或融合蛋白以及包含对靶 RNA 特异的指导序列的指导多核苷酸。Cas13 蛋白或融合蛋白与靶 RNA 的结合可以通过显微镜或其他成像方法进行可视化。在另一个例子中，RNA 适体序列可以附加到或插入到指导多核苷酸，例如 MS2、PP7、Q β 和其他适体。引入与这些适体特异性结合的蛋白质，例如与荧光蛋白或其他可检测标记融合的 MS2 噬菌体外壳蛋白可用于检测靶 RNA，因为 Cas13-指导-靶 RNA 复合物将通过适体相互作用而被标记。

在一些实施方案中，在无细胞系统中检测靶 RNA 的方法导致产生可检测的标记或酶活性。例如，通过使用 Cas13 蛋白、包含对靶 RNA 特异的指导序列的指导多核苷酸、和可检测标记，靶 RNA 将被 Cas13 识别。Cas13 与靶 RNA 的结合会触发其 RNase 活性，这会导致靶 RNA 以及可检测标记的切割。

在一些实施方案中，可检测标记是与荧光探针和淬灭剂连接的 RNA。完整的可检测 RNA 连接荧光探针和淬灭剂，抑制荧光。在可检测 RNA 被 Cas13 切割后，荧光探针从淬灭剂中释放出来并显示出荧光活性。这种方法可用于确定靶 RNA 是否存在于裂解的细胞样品、裂解的组织样品、血液样品、唾液样品、环境样品（例如水、土壤或空气样品）、或其他裂解的细胞或无细胞样品中。这种方法还可用于检测病原体，例如病毒或细菌，或诊断疾病状态，例如癌症。

在一些实施方案中，靶 RNA 的检测有助于诊断疾病和/或病理状态，或病毒或细菌感染存在。例如，Cas13 介导的非编码 RNA 如 PCA3 的检测，如果在患者尿液中检测到则可用于诊断前列腺癌。在另一个例子中，Cas13 介导的 lncRNA-AA174084 的检测，其是一种胃癌的生物标志物，可用于诊断胃癌。

实施例

实验例 1: C13-2 蛋白的筛选

1、CRISPR 和基因的注释

使用软件对来自 NCBI Genbank 和 CNGB(中国国家基因库)数据库的微生物基因组, 预测全基因组的蛋白, 然后使用软件预测基因组上的 CRISPR array。

2、蛋白的初步筛选

用聚类去除冗余的蛋白, 同时过滤掉氨基酸序列长度小于 800aa (氨基酸) 或者大于 1400aa 的蛋白。

3、CRISPR 相关蛋白的获得

CRISPR Array 上下游 10kb 以内的蛋白序列和已知 Cas13 进行比对, 过滤掉 $evaluate > 1 \times 10^{-5}$ 的蛋白。然后再与 NCBI 的 NR 库、EBI 的专利库比对, 过滤掉相似度高的蛋白, 再经挑选得到候选蛋白。通过实验验证, 最终得到 C13-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1, 893aa)。C13-2 蛋白也被称为 CasRfg.4 蛋白。

C13-2 蛋白的基因组序列来源如表 1 所示。

表 1. C13-2 蛋白的基因组序列的来源。

蛋白	数据库	基因组编号	对应编码序列在基因组中的位置	数据库对来源物种的注释
C13-2	CNGB	CNA0009596	F4453_scaffolds_778:1543:4224:+	metagenome

C13-2 蛋白的天然 (野生型) DNA 编码序列为 SEQ ID NO: 9。

C13-2 蛋白的基因座结构如图 1 所示, 包含 CRISPR array 和 C13-2 编码序列。

与 C13-2 联合使用的 gRNA 的同向重复 (direct repeat, DR) 序列或骨架序列 (scaffold sequence) 可以为:

5'-GGAAGAUAAACUCUACAAACCUGUAGGGUUCUGAGAC-3' (SEQ ID NO: 3)。

使用 RNAfold 预测得到上述同向重复序列的 RNA 二级结构如图 2 所示。

实验例 2: C13-2 蛋白的制备、分离和纯化

(一) 载体构建

1、取 pET28a 载体质粒, 经 BamHI 和 XhoI 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳切胶回收线性化的载体, 将包含蛋白编码序列 (可编码 C13-2 蛋白以及核定位信号) 的 DNA 片段通过同源重组的方式插入到载体 pET28a 的克隆区, 反应液转化 Stb13 感受态, 涂布硫酸卡那霉素抗性的 LB 平板, 37°C 过夜培养后, 挑取克隆测序鉴定。

构建好的重组载体命名为 C13-2-pET28a (SEQ ID NO: 10), 该重组载体用于表达 C13-2 重组蛋白 (SEQ ID NO: 11), 该 C13-2 重组蛋白架构为 His tag-NLS-Cas13-SV40 NLS-nucleoplasmin NLS。

2、序列正确的阳性克隆过夜培养, 提取质粒后转化表达菌株 RIPL-BL21(DE3), 涂布硫酸卡那霉素抗性的 LB 平板, 37°C 过夜培养。

(二) 蛋白表达

- 1、挑取单克隆接种至 5ml 硫酸卡那霉素抗性的 LB 培养液，37°C 过夜培养。
- 2、以 1: 100 体积比转接种 500ml 硫酸卡那霉素抗性的 TB 培养液中，以 220rpm 的转速，37°C 培养至 OD 值为 0.6，加 IPTG 至终浓度 0.2mM，16°C 诱导 24h。
- 3、离心收集菌体，15ml PBS 漂洗菌体后离心收集菌体，加 lysis buffer 超声破碎，10,000g 离心 30min 获得含重组蛋白的上清液，上清经过 0.45um 滤膜过滤后即可上柱纯化。

(三) 蛋白纯化

通过 MAC (Ni Sepharose 6 Fast Flow, CYTIVA) 和 HITRAP HEPARIN HP (CYTIVA) 纯化。纯化的 C13-2 重组蛋白经过 SDS-PAGE 电泳呈一条带 (如图 3 所示)。

实验例 3: 外源基因编辑效率验证

1. 合成靶向 EGFP 的待验证载体及对照载体

合成外源 EGFP 表达载体的序列如 SEQ ID NO: 13 所示，质粒结构为 CMV-EGFP。合成 C13-2 蛋白靶向 EGFP 的验证载体质粒，其全长序列如 SEQ ID NO: 14 所示，质粒结构为 CMV-C13-2-U6-gRNA。

使用 EGFP 作为外源的报告基因，其核酸序列 (720bp) 如 SEQ ID NO: 12 所示。

靶向 EGFP 的指导序列为 ugccguucucugcuugucggccaugauu (SEQ ID NO: 4)。

2. 待验证载体转染 293T 细胞

将外源 EGFP 表达载体与 C13-2 蛋白靶向 EGFP 的验证载体质粒按照 1: 2 (166ng:334ng) 在 24 孔板中转染 293T 细胞。

转染方法如下所示:

- 1、胰酶 (Trypsin 0.25%, EDTA, Thermo, 25200056) 消化 293T 细胞，对细胞计数，按照一个孔 500 μ L 将 2×10^5 细胞铺 24 孔板。
- 2、对于每个转染样品，请按照以下步骤准备复合物:
 - a、在加入细胞的 24 孔板每个孔中，加入 50 μ L 无血清的 Opti-MEM I (Thermo, 11058021) 还原血清培养基中稀释前述的 500ng 的质粒 DNA，并轻轻混合;
 - b、在使用前轻轻混合 Lipofectamine 2000 (Thermo, 11668019)，然后在每个孔中，即 50 μ L 的 Opti-MEM I 培养基中稀释 1 μ L 的 Lipofectamine 2000。在室温下孵育 5 分钟。注意：在 25 分钟内继续执行步骤 c;
 - c、孵育 5 分钟后，将稀释的 DNA 与稀释的 Lipofectamine 2000 合并。轻轻混合并在室温下孵育 20 分钟 (溶液可能看起来混浊)。注意：复合物在室温下稳定 6 小时。将复合物加入 293T 细胞中并混合，48h 后使用流式细胞仪进行检测。

3. 流式细胞仪检测下调 EGFP 表达的效果

使用的细胞以及质粒说明如表 2 所示：

表 2. 实验分组

实验分组	备注
293T	细胞空白对照
EGFP	转染外源 EGFP 表达载体
C13-2	转染 EGFP 表达载体以及 C13-2 蛋白靶向 EGFP 的验证载体

将转染后 48h 的细胞使用胰酶（Trypsin 0.25%, EDTA, Thermo）消化，300g 5min 离心去除上清，每个孔的细胞使用 500 μ L 的 PBS 重悬，通过流式细胞仪检测 EGFP 荧光表达，通过 FCS-A 以及 SSC-A 划门去除细胞碎片后，流式细胞仪检测收集数据。

收集记录 FITC 通道 Mean-FITC-A 结果，并按下述计算公式计算下调幅度：

令 EGFP 组的 GFP 荧光为 a, 其他组别的 GFP 荧光为 x。下调幅度(%)=(a-x) \div a \times 100。

其中细胞空白对照组不参与比较。下调幅度结果如表 3 所示，C13-2 靶向 EGFP 时可使其表达下调 64.49%。

表 3. 流式细胞仪检测 GFP 荧光结果

分组	GFP 荧光下调幅度(%)
293T	N/A
EGFP	0.00
C13-2	64.49

实验例 4：内源基因编辑效率验证

1. 构建靶向 AQP1 以及 PTBP1 的载体

合成表达载体 C13-2-BsaI 质粒，序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

实验选择的靶核酸是 AQP1（Aquaporin 1）以及 PTBP1（Polypyrimidine Tract Binding Protein 1），其中验证 AQP1 使用高表达 AQP1 的 293T 细胞系，验证 PTBP1 使用 293T 细胞系。

高表达 AQP1 的 293T 细胞系（293T-AQP1 细胞）的构建方法：构建过表达 AQP1 基因以及 EGFP 基因的载体 Lv-AQP1-T2a-GFP（SEQ ID NO: 16）。其中，AQP1 与 EGFP 使用 2A 肽进行间隔。将 Lv-AQP1-T2a-GFP 质粒包装慢病毒转导 293T 细胞，形成稳定过表达 AQP1 基因的细胞系。

靶向 AQP1 的 gRNA 指导序列为：

AGGGCAGAACCGAUGCUGAUGAAGAC (SEQ ID NO: 5)。

靶向 PTBP1 的 gRNA 指导序列为：

GUGGUUGGAGAACUGGAUGUAGAUGGGCUG (SEQ ID NO: 6)。

使用引物退火方式获得靶向靶位点的片段，其引物如下所示：

靶向 PTBP1

上游引物：5'-AGACGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 22)

下游引物：5'-AAAACAGCCCATCTACATCCAGTTCTCCAACCAC-3' (SEQ ID NO: 23)

靶向 AQP1

上游引物：5'-AGACAGGGCAGAACCGATGCTGATGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 24)

下游引物：5'-AAAAGTCTTCATCAGCATCGGTTCTGCCCT-3' (SEQ ID NO: 25)

引物退火反应体系如下表所示，在 PCR 仪内 95°C 孵育 5 分钟，随后立刻取出在冰上孵育 5 分钟，使引物之间互相退火形成含粘性末端的双链 DNA。

Oligo-F (10 μM)	2 μl
Oligo-R (10 μM)	2 μl
10× 内切酶反应缓冲液*	2 μl
去离子水	up to 20 μl

将合成的 C13-2-BsaI 载体质粒使用 *Bsa* I 内切酶进行酶切后，将上述退火产物和酶切后纯化回收的骨架通过 T4 DNA 连接酶连接，转化大肠杆菌后挑选阳性克隆并提取质粒，得到 C13-2 载体（C13-2 靶向 AQP1 或 PTBP1 的载体质粒），用于下述 C13-2 实验组。C13-2 载体结构为 CMV-C13-2-U6-gRNA，可用于表达 C13-2 蛋白，以及靶向 AQP1 或 PTBP1 的 gRNA。

使用常规方法制备得到以下对照载体：

CasRx-AQP1 质粒（CasRx 靶向 AQP1 的阳性对照载体）序列如 SEQ ID NO: 17 所示，质粒结构为 CMV-CasRx-U6-gRNA。其包含编码 CasRx（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示）的序列。

shRNA-AQP1 质粒（shRNA 靶向 AQP1 的阳性对照载体）序列如 SEQ ID NO: 19 所示，用于表达 shRNA 分子，所述 shRNA 分子序列为 CCACGACCCUCUUUGUCUUCACUCGAGUGAAGACAAAGAGGGUCGUGG (SEQ ID NO: 7)。

shRNA-PTBP1 质粒（shRNA 靶向 PTBP1 的阳性对照载体）序列如 SEQ ID NO: 20 所示，用于表达 shRNA 分子，所述 shRNA 分子序列为 CAGCCCAUCUACAUCCAGUUC CUCGAGGAACUGGAUGUAGAUGGGCUG (SEQ ID NO: 8)。

CasRx-blank 质粒（空白对照载体，可表达 CasRx 和 gRNA，但 gRNA 不靶向 AQP1 和 PTBP1）序列如 SEQ ID NO: 21 所示，质粒结构为 CMV-CasRx-U6-gRNA。

2、待验证载体转染 293T 细胞以及 293T-AQp1 细胞

将对照质粒或靶向 AQP1 的载体质粒按照 500ng 在 24 孔板中转染 293T-AQp1 细胞。

将对照质粒或靶向 PTBP1 的载体质粒按照 500ng 在 24 孔板中转染 293T 细胞。

转染方法如下所示：

1、胰酶（Trypsin 0.25%, EDTA, Thermo）消化细胞，对细胞计数，按照一个孔 500 μ L 将 2×10^5 细胞铺 24 孔板。

2、对于每个转染样品，请按照以下步骤准备复合物：

a、在加入细胞的 24 孔板每个孔中，加入 50 μ L 无血清的 Opti-MEM I（Thermo）还原血清培养基中稀释前述的质粒 DNA，并轻轻混合；

b、在使用前轻轻混合 Lipofectamine 2000（Thermo, 11668019），然后在每个孔中，即 50 μ L 的 Opti-MEM I 培养基中稀释 1.8 μ L 的 Lipofectamine 2000。在室温下孵育 5 分钟。注意：在 25 分钟内继续执行步骤 c；

c、孵育 5 分钟后，将稀释的 DNA 与稀释的 Lipofectamine 2000 合并。轻轻混合并在室温下孵育 20 分钟（溶液可能看起来混浊）。注意：复合物在室温下稳定 6 小时。

将复合物加入细胞中并混合。

3、qPCR 检测靶基因的 RNA

转染后 48h 的细胞使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit AG21017 试剂盒进行 RNA 提取操作，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。RNA 产物使用 Evo M-MLV Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒进行反转录，反转录产物使用 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 试剂盒进行检测。

其中 qPCR 所使用引物如下所示：

检测 PTBP1：

上游引物：5'-ATTGTCCCAGATATAGCCGTTG-3' (SEQ ID NO: 26)

下游引物：5'-GCTGTCATTTCCGTTTGCTG-3' (SEQ ID NO: 27)

检测 AQp1：

上游引物：5'-GCTCTTCTGGAGGGCAGTGG-3' (SEQ ID NO: 28)

下游引物：5'-CAGTGTGACAGCCGGGTTGAG-3' (SEQ ID NO: 29)

检测内参 GAPDH：

上游引物：5'-CCATGGGGAAGGTGAAGGTC-3' (SEQ ID NO: 30)

下游引物：5'-GAAGGGGTCATTGATGGCAAC-3' (SEQ ID NO: 31)

按照 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 使用说明配置反应体系，使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

本实验使用相对定量方法即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标 RNA。其计算方式如下所示：

$$\Delta Ct = Ct(AQp1) - Ct(GAPDH) \text{ 或 } Ct(PTBP1) - Ct(GAPDH)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{待验证样品如 C13-2}) - \Delta Ct(\text{CasRx-blank 或 C13-2-BsaI})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

按照上述计算方式计算 AQp1 以及 PTBP1 的 RNA 量。对于靶向 PTBP1 的验证实验，结果如表 4 和图 4 所示。对于靶向 AQp1 的验证，进行独立的 3 次生物学重复实验（转染操作使用相同批次的 293T 细胞），并获得 3 次的平均结果，如表 5 和图 5 所示。

表 4. PTBP1 RNA 的敲降测试结果

实验分组	PTBP1 RNA 水平
C13-2-BsaI	1.00
C13-2	0.32
shRNA-PTBP1	0.12

表 5. AQp1 RNA 的敲降测试结果

实验分组	AQp1 RNA 水平			
	实验 1	实验 2	实验 3	平均值
CasRx-blank	1.00	1.00	1.00	1.00
CasRx	0.04	0.04	0.20	0.09
shRNA-AQp1	0.10	0.23	0.30	0.21
C13-2-BsaI	-	0.97	-	0.97
C13-2	0.02	0.00	0.00	0.01

注：“-”表示未检测。

C13-2-BsaI 和 CasRx-blank 为对照组，它们即不靶向 AQp1，也不靶向 PTBP1。实验结果表明，联合本实验例的 gRNA 时，C13-2 显示了明显的编辑效果，靶向 PTBP1 的编辑活性高，靶向 AQp1 的编辑活性高于 CasRx。

实验例 5：与已公开的 Cas13 蛋白的编辑效率对比

1、构建靶向内源基因 PTBP1 的编辑载体

公告号为 US10476825B2 的专利公开了来自 BMZ-11B_GL0037771 的 Cas13 蛋白，在本实验例中将其称为 C13-113（该蛋白的氨基酸序列如本文的序列 SEQ ID NO: 32 所示）。本实验例使用的 C13-113 对应的同向重复序列如 SEQ ID NO: 33 所示。

GenBank 公开了 Cas13 蛋白 MBR0191107.1，在本申请中将其称为 C13-114（该蛋白的氨基酸序列如本文的序列 SEQ ID NO: 34 所示）。本实验例使用的 C13-114 对应的同向重复序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

在试剂公司分别合成 C13-113、C13-114 表达载体 C13-113-BsaI (SEQ ID NO: 36) 和 C13-114-BsaI (SEQ ID NO: 37)。

按照实验例 4 的方法, 使用引物退火方式获得靶向靶位点的片段, 其引物如下所示:

靶向 PTBP1

C13-113:

上游引物: 5'-CAACGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 38)

下游引物: 5'-AAAACAGCCCATCTACATCCAGTTCTCCAACCAC-3' (SEQ ID NO: 23)

C13-114:

上游引物: 5'-atctGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 39)

下游引物: 5'-AAAACAGCCCATCTACATCCAGTTCTCCAACCAC-3' (SEQ ID NO: 23)

按照实验例 4 的方法, 将合成的 C13-113-BsaI 和 C13-114-BsaI 质粒用 *Bsa* I 内切酶进行酶切后, 与退火产物进行 T4 连接, 转化大肠杆菌后挑选阳性克隆并提取质粒。转染 293T 细胞 (与实验例 4 不同批次的 293T 细胞) 72h 后进行检测。空白对照组分别转染实验例 4 的 C13-2-BsaI。

转染后 72h 的细胞按照实验例 4 的方法, 提取 RNA, 反转录, qPCR (引物同实验例 4)。

按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 使用说明配置反应体系, 使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PTBP1 RNA 的量。其计算方式如下所示:

$$\Delta Ct = Ct(PTBP1) - Ct(GAPDH)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{待验证样品}) - \Delta Ct(\text{C13-2-BsaI})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

实验结果如表 6 和图 6 所示。

表 6. PTBP1 RNA 的敲降测试结果对比

实验分组	PTBP1 RNA 水平
C13-2-BsaI	1.00
C13-2	0.51
C13-113	1.08

C13-114	0.92
---------	------

表中数据显示，联合本实验例的 gRNA 靶向 PTBP1 时，观察到 C13-2 的较高编辑效率，其编辑效率优于 C13-113、C13-114。C13-113 组未观察到明显的编辑。

实验例 6：测试 C13-2 的脱靶

通过 EMBOSS-water 程序及 NCBI-Blast 程序在靶物种（Homo sapiens）的全基因组及全 cDNA 序列中进行预测，使用 gRNA 指导序列的正反链进行比对，对预测结果进行过滤，按照预测靶标与 gRNA 指导序列长度之差不超过四个碱基以及 mismatch+gap 不超过四个碱基进行过滤，共得到潜在的脱靶信息如表 7 所示。

表 7. 预测的潜在脱靶基因数量

	指导序列 (guide sequence)	潜在脱靶基因数目
C13-2 gRNA/ CasRx gRNA	GUGGUUGGAGAACUGGAUGUAGAUG GGCUG (SEQ ID NO: 6)	7
shRNA1	GCCCAUCUACAUCCAGUUCUC (SEQ ID NO: 40)	6700
shRNA2	CAGCCCAUCUACAUCCAGUUC (SEQ ID NO: 41)	6882

使用实验例 4 的 C13-2 靶向 PTBP1 的载体质粒、shRNA-PTBP1 质粒（其表达的 shRNA 在本实验例中称为“shRNA2”）以及 CasRx-blank 质粒。

使用常规方法制备得到 CasRx-PTBP1 质粒（CasRx 靶向 PTBP1 的阳性对照载体）序列如 SEQ ID NO: 18 所示，质粒结构为 CMV-CasRx-U6-gRNA。

按照实验例 4 的方法另外构建得到表达 shRNA1 的质粒（与 shRNA-PTBP1 质粒区别仅在于编码的 shRNA 的指导序列不同，但也靶向 PTBP1，U6 启动子后不再额外加 g）。

按照实验例 4 的方法，将上述质粒分别转染 293T 细胞。按照 Lipofectamine 2000（Thermo）说明书操作转染 24 孔板，72h 后使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit AG21017 试剂盒提取 RNA。

对提取的 RNA 样本进行 PE150bp RNA-Seq 测序，测序获得的 fastq 文件通过 HISAT 或 STAR 软件与靶物种参考基因组进行比对，获得比对后的 BAM 文件。使用 kallisto、RSEM 或 HTSeq 检测得到转录本及各基因的表达量。

使用 DESeq2、limma-voom、edger 对各组的表达量进行差异分析(相对于 CasRx-blank 组的差异)，将满足 $p.adj < 0.05$ 、 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 0.5$ 、 $\text{basemean} > 2.5$ 的作为差异表达基因 differential expression gene (DEG)，共得到 DEG 信息如下：

表 8. 差异表达基因数量以及与预测的潜在脱靶基因的交集

分组	Up&Sig	Down&Sig	All&Sig	Isec Up	Isec Down	Isec All
----	--------	----------	---------	---------	-----------	----------

	(上调的 DEG 个数)	(下调的 DEG 个数)	(上调或下 调的 DEG 个 数)			
CasRx	4	1	5	0	0	0
shRNA1	182	337	519	45	117	162
shRNA2	171	383	554	23	127	150
C13-2	4	68	72	0	0	0

注：Up 表示表达上调，Down 表示表达下调。

Sig 代表与对照组（CasRx-blank 组）的基因表达差异显著。

Isec 代表 DEG 与程序预测的“潜在脱靶基因”取交集后的数目。

从上表数据可以看出，CasRx、C13-2 的转录组测序和预测脱靶取交集后的脱靶位点个数都为 0，C13-2 几乎无脱靶，shRNA1 和 shRNA2 则存在大量的脱靶位点。在脱靶安全性方面 C13-2 优于 shRNA1 和 shRNA2，且与 CasRx 相当。另外，C13-2 尺寸仅为 893aa，远小于 CasRx 的 967aa，因此更便于与 gRNA 一起包装进 AAV 进行递送。

实验例 7：靶向 ANGPTL3 的编辑

本实验例参照实验例 4 的方法。

构建过表达 ANGPTL3 基因以及 EGFP 基因的载体 Lv-ANGPTL3-T2a-GFP (SEQ ID NO: 52)，其中，ANGPTL3 与 EGFP 使用 2A 肽进行间隔，将 Lv-ANGPTL3-T2a-GFP 质粒包装慢病毒转导 293T 细胞，得到稳定过表达 ANGPTL3 基因的 293T 细胞系（称为 293T-ANGPTL3 细胞）。

用引物退火方式获得靶向靶位点的片段。

将 C13-2-BsaI 载体 (SEQ ID NO: 15) 使用 Bsa I 内切酶进行酶切后，将退火产物和酶切后纯化回收的骨架进行 T4 连接，转化大肠杆菌后挑选阳性克隆并提取得到 C13-2 靶向 ANGPTL3 的质粒 (CMV 驱动 C13-2 蛋白表达，U6 启动子驱动 gRNA 表达，gRNA 的 DR 序列为 SEQ ID NO: 3，gRNA 指导序列如表 9 所示)，将质粒转染 293T-ANGPTL3 细胞。其中阴性对照组转染 C13-2-BsaI 质粒。

表 9. 靶向 ANGPTL3 RNA 的 gRNA 指导序列

gRNA	gRNA 指导序列
ANGPTL3-gRNA1	CAUGAAAAACUUGAGAGUUGCUGGGUCUGA (SEQ ID NO: 42)
ANGPTL3-gRNA2	GAAUUAAGUUAGUUAGUUGCUCUUCUAAA (SEQ ID NO: 43)
ANGPTL3-gRNA3	CGAUGUUGAAUUAUGUCCAUGGACUACCU (SEQ ID NO: 44)

ANGPTL3-gRNA4	GAUAGAGAAAUUUCUGUGGGUUCUUGAAUA (SEQ ID NO: 45)
ANGPTL3-gRNA5	CUGGAGAAGGUCUUUGAUGCUAUUAUCUUG (SEQ ID NO: 46)
ANGPTL3-gRNA6	CACUAUGGAGUAUAUCUUCUCUAGGCCCAA (SEQ ID NO: 47)
ANGPTL3-gRNA7	CCACACUCAUCAUGCCACCACCAGCCUCCU (SEQ ID NO: 48)
ANGPTL3-gRNA8	GACCAUCUAAAUAUGAUUCCCACAUCACAA (SEQ ID NO: 49)

转染后 72h, 提取 RNA, 反转录, 反转录产物进行 qPCR 检测。

qPCR 所使用引物如下所示:

检测 ANGPTL3:

上游引物: 5'-CCAGAACACCCAGAAGTAACT-3' (SEQ ID NO: 50)

下游引物: 5'-TCTGTGGGTTCTTGAATACTAGTC-3' (SEQ ID NO: 51)

检测内参 GAPDH:

上游引物: 5'-CCATGGGGAAGGTGAAGGTC-3' (SEQ ID NO: 30)

下游引物: 5'-GAAGGGGTCATTGATGGCAAC-3' (SEQ ID NO: 31)

使用相对定量方法即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶 RNA 的含量。重组质粒转染细胞、提取 RNA、反转录以及 qPCR 均进行独立的 3 次生物学重复实验, 并获得 3 次的平均结果。如表 10 和图 7 所示。

表 10. ANGPTL3 RNA 的敲降测试结果

实验分组	实验 1	实验 2	实验 3	平均
C13-2-BsaI	1.00	1.00	1.00	1.00
ANGPTL3-gRNA1	0.54	0.27	0.49	0.43
ANGPTL3-gRNA2	0.17	0.24	0.20	0.20
ANGPTL3-gRNA3	0.59	0.38	0.44	0.47
ANGPTL3-gRNA4	0.02	0.02	0.01	0.02
ANGPTL3-gRNA5	0.26	0.28	0.38	0.31
ANGPTL3-gRNA6	0.33	0.25	0.33	0.30
ANGPTL3-gRNA7	0.73	0.37	0.60	0.57
ANGPTL3-gRNA8	0.64	0.67	0.87	0.73

实验数据显示, C13-2 可对 ANGPTL3 RNA 实现有效的敲降, 其中 gRNA2、gRNA4、gRNA5、gRNA6 的编辑效果显著。

实验例 8: 使用 C13-2 失活突变体 (dC13-2) 进行编辑

构建得到 C13-2-VEGFA 载体 (SEQ ID NO: 72)，其可表达 C13-2 蛋白以及靶向 VEGFA 的 gRNA，该 gRNA 指导序列为 TGGGTGCAGCCTGGGACCACTTGGCATGG (SEQ ID NO: 73)。

然后使用常规的同源重组方法由 C13-2-VEGFA 载体构建得到 C13-2 的 R4xH 突变体验证载体，如表 11 所示。

突变体载体相对于 C13-2-VEGFA 载体的 C13-2 编码序列引入以下突变：

R210A+H215A：AGAAACGCCACCGCCCAC (SEQ ID NO: 74) → GCAAACGCCACCGCCGCC (SEQ ID NO: 75)；

R750A+H755A：AGAAAGACCAAGAGACAC (SEQ ID NO: 76) → GCAAAGACCAAGAGAGCC (SEQ ID NO: 77)；和/或

R785A+H790A：AGAAACGACGTGGAGCAC (SEQ ID NO: 78) → GCAAACGACGTGGAGGCC (SEQ ID NO: 79)。

表 11. 用于测试 C13-2 失活突变的载体

质粒载体	备注
C13-2-BsaI (SEQ ID NO: 15)	C13-2 阴性对照
C13-2-VEGFA (SEQ ID NO: 72)	表达野生型的 C13-2
R4xH-1-VEGFA	表达 C13-2 突变体，突变 C13-2 第 1 个 R4xH(R210A/H215A)
R4xH-2-VEGFA	表达 C13-2 突变体，突变 C13-2 第 2 个 R4xH(R750A/H755A)
R4xH-3-VEGFA	表达 C13-2 突变体，突变 C13-2 第 3 个 R4xH(R785A/H790A)
R4xH(1,3)-VEGFA	表达 C13-2 突变体，突变 C13-2 第 1、3 个 R4xH(R210A/H215A, R785A/H790A)
R4xH(1,2,3)-VEGFA	表达 C13-2 突变体，突变 C13-2 全部 3 个 R4xH(R210A/H215A, R750A/H755A, R785A/H790A)
293T-NC	未处理的 293T 细胞

将载体转染 293T 细胞系。按照 Lipofectamine 2000 (Thermo) 说明书操作转染。72h 后使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA。将 3 批次实验提取的 RNA 送测序公司进行 RNAseq 测序，检测 VEGFA RNA 量如下表 12 所示：

表 12. RNAseq 测序确定的 VEGFA RNA 量

分组	tpm 值(平均)	相对 C13-2-BsaI 组的减少量
----	-----------	---------------------

C13-2-BsaI	67.99067264	0
R4xH-1-VEGFA	61.02221547	10.25
R4xH-2-VEGFA	36.83780119	45.82
R4xH-3-VEGFA	57.89735168	14.85
R4xH(1,3)-VEGFA	52.12446721	23.34
R4xH(1,2,3)-VEGFA	64.72357693	4.81

表 12 的实验数据表明，引入 R750A+H755A 突变后编辑活性仍较高，引入 R210A+H215A 和/或 R785A+H790A 突变后保留较弱的编辑活性，同时引入 R210A+H215A、R750A+H755A 和 R785A+H790A 突变后才使得编辑活性几乎完全丧失。

实验例 9: C13-2 截短体的测试

构建靶向内源基因 VEGFA 的 C13-2 截短体的验证载体

使用三片段同源重组的方法，由 C13-2-VEGFA 质粒 (SEQ ID NO: 72) 构建得到表 13 所示的各截短体的验证载体 (与 C13-2-VEGFA 载体的区别仅在于 C13-2 的编码序列被截短)，其可表达各截短体蛋白，以及靶向 VEGFA 的 gRNA。

表 13. 构建的 C13-2 截短体的验证载体

载体	表达产物/备注
C13-2-BsaI (SEQ ID NO: 15)	阴性对照
C13-2-VEGFA	野生型的 C13-2
C10	缺失 C13-2 的 91-120 位氨基酸的截短体
C16	缺失 C13-2 的 141-180 位氨基酸的截短体
C22	缺失 C13-2 的 211-240 位氨基酸的截短体
C34	缺失 C13-2 的 331-360 位氨基酸的截短体
C38	缺失 C13-2 的 351-400 位氨基酸的截短体
C44	缺失 C13-2 的 431-460 位氨基酸的截短体
C48	缺失 C13-2 的 461-500 位氨基酸的截短体
C54	缺失 C13-2 的 511-550 位氨基酸的截短体
C62	缺失 C13-2 的 611-640 位氨基酸的截短体
C64	缺失 C13-2 的 631-660 位氨基酸的截短体

C67	缺失 C13-2 的 661-690 位氨基酸的截短体
C74	缺失 C13-2 的 691-760 位氨基酸的截短体
C84	缺失 C13-2 的 821-860 位氨基酸的截短体
C87	缺失 C13-2 的 861-890 位氨基酸的截短体
293T-NC	对照组, 未转染的 293T 细胞

按照 Lipofectamine 2000 (Thermo) 说明书操作, 将验证载体以及对照载体转染 293T 细胞系。72h 后使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA, 使用 Evo M-MLV Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒进行反转录。按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 使用说明配置反应体系, 使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

其中 qPCR 所使用引物如下所示:

检测 VEGFA: ACCTCCACCATGCCAAGTGG (SEQ ID NO: 88)

CAGGGTCTCGATTGGATGGC (SEQ ID NO: 89)

检测内参 GAPDH: CCATGGGGAAGGTGAAGGTC (SEQ ID NO: 30)

GAAGGGGTCATTGATGGCAAC (SEQ ID NO: 31)

使用相对定量方法即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标 RNA。进行多批次重复试验, 结果取平均值。如表 14 所示。

表 14. 截短体编辑后的 VEGFA RNA 相对量

分组	VEGFA RNA 相对量
C13-2-BsaI	1.00
C13-2-VEGFA	0.06
C10	0.68
C16	0.52
C22	0.51
C34	0.77
C38	0.51
C44	0.65
C48	0.66
C54	0.72
C62	0.62
C64	0.69

C67	0.69
C74	0.65
C84	0.81
C87	0.90
293T-NC	1.05

本实验例的 C13-2 截短体保留一定的 RNA 编辑活性。

实验例 10: 不同 DR (同向重复) 序列的测试

构建编码不同 DR 序列 (如表 15 所示) 的靶向内源基因 VEGFA 和 PTBP1 的验证载体 (如表 16 所示)。

表 15. 设计的不同 DR 序列

DR 名	DR 序列	备注
DRrc	GGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAG AC (SEQ ID NO: 3)	-
DR2	CCGCACAGTCCCTACAGGTTTGTAGAGTCATCTT CC (SEQ ID NO: 80)	-
DR2rc	GGAAGATGACTCTACAAACCTGTAGGGACTGTGC GG (SEQ ID NO: 81)	与 DR2 反向互补
DR3	GGTGTACAGGGTGCCTGGATTTGACAGGGTTACA GC (SEQ ID NO: 82)	-
DR3rc	GCTGTAACCCTGTCAAATCCAGGCACCCTGTACA CC (SEQ ID NO: 83)	与 DR3 反向互补
DR4	GGTGTACAGGGTGCCTAGATTTGACAGGGTTACA GC (SEQ ID NO: 84)	-
DR4rc	GCTGTAACCCTGTCAAATCTAGGCACCCTGTACA CC (SEQ ID NO: 85)	与 DR4 反向互补
DR-hf1	GGAAGAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGAC (SEQ ID NO: 86)	删除 DRrc 茎区未配对的 2nt
DR-hf2	GGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGAGTTCTGAG AC (SEQ ID NO: 87)	DRrc 茎区的 U-G 配对碱基改为 U-A

表 16. 构建得到表达各种 gRNA 的载体质粒

质粒名	各质粒表达的 gRNA 的靶 RNA	备注
C13-2-BsaI	不靶向 VEGFA 或 PTBP1	C13-2 阴性对照
C13-2-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DRrc
C13-2-DR2-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR2
C13-2-DR2rc-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR2rc
C13-2-DR3-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR3
C13-2-DR3rc-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR3rc
C13-2-DR4-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR4
C13-2-DR4rc-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR4rc
C13-2-DR-hf1-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR-hf1
C13-2-DR-hf2-VEGFA	VEGFA	DR 序列为 DR-hf2
C13-2-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DRrc
C13-2-DR2-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR2
C13-2-DR2rc-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR2rc
C13-2-DR3-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR3
C13-2-DR3rc-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR3rc
C13-2-DR4-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR4
C13-2-DR4rc-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR4rc
C13-2-DR-hf1-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR-hf1
C13-2-DR-hf2-PTBP1	PTBP1	DR 序列为 DR-hf2
293T-NC	N/A	未处理的 293T 细胞

由实验例 8 的 C13-2-VEGFA 载体以及实验例 4 的 C13-2 靶向 PTBP1 的载体质粒通过常规方法构建得到(仅是 crRNA 表达框序列发生了替换)表 16 中表达各种不同 crRNA 序列(5'-guide-DR-3')的验证载体。

按前述实验例的实验方法将验证载体以及对照载体转染 293T 细胞, 72h 后提取 RNA、反转录、qPCR 试剂盒进行检测。其中 qPCR 所使用引物如下所示:

检测 VEGFA: ACCTCCACCATGCCAAGTGG (SEQ ID NO: 88)

CAGGGTCTCGATTGGATGGC (SEQ ID NO: 89)

检测 PTBP1: ATTGTCACAGATATAGCCGTTG (SEQ ID NO: 26)

GCTGTCATTTCCGTTTGCTG (SEQ ID NO: 27)

检测内参 GAPDH: CCATGGGGAAGGTGAAGGTC (SEQ ID NO: 30)

GAAGGGGTCATTGATGGCAAC (SEQ ID NO: 31)

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标 RNA 的变化。进行多批次重复试验, 结果取平均值。如表 17、表 18、图 9、图 10 所示。

表 17. 不同 gRNA 编辑后的 VEGFA RNA 相对量

VEGFA	VEGFA RNA 相对量
C13-2-BsaI	1.00
C13-2-VEGFA	0.03
C13-2-DR2-VEGFA	0.84
C13-2-DR2rc-VEGFA	0.28
C13-2-DR3-VEGFA	0.51
C13-2-DR3rc-VEGFA	0.85
C13-2-DR4-VEGFA	0.57
C13-2-DR4rc-VEGFA	0.95
C13-2-DR-hf1-VEGFA	1.02
C13-2-DR-hf2-VEGFA	0.03
293T-NC	1.22

表 18. 不同 gRNA 编辑后的 PTBP1 RNA 相对量

PTBP1	平均值
C13-2-BsaI	1.00
C13-2-PTBP1	0.37
C13-2-DR-hf1-PTBP1	1.21
C13-2-DR-hf2-PTBP1	0.25
293T-NC	1.05

表 17、表 18 实验结果显示, 使用 DRrc 或 DR-hf2 时编辑效率最高, 优于其他 DR 序列 ($P < 0.05$)。使用 DR2rc、DR3 或 DR4 时也可达到比较高的编辑效率, 优于 DR2、DR3rc、DR4rc 和 DR-hf1。

同向重复序列 DRrc、DR-hf2、DR2rc 的序列比对结果如图 18 所示。
RNAfold 预测同向重复序列 DR-hf2 的 RNA 二级结构如图 19 所示。

实验例 11: C13-2 与主流 Cas13 工具的对比

本实验例全部验证载体及对照载体（表 19）均使用与 C13-2-BsaI（SEQ ID NO: 15）同样的骨架序列，仅 Cas13 编码序列、crRNA 编码序列不同。各载体的 NLS 序列及其连接序列相同。所有载体结构为 CMV-NLS-Cas13-2×NLS-U6-crRNA，全部 Cas13 均在 N 端带有 1 个 NLS，在 C 端带有 2 个 NLS，总共为 3×NLS 的结构。

因为 293T 细胞中不含有 EGFP 序列，因此使用靶向 GFP 的载体作为阴性对照。

靶向 GFP 的指导序列为 tgccgttctctctgcttgctggccatgatat（SEQ ID NO: 90）。

靶向 PTBP1 的指导序列为：

GTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG（SEQ ID NO: 6）。

靶向 VEGFA 的指导序列为：

TGGGTGCAGCCTGGGACCACTTGGCATGG（SEQ ID NO: 73）。

表 19. 为与主流 Cas13 工具对比所构建的验证载体及对照载体

质粒名	结构
CasRx-3NLS-GFP	CMV-NLS-CasRx-2×NLS-U6-DR-GFP guide
CasRx-3NLS-PTBP1	CMV-NLS-CasRx-2×NLS-U6-DR-PTBP1 guide（SEQ ID NO: 91）
PspCas13b-3NLS-GFP	CMV-NLS-PspCas13b-2×NLS-U6-GFP guide-DR
PspCas13b-3NLS-PTBP1	CMV-NLS-PspCas13b-2×NLS-U6-PTBP1 guide-DR（SEQ ID NO: 92）
PspCas13b-3NLS-VEGFA	CMV-NLS-PspCas13b-2×NLS-U6-VEGFA guide-DR
Cas13X.1-3NLS-GFP	CMV-NLS-Cas13X.1-2×NLS-U6-GFP guide-DR
Cas13X.1-3NLS-PTBP1	CMV-NLS-Cas13X.1-2×NLS-U6-PTBP1 guide-DR（SEQ ID NO: 93）
Cas13X.1-3NLS-VEGFA	CMV-NLS-Cas13X.1-2×NLS-U6-VEGFA guide-DR
Cas13Y.1-3NLS-GFP	CMV-NLS-Cas13Y.1-2×NLS-U6-GFP guide-DR
Cas13Y.1-3NLS-PTBP1	CMV-NLS-Cas13Y.1-2×NLS-U6-PTBP1 guide-DR（SEQ ID NO: 94）
Cas13Y.1-3NLS-VEGFA	CMV-NLS-Cas13Y.1-2×NLS-U6-VEGFA guide-DR
C13-2-GFP	CMV-NLS-C13-2-2×NLS-U6-DR-GFP guide
C13-2-PTBP1	CMV-NLS-C13-2-2×NLS-U6-DR-PTBP1 guide
C13-2-VEGFA	CMV-NLS-C13-2-2×NLS-U6-DR-VEGFA guide

为节省篇幅，示例性地给出了表 19 中 4 个载体的序列（SEQ ID NO: 91-94）。

将验证载体以及对照载体转染 293T 细胞。未转染质粒的 293T 作空白对照。

按照 Lipofectamine 2000（Thermo）说明书操作转染，48h 后使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。RNA 产物使用 Evo M-MLV Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒进行反转录。按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 使用说明配置反应体系，使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

其中 qPCR 所使用引物如下所示：

检测 VEGFA：ACCTCCACCATGCCAAGTGG（SEQ ID NO: 88）

CAGGGTCTCGATTGGATGGC（SEQ ID NO: 89）

检测 PTBP1：ATTGTCCCAGATATAGCCGTTG（SEQ ID NO: 26）

GCTGTCATTTCCGTTTGCTG（SEQ ID NO: 27）

检测内参 GAPDH：CCATGGGGAAGGTGAAGGTC（SEQ ID NO: 30）

GAAGGGGTCATTGATGGCAAC（SEQ ID NO: 31）

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶 RNA 的量，各 Cas13 蛋白以其各自的靶向 GFP 组为阴性对照。进行多批次实验，结果取平均值。如表 20、表 21、图 11、图 12 所示。

表 20. C13-2 与已知 Cas13 工具靶向 VEGFA RNA

分组	编辑后的 VEGFA RNA 相对量
PspCas13b-3NLS-GFP	0.82
PspCas13b-3NLS-VEGFA	0.45
Cas13X.1-3NLS-GFP	0.94
Cas13X.1-3NLS-VEGFA	0.55
Cas13Y.1-3NLS-GFP	0.98
Cas13Y.1-3NLS-VEGFA	0.67
C13-2-GFP	0.83
C13-2-VEGFA	0.23
293T 空白对照	0.98

在 VEGFA 靶点编辑效果对比中，C13-2 编辑效果很好，优于目前主流的 Cas13 编辑工具，编辑效率 C13-2 > PspCas13b > Cas13X.1 > Cas13Y.1。

表 21. C13-2 与已知 Cas13 工具靶向 PTBP1 RNA

分组	编辑后的 PTBP1 RNA 相对量
----	--------------------

CasRx-3NLS-GFP	1.15
CasRx-3NLS-PTBP1	0.05
PspCas13b-3NLS-GFP	0.98
PspCas13b-3NLS-PTBP1	0.51
Cas13X.1-3NLS-GFP	1.51
Cas13X.1-3NLS-PTBP1	0.56
Cas13Y.1-3NLS-GFP	1.37
Cas13Y.1-3NLS-PTBP1	0.77
C13-2-GFP	1.13
C13-2-PTBP1	0.03
293T 空白对照	1.16

在 PTBP1 靶点编辑效果对比中, C13-2 编辑效果很好, 编辑效率数值 C13-2>CasRx>PspCas13b>Cas13X.1>Cas13Y.1。C13-2 编辑效率明显优于 PspCas13b、Cas13X.1 和 Cas13Y.1 (P<0.05)。

实验例 12: 由 dC13-2 构建单碱基编辑器

本实验例中用于验证单碱基编辑效果的靶点是 EGFP, 用于靶向该 EGFP 的指导序列是 tgccgttctctgctgtgcggccatgatatagacgttggtggctgttgtagttgtactccagcttgtgcc (SEQ ID NO: 95)。

本实验例涉及 dC13-2 的载体表达的都是含 R210A+H215A、R750A+H755A 和 R785A+H790A 突变的 C13-2 失活突变体。

表 22. 单碱基编辑相关的质粒载体及说明

质粒名称	备注
dC13-2-BsaI (SEQ ID NO: 96)	突变 C13-2 全部 3 个 R4XH
dC13-2-EGFP (SEQ ID NO: 97)	不使用 ADAR, 作阴性对照
dC13-2-ADAR-EGFP (SEQ ID NO: 98)	使用 ADAR, 不使用连接肽
dC13-2-A(EAAAK)3A-ADAR-EGFP (SEQ ID NO: 99)	使用 ADAR, 使用刚性连接肽 A(EAAAK)3A
dC13-2-(GGGGS)3-ADAR-EGFP (SEQ ID NO: 100)	使用 ADAR, 使用柔性连接肽(GGGGS)3
pAAV-CMV-EGFP (SEQ ID NO: 101)	表达 EGFP 的质粒

PLKO-PURO-PspGRNA-EGFP (SEQ ID NO: 102)	表达与 PspCas13b 组合使用的 gRNA
pC0055-CMV-dPspCas13b-GS-ADAR2DD (addgene)	表达 dPspCas13b-ADAR 的商业化质粒

使用常规方法构建得到 dC13-2-BsaI 和 dC13-2-EGFP 载体。

由 dC13-2-BsaI 质粒、dC13-2-EGFP 质粒和 pC0055-CMV-dPspCas13b-GS-ADAR2DD 质粒，通过同源重组的方法获得单碱基编辑验证载体

dC13-2-ADAR-EGFP、dC13-2-A(EAAAK)3A-ADAR-EGFP 和 dC13-2-(GGGGS)3-ADAR-EGFP。

将 pC0055-CMV-dPspCas13b-GS-ADAR2DD 作为阳性对照。由于该质粒不含 gRNA 表达框，因此由外包公司合成 gRNA 表达载体 PLKO-PURO-PspGRNA-EGFP。

按照 Lipofectamine 2000 (Thermo) 说明书操作转染，将待验证的载体与 EGFP 报告载体 pAAV-CMV-EGFP 按照 4:1 进行转染，转染方案如下表 23 所示，其中因为 pC0055-CMV-dPspCas13b-GS-ADAR2DD 与 PLKO-PURO-PspGRNA-EGFP-AD 分别表达 PspCas13b-ADAR 蛋白以及 gRNA，因此各按 200ng 进行共转。

表 23. 单碱基编辑验证载体与报告载体转染方案

细胞	293T	
载体比例	验证载体	报告载体
转染验证载体:报告载体 =4:1 (400g: :100ng)	dC13-2-EGFP	pAAV- CMV- EGFP
	dC13-2-ADAR-EGFP	
	dC13-2-A(EAAAK)3A-ADAR-EGFP	
	dC13-2-(GGGGS)3-ADAR-EGFP	
验证载体: 报告载体 =2:2:1 (200:200:100ng)	pC0055-CMV-dPspCas13b-GS- ADAR2DD	pAAV- CMV- EGFP
	PLKO-PURO-PspGRNA-EGFP	

转染 48h 后，使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。RNA 产物使用 Evo M-MLV RT-PCR 通用型反转录酶试剂盒进行反转录，反转录产物使用鉴定引物进行 PCR，并将 PCR 产物送测序公司测序。

鉴定引物序列如下所示（产物长度 704bp）：

agggcgaggagctgtt (SEQ ID NO: 103) ，

gtacagctcgatccatgccg (SEQ ID NO: 104)。

测序结果如图 13 所示，指导序列第 48 位碱基在靶 RNA 上的对应位置产生了 A→G 转换，说明发明人构建的 dC13-2 编辑器成功诱导了单碱基编辑。

其中阴性对照 dC13-2-EGFP 组未发生碱基转换，阳性对照 dPspCas13b-ADAR 组诱导发生了碱基转换。dC13-2 与 ADAR 之间不使用连接肽、使用刚性连接肽 A (EAAAK)₃A 以及使用柔性连接肽(GGGGS)₃ 时均诱导产生了碱基转换。

实验例 13: C13-2 的第一轮突变

第一轮突变原理：使用 AlphaFold v2.1 预测 C13-2 的结构，对属于 REC 叶的 aa 1-89、aa 263-417 进行 N→A 突变和 R→A 突变。

设计的突变体如下表 24 所示。

表 24. 第一轮突变

突变体名称	突变位点	突变体名称	突变位点
M01	R11A	M15	N299A
M02	N34A	M16	N303A
M03	R35A	M17	R308A
M04	R47A	M18	R314A
M05	R58A	M19	R320A
M06	R63A	M20	R328A
M07	R64A	M21	N332A
M08	N68A	M22	R341A
M09	N87A	M23	N346A
M10	N265A	M24	R358A
M11	N274A	M25	N372A
M12	R276A	M26	N383A
M13	R290A	M27	N390A
M14	R294A	M28	N394A

验证载体构建

第一轮突变使用 VEGFA 靶点进行验证。使用前述实验例的 C13-2-VEGFA 载体作为野生型 C13-2 编码载体，使用诺唯赞点突变试剂盒 Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 对其进行改造，得到各突变体的表达构建体（验证载体），用于表达 C13-2 突变体和靶向 VEGFA 的 gRNA。使用的引物如下表 25 所示。

表 25. 用于验证载体的引物序列

突变体	引物序列	SEQ ID NO
M01	AACCAAGGCCAAGgcAATGGGCGTGAAGGCCCT	105
	ATTgcCTTGGCCTTGGTTTTCTTGTCTTGCTC	106

M02	CgcCAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTA	107
	TCGATCTTGCTTCTGgcGCCCTTGCCGAAGGTGGT	108
M03	CAACgcAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTA	109
	TCGATCTTGCTTgcGTTGCCCTTGCCGAAGGTG	110
M04	TACCACGGCgcAGCCCTGGAGACACCCAAGCAC	111
	CAGGGCTgcGCCGTGGTAGCCCTCGGTGAACTC	112
M05	AAGCACTTCGGCATCgcAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATC G	113
	TgcGATGCCGAAGTGCTTGGGTGTCTCCAGGGC	114
M06	TTCGAGGTGAgcAGAATCGACGAGAACGTGGACC	115
	GATTCTgcTCACCTCGAAGCCTCTGATGCCGAA	116
M07	AGGTGAGAAgcAATCGACGAGAACGTGGACCTG	117
	GTCGATTgcTTCTCACCTCGAAGCCTCTGATGC	118
M08	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	119
	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCGAAGCCT	120
M09	TGGTgcCCCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACT	121
	TCTCGCTGGGGgcCACCAGCAGGGCCTCGATGG	122
M10	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTGACC	123
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGGAAGTCCTT	124
M11	TGTTGACCTGCTGgcCGCCAGAGACGTGGAGCA	125
	CGgcCAGCAGGTCGAACAGGATGGCCATGTTCA	126
M12	CgcAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGA	127
	TTCTGCTCCACGTCTgcGGCGTTCAGCAGGTGCGAAC	128
M13	GAGTTCTACgcATTCACCATCAGAAAGGACGGC	129
	GGTGAATgcGTAGAACTCGTCGGTGATCTGCTT	130
M14	TTCACCATCgcAAAGGACGGCAAGAACCTGGGC	131
	GTCCTTgcGATGGTGAATCTGTAGAACTCGTCG	132
M15	CAAGgcCCTGGGCATGAACCTGGTGAAGATCAG	133
	TTCATGCCCAGGgcCTTGCCGTCCTTTCTGATGG	134
M16	CATGgcCCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCAT	135
	ATCTTCACCAGGgcCATGCCCAGGTTCTTGCCG	136
M17	GTGAAGATCgcAGAGATCATCATCGACAGATACGC	137
	GATCTCTgcGATCTTCACCAGGTTTCATGCCAG	138
M18	TCATCATCGACgcATACGCCAGCGGCCTGAGAG	139
	CGTATgcGTGATGATGATCTCTCTGATCTTCA	140
M19	CCTGgcAGACAAGAAGCACGACCCCCACAGACA	141
	TGCTTCTTGCTTgcCAGGCCGCTGGCGTATCTG	142
M20	CCACgcACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTT	143
	TTGATCTTCTGTgcGTGGGGGTCGTGCTTCTTG	144
M21	ACAGAAGATCgcCGTGATCGCCGACTTCCTGAT	145
	ATCACGgcGATCTTCTGTCTGTGGGGGTCGTGC	146
M22	ACTTCTGATCTTgcAGCCCTGAGCCAGAACCAGG	147
	CTgcGAAGATCAGGAAGTCGGCGATCACGTTG	148
M23	CCAGgcCCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAG	149
	ATGATGCCCTGGgcCTGGCTCAGGGCTCTGAAGA	150

M24	CAGCCTGgcACTGACCAAGGACGAGGAGGAGAA	151
	TTGGTCAGTgcCAGGCTGCTCACGGTCTTGTCG	152
M25	ACCACGTGTACCAGgcCGCCGCCGAGCTGGTGTG	153
	CGgcCTGGTACACGTGGTCCTTCTCCTCCTCGT	154
M26	TGGTGAGCgcCTGCCTGACCCCCTACTTCAACG	155
	TCAGGCAGgcGCTCACCATGCCCCACACCAGCT	156
M27	CTACTTCgcCGACCCCAAGAACAAGTACATCCT	157
	TTGGGGTTCGgcGAAGTAGGGGGTTCAGGCAGTTG	158
M28	CAAGgcCAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACGC	159
	AGGATGTACTTGgcCTTGGGGTTCGTTGAAGTAGGG	160

转染

将验证载体以及对照载体按照 Lipofectamine 2000 (Thermo) 说明书转染 293T 细胞。C13-2-BsaI 对照组转染前述实验例的 C13-2-BsaI 载体，WT 对照组转染 C13-2-VEGFA 载体，均表达野生型 C13-2。另设 293T 细胞对照组，不转染任何质粒。

qPCR 检测靶 RNA 水平

转染后 48h 的细胞使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。RNA 产物使用 Evo M-MLV Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒进行反转录，反转录产物使用 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Low Rox Plus) 试剂盒进行检测。

其中 qPCR 所使用引物为 SEQ ID NO: 88、89、30、31。

按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Rox Plus) 使用说明配置反应体系，使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算编辑后的靶 RNA 水平。重复 3 次实验，结果取平均值，如表 26、图 14 所示。

表 26. qPCR 测试突变体靶向编辑后的 VEGFA RNA 水平

分组	编辑后的 VEGFA RNA 相对量	分组	编辑后的 VEGFA RNA 相对量
C13-2-BsaI	1.00	M15	0.02
WT	0.03	M16	0.02
M01	0.03	M17	0.03
M02	0.02	M18	0.02
M03	0.02	M19	0.03
M04	0.02	M20	0.03
M05	0.02	M21	0.02
M06	0.02	M22	0.03
M07	0.02	M23	0.29
M08	0.02	M24	0.27
M09	0.03	M25	0.07

M10	0.03	M26	0.21
M11	0.03	M27	0.11
M12	0.02	M28	0.06
M13	0.02	293T	1.20
M14	0.02		

从 qPCR 检测结果可见，所有点突变体仍保留了高编辑活性。

RNAseq 测序

将编辑后提取的总 RNA 样品进行 RNAseq 测序，建库类型为 LncRNA 链特异性文库，测序数据量是 16G，测序策略是 PE150。

RNAseq 分析原理：

使用 fastqc、multiqc 对数据进行质控，使用 fastp 去除低质量 reads；

比对至人 rRNA 序列进行去除，使用 Hisat2 比对软件比对至 hg38 参考基因组；

比对后使用 Kallisto 软件对基因进行表达水平的定量，而后使用 sleuth 软件进行表达量差异分析，将 $|b| > 0.5$ ， $qval < 0.05$ ， $mean_obs > 2$ 的基因视为差异表达基因；以 293T 细胞对照组为基准；

将指导序列使用 EMBOSS water 软件比对至参考 cDNA，将比对碱基数 ≥ 18 ，错配碱基数 ≤ 6 ，最小连续配对碱基数 ≥ 8 的转录本视为预测脱靶的转录本，对应的基因视为预测得到的潜在脱靶基因；

将显著下调的差异表达基因与预测的潜在脱靶基因取交集，剔除在靶的 VEGFA 基因后，得到脱靶基因集。

RNASeq 结果分析

以 293T 细胞对照组作为基准，分析各组的 VEGFA 基因表达水平，结果如表 27 和图 15 所示。

表 27. RNAseq 测得的 VEGFA 编辑效率

分组	TPM 值	编辑效率(%)
C13-2-BsaI	84.49	4.99
293T	88.93	0
WT	25.71	71.09
M01	25.58	71.24
M02	23.81	73.22
M03	27.48	69.09
M04	28.82	67.59
M05	29.26	67.09
M06	27.44	69.15
M07	17.67	80.13
M08	15.33	82.76
M10	18.21	79.53

M11	30.23	66.01
M12	21.77	75.52
M13	26.53	70.17
M14	24.03	72.98
M15	23.99	73.02
M16	32.67	63.27
M17	37.50	57.83
M18	20.00	77.51
M19	26.05	70.71
M20	26.91	69.74
M21	33.01	62.88
M22	32.30	63.68
M23	49.79	44.01
M24	56.57	36.39
M25	46.40	47.82
M26	61.39	30.97
M27	44.77	49.66
M28	40.39	54.58

RNAseq 结果数据与 qPCR 结果基本吻合。

联合本实验例的 gRNA 时，M02、M07、M08、M10、M12、M14、M15、M18 变体的编辑活性相比野生型 C13-2 略微提高。

差异表达基因数量及脱靶基因数量如表 28 所示。

关于编辑后细胞内表达下调的差异表达基因数量，M04、M09、M17、M22、M25、M27 和 M28 组少于 WT 组。

关于取交集后确定的脱靶基因数量，M01 至 M28 组均为 0，即无脱靶。

表 28. 不同突变体靶向 VEGFA 的差异表达基因及脱靶基因

分组	表达上调的差异表达基因	表达下调的差异表达基因	取交集后确定的脱靶基因数量（已剔除 VEGFA 基因）
WT	59	3	0
M01	89	8	0
M02	107	12	0
M03	168	27	0
M04	62	1	0
M05	131	3	0
M06	109	15	0
M07	88	5	0
M08	193	31	0
M09	43	2	0
M10	90	6	0
M11	108	7	0
M12	109	4	0

M13	123	4	0
M14	112	4	0
M15	110	20	0
M16	175	16	0
M17	125	2	0
M18	57	3	0
M19	111	10	0
M20	124	5	0
M21	159	5	0
M22	76	2	0
M23	81	9	0
M24	89	8	0
M26	45	4	0
M28	151	1	0

实验例 14: C13-2 第二轮突变

突变体设计

基于实验例 1 结果得到 5 个低脱靶突变位点 (M09 N87A、M17 R308A、M28 N394A、M04 R47A、M13 R290A)，围绕 5 个点内部组合或者与其他突变位点组合。另外还设计了保守位点的保守性突变。如表 29 所示。

表 29. 第二轮设计的突变体

突变体	突变	突变体	突变
M2-1	R47A+R290A	M2-22	L304I
M2-2	R47A+R314A	M2-23	V305K
M2-3	R290A+R314A	M2-24	I311M
M2-4	R47A+R290A+R314A	M2-25	D313E
M2-5	R308A+N68A	M2-26	H324Y
M2-6	N394A+N68A	M2-27	P326S
M2-7	N87A+N68A	M2-28	H327V
M2-8	R308A+N265A	M2-29	N332Y
M2-9	N394A+N265A	M2-30	N346D
M2-10	N87A+N265A	M2-31	T353L
M2-11	R308A+N68A+N265A	M2-32	T360S
M2-12	N87A+N68A+N265A	M2-33	E365D
M2-13	T7S	M2-34	A373E
M2-14	A16S	M2-35	M380K
M2-15	S260E	M2-36	S382R
M2-16	A263K	M2-37	K395G
M2-17	M266I	M2-38	Y396D
M2-18	N274K	M2-39	D402L
M2-19	F288Y	M2-40	D411E
M2-20	M302F	M2-41	S418K

M2-21	N303S		
-------	-------	--	--

验证载体构建

第二轮突变选用人 AR（雄激素受体）靶点进行测试，合成得到 C13-2-AR-h3 质粒载体（SEQ ID NO: 161，可表达野生型 C13-2 和靶向 AR 的 h3 gRNA，其指导序列为 SEQ ID NO: 162，即 ATAACATTTCCGAAGACGACAAGAT）。

使用诺唯赞点突变试剂盒 Mut Express MultiS Fast Mutagenesis Kit V2 对 C13-2-AR-h3 质粒载体进行改造，得到各突变体的表达构建体（验证载体），用于表达 C13-2 突变体和 h3 gRNA。使用的引物如下表 30 所示。

表 30. 用于构建突变体表达载体的引物

突变体	引物序列	SEQ ID NO
M2-1	TACCACGGCgcAGCCCTGGAGACACCCAAGC	163
	GGTGAATgcGTAGAACTCGTCGGTGATCTGCT	164
	GAGTTCTACgcATTCACCATCAGAAAGGACGGC	165
	CAGGGCTgcGCCGTGGTAGCCCTCGGT	166
M2-2	TACCACGGCgcAGCCCTGGAGACACCCAAGC	167
	CGTATgcGTCGATGATGATCTCTCTGATCTTCA	168
	TCATCATCGACgcATACGCCAGCGGCCTGAG	169
	CAGGGCTgcGCCGTGGTAGCCCTCGGT	170
M2-3	GAGTTCTACgcATTCACCATCAGAAAGGACGGC	171
	CGTATgcGTCGATGATGATCTCTCTGATCTTCA	172
	TCATCATCGACgcATACGCCAGCGGCCTGAG	173
	GGTGAATgcGTAGAACTCGTCGGTGATCTGCT	174
M2-4	TACCACGGCgcAGCCCTGGAGACACCCAAGC	175
	GGTGAATgcGTAGAACTCGTCGGTGATCTGCT	176
	GAGTTCTACgcATTCACCATCAGAAAGGACGGC	177
	CGTATgcGTCGATGATGATCTCTCTGATCTTCA	178
	TCATCATCGACgcATACGCCAGCGGCCTGAG	179
	CAGGGCTgcGCCGTGGTAGCCCTCGGT	180
M2-5	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	181
	GATCTCTgcGATCTTCACCAGGTTTCATGCC	182
	GTGAAGATCgcAGAGATCATCATCGACAGATACGC	183
	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCG	184
M2-6	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	185
	AGGATGTACTTgcCTTGGGGTCGTTGAAGTAGGG	186
	CAAGgcCAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACG	187
	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCG	188
M2-7	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	189
	TCTCGCTGGGGgcCACCAGCAGGGCCTCGAT	190
	TGGTGgcCCCCAGCGAGAAGGTGGG	191

	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCG	192
M2-8	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTCGACC	193
	GATCTCTgcGATCTTCACCAGGTTTCATGCCC	194
	GTGAAGATCgcAGAGATCATCATCGACAGATACGC	195
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGG	196
M2-9	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTCGACC	197
	AGGATGTACTTGgcCTTGGGGTCGTTGAAGTAGGG	198
	CAAGgcCAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACG	199
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGG	200
M2-10	TGGTGgcCCCCAGCGAGAAGGTGGG	201
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGG	202
	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTCGACC	203
	TCTCGCTGGGGgcCACCAGCAGGGCCTCGAT	204
M2-11	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	205
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGG	206
	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTCGACC	207
	GATCTCTgcGATCTTCACCAGGTTTCATGCCC	208
	GTGAAGATCgcAGAGATCATCATCGACAGATACGC	209
	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCG	210
M2-12	AAGAATCGACGAGgcCGTGGACCTGTGCGGCGA	211
	TCTCGCTGGGGgcCACCAGCAGGGCCTCGAT	212
	TGGTGgcCCCCAGCGAGAAGGTGGG	213
	CATGgcCACGGCGTTCTTGCTCAGG	214
	AAGAACGCCGTGgcCATGGCCATCCTGTTCGACC	215
	ACGgcCTCGTCGATTCTTCTCACCTCG	216
M2-13	ACAAGAAAtCCAAGGCCAAGAGAATGGGCGTG	217
	GGCCTTGgaTTTCTTGTCTTGTCTCATGTCTGA	218
M2-14	AGAATGGGCGTGAAGtCCCTGCTGGCCCACGGCG	219
	GaCTTCACGCCATTCTCTTGGCCTTGGTTTT	220
M2-15	CTTCCTGgaaAAGAACGCCGTGAACATGGCCA	221
	CGTTCTTtCAGGAAGTCCTTGTTACCTTCTT	222
M2-16	GCAAGAAcCaagGTGAACATGGCCATCCTGTTCG	223
	GTTcACcttGTTCTTGCTCAGGAAGTCCTTGTT	224
M2-17	GTGAACATaGCCATCCTGTTCGACCTGCTGAA	225
	AGGATGGCtATGTTACAGGCGTTCTTGCTCAG	226
M2-18	TGTTCGACCTGCTGAAgGCCAGAGACGTGGAGCAG AA	227
	cTTCAGCAGGTTCGAACAGGATGGCCATGTTCA	228
M2-19	CGACGAGTaCTACAGATTACCATCAGAAAGGACG	229
	ATCTGTAGtACTCGTCGGTGATCTGCTTCTTC	230
M2-20	AACCTGGGcttAACCTGGTGAAGATCAGAGAGATC A	231
	AGGTTgaaGCCAGGTTCTTGCCGTCCTTTCT	232
M2-21	CATGAgCCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCA	233
	TCTTCACCAGGcTCATGCCAGGTTCTTGCCG	234

M2-22	GCATGAACatcGTGAAGATCAGAGAGATCATCATCG A	235
	CTTCACgatGTTTCATGCCCAGGTTCTTGCCGT	236
M2-23	GGCATGAACCTGaaGAAGATCAGAGAGATCATCATC GACA	237
	CTTCttCAGGTTTCATGCCCAGGTTCTTGCCGTC	238
M2-24	GAGATCATgATCGACAGATACGCCAGCGGCCT	239
	CTGTTCGATcATGATCTCTCTGATCTTCACCAGGT	240
M2-25	ATCATCGAgAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGA	241
	GCGTATCTcTCGATGATGATCTCTCTGATCTTCA	242
M2-26	ACAAGAAGtACGACCCCCACAGACAGAAGATC	243
	GGGGTCGTaCTTCTTGCTCTCAGGCCGCTGG	244
M2-27	AAGAAGCACGACiCCCACAGACAGAAGATCAACGT G	245
	TGGGaGTCGTGCTTCTTGCTCTCAGGCCGCT	246
M2-28	CCgtCAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACT	247
	TGATCTTCTGTCTGacGGGGTCGTGCTTCTTGCTCT	248
M2-29	GAAGATCtACGTGATCGCCGACTTCCTGATCT	249
	CGATCACGTaGATCTTCTGTCTGTGGGGTTCG	250
M2-30	CAGgACCAGGGCAtCATCGACAAGACCGTGAG	251
	ATGATGCCCTGGTcCTGGCTCAGGGCTCTGAAGA	252
M2-31	TCATCGACAAGctCGTGAGCAGCCTGAGACTGAC	253
	TCACGagCTTGTCGATGATGCCCTGTTCTGGC	254
M2-32	TGAGACTGtCCAAGGACGAGGAGGAGAAGGAC	255
	GTCCTTGgaCAGTCTCAGGCTGCTCACGGTCT	256
M2-33	AAGGACGAGGAGGAcAAGGACCACGTGTACCAGA ACG	257
	TTgTCCTCCTCGTCCTTGGTCAGTCTCAGGCT	258
M2-34	ACGTGTACCAGAACGagGCCGAGCTGGTGTGGGGC	259
	CctCGTTCTGGTACACGTGGTCCTTCTCCTCCT	260
M2-35	AaGGTGAGCAACTGCCTGACCCCTACTTCAA	261
	AGGCAGTTGCTCACctTGCCCCACACCAGCTCGG	262
M2-36	ATGGTGAGgAACTGCCTGACCCCTACTTCAA	263
	AGGCAGTTcCTCACCATGCCCCACACCAGCTC	264
M2-37	CAAGAACggGTACATCCTGAAGTACAAGGACGC	265
	AGGATGTACccGTTCTTGGGGTCGTTGAAGTAGG	266
M2-38	AGAACAAGgACATCCTGAAGTACAAGGACGCC	267
	CAGGATGTcCTTGTTCTTGGGGTCGTTGAAGT	268
M2-39	AGTACAAGctCGCCAAGACCCCGGCGACTTCG	269
	TCTTGGCCgagCTTGTACTTCAGGATGTACTTGTTCT G	270
M2-40	TTCGAGGAgTGGATCACCAGCAAGATCAGCGA	271
	GTGATCCAeTCCTCGAAGTCGCCGGGGGTCTT	272
M2-41	CAAGATCAagGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGT	273
	TCGTCTCctTGATCTTGCTGGTGATCCAGTCC	274

转染

将验证载体以及对照载体按照 Lipofectamine 2000 (Thermo) 说明书转染 293T 细胞。C13-2-BsaI 对照组转染前述实验例的 C13-2-BsaI 载体，WT 对照组转染 C13-2-AR-h3 载体，均表达野生型 C13-2。另设 293T 细胞对照组，不转染任何质粒。

qPCR 检测靶 RNA 水平

转染后 48h 的细胞使用 SteadyPure Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取 RNA，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。RNA 产物使用 Evo M-MLV Mix Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒进行反转录，反转录产物使用 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Low Rox Plus) 试剂盒进行检测。

其中 qPCR 所使用引物如下所示：

检测 AR: CCAGGGACCATGTTTTGCC (SEQ ID NO: 275)

CGAAGACGACAAGATGGACAA (SEQ ID NO: 276)

检测内参 GAPDH: SEQ ID NO: 30、31。

按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (Rox Plus) 使用说明配置反应体系，使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 进行检测。

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算编辑后的靶 RNA 水平。重复 3 次实验，结果取平均值，如表 31、图 16 所示。

表 31. qPCR 测试突变体靶向编辑后的 AR RNA 水平

分组	编辑后的 AR RNA 相对量	分组	编辑后的 AR RNA 相对量
BsaI	1.00	M2-24	0.06
WT2	0.13	M2-25	0.08
M2-2	0.09	M2-26	0.07
M2-3	0.09	M2-27	0.10
M2-5	0.14	M2-28	0.11
M2-6	0.12	M2-29	0.12
M2-7	0.15	M2-30	0.10
M2-9	0.11	M2-31	0.10
M2-12	0.19	M2-32	0.10
M2-13	0.15	M2-33	0.07
M2-14	0.14	M2-34	0.07
M2-15	0.15	M2-35	0.09
M2-16	0.09	M2-36	0.08
M2-17	0.07	M2-37	0.26
M2-18	0.07	M2-38	0.16
M2-19	0.05	M2-39	0.10
M2-20	0.09	M2-40	0.07

M2-21	0.13	M2-41	0.08
M2-22	0.10	293T	1.21
M2-23	0.07		

RNAseq 测序

将编辑后提取的总 RNA 样品进行 RNAseq 测序，建库类型为 LncRNA 链特异性文库，测序数据量是 16G，测序策略是 PE150。

RNAseq 分析原理：

使用 fastqc、multiqc 对数据进行质控，使用 fastp 去除低质量 reads；

比对至人 rRNA 的序列进行去除，使用 Hisat2 比对至 hg38 参考基因组；

比对后使用 Kallisto 软件对基因进行表达水平的定量，而后使用 sleuth 软件进行表达量差异分析，将 $|b| > 0.5$ ， $qval < 0.05$ ， $mean_obs > 2$ 的基因视为差异表达基因；

将指导序列使用 EMBOSS water 软件比对至参考 cDNA，将比对碱基数 ≥ 18 ，错配碱基数 ≤ 6 ，最小连续配对碱基数 ≥ 8 的转录本视为预测脱靶的转录本，对应的基因视为预测的脱靶基因；

将显著下调的差异表达基因与预测的脱靶基因取交集，剔除在靶的 AR 基因后，得到脱靶基因集。

RNASeq 结果分析

以 293T 细胞对照组作为基准，分析各组的 AR 基因表达水平及编辑效率（取平均值），结果如表 32 和图 17 所示。

表 32. RNAseq 测得的 AR 编辑效率

分组	TPM 值	编辑效率(%)
C13-2-BsaI	7.34	17.91
293T	8.94	0
WT	5.62	37.17
M2-1	4.36	51.28
M2-2	4.27	52.2
M2-3	4.65	47.99
M2-4	4.98	44.28
M2-5	6.75	24.54
M2-6	6.36	28.91
M2-7	6.12	31.61
M2-8	5.24	41.38
M2-9	3.85	56.96
M2-10	4.42	50.56
M2-11	5.20	41.82
M2-12	6.62	25.96
M2-13	6.95	22.34
M2-14	5.90	34.01

M2-15	5.44	39.18
M2-16	3.69	58.71
M2-17	4.13	53.8
M2-18	3.38	62.18
M2-19	3.73	58.25
M2-20	5.10	42.96
M2-21	6.83	23.58
M2-22	6.02	32.7
M2-23	4.32	51.74
M2-24	4.56	49.02
M2-25	3.74	58.2
M2-26	4.19	53.18
M2-27	5.24	41.43
M2-28	5.00	44.06
M2-29	5.87	34.42
M2-30	5.74	35.81
M2-31	4.95	44.66
M2-32	4.58	48.76
M2-33	3.47	61.22
M2-34	3.93	56.1
M2-35	4.69	47.52
M2-36	5.29	40.84
M2-37	7.93	11.32
M2-38	6.49	27.47
M2-39	4.50	49.73
M2-40	4.60	48.62
M2-41	3.65	59.17

RNAseq 结果数据与 qPCR 结果基本吻合。

联合本实验例的 gRNA 时，M2-1、M2-2、M2-3、M2-4、M2-9、M2-10、M2-16、M2-17、M2-18、M2-19、M2-23、M2-24、M2-25、M2-26、M2-32、M2-33、M2-34、M2-35、M2-39、M2-40 和 M2-41 变体的编辑活性比野生型 C13-2 高。

差异表达基因数量及脱靶基因数量如表 33 所示。

关于编辑后细胞内表达下调的差异表达基因数量，M2-1、M2-2、M2-3、M2-4、M2-5、M2-6、M2-7、M2-8、M2-10、M2-13、M2-14、M2-15、M2-16、M2-21、M2-22、M2-23、M2-24、M2-25、M2-26、M2-27、M2-28、M2-29、M2-30、M2-31、M2-32、M2-33、M2-34、M2-35、M2-36、M2-37、M2-38、M2-39、M2-40 和 M2-41 组少于 WT 组。

关于取交集后确定的脱靶基因数量，M2-1、M2-2、M2-3、M2-4、M2-5、M2-6、M2-7、M2-8、M2-10、M2-13、M2-14、M2-15、M2-16、M2-21、M2-22、M2-23、M2-24、M2-25、M2-26、M2-27、M2-28、M2-29、M2-30、M2-31、M2-32、M2-33、M2-35、M2-

36、M2-37、M2-38、M2-39、M2-40 和 M2-41 组少于 WT 组。其中，M2-1、M2-6、M2-7、M2-14、M2-15、M2-22、M2-31、M2-38、M2-39 无脱靶。

表 33. 突变体靶向 AR 时的差异表达基因及脱靶基因

分组	表达上调的 差异表达基 因	表达下调的 差异表达基 因	取交集后确定的脱靶 基因数量（已剔除 AR 基因）
C13-2-BsaI	4	42	N/A
WT	1199	1023	54
M2-1	42	4	0
M2-2	987	670	40
M2-3	55	5	1
M2-4	497	114	4
M2-5	1080	923	39
M2-6	254	18	0
M2-7	55	2	0
M2-8	914	633	24
M2-9	1439	1508	68
M2-10	1195	942	42
M2-11	2344	2156	102
M2-12	1426	1366	75
M2-13	775	547	24
M2-14	41	5	0
M2-15	85	3	0
M2-16	535	165	9
M2-17	1225	1055	57
M2-18	1551	1255	88
M2-19	1481	1404	81
M2-20	1332	1264	58
M2-21	301	38	2
M2-22	39	3	0
M2-23	193	14	1
M2-24	842	318	21
M2-25	908	624	31
M2-26	1221	820	50
M2-27	974	457	24
M2-28	755	443	20
M2-29	473	122	8
M2-30	886	490	20
M2-31	110	3	0
M2-32	694	295	14
M2-33	766	417	18
M2-34	1149	959	57

M2-35	1129	861	44
M2-36	592	397	20
M2-37	306	50	2
M2-38	51	4	0
M2-39	101	2	0
M2-40	828	348	16
M2-41	837	385	21

实验例 15: 靶蛋白水平的测试

将前述实验例的 C13-2-VEGFA 载体及阴性对照载体 C13-2-BsaI 转染 293T 细胞 (Lipofectamine 2000, Thermo Fisher), 37°C 培养 72h 后收集上清。使用 Elascience 公司的 Human VEGF-A (Vascular Endothelial Cell Growth Factor A) ELISA Kit 检测 VEGFA 蛋白的水平, 显示相比阴性对照组的 VEGFA 蛋白表达量下调了 97.4%。

在 293T 细胞中, 使用载体表达 CasRx、以及含相同指导序列的 gRNA 进行编辑后, 相比 CasRx 阴性对照组的 VEGFA 蛋白表达量下调了 75.7%。

序列:

SEQ ID NO: 1 (野生型 C13-2 蛋白序列, 893aa):

MSKDKKTKAKRMGVKALLAHGEDKLTMTTFGKGNRSKIEFTEGYHGRALETPK
HFGIRGFVRRIDENVDLCGDLEEGKTIEALLVNPSEKVGEDYLKLGKGTLEKRFFGREF
PHDNIRIQLIYNILDIYKILGMNVADILYALGNMQDTELDIDMFGQSLNEDNLKECLK
RMRPYMGYFGDIFKISPKGENIADREHNKKVLRCSVLRNATAHDKQDEYPWFKSSDI
YETKIFKADMWKIHKDQYREKIKKVNKDFLSKNAVNMAILFDLLNARDVEQKKQITDE
FYRFTIRKDGKNLGMNLVKIREIHDYASGLRDKKHDPHRQKINVIADFLIFRALSQNN
GIIDKTVSSLRLTKDEEEKDHVYQNAELVWGMVSNCLTPYFNDPKNKYILKYKDAK
TPGDFEDWITSKISEDGEPFVKVLSFLCNFLEGKEINELLTAYIHKFECIQDFLNVISSLG
ENVQFQPRFALFNNASFAQNVAVQLRILASIGKMKPDLTEAKRPLYKAAIRMLCPPEKW
EKYTSDEWLEKNMLLNSEDRKNDKQVNPFRNFIAGNVIESRRFMVLRYSKPKA
VRAIMQNRSIVNYVLHRLPSEQVHRYASVFPENFADLEQEIDFLTKKLFESFEELLHEK
DVILNNSRSHKPSLEIERLKAITGLYLSVAYIAIKNIVKANARYYIAFAVFERDKELVKAK
DARIQTKIPETDFPDYFCLTQYYLDRDEEEKKFPGDPRDKEAFFEHLRKTKRHFQSKQR
EWLNEKIADAKSSQATGLLLREARNVVEHLNVLRAIPDYIQDFRHGEKGETAMNSYFE
LYHYLMQRLMLKNTTELDLSHWSGWIMRSGRPDRDLIQIAFVSLAYNLPRYRNLTKEH
HFDDTVLQKIREKESLD

SEQ ID NO: 2 (CasRx-AQp1 质粒表达的 CasRx 的氨基酸序列, 966aa) :

IEKKKSFAKGMGVKSTLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGDSIRSVNEGEAFSA
EMADKNAGYKIGNAKFSPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGLKETLEKRYFGESADG
NDNICIQVIHNILDIEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFGKFSTVYTYDEFKDPPEH
RAAFNNNDKLINAIIKAQYDEFDNFLDNPRLLGYFGQAFFSKEGRNYIINYGNEDYDILAL
LSGLRHWVHNNNEESRISRTWLYNLDKNLDNEYISTLNYLYDRITNELTNSFSKNSAA
NVNYIAETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGFNITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVF
DSIRTKVYTMMDFVIYRYIEEDAKVAAANKSLPDNEKSLSEKDIFVINLRGSFNDDQK
DALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGNKTREYKKKDPRLPRILPAGRDVSAFSKLM
YALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNIQSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAKIADEL
LIKSFARMGEPADARRAMYIDAIRILGTNLSYDELKALADTFSLDENGKLLKKGKHG
MRNFIINNVISNKRFLHYLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGRIADIQKKQNGKQNGKQI
DRYYETCIGKDKGKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKKRSVIEDTGRENAEREKFKKII

SLYLTVIYHILKNIVNINARYVIGFHCVERDAQLYKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCA
GIDETAPDKRKDVEKEMAERAKESIDSLESANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINREK
AKTALNAYLRNTKWNVIREDLLRIDNKTCTLFRNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVNSY
FQLYHYIMQRIIMNEREYKSSGKVSEYFDAVNDEKKYNDRLKLLCVPFGYCI PRFKNL
SIEALFDRNEAAKFDKEKKKVS GNS

SEQ ID NO: 3 (C13-2 gRNA 同向重复序列/骨架序列):

5'-GGAAGAU AACUCUACAA ACCUGUAGGGUUCUGAGAC-3'

SEQ ID NO: 4 (靶向 EGFP 的指导序列):

ugccguucucugcuugucggccaugauau

SEQ ID NO: 5 (靶向 AQp1 的指导序列):

AGGGCAGAACCGAUGCUGAUGAAGAC

SEQ ID NO: 6 (靶向 PTBP1 的指导序列):

GUGGUUGGAGAACUGGAUGUAGAUGGGCUG

SEQ ID NO: 7 (靶向 AQp1 的 shRNA):

CCACGACCCUCUUUGUCUUCACUCGAGUGAAGACAAAGAGGGUCGUGG

SEQ ID NO: 8 (靶向 PTBP1 的 shRNA):

CAGCCAUCUACAUCAGUUCUCGAGGAACUGGAUGUAGAUGGGCUG

SEQ ID NO: 9 (野生型 C13-2 DNA 编码序列):

ATGAGCAAAGACAAAAAACA AAAGCGAAACGAATGGGAGTCAAAGCCCTG
TTGGCTCACGGGGAAGATAAACTGACGATGACCACCTTTGGGAAAGGAAACCGTTC
GAAGATCGAGTTTACGGAAGGGTATCACGGCCGAGCGCTTGAGACCCCCAAACT
TTGGAATACGCGGCTTTGAGGTAAGGAGGATCGATGAAAACGTCGATCTCTGCGGG
GATCTCGAGGAGGGGAAAACGATCGAGGCCTTGCTGGTCAACCCGTCTGAAAAG
TCGGCGAGGACTACCTCAAGCTTAAGGGGACACTGGAAAACGTTTCTTCGGCCGT
GAATTTCCGCATGACAACATCCGGATCCAGCTCATCTATAATATTCTCGACATTTATA
AGATTTTGGGGATGAATGTCGCTGATATTCTTTACGCGCTGGGAAACATGCAGGATA
CAGAGCTGGACATTGATATGTTTGGACAGTCTTTGAACAATGAAGACAACCTTAAA
GAATGTCTGAAACGAATGCGGCCTTATATGGGCTATTTTCGGAGATATTTCAAGATTT
CCCCAAAAGGCGAGAACATAGCCGATCGGGAACATAACAAAAAAGTTCTGCGCTG
TATTTCTGTTCTGCGCAACGCTACCGCCCATGACAAACAAGACGAATATCCGTGGTT
CAAGAGCAGCGACATCTACGAAACGAAAATTTTAAAGGCGGACATGTGGAAAATCA
TCAAGGACCAATATCGGGAAAAGATCAAGAAAGTCAATAAGGATTTTTTATCGAAA

AACGCGGTAAACATGGCCATCCTATTTGACCTTCTGAATGCCCGTGATGTGGAACAG
AAAAAGCAGATCACGGATGAATTCTATCGTTTCACGATTCGAAAAGACGGGAAGAA
TCTGGGGATGAATCTGGTTAAGATCCGCGAGATAATTATTGATCGTTACGCCAGTGG
CCTCCGTGATAAAAAGCACGATCCTCACCGCCAGAAAATCAATGTGATCGCGGACT
TCCTGATTTTCCGCGCTCTTTCGCAAATCAGGGAATCATCGACAAGACCGTTTCCA
GCCTGCGCCTCACGAAAGACGAAGAGGAAAAAGACCACGTGTACCAGAATGCCGC
GGA ACTGGTCTGGGGGATGGTCAGTAATTGTTTGACCCCGTATTTTAACGACCCTAA
AAATAAATACATTCTTAAATACAAAGACGCCAAA ACTCCTGGTGACTTCGAGGATTG
GATCACCAGTAAAATCTCGGAGGATGACGGGGAGCCGTTTCGTGAAAGTGCTTTCGT
TCCTCTGTAATTTCTGGAAGGGAAGGAAATCAACGAGCTGCTGACCGCTTACATTC
ATAAATTCGAGTGTATT CAGGACTTCTTGAACGTGATTTCCAGTCTTGGGGAAAACG
TTCAGTTTCAGCCTCGTTTCGCGCTGTTCAACAATGCCAGTTTCGCCAAAATGTTG
CGGTACAGTTGCGTATCCTGGCAAGTATCGGGAAGATGAAACCCGATTTGACCGAG
GCGAAACGCCCGCTTTACAAGGCAGCGATTCGGATGCTTTGTCCTCCAGAGAAGTG
GGAAAATACACCTCGGATGAGTGGCTTGAAAAAATATGCTCCTCAATTCGAGG
ACCGTAAAAATGATAAAAAGAAGAAACAGGTCAACCCTTTCCGGAATTT CATCGCG
GGGAATGTGATCGAGTCACGTCGGTTTATGTATCTGGTCCGGTATTCAAAGCCGAAA
GCGGTTTCGTGCGATTATGCAAACCGGAGTATCGTGA ACTATGTTCTTCACAGGCTT
CCGTCCGAGCAGGTT CACCGGTACGCCAGCGTGTTTCCTGAAAATTTCCGCCGATCT
GGAACAGGAAATTGACTTCTTGACAAAGAACTTTTCGAATTCTCATTTCGAGGAAC
TCCTCCATGAAAAGGATGTGATTTTGAATAATTCCAGATCTCACAAACCTTCCTTAG
AGATCGAACGCCTTAAAGCCATTACAGGGCTGTACCTTTCGGTTGCCTACATCGCCA
TCAAAAACATCGTGAAAGCCAACGCACGGTATTACATCGCCTTCGCGGTTTTTCGAA
CGTGACAAGGAACTGGTGAAAGCCAAGGACGCACGAATCCAGACGAAGATCCCCG
AGACAGATTTTCCGGACTATTTCTGCCTCACGCAGTATTACCTTGACCGCGATGAGG
AGAAAAAATTC CCGGGTGACCCGCGTGATAAAGAGGCTTTTTTCGAACATCTCCGC
AAGACGAAACGGCATTCTCAAACAGTGGCGCGAGTGGCTGAATGAGAAAATTG
CGGACGCAAAGAGCTCCCAGGCAACCGGCCTTTTGTGAGAGAGGCCCGAAACGA
CGTGGAACATTTGAACGTCTGCGCGCGATCCCGGATTACATCCAGGATTTCCGCCA
TGGGGAAAAAGGGGAAACGGCAATGAATTCGTATTTTCGAGCTGTACCATTACCTCAT
GCAGAGGCTGATGCTCAAAAACACGGAATTGGATTTGTCCATTGGAGCGGCTGGA
TCATGCGTTCCGGTCGGCCGGATCGGGATTTGATTCAGATCGCGTTCGTTCATTGG

aagcgggcatgtaaggcggttttctgttggcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatg
aaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgtaggggtaaacaactggcggtatg
gatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgttcgtaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcag
catcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccatt
catgttgtgctcaggtcgcagacgtttgcagcagcagtcgcttccagttcgcgtatcgggtattcattctgtaaccagtaaggcaa
ccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcccacccgtggggccgcatgccggcgataatggcctgcttc
tcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgcgaaggcttgagcagggcgtgcaagattccgaataaccgaagcgcagggccgatc
atcgtcgcctccagcgaagcggctcctcgccgaaatgaccagagcgtgcccgcacctgtcctacgagttgcatgataaagaaga
cagtcataagtgcggcgacgatagtcatccccgcgccaccggaaggagctgactgggtgaaggctcgaaggcagcggcgcag
atcccgggtgcctaatgagtgcgtaacttacattaattgcttgcgtcactgcccgcttccagtcgggaaacctgctgtccagctgcatt
aatgaatcgccaacgcgccccgagaggcggttgcgtattggggccagggtggtttttttaccagtgagacgggcaacagctg
attgcccttaccgctggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggtt
aacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatatccgccaacgcgcagcccggactcggtaatg
gcgcgattgcgccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtggaacgatgccctcattcagcatttgcattggttggaa
aaccggacatggcactccagtcgccttccggtccgctatcggctgaattgattgcgagtgagatattatgccagccagccagacgcag
acgcgccgagacagaactaatgggcccgtaacagcgcgattgctggtgaccaatgcgaccagatgtccacgcccagtcgcgta
ccgtcttcatgggagaaaataactgttgatgggtgctcgtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttcca
cagcaatggcatcctggtcatccagcggatagtaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgcccgtttacagg
cttcgacgcccgttcttaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattaatcgccgcgacaatttgcgacg
gcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgtgtccacgcggttgggaatgta
attcagctccgccatcggccttccacttttccgcgttttcgagaaacgtggctggcctggtcaccacgcgggaaacggtctgataa
gagacaccggcactactcgcgacatcgtataacgttactggtttacattaccaccctgaattgactcttccgggcgctatcatgccata
ccgcgaaaggttttgcgcatcagtggtgctcgggatcgcagcctctcccttatgcgactcctgattaggaagcagcccagtagtagg
ttgagggcgttgagcaccgcccgcgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcggccaacagtccccggccacggggcctgccac
cataccacgcccgaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatfatagggccagca
accgcacctgtggcgcgggtgatccggccacgatcgtccggcgtagaggatcgagatctcgcgaaattaatacactcac
tataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgttaactttaagaaggagatataccatgggcagcagccatc
atcatcatcacagcagcggcctggtgccgcggcagccatfatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatccccgg
cagctaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgcATGAGCAAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAG
AATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCACGGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACC
TTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAG
CCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCATCAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGA

CGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTGGAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTG
CTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCC
TGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGTTCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTG
ATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGATCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTG
TACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACCGAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAG
CCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGGAGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATG
GGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATCAGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAG
AGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGATGCATCAGCGTGCTGAGAAACGCCACCGCC
CACGACAAGCAGGACGAGTACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAA
AGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAAGATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATC
AAGAAGGTGAACAAGGACTTCTGAGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGT
TCGACCTGCTGAACGCCAGAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTT
CTACAGATTCACCATCAGAAAGGACGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAG
ATCAGAGAGATCATCATCGACAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACG
ACCCCCACAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTTCTGATCTTCAGAGCCCTG
AGCCAGAACCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGG
ACGAGGAGGAGAAGGACCACGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCAT
GGTGAGCAACTGCCTGACCCCTACTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGA
AGTACAAGGACGCCAAGACCCCGGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGCAAGAT
CAGCGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGTGAAGGTGCTGAGCTTCTGTGCAACTTC
CTGGAGGGCAAGGAGATCAACGAGCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGT
GCATCCAGGACTTCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCAG
CCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCT
GAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGG
CCCCTGTACAAGGCCGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTA
CACCAGCGACGAGTGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAA
GAACGACAAGAAGAAGAAGCAGGTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAAC
GTGATCGAGAGCAGAAGATTCATGTACCTGGTGGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGT
GAGAGCCATCATGCAGAACAGAAGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCCA
GCGAGCAGGTGCACAGATACGCCAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGA
GCAGGAGATCGACTTCTGACCAAGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGC
TGCACGAGAAGGACGTGATCCTGAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGA

GATCGAGAGACTGAAGGCCATCACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCA
TCAAGAACATCGTGAAGGCCAACGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTGAG
AGAGACAAGGAGCTGGTGAAGGCCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCG
AGACAGACTTCCCCGACTACTTCTGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAG
GAGAAGAAGTTCCCCGGCGACCCCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGA
GAAAGACCAAGAGACACTTCAGCAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGA
TCGCCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCAGAAA
CGACGTGGAGCACCTGAACGTGCTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCA
GACACGGCGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTA
CCTGATGCAGAGACTGATGCTGAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGC
GGCTGGATCATGAGAAGCGGCAGACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGT
GAGCCTGGCCTACAACCTGCCAGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCACTTC
GACGACACCGTGCTGCAGAAGATCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACACAGGCGGC
GGCCCCGGCGGCGGCGCCGCCGGCAGCGGCAGCcttaagaaaaaacgaaaagttggcagcgg
aagcaaaaggccggcgccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagTAActcgagcaccaccaccaccactga
gatccggtgctaaacaagccccgaaaggaagctgagttggtgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggcctctaa
acgggtcttgaggggtttttgctgaaaggaggaaactatataccggat

SEQ ID NO: 11 (重组 C13-2 蛋白):

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSPAAKKKKLDGSVDMSKDK
KTKAKRMGVKALLAHGEDKLTMTTFGKGNRSKIEFTEGYHGRALETPKHFGIRGFEV
RRIDENVDLCGDLEEGKTIEALLVNPSEKVGEDYLKLGKGTLEKRFFGREFFHDNIRIQLI
YNILDIYKILGMNVADILYALGNMQDTELIDMFGQSLNEDNLKECLKRMRPYMGY
FGDIFKISPKGENIADREHNKKVLRCSVLRNATAHDKQDEYPWFKSSDIYETKIFKAD
MWKIIKDQYREKIKKVNKDFLSKNAVMAILFDLLNARDVEQKKQITDEFYRFTIRKD
GKNLGMNLVKIREIIIDRYASGLRDKKHDPHRQKINVIADFLIFRALSQNQGIIDKTVSSL
RLTKDEEEKDHVYQNAAEVLWGMVSNCLTPYFNPKNKYILKYKDAKTPGDFEDWIT
SKISEDGEPFVKVLSFLCNFLEGKEINELLTAYIHKFECIQDFLNVISLGENVQFQPRF
ALFNNASFAQNVAVQLRILASIGMKPDLTEAKRPLYKAAIRMLCPPEKWEKYTSDEW
LEKNMLLNSEDRKNDKKKKQVNPFRNFIAGNVIESRRFMYLVRYSPKAVRAIMQNR
SIVNYVLHRLPSEQVHRYASVFPENFADLEQEIDFLTKKLFESFEELLHEKDVLNNSRS
HKPSLEIERLKAITGLYLSVAYIAIKNIVKANARYYIAFAVFERDKELVKAKDARIQTKIP
ETDFPDYFCLTQYYLDRDEEKKFPGDPRDKEAFFEHLRKTKRHFSKQWREWLNEKIA

DAKSSQATGLLLREARNDVEHLNVLRAIPDYIQDFRHGEKGETAMNSYFELYHYLMQ
RLMLKNTLDELDSHWSGWIMRSGRPDRDLIQIAFVSLAYNLPRYRNLTKEHHFDDTVLQ
KIREKESLDTGGGPGGGAAAGSGSPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKK

SEQ ID NO: 12 (外源 EGFP 报告基因序列):

atggtgagcaagggcgaggagctgttcacgggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagt
tcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagtcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgc
cctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaag
tcgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccegcgccgaggtgaagtgc
agggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcctcgcactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtac
aactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgagg
acggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctg
agcaccagtcgccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccccgggatcact
ctcggcatggacgagctgtacaagtaa

SEQ ID NO: 13 (外源 EGFP 报告基因表达载体的质粒序列):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccggggcgtcgggcgaccttggtcgcccggcctcagtgagcg
agegagcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggtcctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaatacaattacggggcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattfacggtaactgccacttggcagctacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctacgtattagctacgctattaccatgggtgatggg
tttggcagctacatcaatggcgctggatagcgggttgactcacggggattccaagtctccaccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttcaaaaatgctgtaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggttaactaccggtgccaccatgggtgagcaagggcgaggagctgttcacgggggtggtgcccatcctggtgc
agctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaag
ttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctacce
cgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggc
aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcctcgcactcaaggagga
cggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaa
gggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacg
gccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcc
tgctggagttcgtgaccgccccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcggccgaattcctagagctcgtgatca
gcctcagctgtgccttctagttgccagccatctgttttccccctccccctgcttcttaccctggaaggtgccactcccactgtccttt

cctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggag
gattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtaccgagggcctatttcccatgattcctcatatttgcatacagatacaaggetgtt
agagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagttgcag
ttttaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttctgatttctggctttatatactgtggaaaggacgaaac
accggagaccacggcaggtctcagtttagtactctggaaacagaatctactaaaacaaggcaaatgccgtgtttatctcgtcaactgtt
ggcgagattttgcgccgcaggaacccctagtgtggagttggccactccctctctgcgctcgtcgtcactgaggccggggcagc
caaaggtcggccgacggccgggctttgcccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagggggcgcctgatgcg
gtattttctccttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgcacctgtagcggcgattaagcggcg
gggtgtgggtgttacgcgagcgtgaccgctacactggcagcgccttagcggccctcctttcgtttcttcccttcttctcggcaggt
cgccggctttcccgtaagctctaaatcgggggctcccttagggfcccatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaacttgatt
gggtgatggttcacgtagtgggccatcggcctgatagacggttttcggccttgacgtggagtcacgttcttaatagtgactctgttc
caaactggaacaacactcaaccctatctcgggctattctttgattataaggattttgccgatttggcctattggtaaaaaatgagctgat
ttaacaaaaattaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaag
ccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgctc
tccgggagctgcatgtgacagaggtttaccgctatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggtta
atgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaaatacattcaa
atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatgaaaaaggaagagtagtagtattcaacatttccgtgctgcct
tattccctttttgcggcattttgccttctgttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacga
gtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtt
ctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacggcgggcaagagcaactcggctgccgcatacactattctcagaatgacttggtgagta
ctcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacatgagtgataaactgcggc
caacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgg
gaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaa
ctggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccct
tccggtggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggatcattgcagcactggggccagatggttaagcc
ctcccgtatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgatt
aagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttt
gataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgatcct
tttttctgcgctaatctgctgcttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttggttgcccggatcaagagctaccaactttttc
cgaaggttaactggctcagcagagcgcagatacacaactgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagc
accgcctacatacctcgtctgtaatcctgttaccagtggtgctgcccagtgccgataagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactg

agatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccgaagggagaaagggcgacaggtatccggtaagcggcagggtcgg
aacaggagagcgcacaggggagctccaggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtg
atftttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacggcagcaacgcggccttttacggctcctggccttttctggcctttgc
tcacatgt

SEQ ID NO: 14 (靶向 EGFP 的 C13-2 表达载体的质粒序列):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgctcggcgacctttggctgcccgccctcagtgagcg
agegagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggtcctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataacggggcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataactacggtaaatggcccgctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaactgccactggcagctacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagctacatgaccttatgggactttcacttggcagctacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtatggg
tttggcagctacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccggtgccaccatgccggcagctaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgcacATGAGC
AAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAGAATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCAC
GGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACCTTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCG
AGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAGCCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCAT
CAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGACGAGAACGTGGACCTGTGCGGGCAGCTG
GAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTGCTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGC
GAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCCCTGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGT
TCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTGATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGA
TCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTGTACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACC
GAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAGCCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGG
AGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATGGGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATC
AGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAGAGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGA
TGCATCAGCGTGCTGAGAAACGCCACCGCCCACGACAAGCAGGACGAGTACCCCT
GGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAAAGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAA
GATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATCAAGAAGGTGAACAAGGACTTCCTG
AGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGTTTCGACCTGCTGAACGCCAGAGACG
TGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTTCTACAGATTCACCATCAGAAAGGA
CGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCATCGACAGAT
ACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACGACCCCCACAGACAGAAGATCAACG

TGATCGCCGACTTCCTGATCTTCAGAGCCCTGAGCCAGAACCAGGGCATCATCGAC
AAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGGACGAGGAGGAGAAGGACCACGTG
TACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCATGGTGAGCAACTGCCTGACCCCCTA
CTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACGCCAAGACCCCC
GGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAGCAAGATCAGCGAGGACGACGGCGAGCCCT
TCGTGAAGGTGCTGAGCTTCCTGTGCAACTTCCTGGAGGGCAAGGAGATCAACGA
GCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGTGCATCCAGGACTTCCTGAACGTGA
TCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCCAGCCCAGATTCGCCCTGTTCAACAAC
GCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCTGAGAATCCTGGCCAGCATCGGCA
AGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGGCCCTGTACAAGGCCGCCATCAG
AATGCTGTGCCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTACACCAGCGACGAGTGGCTGGAG
AAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAAGAACGACAAGAAGAAGAAGCAG
GTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAACGTGATCGAGAGCAGAAGATTCAT
GTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGTGAGAGCCATCATGCAGAACAGA
AGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCAGCGAGCAGGTGCACAGATACGC
CAGCGTGTTCCCGGAGAACTTCGCCGACCTGGAGCAGGAGATCGACTTCCTGACCA
AGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGCTGCACGAGAAGGACGTGATCCT
GAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGAGATCGAGAGACTGAAGGCCATC
ACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCATCAAGAACATCGTGAAGGCCAA
CGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAGAGAGACAAGGAGCTGGTGAAGG
CCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCGAGACAGACTTCCCCGACTACTTC
TGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAGGAGAAGAAGTTCCCCGGCGACC
CCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGAGAAAGACCAAGAGACACTTCAG
CAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGATCGCCGACGCCAAGAGCAGCCA
GGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCAGAAACGACGTGGAGCACCTGAACGTG
CTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCAGACACGGCGAGAAGGGCGAGA
CAGCCATGAACAGTACTTTCGAGCTGTACCACTACCTGATGCAGAGACTGATGCTG
AAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGCGGCTGGATCATGAGAAGCGGCA
GACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGTGAGCCTGGCCTACAACCTGCCC
AGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTCGACGACACCGTGCTGCAGAAGA
TCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACACAGGCGGGCGGCCCCGGCGGGCGGCCGCCG
CCGGCAGCGGCAGCcctaagaaaaaacgaaaagttggcagcgggaagcaaaaggccggcgccacgaaaaaggccgg

ccaggcaaaaaagaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCCTTGAG
CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT
TTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattccttcatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataatt
ggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaaacgtgacgtgagaagtaataatttcttgggtagttgcagtttaaaattatgt
tttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggcttatatacttgggaaaggacgaaacaccGGAAG
ATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACTgcccgttcttctgcttgcggccatgataTTTTTTgcgg
ccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggctgccccgac
gccccggctttgccccggcggcctcagtgagcgcgcgcgcgcagctgcctgcaggggcctgatgcggtattttctccttacgca
tctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacg
cgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccttagcggcctccttctccttctccttctcctcgcacgttcgcccggctttccccgtc
aagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgaccccaaaaaactgattgggtgatggttcacgta
gtgggccatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtcacgttcttaatagtgactcctgttccaaactggaacaact
caactctatctcgggctattctttgattataagggaatttgcgattcggctctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaatftaacgcg
aatttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagftaagccagccccgacaccgc
caacaccgctgacgcgcctgacgggcttctctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgt
cagaggtttcaccgcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgcatgataataatggtt
tcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttaataacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatgaaaaaggaaagatgagattcaacattccgtgctgccttattccctttttgcggcattt
gccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgga
tctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtatta
tcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaag
catcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcataaccatgagtataaactgcggccaacttactctgacaacga
tcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaag
ccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcaactattaactggcgaactacttactctag
cttccccgcaacaattaatagactggatggagggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttcggctggctggtttattgc
tgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtatctta
cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcag
accaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaagatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaa
tcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttcttgatcctttttctgcgcgtaactgc
tgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggctttag
cagagcgcagataccaataactgttctctagtgtagccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtc
tgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgca

gcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagct
atgagaaaagcggcagcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgag
ggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccaccttgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagg
ggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttctggccttttctggtccttttgcacatgt

SEQ ID NO: 15 (C13-2-BsaI 载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgtcggggcagcctttggcgtcccggcctcagtgagcg
agegagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataacggggcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataactacggtaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaactgccactggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagtagacattatgggactttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
tttggcagtagatcaatggcgtggatagcgggttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaaacactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccggtgccaccatgccggcagctaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgacATGAGC
AAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAGAATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCAC
GGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACCTTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCG
AGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAGCCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCAT
CAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGACGAGAACGTGGACCTGTGCGGGCGACCTG
GAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTGCTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGC
GAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCTGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGT
TCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTGATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGA
TCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTGTACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACC
GAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAGCCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGG
AGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATGGGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATC
AGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAGAGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGA
TGCATCAGCGTGCTGAGAAACGCCACCGCCCACGACAAGCAGGACGAGTACCCCT
GGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAAAGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAA
GATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATCAAGAAGGTGAACAAGGACTTCCTG
AGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGTTTCGACCTGCTGAACGCCAGAGACG
TGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTTCTACAGATTCACCATCAGAAAGGA
CGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCATCGACAGAT
ACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACGACCCCCACAGACAGAAGATCAACG

TGATCGCCGACTTCCTGATCTTCAGAGCCCTGAGCCAGAACCAGGGCATCATCGAC
AAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGGACGAGGAGGAGAAGGACCACGTG
TACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCATGGTGAGCAACTGCCTGACCCCCTA
CTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACGCCAAGACCCCC
GGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAGCAAGATCAGCGAGGACGACGGCGAGCCCT
TCGTGAAGGTGCTGAGCTTCTGTGCAACTTCTGGAGGGCAAGGAGATCAACGA
GCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGTGCATCCAGGACTTCTGAACGTGA
TCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCCAGCCCAGATTCGCCCTGTTCAACAAC
GCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCTGAGAATCCTGGCCAGCATCGGCA
AGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGGCCCTGTACAAGGCCGCCATCAG
AATGCTGTGCCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTACACCAGCGACGAGTGGCTGGAG
AAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAAGAACGACAAGAAGAAGAAGCAG
GTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAACGTGATCGAGAGCAGAAGATTCAT
GTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGTGAGAGCCATCATGCAGAACAGA
AGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCAGCGAGCAGGTGCACAGATACGC
CAGCGTGTTCCCGAGAACTTCGCCGACCTGGAGCAGGAGATCGACTTCTTGACCA
AGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGCTGCACGAGAAGGACGTGATCCT
GAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGAGATCGAGAGACTGAAGGCCATC
ACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCATCAAGAACATCGTGAAGGCCAA
CGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAGAGAGACAAGGAGCTGGTGAAGG
CCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCGAGACAGACTTCCCCGACTACTTC
TGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAGGAGAAGAAGTTCCCCGGCGACC
CCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGAGAAAGACCAAGAGACACTTCAG
CAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGATCGCCGACGCCAAGAGCAGCCA
GGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCAGAAACGACGTGGAGCACCTGAACGTG
CTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCAGACACGGCGAGAAGGGCGAGA
CAGCCATGAACAGTACTTTCGAGCTGTACCACTACCTGATGCAGAGACTGATGCTG
AAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGCGGCTGGATCATGAGAAGCGGCA
GACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGTGAGCCTGGCCTACAACCTGCCC
AGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTCGACGACACCGTGCTGCAGAAGA
TCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACACAGGCGGGCGGCCCCGGCGGGCGGCCGCCG
CCGGCAGCGGCAGCcctaagaaaaaacgaaaagttggcagcgggaagcaaaaggccggcgccacgaaaaaggccgg

ccaggcaaaaaagaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCCTTGAG
CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT
TTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattcctcatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataatt
ggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaaatcgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagttgcagtttaaaattatgt
tttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggcttatatacttctgtgaaaggacgaaacaccGGAAG
ATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACggagaccacggcaggtctcaTTTTTgaggccgcag
gaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgcctcactgaggccgggcgaccaaaaggtcggccgacggccgg
gctttggccggggcggcctcagtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgc
ggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaacctagtagcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagc
gtgaccgctacacttgccagcgccttagcggcctcttctccttctccttctccttctcctcggcactgctcggcgtttcccgtcaagctc
taaategggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattgggtgatggttcacgtagtgggc
catgcctgatagacggttttcggccttgacggttgagtcacggttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaactcaactct
atctcgggctattctttgattataagggatttggcatttcggctattggtaaaaaatgagctgatttaaaaaaattaacgcgaatttaa
caaaatattaacgtttacaatttatggtgcaactctcagtacaatctgctctgatgcccatagttaagccagccccgacaccgccaacacc
cgctgacgcgcctgacgggcttctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagaggtt
ttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggftaatgcatgataataatggttcttagac
gtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatcttaatacattcaaatatgatccgctcatgagacaataac
cctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagatgagtagtcaacattccgtgctcgccttattccctttttgaggcattttgccttcc
tgttttgctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatctcaac
agcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgt
ttgacggcgggcaagagcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttac
ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtctccataacctagtgataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggagg
accgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcctgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcaactattaactggcgaactacttactctagctcccg
gcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccactctcgcctcggccctccggctggctggtttattgctgataaa
tctggagccggtagcgtggaagccgcgggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatcttacacgac
ggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagt
ttactcatatacttttagattgattfaaaacttcatttttaattaaaagatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaaccctta
acgtgagtttcttccactgagcgtcagacccccgtgaaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgc
aaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccgatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagc
gcagataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaat
cctgttaccagtggtgctgccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtc

gggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaga
aagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagct
tccaggggaaacgcctggatctttatagctctgtcgggttcgccacctctgactgagcgtcgattttgtgatgctcgcagggggc
ggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctcctggccttttctggccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 16 (Lv-AQp1-T2a-GFP 载体):

GTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGC ACTCTCAGTACAATCT
GCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAAT
TGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCC
AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA
ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC
GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTT
TTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTC
CAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGG
TGGGAGGTCTATAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC
CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC
TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAA
TCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGA
GCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGG
CGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG
ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAA
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATAAACATATAGTATGGGCAA
GCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGC
TG TAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGA ACT
TAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATA
AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAG
ACCACCGCACAGCAAGCGGCCGGCCGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGAT

ATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCA
 TTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGA
 GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT
 GGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAG
 TGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTGTTGCAA
 CTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA
 CCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTGCA
 CCACTGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGA
 ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATA
 CACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATT
 GGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGGCTGTG
 GTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTG
 CTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC
 CCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGT
 GGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCGTG
 CGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGG
 GATTGGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAC
 AACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACA
 GGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGCGTCGAGGAGCT
 TGGCCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
 AACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG
 GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATACTTACGGTAAATGG
 CCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
 TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG
 GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
 GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
 GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC
 GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAA
 GTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGAC
 TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT
 ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA
 GACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTC

CGCGGCCCGAATTCGccaccAtggccagcgagttcaagaagaagctcttctggagggcagtggtggccgagttcctg
gccacgacctctttgttctcatcagcatcggttctgccctgggcttcaatacccggggggaacaaccagacggcggtccaggacaac
gtgaaggtgtcgtggccttcgggctgagcatcgccacgctggcgagagtggtggccacatcagcggcgcccacctcaaccggct
gtcacactggggctgctgctcagtgccagatcagcatcttccgtgccctcatgtacatcatcggccagtgctgggggcatcgtgcc
accgccatctctcagggcatcaactcctcctgactgggaactcgttggccgaatgacctggctgatggtgtgaactggggccaggg
cctgggcatcgagatcatcgggacctccagctggtgctatgctgctggctactaccgaccggagggcggctgaccttggtggctcag
cccccttggccatggcctctctgtagcccttggacacctcctggctattgactacactggctgtgggattaacctgctcggctcttggct
ccgcggtgatcacacacaactcagcaaccactggattttctgggtggggccattcatcgggggagccctggctgtactcatctacgactt
catcctggccccacgcagcagtgacctcacagaccgctgaaggtgtggaccagcggccaggtggaggagtatgacctggatgccg
acgacatcaactccagggtggagatgaagcccaaaTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTggatccGCTA
GCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAA
TCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACAGTGCTT
CAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCG
AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCT
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA
CCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACC
TGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGT
CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
AGTAAg gatccTAGGCGGCCGCGCATGCCCTGCAGGTGATCTATCGATCGGCCGGCCCC
TCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTG
TGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC
GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCA
AAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCT
TGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTG
GCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCG
GCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCT

CTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTA
TGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAA
AAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACG
ATGATAATATGGCCACAACCGGGCCGGATATCACGCGTGATCTGATCAGCACGTGTT
GACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACT
AAACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAAGAGCAACG
GCTACAATCAACAGCATCCCCATCTCTGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCT
CTCTAGCGACGGCCGCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGGACCT
TGTGCAGAACTCGTGGTGCTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGAC
TTGTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCCTGCGGACGGT
GCCGACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGT
GATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGG
GAGGGCTAAGCAATGCATACATGTGTTTAAACCTCGACTTAATTAAGTCGAGGGTCG
ACGGTATCGATAAGCTCGCTTACGAGATCATGTTTAAAGGGTTCCGGTCCACTAGG
TACAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG
ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA
TGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAAT
CCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG
GTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTG
TCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCAT
CGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT
CCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA
CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG
ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTC
GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATAACCGTCGAC
CTCGATCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTAC
CAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCA
GTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGC
CACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGAC
AAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGA
ACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAG
CTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGAAGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCC

GCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTATTA
GAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATCC
GGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTA
ACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAG
TGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGCATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAA
CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAG
CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT
GCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGA
GTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG
CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA
GTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGT
ATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATG
TTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTT
GGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATG
CCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
CCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA

ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG
AAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
ATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGAC

SEQ ID NO: 17 (CasRx-AQp1 质粒, CasRx 靶向 AQp1 的阳性对照载体):

cctgcaggcagctgcgcctcgcctcactgaggccgcccggcgctggcgaccttggcgcggcctcagtgagcgagcga
gcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggtcctgcggcctctagactcgagcggtgacattgatttgactagtatta
atagtaatcaattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgtfacataactfacggtaaatggcccgcctggctgaccg
ccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagta
ttacggtaactgccacttgccagtagcatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcct
ggcattatgccagtagatgacctatgggacttctacttggcagtagctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcggtttgg
cagtacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggattccaagtctccaccattgacgtcaatgggagttgtttggcacca
aatcaacgggactttcaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataag
cagagctctctggtaactaccggtgccaccATGAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGCCAG
CATCGAAAAAAAAGTCCTTCGCCAAGGGCATGGGCGTGAAGTCCACACTCGTG
TCCGGCTCCAAAGTGTACATGACAACCTTCGCCGAAGGCAGCGACGCCAGGCTGG
AAAAGATCGTGGAGGGCGACAGCATCAGGAGCGTGAATGAGGGCGAGGCCTTCAG
CGCTGAAATGGCCGATAAAAACGCCGGCTATAAGATCGGCAACGCCAAATTCAGCC
ATCCTAAGGGCTACGCCGTGGTGGCTAACAAACCCTCTGTATACAGGACCCGTCCAG
CAGGATATGCTCGGCCTGAAGGAAACTCTGGAAAAGAGGTACTTCGGCGAGAGCG
CTGATGGCAATGACAATATTTGTATCCAGGTGATCCATAACATCCTGGACATTGAAAA
AATCCTCGCCGAATACATTACCAACGCCGCCTACGCCGTCAACAATATCTCCGGCCT
GGATAAGGACATTATTGGATTTCGGCAAGTTCTCCACAGTGTATACCTACGACGAATT
CAAAGACCCCGAGCACCATAGGGCCGCTTCAACAATAACGATAAGCTCATCAACG
CCATCAAGGCCAGTATGACGAGTTCGACAACCTCCTCGATAACCCCGACTCGGC
TATTTCCGGCCAGGCCTTTTTTCAGCAAGGAGGGCAGAAATTACATCATCAATTACGGC
AACGAATGCTATGACATTCTGGCCCTCCTGAGCGGACTGAGGCACTGGGTGGTCCA
TAACAACGAAGAAGAGTCCAGGATCTCCAGGACCTGGCTCTACAACCTCGATAAGA
ACCTCGACAACGAATACATCTCCACCCTCAACTACCTCTACGACAGGATCACCAATG
AGCTGACCAACTCCTTCTCCAAGAACTCCGCCGCCAACGTGAACTATATTGCCGAA

ACTCTGGGAATCAACCCTGCCGAATTCGCCGAACAATATTTTCAGATTCAGCATTATG
AAAGAGCAGAAAAACCTCGGATTCAATATCACCAAGCTCAGGGAAGTGATGCTGG
ACAGGAAGGATATGTCCGAGATCAGGAAAAATCATAAGGTGTTGACTCCATCAGG
ACCAAGGTCTACACCATGATGGACTTTGTGATTTATAGGTATTACATCGAAGAGGAT
GCCAAGGTGGCTGCCGCCAATAAGTCCCTCCCCGATAATGAGAAGTCCCTGAGCGA
GAAGGATATCTTTGTGATTAACCTGAGGGGCTCCTTCAACGACGACCAGAAGGATG
CCCTCTACTACGATGAAGCTAATAGAATTTGGAGAAAGCTCGAAAATATCATGCACA
ACATCAAGGAATTTAGGGGAAACAAGACAAGAGAGTATAAGAAGAAGGACGCCCC
TAGACTGCCCAGAATCCTGCCCGCTGGCCGTGATGTTTCCGCCTTCAGCAAACCTCAT
GTATGCCCTGACCATGTTCCCTGGATGGCAAGGAGATCAACGACCTCCTGACCACCCT
GATTAATAAATTCGATAACATCCAGAGCTTCCCTGAAGGTGATGCCTCTCATCGGAGT
CAACGCTAAGTTCGTGGAGGAATACGCCTTTTTCAAAGACTCCGCCAAGATCGCCG
ATGAGCTGAGGCTGATCAAGTCCTTCGCTAGAATGGGAGAACCTATTGCCGATGCC
AGGAGGGCCATGTATATCGACGCCATCCGTATTTTAGGAACCAACCTGTCCTATGAT
GAGCTCAAGGCCCTCGCCGACACCTTTTCCCTGGACGAGAACGGAAACAAGCTCA
AGAAAGGCAAGCACGGCATGAGAAATTTATTATTAATAACGTGATCAGCAATAAAA
AGGTTCCACTACCTGATCAGATACGGTGATCCTGCCACCTCCATGAGATCGCCAAA
AACGAGGCCGTGGTGAAGTTCGTGCTCGGCAGGATCGCTGACATCCAGAAAAAAC
AGGGCCAGAACGGCAAGAACCAGATCGACAGGTACTACGAACTTGTATCGGAAA
GGATAAGGGCAAGAGCGTGAGCGAAAAGGTGGACGCTCTCACAAGATCATCACC
GGAATGAACTACGACCAATTCGACAAGAAAAGGAGCGTCATTGAGGACACCGGCA
GGGAAAACGCCGAGAGGGAGAAAGTTTAAAAAGATCATCAGCCTGTACCTCACCGT
GATCTACCACATCCTCAAGAATATTGTCAATATCAACGCCAGGTACGTCATCGGATTC
CATTGCGTCGAGCGTGATGCTCAACTGTACAAGGAGAAAGGCTACGACATCAATCT
CAAGAACTGGAAGAGAAGGGATTCAGCTCCGTCACCAAGCTCTGCGCTGGCATT
GATGAAACTGCCCCCGATAAGAGAAAGGACGTGGAAAAGGAGATGGCTGAAAGAG
CCAAGGAGAGCATTGACAGCCTCGAGAGCGCCAACCCCAAGCTGTATGCCAATTAC
ATCAAATACAGCGACGAGAAGAAAGCCGAGGAGTTCACCAGGCAGATTAACAGGG
AGAAGGCCAAAACCGCCCTGAACGCCTACCTGAGGAACACCAAGTGGAATGTGAT
CATCAGGGAGGACCTCCTGAGAATTGACAACAAGACATGTACCCTGTTTCAGAAACA
AGGCCGTCCACCTGGAAGTGGCCAGGTATGTCCACGCCTATATCAACGACATTGCCG
AGGTCAATTCCTACTTCCAACCTGTACCATTACATCATGCAGAGAATTATCATGAATGA

GAGGTACGAGAAAAGCAGCGGAAAGGTGTCCGAGTACTTCGACGCTGTGAATGAC
 GAGAAGAAGTACAACGATAGGCTCCTGAAACTGCTGTGTGTGCCTTTCGGCTACTG
 TATCCCCAGGTTTAAGAACCTGAGCATCGAGGCCCTGTTGATAGGAACGAGGCCG
 CCAAGTTCGACAAGGAGAAAAAGAAGGTGTCCGGCAATTCCGGATCCGGACCTAA
 GAAAAAGAGGAAGGTGGCGGCCGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgaghta
 ccttagagctcgtgatcagcctcactgtgccttctagttgccagccatctgttgttccccctccccgtgccttcttgaccctggaagg
 tgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggca
 ggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcagcagctgtgggaGAGGGCCTATTTCCCATGATTCTT
 CATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGT
 AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTA
 GTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGA
 AAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCAAGT
 AAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACagggcagaaccgatgctgatgaagacCAAGTAAA
 CCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACTTTTTTTTccccgggaatggccgcaggaaccctagtgatgg
 agttggccactccctctctgcgcgctcgtcactgaggccggggcaccaaaggtgcccgcagcccgggctttgcccggggcg
 cctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgctgatgcggfctttctcttacgcacatctgtgcggfctttcacaccgcat
 acgtcaaaagcaaccatagtagcgcctgtagcggcgcaataagcgcggcggtgtgtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
 ccagcgccttagcgcctcctttcgtttcttccctctcttctcgcacagttcggcgctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcc
 ctttagggftccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaaactgattgggtgatggttacgtagtggccatcgccctgataga
 cggttttcgcctttgacggttgagtgccacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaactcaaccctatctcgggctattctt
 ttgattataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaatgaacgcgaatttaacaaaatattaacgtt
 tacaattttatggtgcaactctcagtaaatctgctctgatgcgcagatagtaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccc
 tgacgggcttctgctccccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctacac
 cgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcactt
 ttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctc
 aataatattgaaaaggaagagatgagattcaacattccgtgctgccttattccctttttgcggcattttgcttctctgttttctcacca
 gaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcctt
 gagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgtattgacgccgggcaa
 gagcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacag
 taagagaattatgcagtgtccataaccatgagtgataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa
 ccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtg
 acaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccccgcaacaattaataga

ctggatggagcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgctgataaatctggagccgggtga
 gcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggca
 actatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatataactt
 tagattgattaaaacttcattttaattfaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccftaacgtgagtttcgttc
 cactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaagatcttcttgagatcctttttctgcgctaactctgctgcttgaacaaaaaaacca
 ccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtactggctcagcagagcgcagataccaaata
 ctgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtgg
 ctgctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggg
 gggctcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcctt
 cccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaa
 cgctggtatctttatagctctgctgggttccaccctctgacttgagcgtgatTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGA
 aaacgccagcaacgcggccttttacggtcctggcctttgctggcctttgctcacatgt

SEQ ID NO: 18 (CasRx-PTBP1 质粒, CasRx 靶向 PTBP1 的阳性对照载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgtcgggcgaccttggtcgcccggcctcagtgagcg
 agcgagcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggtcctgcggcctctagactcagggcgttgacattgattattgacta
 gttatfaatagtaataaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctg
 accgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
 gagtatttacggtaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
 cgctggcattatgcccagtacatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcategctattaccatgggtgatcggg
 ttttggcagtacatcaatggcggtgatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccttattgacgtcaatgggagtttgg
 caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgcccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
 tataagcagagctctctggttaactaccggtgccaccATGAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGC
 CAGCATCGAAAAAAAAAAGTCCTTCGCCAAGGGCATGGGCGTGAAGTCCACACTC
 GTGTCCGGCTCCAAAGTGTACATGACAACCTTCGCCGAAGGCAGCGACGCCAGGCT
 GGAAAAGATCGTGGAGGGCGACAGCATCAGGAGCGTGAATGAGGGCGAGGCCTTC
 AGCGCTGAAATGGCCGATAAAAACGCCGGCTATAAGATCGGCAACGCCAAATTCAG
 CCATCCTAAGGGCTACGCCGTGGTGGCTAACAACCCTCTGTATACAGGACCCGTCCA
 GCAGGATATGCTCGGCCTGAAGGAAACTCTGGAAAAGAGGTACTTCGGCGAGAGC
 GCTGATGGCAATGACAATATTTGTATCCAGGTGATCCATAACATCCTGGACATTGAAA
 AAATCCTCGCCGAATACATTACCAACGCCGCTACGCCGTCAACAATATCTCCGGCC
 TGGATAAGGACATTATTGGATTCCGCAAGTTCTCCACAGTGTATACCTACGACGAAT
 TCAAAGACCCCGAGCACCATAGGGCCGCTTCAACAATAACGATAAGCTCATCAAC

GCCATCAAGGCCAGTATGACGAGTTCGACAACCTTCCTCGATAACCCAGACTCGG
CTATTTTCGGCCAGGCCTTTTTTCAGCAAGGAGGGCAGAAATTACATCATCAATTACGG
CAACGAATGCTATGACATTCTGGCCCTCCTGAGCGGACTGAGGCACTGGGTGGTCC
ATAACAACGAAGAAGAGTCCAGGATCTCCAGGACCTGGCTCTACAACCTCGATAAG
AACCTCGACAACGAATACATCTCCACCCTCAACTACCTCTACGACAGGATCACCAAT
GAGCTGACCAACTCCTTCTCCAAGAACTCCGCCGCCAACGTGAACTATATTGCCGA
AACTCTGGGAATCAACCCTGCCGAATTCGCCGAACAATATTTTCAGATTCAGCATTAT
GAAAGAGCAGAAAAACCTCGGATTCAATATCACCAAGCTCAGGGAAGTGATGCTG
GACAGGAAGGATATGTCCGAGATCAGGAAAAATCATAAGGTGTTTCGACTCCATCAG
GACCAAGGTCTACACCATGATGGACTTTGTGATTTATAGGTATTACATCGAAGAGGA
TGCCAAGGTGGCTGCCGCCAATAAGTCCCTCCCCGATAATGAGAAGTCCCTGAGCG
AGAAGGATATCTTTGTGATTAACCTGAGGGGCTCCTTCAACGACGACCAGAAGGAT
GCCCTCTACTACGATGAAGCTAATAGAATTTGGAGAAAGCTCGAAAATATCATGCAC
AACATCAAGGAATTTAGGGGAAACAAGACAAGAGAGTATAAGAAGAAGGACGCCC
CTAGACTGCCCAGAATCCTGCCCGCTGGCCGTGATGTTTCCGCCTTCAGCAAACCTCA
TGTATGCCCTGACCATGTTCTGATGGCAAGGAGATCAACGACCTCCTGACCACCC
TGATTAATAAATTCGATAACATCCAGAGCTTCCTGAAGGTGATGCCTCTCATCGGAG
TCAACGCTAAGTTCGTGGAGGAATACGCCTTTTTCAAAGACTCCGCCAAGATCGCC
GATGAGCTGAGGCTGATCAAGTCCTTCGCTAGAATGGGAGAACCTATTGCCGATGC
CAGGAGGGCCATGTATATCGACGCCATCCGTATTTTAGGAACCAACCTGTCCTATGAT
GAGCTCAAGGCCCTCGCCGACACCTTTTCCCTGGACGAGAACGGAAACAAGCTCA
AGAAAGGCAAGCACGGCATGAGAAATTTATTATTAATAACGTGATCAGCAATAAA
AGGTTCCACTACCTGATCAGATACGGTGATCCTGCCACCTCCATGAGATCGCCAAA
AACGAGGCCGTGGTGAAGTTCGTGCTCGGCAGGATCGCTGACATCCAGAAAAAAC
AGGGCCAGAACGGCAAGAACCAGATCGACAGGTACTACGAAACTTGTATCGGAAA
GGATAAGGGCAAGAGCGTGAGCGAAAAGGTGGACGCTCTCACAAGATCATCACC
GGAATGAACTACGACCAATTCGACAAGAAAAGGAGCGTCATTGAGGACACCGGCA
GGGAAAACGCCGAGAGGGAGAAAGTTTAAAAAGATCATCAGCCTGTACCTCACCGT
GATCTACCACATCCTCAAGAATATTGTCAATATCAACGCCAGGTACGTCATCGGATTC
CATTGCGTCGAGCGTGATGCTCAACTGTACAAGGAGAAAGGCTACGACATCAATCT
CAAGAACTGGAAGAGAAGGGATTCAGCTCCGTCACCAAGCTCTGCGCTGGCATT
GATGAAACTGCCCCCGATAAGAGAAAAGGACGTGGAAAAGGAGATGGCTGAAAGAG

CCAAGGAGAGCATTGACAGCCTCGAGAGCGCCAACCCCAAGCTGTATGCCAATTAC
ATCAAATACAGCGACGAGAAGAAAGCCGAGGAGTTCACCAGGCAGATTAACAGGG
AGAAGGCCAAAACCGCCCTGAACGCCTACCTGAGGAACACCAAGTGGAATGTGAT
CATCAGGGAGGACCTCCTGAGAATTGACAACAAGACATGTACCCTGTTTCAGAAACA
AGGCCGTCCACCTGGAAGTGGCCAGGTATGTCCACGCCTATATCAACGACATTGCCG
AGGTCAATTCCTACTTCCAACCTGTACCATTACATCATGCAGAGAATTATCATGAATGA
GAGGTACGAGAAAAGCAGCGGAAAGGTGTCCGAGTACTTCGACGCTGTGAATGAC
GAGAAGAAGTACAACGATAGGCTCCTGAAACTGCTGTGTGTGCCTTTCGGCTACTG
TATCCCCAGGTTTAAGAACCTGAGCATCGAGGCCCTGTTCGATAGGAACGAGGCCG
CCAAGTTCGACAAGGAGAAAAAGAAGGTGTCCGGCAATTCCGGATCCGGACCTAA
GAAAAAGAGGAAGGTGGCGGCCGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgaggta
ccctagagctcgtgatcagcctcactgtgccttctagttgccagccatctgttgttccccctccccgtgccttcttgaccctggaagg
tgccaactccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgcattctattctggggggtgggggtggggca
ggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcagcagcgtggggaGAGGGCCTATTTCCCATGATTCTT
CATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTA
GTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGA
AAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCAAGT
AAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATG
GGCTGCAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACTTTTTTTTcccgggaatggcc
gcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggctgcccgcgcg
ccgggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagggcgccctgatgcggtattttctcttacgcactc
gtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtacgcgcctctgagcggcgcaattaagcgcggcggggtgtggtggttacgcg
cagcgtgaccgctacacttgccagcgcctagcgcctccttctgcttcttcttcttcttctgcccacgttcggcgtttccccgtca
agctetaaatcggggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcagccccaaaaaacttgattgggtgatggttcacgtag
tgggcatcgcctgatagacgggttttgcctttgacgttggagtcacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactc
aacctatctcgggctattctttgattataagggatttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcg
aatttfaacaaatattaacgtttacaattttatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgaccccc
caacaccgctgacgcgcctgacgggcttctctcctccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtg
cagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttatagggttaatgtcatgataataatggtt
tcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgagattcaacattccgtgctgccttattccctttttgcggcattt

gccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgga
tctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcgccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtatta
tcccgattgacgccgggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactcaccagtcacagaaaag
catcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcataacatgagtataaactgcggccaactactctgacaacga
tcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaactgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaag
ccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactactactctag
ctcccgcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccactctgcgctcggccctccggctggctggtttattgc
tgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggaagccctcccgatcgtagtatcta
cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcag
accaagttactcatatatacttttagattgattaaaacttcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctatgacaaaa
tccttaacgtgagtttctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgatcctttttctgcgcgtaactctgc
tgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggccgatcaagagctaccaactcttttcgaaggtaactggcttcag
cagagcgcagatacacaactgtccttctagttagcctgtagtagccagtagtagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgt
ctgctaactcctgttaccagtggtgctgccagtggcgataagctgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgc
agcggtcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagc
tatgagaaagcggcaccgttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgag
ggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagctctgctgggttccaccctctgactgagcgtcgtttttgtgatgctcgcagg
ggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctggccttttctggccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 19 (shRNA-AQp1 质粒, shRNA 靶向 AQp1 的阳性对照载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgagccgcccggcgtcgggcgaccttggcgcggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggtcctgcggcctctagactcagggcgtgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaactacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaactgccacttgagcgtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctacgtattagctcgtattaccatgggtgatcggg
tttggcagctacatcaatggcgtggatagcgggttactcaggggattccaagtctccaccctattgacgtcaatgggagtttgg
caccaaaatcaacgggactttcaaaaatgctgtaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggtaactaccggtgccaccatggtgagcaaggcgaggagctgtaccgggggtggtgcccatcctggtc
agctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaag
ttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgacgtgctcagccgctacc
cgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggc
aactacaagaccgcggcggaggtgaagttcagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcctcactcaaggagga

cggaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaa
ggatgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacg
gccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcc
tgctggagttcgtgaccgccggggtacactctcgccatggacgagctgtacaagtaaagcggccgaattcctagagctcgtgatca
gcctcgaactgtgccttctagttgccagccatctgtgtttgccctccccctgccttccctgaccctggaagggtgccactcccactgtcctt
cctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggag
gattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtaccgagggcctatttccatgattcctcatattgcatatac gatacaaggctgtt
agagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctggtagttgacg
tttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttctggctttatatactgtggaaggacgaaac
accgccacgacctctttgtctcaCTCGAGtgaagacaaagagggtcgtggTTTTTggccgcaggaacccttagtgatgg
agttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggggcaccacaaaggtcggcggcagccggggtttgccggggcgg
cctcagtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgcctgatgcggtatttctccttacgcacatctgtgcgggtattcacaccgcat
acgtcaaaagcaaccatagtacgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactg
ccagcgcctagcgcggccttctccttctccttctccttctcgcacgttcggcggcttccccgtaagctcaaatcgggggctcc
cttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaactgattgggtgatggttcacgtagtggccatcgcctgataga
cgggtttcgcctttgacgttgagtcacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcgggctattctt
ttgattataagggttttccgatttcggcctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaattaacgcgaatttaacaaaatattaacgtt
tacaatttatgggtgactctcagtaacaatctgctctgatgccgcatagtaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccc
tgacgggcttctgctcctccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctcgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgctacac
cgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcactt
ttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttatttttaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttc
aataatattgaaaagggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccttattccctttttgcggcattttgccttctgttttctcacca
gaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatcctt
gagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacggcgggcaa
gagcaactcggctcggcatacactattctcagaatgacttggtgagfaccaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacag
taagagaattatgcagtgtccataacctgagtgataaactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa
ccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtg
acaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcaaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaataga
ctggatggagggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctgggtttattgctgataaatctggagccgggtga
gcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctcccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggca
actatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactt
tagattgatttaaaactcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttcttc

cactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttcaaacacaaaaaacca
ccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaata
ctgtccttctagtgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtgg
ctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggg
gggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccagctt
cccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaa
cgectggtatctttatagctctgctgggttcgccacctctgacttgagcgtcgatcttctgtatgctcgtcagggggggcggagcctatggaa
aaacgccagcaacggcctttttacggcttctggccttttctgctggccttttctcacaatgt

SEQ ID NO: 20 (shRNA-PTBP1 质粒, shRNA 靶向 PTBP1 的阳性对照载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccggcgtcggcgaccttggctgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggtcctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaattacggggctcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagtacatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtatgccc
ttttggcagfacatcaatggcgctggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggttaactaccggtgccaccatggtgagcaaggcgcagggagctgttcaccgggggtggtgccatcctggtc
agctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaag
ttcatctgaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgacgtgctcagccgctacc
cgaccacatgaagcagcagcagacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggc
aactacaagaccgcgccgaggtgaagttcagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcacgactcaaggagga
cggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatatggccgacaagcagaagaacggcatcaa
ggatgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacccccatcggcgacg
gccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagacccccacgagaagcgcgatcacatggtcc
tgctggagttcgtgaccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaaacggccgaattcctagagctcgtgatca
gctcgtgctgcttctagttgccagccatctgttgttggcccctccccgtgcttcttaccctggaaggtgccactcccactgtcctt
cctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggag
gattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtaccgagggcctatttccatgattcctcatattgcatatacgatacaagctgtt
agagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagtttcag
tttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttctggctttatatactgtgaaaggacgaaac
accGCAGCCCATCTACATCCAGTTCCTCGAGGAACTGGATGTAGATGGGCTGTTTTTT

ggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcactgaggccgggcgaccaaaggctgccc
gacgcccgggctttgccggggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgcctgatgcggtattttctccttac
gcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggtt
acgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgcctagcgcggcctcttctccttctccttctccttctcgcacgctcgcggcttccc
cgtaagctctaaatcgggggctcccttagggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaacttgattgggtgatggttca
cgtagtgggcatcgcctgatagacgggttttcgcccttgacgttgagtcacgcttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaa
cactcaaccctatctcgggctattctttgattataagggtttgccgattcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattfaa
cggaatttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgactctcagtaaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgacac
ccgccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcat
gtgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataaat
ggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttaataacattcaaatatgtatccgctcat
gagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgagattcaacattccgtgctgcccttattccctttttgcgg
cattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaa
ctggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatgtggcgcg
gtattatcccgtattgacccgggcaagagcaactcggtcgccgatacactattctcagaatgacttggtgagtactcaccagtcacag
aaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataaacactgcggccaacttacttctgac
aacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctga
atgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcaaaactattaactggcgaactactt
actctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggtgg
tttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgta
ggtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaa
ctgtcagaccaagttfactcatatatacttttagattgattfaaaacttcatttttaattfaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatg
accaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcg
taatctgctgcttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaact
ggcttcagcagagcgcagatacacaactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacat
acctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggat
aaggcgcagcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctaca
gctgagctatgagaaaagccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaacaggagag
cgcacgaggggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagctcctgctcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgtattttgatg
ctcgtcagggggcggagcctatggaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctcgtgccttttctggtccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 21 (CasRx-空白质粒, 表达 CasRx 但没有靶向 AQP1 或 PTBP1 的 gRNA 的空白对照载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgaggccgcccggcgctcggcgacaccttggctgcccggcctcagtgagcg
 agcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggtcctgcgccctctagactcgagcggtgacattgattgacta
 gttattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataactacggtaaattggcccgcctggctg
 accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
 gagtatttacggtaaactgcccaactggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtagccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
 cgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
 ttttggcagfacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgg
 caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggggagggteta
 tataagcagagctctctgctaactaccggtgccaccATGAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGC
 CAGCATCGAAAAAAAAAAGTCCTTCGCCAAGGGCATGGGCGTGAAGTCCCACTC
 GTGTCCGGCTCCAAAGTGTACATGACAACCTTCGCCGAAGGCAGCGACGCCAGGCT
 GGAAAAGATCGTGGAGGGCGACAGCATCAGGAGCGTGAATGAGGGCGAGGCCTTC
 AGCGCTGAAATGGCCGATAAAAACGCCGGCTATAAGATCGGCAACGCCAAATTCAG
 CCATCCTAAGGGCTACGCCGTGGTGGCTAACAACCCTCTGTATACAGGACCCGTCCA
 GCAGGATATGCTCGGCCTGAAGGAACTCTGGAAAAGAGGTACTTCGGCGAGAGC
 GCTGATGGCAATGACAATATTTGTATCCAGGTGATCCATAACATCCTGGACATTGAAA
 AAATCCTCGCCGAATACATTACCAACGCCGCTACGCCGTCAACAATATCTCCGGCC
 TGGATAAGGACATTATTGGATTCGGCAAGTTCTCCACAGTGTATACCTACGACGAAT
 TCAAAGACCCCGAGCACCATAGGGCCGCTTTCAACAATAACGATAAGCTCATCAAC
 GCCATCAAGGCCAGTATGACGAGTTCGACAACCTCCTCGATAACCCAGACTCGG
 CTATTCGGCCAGGCCTTTTTTCAGCAAGGAGGGCAGAAATTACATCATCAATTACGG
 CAACGAATGCTATGACATTCTGGCCCTCCTGAGCGGACTGAGGCACTGGGTGGTCC
 ATAACAACGAAGAAGAGTCCAGGATCTCCAGGACCTGGCTCTACAACCTCGATAAG
 AACCTCGACAACGAATACATCTCCACCCTCAACTACCTCTACGACAGGATCACCAAT
 GAGCTGACCAACTCCTTCTCCAAGAACTCCGCCGCCAACGTGAACTATATTGCCGA
 AACTCTGGGAATCAACCCTGCCGAATTCGCCGAACAATATTCAGATTCAGCATTAT
 GAAAGAGCAGAAAAACCTCGGATTCAATATCACCAAGCTCAGGGAAGTGATGCTG
 GACAGGAAGGATATGTCCGAGATCAGGAAAAATCATAAGGTGTTTCGACTCCATCAG
 GACCAAGGTCTACACCATGATGGACTTTGTGATTTATAGGTATTACATCGAAGAGGA
 TGCCAAGGTGGCTGCCGCCAATAAGTCCCTCCCCGATAATGAGAAGTCCCTGAGCG
 AGAAGGATATCTTTGTGATTAACCTGAGGGGCTCCTTCAACGACGACCAGAAGGAT
 GCCCTCTACTACGATGAAGCTAATAGAATTTGGAGAAAGCTCGAAAATATCATGCAC

AACATCAAGGAATTTAGGGGAAACAAGACAAGAGAGTATAAGAAGAAGGACGCCC
CTAGACTGCCCAGAATCCTGCCCGCTGGCCGTGATGTTTCCGCCTTCAGCAAACCTCA
TGTATGCCCTGACCATGTTCTGGATGGCAAGGAGATCAACGACCTCCTGACCACCC
TGATTAATAAATTCGATAACATCCAGAGCTTCCTGAAGGTGATGCCTCTCATCGGAG
TCAACGCTAAGTTCGTGGAGGAATACGCCTTTTTCAAAGACTCCGCCAAGATCGCC
GATGAGCTGAGGCTGATCAAGTCCTTCGCTAGAATGGGAGAACCTATTGCCGATGC
CAGGAGGGCCATGTATATCGACGCCATCCGTATTTTAGGAACCAACCTGTCCTATGAT
GAGCTCAAGGCCCTCGCCGACACCTTTTCCCTGGACGAGAACGGAAACAAGCTCA
AGAAAGGCAAGCACGGCATGAGAAATTCATTATTAATAACGTGATCAGCAATAAA
AGGTTCCACTACCTGATCAGATACGGTGATCCTGCCACCTCCATGAGATCGCCAAA
AACGAGGCCGTGGTGAAGTTCGTGCTCGGCAGGATCGCTGACATCCAGAAAAAAC
AGGGCCAGAACGGCAAGAACCAGATCGACAGGTACTACGAAACTTGTATCGGAAA
GGATAAGGGCAAGAGCGTGAGCGAAAAGGTGGACGCTCTCACAAGATCATCACC
GGAATGAACTACGACCAATTCGACAAGAAAAGGAGCGTCATTGAGGACACCGGCA
GGGAAAACGCCGAGAGGGAGAAGTTTAAAAGATCATCAGCCTGTACCTCACCGT
GATCTACCACATCCTCAAGAATATTGTCAATATCAACGCCAGGTACGTCATCGGATTC
CATTGCGTCGAGCGTGATGCTCAACTGTACAAGGAGAAAGGCTACGACATCAATCT
CAAGAACTGGAAGAGAAGGGATTCAGCTCCGTCACCAAGCTCTGCGCTGGCATT
GATGAACTGCCCCCGATAAGAGAAAGGACGTGGAAAAGGAGATGGCTGAAAGAG
CCAAGGAGAGCATTGACAGCCTCGAGAGCGCCAACCCCAAGCTGTATGCCAATTAC
ATCAAATACAGCGACGAGAAGAAAGCCGAGGAGTTCACCAGGCAGATTAACAGGG
AGAAGGCCAAAACCGCCCTGAACGCCTACCTGAGGAACACCAAGTGGAATGTGAT
CATCAGGGAGGACCTCCTGAGAATTGACAACAAGACATGTACCCTGTTTCAGAAACA
AGGCCGTCCACCTGGAAGTGGCCAGGTATGTCCACGCCTATATCAACGACATTGCCG
AGGTCAATTCCTACTTCCAACCTGTACCATTACATCATGCAGAGAATTATCATGAATGA
GAGGTACGAGAAAAGCAGCGGAAAGGTGTCCGAGTACTTCGACGCTGTGAATGAC
GAGAAGAAGTACAACGATAGGCTCCTGAAACTGCTGTGTGTGCCTTTCGGCTACTG
TATCCCAGGTTTAAGAACCTGAGCATCGAGGCCCTGTTCGATAGGAACGAGGCCG
CCAAGTTCGACAAGGAGAAAAAGAAGGTGTCCGGCAATTCGGATCCGGACCTAA
GAAAAGAGGAAGGTGGCGGCCGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagga
ccctagagctcgetgatcagcctcgaactgtgccttetagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttcttgaccctggaagg
tgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggca

gtfaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgg
gctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaa
gcgccacgctcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttc
cagggggaacgcctggtatcttatagtcctgctgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgg
agcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaacggcttctggccttttgccttttgcctcacaatgt

SEQ ID NO: 22 (PTBP1 上游引物):

AGACGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG

SEQ ID NO: 23 (PTBP1 下游引物):

AAAACAGCCCATCTACATCCAGTTCTCCAACCAC

SEQ ID NO: 24 (AQP1 上游引物):

AGACAGGGCAGAACCGATGCTGATGAAGAC

SEQ ID NO: 25 (AQP1 下游引物):

AAAAGTCTTCATCAGCATCGGTTCTGCCCT

SEQ ID NO: 26 (PTBP1 上游引物):

ATTGTCCCAGATATAGCCGTTG

SEQ ID NO: 27 (PTBP1 下游引物):

GCTGTCATTTCCGTTTGCTG

SEQ ID NO: 28 (AQP1 上游引物):

GCTCTTCTGGAGGGCAGTGG

SEQ ID NO: 29 (AQP1 下游引物):

CAGTGTGACAGCCGGGTTGAG

SEQ ID NO: 30 (GAPDH 上游引物):

CCATGGGGAAGGTGAAGGTC

SEQ ID NO: 31 (GAPDH 下游引物):

GAAGGGGTCATTGATGGCAAC

SEQ ID NO: 32 (C13-113 蛋白序列, 928aa):

MSKDKKTKAKRMGVKALLAHGEDKLTMTTFGKGNRSKIEFTEGYHGRALETPK
HFGKRGFEVRKIDENVLDLYGDLEEGKTIEALLINPSEKVGEDYLKLGKLTLEKRFFGREF
PHDNIRIQLIYNILDIYKILGMNVADILYALGNMQDTELDIDMFGQSLNNPEKAKDVVQ
RMKPYMGFFGGIFRTQKKEDRKKDSNLSEEEKEEKKKKQEELLQKDLQHNMDVARCI
SALRHATAHNKPATAHDKQDEYPWFKSSDIYETKIFKAGMWSVIEADYKKKIQDVNK
QFFSKNKVNLAILFDLLDVRDVKQKKRISDEFYRFTIRKDGKNLGMNLVKIREIIDRYA

SGLRDKKHDPHRQKINVIADFLIFRALSQNQGIIDKTVSSLRLTKDEEEKDHVYQNAAE
 LVWGMVSNCLTPYFNDPKNKYILKYKDAKTPGDFEDWITSKISEDGEFPVKVLSFLC
 NFLEGKEINELLTAYIHKFECIQDFLNVISLGENVQFQPRFALFNNASFAQNVAVQLRIL
 ASIGKMKPDLTEAKRPLYKAAIRMLCPPEKWEKYTSDEWLEKNMLLNSEDRKNDKKK
 KQVNPFRNFIAGNVIESRRFMLVRYSKPKAVRAIMQNRSIVNYVLHRLPSEQIKTYSR
 VFPEDFSDTEAEIDFLVNKLSEFSFETFISNQQTILNNSKRGFSPNRRETAEEIERLKAITG
 LYLSVAYIAIKNIVKANARYYIAFAVFERDKELVKAKDARIQTTIPNTKFTNYFCLTQYY
 LDRDEEKKFPGDPRDKEAFFEHLRKTKRHFSKQWREWLNKIADAKSSQATGLLLRE
 ARNDVEHLNVLRAIPDYIQDFRHGEKGETAMNSYFELYHYLMQRLMLKNTELDLSHW
 SGWIMRSGRPDRDLIQIAFVSLAYNLPRYRNLTKEHHFDDTVLQKIREKESLD

SEQ ID NO: 33 (C13-113 同向重复序列):

GGUCAACAGUGUGGGGAAUUACCCGCACUCUACAAC

SEQ ID NO: 34 (C13-114 蛋白序列):

MSKDKKTKAKRMGVKALLAHGEDKLTMTTFGKGNRSQIEFTEGYHGRALETPK
 RFGKRGFEVRKIDENVLDLYGDLDEGKTIEALLVNPSENVGEDYLKCLKSTLENYFFGREF
 PHDNIRIQLIYNILDIYKILGMNVADILYTLGNLQDAEGDIDLFGKSLNEDNIKESLNR
 MRPYMGYFGEVFKKDNREHNKKVLRCSALRNATAHGKQDEYPWFKSSDIYEKTIFK
 ADKWRIEDQYREKIRKVNNEFFSKNKVNLAIFDLLHARDVEPKKQIADEFYRFTIRK
 DGKNLGMNLVKIREKIIDRFARDLRDKKHDPHRQKIHVIADFLIFRALSQNQEVIDKTV
 SRLRLTKDEEEKDRVYQNAAEELVWGMVSNCLSPYFKDPKKYIIQYKSGGKIKIFDDWI
 TSKISAKDGEFPVKVLSFLCNFLEGKEINELLTAYIHKFECIQDFLKVISSLGERAQFQPR
 FDLFNKPDFAQNVAVQLRILASIGKMKPDLTEAKRPLYKAAIQMLCPPEKWEKYTSDE
 WLEENMLLNSEDRQNKEKREKVNPFNFIAGNVIESRRFMLVRYSKPKAVRALMKN
 RSVVNYVLHRLPPEQIKTYSRVFPDDFNDTEAEIDFLVNKLSEFSFETFITSRQITLANSK
 RGFSPNRRETAEEIERLKAITGLYLSVAYIAIKNIVKANARYYIAFAVFERDKELVKAKD
 ARIQTTIPNTTYTNYFCLTQYYLDRDEEKKFQGDPRDKEAFFEHLRKKKTHFSKQWRE
 WLNEKIADAKSAQETGLLLTEARNDVEHLNVLRAIPDYIQDFRHGDKGETPMNSYFEL
 YHYLLQRLMLKNRLDLSSWRSWIERSGRPDRDLIQIAFVSLAYNLPRYRNLTKEHHF
 DDTVVLQKIRERKSLD

SEQ ID NO: 35 (C13-114 同向重复序列):

agUcUcagaacccUacaggUUUgUagagUUaUcU

SEQ ID NO: 36 (C13-113-BsaI 表达载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgctcggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcg
agegagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaatacaattacggggcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaactgcccacttggcagtfacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgcccagtfacatgacctatgggactttctacttggcagtfacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtatgagg
tttggcagtfacatcaatggcgctggatagcggttgactcacggggattccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggttaactaccggtgccaccatgccggcagtaagaaaaaaaactggatggcagcgtcgcacATGAGC
AAGGATAAGAAAACCAAAGCCAAGAGGATGGGTGTGAAAGCCCTGCTGGCCCACG
GAGAGGACAAGCTGACAATGACCACATTCGGAAAGGGCAATAGATCCAAAATCGA
GTTACACAGAGGGATAACACGGCAGGGCCCTGGAAACCCCAAGCACTTTGGCAAG
AGGGGATTCGAGGTCCGGAAGATCGATGAGAATGTTGACCTGTACGGGGACCTCGA
GGAGGGCAAACCATTGAAGCCCTGCTCATTAATCCTAGCGAGAAGGTGGGCGAG
GACTACCTCAAGCTGAAGGGGACTCTCGAGAAACGGTTTTTTGGGCGCGAATTTCC
ACATGACAATATCAGAATCCAGCTGATCTACAACATCCTGGACATCTACAAAATACT
GGGCATGAACGTCGCCGACATCCTGTACGCTCTGGGCAATATGCAGGACACAGAGC
TGGACATTGATATGTTCCGGCCAGTCTCTGAATAATCCTGAGAAGGCCAAAGATGTGG
TGCAGAGGATGAAGCCTTACATGGGCTTTTTTTGGGCGGCATCTTCAGAACCAGAAAG
AAGGAGGACCGGAAGAAGGACAGCAATCTCAGCGAGGAGGAGAAGGAGGAGAA
GAAGAAGAAGCAGGAAGAGCTGCTGCAGAAGGACCTGCAGCACAAACATGGATGTC
GCCAGATGTATTAGCGCACTGAGACATGCCACCGCCACAATAAGCCAGCCACTGC
CCACGATAAGCAGGACGAATACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATTTATGAGACAA
AGATTTTCAAAGCAGGCATGTGGTCAGTGATCGAGGCTGATTATAAGAAGAAGATC
CAGGATGTTAATAAACAGTTCTTCAGCAAGAATAAGGTGAACCTGGCCATCCTCTTT
GACCTGCTGGACGTACGTGATGTGAAGCAAAAAAAGCGGATCAGCGATGAGTTCTA
CCGTTTTTACCATCAGGAAGGACGGGAAAAACCTGGGCATGAATCTCGTGAAAATTA
GAGAGATCATTATCGACCGCTACGCCAGCGGGCTGCGCGATAAGAAACATGATCCC
CACAGACAGAAAATCAACGTAATTGCAGACTTCTGATTTTCCGGGCCCTGTCACA
GAACCAGGGGATCATAGATAAGACTGTGTCTAGTCTGCGGCTGACCAAGGACGAGG

AGGAGAAGGACCATGTGTATCAGAATGCAGCCGAACTGGTGTGGGGGATGGTGTCC
AACTGCCTGACCCCATACTTCAATGATCCCAAGAATAAATACATCCTGAAATACAAA
GACGCCAAGACTCCCGGGGATTTGAGGATTGGATCACCAGCAAATCAGTGAGG
ACGATGGGGAGCCTTTTGTGAAGGTGCTGAGCTTTCTGTGTAATTTCTTAGAGGGA
AAGGAAATTAACGAGCTGCTTACCGCCTACATCCATAAATTCGAATGTATCCAGGAT
TTTCTGAACGTGATATCTTCACTGGGCGAGAACGTCCAGTTTCAGCCCAGATTTGCC
CTGTTTAATAATGCTAGCTTCGCTCAGAACGTTGCCGTCCAGCTGAGGATTTTGGCC
AGCATCGGCAAGATGAAGCCTGATCTGACCGAGGCCAAAAGGCCCTGTACAAAG
CAGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTACACCAGTGATGA
ATGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAATAGCGAGGACAGAAAGAACGACAAGAAA
AAGAAACAGGTGAACCCTTTCAGGAATTTTATTGCAGGGAACGTTATCGAGTCTCG
CCGCTTTATGTATCTGGTGAGGTACAGCAAGCCAAAGGCCGTGCGGGCCATCATGC
AGAACAGGTCAATCGTGAACCTACGTGCTCCACCGGCTGCCTTCAGAGCAGATCAAA
ACTTACTCCCGTGTGTTCCCCGAGGACTTCTCCGACACCGAGGCCGAAATCGACTT
TCTCGTGAATAAACTGAGTGAATTTTCATTTGAAACCTTCATCTCCAACCAGCAGAC
AATTCTGAACAACCTCCAAGAGAGGCTTTAGCCCCAATAGACGGGAAACGGCCGAG
GAGATTGAACGGCTGAAGGCCATTACCGGCCTGTACCTCTCAGTGGCCTATATCGCC
ATCAAAAACATCGTGAAGGCCAACGCTAGGTACTATATTGCATTCGCCGTGTTTCGAA
AGAGATAAGGAGCTGGTGAAAGCCAAGGACGCCCCGCATACAGACCACTATCCCTAA
CACAAAATTTACTAACTATTTTTGTCTGACTCAGTACTATCTGGACCGCGACGAAGA
GAAGAAGTTTCCTGGCGACCCCCGCGACAAGGAGGCCTTCTTTGAACATCTGAGG
AAAATAAGCGGCACTTTAGTAAACAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGATCG
CCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGGCTGCTGCTGCGGGAGGCAAGAAATGA
TGTGGAACACCTGAATGTGCTGAGAGCTATCCCCGACTACATCCAGGACTTTCGCC
ACGGAGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAATAGCTACTTCGAGCTGTATCACTACCTG
ATGCAGAGGCTGATGCTTAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGCGGCT
GGATCATGAGGTCCGGTCGACCTGACAGGGATCTGATACAGATTGCTTTCGTGTCCC
TGGCATACAATCTGCCACGGTACAGAAATCTGACCAAAGAGCATCACTTCGATGAC
ACCGTGCTTCAGAAGATCAGGGAGAAAGAGAGCCTGGATAACAGGCGGGCGGCCCGG
GCGGCGGGCGCCGCCCGCCGCGCAGCGGCAGC
cctaagaaaaaacgaaaagttggcagcgggaagcaaaaggc
cgggcgccacgaaaaagccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACG
CTtgagaattcCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA

ATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctattcccatgattccttcatattgcatatac
atacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataattctt
gggtagttgcagtttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttctggctttatatacttgtgg
aaaggacgaaacaccGGTCAACAGTGTGGGGAATTACCCGCACTCTACAACggagaccacggcag
gtctcaTTTTTgcgccgcaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgcctcactgagccgggc
gaccaaaggtgcccgcgcccgggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagggcgccctgat
gcggtatttctccttacgcatctgtgcggtattcacaccgatacgtcaaagcaaccatagctacgcgcctgtagcggcgcataagcgc
ggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcggcctccttctgctttctccttctcttctgcca
cgttcggcgctttcccgtcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgattagtctttacggcacctcgaccccaaaaactt
gattgggtgatggttacgtagtgggccatcgccctgatagacggftttcgcccttgacgftggagtcacgcttftaagtgactctt
gttccaaactggaacaacactcaactctatctcgggctattctttgattataagggattttgccgatttcggtctattggttaaaaaatgagct
gatttaacaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgactctcagtacaatctgctctgatgcccatagtt
aagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgacc
gtctccgggagctgcatgtgtagaggtttcaccgctacaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttatagg
ttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttattttctaaatacattc
aaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaaagatgagattcaacatttccgtgctgc
ccttatccctttttgcggeattttgecttctgttttctcaccagaaacgctgggaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgac
gagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaa
gtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcggcgatacactattctcagaatgacttggtga
gtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctagtgataaactgc
ggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgt
tgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactat
taactggcgaacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagggcgataaagttgaggaccacttctgcctcggc
ccttcgggctggctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgctgtagcagcactggggccagatggtaa
gccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcact
gattaagcattggtactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatc
cttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgag
atcttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttfttggcgatcaagagctaccaactct
tttccgaaggtaactgcttcagcagagcagataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgt
agcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgccaagtgccgataagtcgtcttaccgggttgactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccga
actgagatacctacagcgtgagctatgagaaaagcggcaccgctcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggg

tcggaacaggagagegcacgaggagctccaggggaaacgcctggtatctttatagctctgctgggttcgccacctctgacttgagc
gtcgatttttgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctgaccttttctggcct
tttgctcacatgt

SEQ ID NO: 37 (C13-114-BsaI 表达载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgctggggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggttctgcgccctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaattacggggctcattagttcatagcccatatattggagttccgcgttacataacttacggtaaattggccgctggctg
accgccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgectggcattatgccagtacatgacctatgggactttcacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
ttttggcagtacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggatttccaagtcaccaccattgacgtcaatgggagtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgaacaactccgccccattgacgcaaattggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggtaactaccggtgccaccatgccggcagctaagaaaaaagaactggatggcagcgtcgacATGTCC
AAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGCGGATGGGCGTGAAAGCACTGCTGGCCCATG
GCGAGGATAAGCTCACCATGACCACTTTTGGTAAGGGAAATAGGTCCCAGATCGAG
TTTACAGAAGGCTATCACGGCCGAGCCCTGGAGACACCCAAAAGATTCGGCAAGA
GGGGGTTTGAGGTGAGAAAGATCGATGAAAACGTCGACCTGTATGGTGACCTGGAC
GAGGGCAAGACTATTGAGGCCCTGCTGGTGAACCCCTCCGAGAACGTTGGAGAGG
ACTATCTGAAACTGAAAAGCACACTGGAGAACTATTTTTTCGGTCGCGAGTTCCCTC
ATGACAATATCCGCATCCAGCTGATCTACAACATCTTGGATATCTATAAGATCCTGGG
GATGAACGTGGCTGACATCCTCTACACCCTGGGCAATCTGCAGGACGCTGAAGGAG
ATATCGATCTGTTTCGGGAAGTCCCTCAACAACGAGGACAACATTAAGAAAGTCTG
AATAGAATGAGGCCCTACATGGGCTACTTTGGGGAGGTGTTTAAAAAGGACAATAG
AGAACATAACAAGAAAGTGCTCCGGTGCATCTCCGCTCTGCGCAACGCCACAGCCC
ACGGCAAACAGGATGAATATCCTTGGTTCAAGAGCAGCGATATCTATGAAAAGACT
ATCTTCAAAGCCGACAAGTGGCGGATCATCGAGGACCAGTACAGAGAAAAGATTAG
GAAGGTGAACAACGAGTTTTTCAGCAAAAACAAAGTCAATCTGGCTATCCTCTTCG
ATCTTCTGCACGCCAGAGATGTGGAACCTAAGAAACAGATTGCCGATGAATTTTACA
GGTTCACCATCAGAAAGGATGGCAAAAATCTGGGGATGAACCTGGTGAAGATCAG
GGAGAAAATCATCGATCGGTTTGCCCGCGATCTGCGAGACAAGAAACACGACCCAC
ACAGACAGAAAATTCACGTGATCGCCGATTTCTGATTTTCAGGGCCCTGAGTCAG
AATCAGGAAGTGATCGACAAAACAGTCAGCCGGCTGAGGCTGACCAAGGATGAAG

AGGAGAAAGATAGAGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTCGTGTGGGGAATGGTGTC
CAACTGTCTGAGCCCATATTTCAAAGACCCTAAGAAATACATCATCCAGTATAAGTC
CGGCGGAAAAATCAAATCTTCGACGACTGGATCACCTCTAAGATTTCCGCCAAAG
ATGGCGAGCCATTTGTGAAGGTGCTGTCCTTTCTCTGCAATTTCTGGAGGGCAAG
GAGATCAACGAGCTGCTGACCGCTACATCCACAAGTTCGAGTGCATCCAGGATTT
TCTGAAAGTCATTTCCAGCCTGGGCGAGAGGGCCAGTTTCAGCCTCGGTTTCGATC
TGTTCAATAAGCCTGACTTTGCACAGAACGTGGCCGTGCAGCTGCGCATCCTCGCC
AGTATTGGGAAAATGAAGCCCGATCTGACTGAGGCCAAAAGGCCTCTCTACAAAGC
TGCCATCCAGATGCTCTGCCCTCCTGAGAAATGGGAGAAATACACAAGCGACGAGT
GGCTGGAGGAGAACATGCTGCTGAACTCCGAGGATAGGCAGAATAAGGAGAAGCG
AGAGAAGGTCAATCCCTTTTCGGAATTTTCATCGCCGGCAATGTGATTGAGAGCCGCC
GATTTATGTACCTCGTGAGGTACTCCAAGCCCAAGGCAGTTCGGGCTCTGATGAAA
AATAGATCAGTGGTGAACACTACGTGCTGCACAGGCTGCCTCCAGAGCAGATCAAGAC
CTACTCCAGGGTGTTCCTGATGACTTCAATGATACTGAAGCTGAGATCGATTTCT
GGTGAACAAGCTCAGCGAATTTTCTTCGAGACATTCATCACCAGCAGACAGACCA
TTCTGGCAAATTCOAAGAGGGGGTTTTCTCCTAACCGGCGGGAGACAGCCGAGGA
GATCGAAAGGCTGAAAGCCATCACAGGCCTGTACCTCAGCGTGGCCTACATTGCTAT
CAAAAATATCGTGAAAGCAAATGCCCGATACTACATAGCCTTCGCCGTGTTTCGAGCG
GGACAAGGAGCTCGTGAAAGCCAAGGACGCCAGGATACAGACTACCATCCCCAAT
ACAACCTACACTAATTACTTCTGCCTGACTCAGTACTACCTGGACCGTGACGAGGA
GAAAAAGTTTCAGGGCGACCCTCGGGATAAGGAGGCTTTCTTTGAACATCTCCGTA
AGAAGAAAACACACTTTAGCAAGCAGTGGCGGGAGTGGCTGAATGAGAAGATCGC
TGATGCCAAGTCCGCCCAGGAAACCGGCCTGCTGCTGACCGAGGCCAGGAATGAC
GTGGAACACCTGAATGTGCTGCGGGCCATTCCCGATTATATCCAGGACTTCAGGCAC
GGAGATAAGGGGGAAACTCCTATGAACAGCTACTTCGAGCTGTATCATTACCTGCTG
CAGAGGCTCATGCTGAAAAATCGGCTGCTCGACCTGTCTAGCTGGCGCTCCTGGAT
CGAGAGGTCTGGCCGACCTGATCGCGACCTGATTCAGATCGCATTTGTGAGCCTGG
CTTATAATCTGCCTAGATATCGGAATCTGACCAAGGAGCACCCTTTGATGATACCGT
GCTGCAGAAGATTAGAGAAAGGAAGAGCCTGGACACAGGCGGGCGGCCCGGCGG
CGGCGCCCGCCCGGCAGCGGCAGCccctaagaaaaaacgaaaagttggcagcggagcaaaaggccggcg
ccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgag
aatcCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGT

GTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttcccatgattccttcatattgcatatacagatacaag
gctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagt
ttgcagtttaaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgtggaaaggac
gaaacaccgagtctcagaaccctacaggttttagagttatctggagaccacggcaggtctcaTTTTTgcggccgcaggaacccc
tagtgatggagtggccactccctctctgcgcgctcgcctcactgaggccggcgaccaaaaggcgcccgcaccccgggctttgcc
cgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagctgctgcagggcgctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttca
caccgcatacgtcaaagcaaccatagtacgcgcctgtagcggcgcaftaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccg
ctacacttgccagcgccttagcgcctccttctgcttcttcccttcttctcgcacgctcgcggctttcccgtcaagctctaaatcgg
gggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaacttgattgggtgatggtcacgtagtgggcatcgcc
ctgatagacggttttcgccttgacgttgagtcacgcttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaactctatctcgg
gctattctttgatattataagggttttgcgatttgggtctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaatttaacgcaatttaacaaaata
ttaacgtttacaatttatgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgatagftaagccagccccgcaccccgaacaccgctga
cgcgcctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttcacc
gtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggftaatgcatgataataatggttcttagacgtcagg
tggcactttcgggaaatgtgcgcggaaccctattgtttattttctaaatacattcaaatatgatccgctcatgagacaataaccctgata
aatgctcaataatattgaaaaggaagagatgagtattcaacatttccgtgctgccttattccctttttgcggcattttgcttctgttttg
ctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatgaactggatctcaacagcggg
aagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacg
ccgggcaagagcaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatg
gcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctgagtataaactcgcggcaactacttctgacaacgatcggaggaccga
aggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaac
aattaatagactggatggaggggataaaagttgcaggaccacttctgcctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctgga
gccggtgagcgtggaagccggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtattctacacgacgggga
gtcaggaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttfactc
atatatactttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtg
agtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgaaca
aaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggcgatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggttcagcagagcgcag
ataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactctgt
taccagtggctgtgccagtggcgataagtcgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggc
tgaacggggggtctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagc
gccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggggagcttcca

gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcagggggcgag
cctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgetggccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 38 (PTBP1 上游引物):

CAACGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG

SEQ ID NO: 39 (PTBP1 上游引物):

ATCTGTGGTTGGAGAACTGGATGTAGATGGGCTG

SEQ ID NO: 40 (靶向 PTBP1 的 shRNA 的指导序列):

GCCCAUCUACAUCCAGUUCUC

SEQ ID NO: 41 (靶向 PTBP1 的 shRNA 的指导序列):

CAGCCCAUCUACAUCCAGUUC

SEQ ID NO: 42 (ANGPTL3-gRNA1 指导序列)

CAUGAAAACUUGAGAGUUGCUGGGUCUGA

SEQ ID NO: 43 (ANGPTL3-gRNA2 指导序列)

GAAUUAAGUUAGUUAGUUGCUCUUCUAAAU

SEQ ID NO: 44 (ANGPTL3-gRNA3 指导序列)

CGAUGUUGAAUUAUGUCCAUGGACUACCU

SEQ ID NO: 45 (ANGPTL3-gRNA4 指导序列)

GAUAGAGAAAUUUCUGUGGGUUCUUGAAUA

SEQ ID NO: 46 (ANGPTL3-gRNA5 指导序列)

CUGGAGAAGGUCUUUGAUGCUAUUAUCUUG

SEQ ID NO: 47 (ANGPTL3-gRNA6 指导序列)

CACUAUGGAGUAUAUCUUCUCUAGGCCCAA

SEQ ID NO: 48 (ANGPTL3-gRNA7 指导序列)

CCACACUCAUCAUGCCACCACCAGCCUCCU

SEQ ID NO: 49 (ANGPTL3-gRNA8 指导序列)

GACCAUCUAAAUAUGAUUCCACAUCACAA

SEQ ID NO: 50 (ANGPTL3 上游引物):

CCAGAACACCCAGAAGTAACT

SEQ ID NO: 51 (ANGPTL3 下游引物):

TCTGTGGGTTCTTGAATACTAGTC

SEQ ID NO: 52 (Lv-ANGPTL3-T2a-GFP 载体):

GTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGC ACTCTCAGTACAATCT
GCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAAT
TGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTTGCCTGCTTCGCGATGTACGGGCC
AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA
ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC
GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTT
TTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTC
CAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
TGGGAGGTCTATAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC
CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC
TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAA
TCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGA
GCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGG
CGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG
ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAA
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATAAACATATAGTATGGGCAA
GCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGC
TG TAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACT
TAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATA
AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAG
ACCACCGCACAGCAAGCGGCCGGCCGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGAT
ATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCA
TTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGA
GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT
GGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAG
TGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAA

CTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA
CCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACATTTGCA
CCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGA
ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATA
CACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATT
GGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTG
GTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTG
CTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC
CCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGT
GGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCGTG
CGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGG
GATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAC
AAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACA
GGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGCGTCGAGGAGCT
TGGCCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
AACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG
GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGG
CCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG
GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC
GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAA
GTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAATCAACGGGAC
TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT
ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA
GACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTC
CGCGGCCCCGAATTCgccaccatggccatgttcacaatfaagctcctctttttattgttctctagttatttctccagaattgatc
aagacaattcatcatttgattctctatctccagagccaaaatcaagatttgctatgttagacgatgtaaaaatttagccaatggcctcctcagt
tgggacatggtcttaagactttgtccataagacgaaggccaaataatgacatatttcaaaaactcaacatattgatcagctcttttatgat
ctatcgctgcaaacagtgaaatcaaaagaagaagaaaaggaactgagaagaactacatafaaactacaagtcaaaaatgaagaggtaa
agaatatgtcactgaaactcaactcaaaaactgaaagcctcctagaagaaaaaattctacttcaacaaaaagtgaatatttagaagagcaa

ctaaactaactaattcaaaatcaacctgaaactccagaacaccagaagtaacttcacttaaaactttttagaaaaacaagataatagcatc
 aaagaccttctccagaccgtggaagaccaatataaacaattaaccaacagcatagtcaaataaaagaaatagaaaatcagctcagaag
 gactagtattcaagaacccacagaaatttctctatcttccaagccaagagcaccagaactactccctttctcagttgaatgaataagaaa
 tgtaaaacatgatggcattctctgctgaatgtaccaccattataacagaggtgaacatacaagtggcatgtatgccatcagaccagcaact
 ctcaagttttcatgtctactgtgatgttatatcaggtagtcctggacattaattcaacatcgaatagatggatcacaaaacttcaatgaaag
 tgggagaactacaaatattggtttgggaggcttgatggagaatttggttggcctagagaagatatactccatagtgaaagcaatctaattat
 gttttacgaattgagttggaagactggaaagacaacaacattatattgaatattcttttacttgggaaatcacgaaaccaactatacgetac
 atctagttgcgattactggcaatgtcccaatgcaatcccgaaaacaagatttgggttttctacttgggatcacaaagcaaaaggacac
 ttcaactgtccagagggttattcaggaggctggtggtggcatgatgagtgaggagaaaacaacctaaatggtaaatataacaaccaaga
 gcaaaatctaagccagagaggagaagaggattatcttggaaagtctcaaaatggaaggttatactctataaaatcaacccaaatgttgatec
 atccaacagattcagaaagctttgaagatccGCTAGCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCT
 AACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
 TTCACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
 AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCT
 GAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCA
 CCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
 GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
 AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC
 TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
 GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA
 AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG
 CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCC
 GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA
 CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAg gatccTAGGCGGCCGCGCATGCCCTGCA
 GGTGATCTATCGATCGGCCGGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCC
 GAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATT
 GCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCA
 TTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGA
 AGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTT
 TGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCAC
 GTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGG

ATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAA
GGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATG
CTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGG
ACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCGGGCCGGATATC
ACGCGTGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATA
GTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGA
ATCCACCCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCCATCTCTGAAG
ACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCCGCATCTTCACTGGTGTC
AATGTATATCATTTTACTGGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGCTGGGCACTGCT
GCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAACAG
GGGCATCTTGAGCCCCTGCGGACGGTGCCGACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTG
GGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGTGATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGT
GAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGAGGGCTAAGCAATGCATACATGTGTTTAA
ACCTCGACTTAATTAAGTCGAGGGTTCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTCACGAGATC
ATGTTTAAGGGTTCCGGTTCCACTAGGTACAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCA
ACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCT
TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTAT
GGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGT
GGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCC
ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG
GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTT
TCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTA
CGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCT
GCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGC
CGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCTCGATCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCA
ATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACA
AGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGA
CTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA
GGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACA
CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCC
ACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGAAG

AAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATG
GATGACCCGGAGAGAGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTC
TCACATGGCCCGAGAGCTGCATCCGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGAT
CTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAA
GCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACT
AGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGCATGTGAGCA
AAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG
CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT
GCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTC
GGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC
TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGC
GCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
CAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGAT
CTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA
TCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGAT
ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
TAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
CATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACG
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGC
AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
CCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC

ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC
 CAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTAC
 CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATA
 AGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCA
 TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
 ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC

NLS:

NLS1: SPKKKRKVEAS (SEQ ID NO: 53)

NLS2: GPKKKRKVAAA (SEQ ID NO: 54)

NLS3: PKKKRKV (SEQ ID NO: 55)

NLS4: KRPAATKKA GQA KKKK (SEQ ID NO: 56)

NLS5: PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 57)

NLS6: RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 58)

NLS7: NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 59)

NLS8: RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO:
60)

NLS9: VSRKRPRP (SEQ ID NO: 61)

NLS10: PPKKARED (SEQ ID NO: 62)

NLS11: POPKKKPL (SEQ ID NO: 63)

NLS12: SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 64)

NLS13: DRLRR (SEQ ID NO: 65)

NLS14: PKQKKRK (SEQ ID NO: 66)

NLS15: RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 67)

NLS16: REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 68)

NLS17: KRKGDEV DGVDEVAKKSKK (SEQ ID NO: 69)

NLS18: RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 70)

NLS19: PAAKKKKLD (SEQ ID NO: 71)

SEQ ID NO: 72 (实验例 8 的 C13-2-VEGFA 载体):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcactgaggccgcccggcgctcggcgacctttggcgcgccgcctcagtgagcg
 agcgagcgcgcagagagggtggccaactccatcactaggggtcctcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta

gttattaatagtaatacaattacggggcattagttcatagcccatatattggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaaaactgcccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagttacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttctacttggcagttacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
tttggcagttacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccaccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctgctaactaccgggtgccaccatgccggcagtaagaaaaaagaactggatggcagcgtcgcacATGAGC
AAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAGAATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCAC
GGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACCTTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCG
AGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAGCCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCAT
CAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGACGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTG
GAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTGCTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGC
GAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCCCTGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGT
TCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTGATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGA
TCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTGTACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACC
GAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAGCCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGG
AGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATGGGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATC
AGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAGAGAGCACACAAGAAGGTGCTGAGA
TGCATCAGCGTGCTGAGAAACGCCACCGCCCACGACAAGCAGGACGAGTACCCCT
GGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAAAGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAA
GATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATCAAGAAGGTGAACAAGGACTTCCTG
AGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGTTTCGACCTGCTGAACGCCAGAGACG
TGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTTCTACAGATTCACCATCAGAAAGGA
CGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCATCGACAGAT
ACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACGACCCCCACAGACAGAAGATCAACG
TGATCGCCGACTTCCTGATCTTCAGAGCCCTGAGCCAGAACCAGGGCATCATCGAC
AAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGGACGAGGAGGAGAAGGACCACGTG
TACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCATGGTGAAGCAACTGCCTGACCCCTA
CTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACGCCAAGACCCCC
GGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGATCAGCGAGGACGACGGCGAGCCCT
TCGTGAAGGTGCTGAGCTTCCTGTGCAACTTCCTGGAGGGCAAGGAGATCAACGA

GCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGTGCATCCAGGACTTCCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCAGCCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCTGAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGGCCCTGTACAAGGCCGCCATCAG AATGCTGTGCCCCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTACACCAGCGACGAGTGGCTGGAG AAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAAGAACGACAAGAAGAAGAAGCAG GTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAACGTGATCGAGAGCAGAAGATTCAT GTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGTGAGAGCCATCATGCAGAACAGA AGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCAGCGAGCAGGTGCACAGATACGC CAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGAGCAGGAGATCGACTTCCTGACCA AGAAGCTGTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGCTGCACGAGAAGGACGTGATCCT GAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGAGATCGAGAGACTGAAGGCCATC ACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCATCAAGAACATCGTGAAGGCCAA CGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAGAGAGACAAGGAGCTGGTGAAGG CCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCGAGACAGACTTCCCCGACTACTTC TGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAGGAGAAGAAGTTCGCCGGCGACC CCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGAGAAAGACCAAGAGACACTTCAG CAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGATCGCCGACGCCAAGAGCAGCCA GGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCAGAAACGACGTGGAGCACCTGAACGTG CTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCAGACACGGCGAGAAGGGCGAGA CAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTACCTGATGCAGAGACTGATGCTG AAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGCGGCTGGATCATGAGAAGCGGCA GACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGTGAGCCTGGCCTACAACCTGCCC AGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTCGACGACACCGTGTGCTGCAGAAGA TCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACACAGGCGGGCGGCCCGGGCGGGCGCCGCCG CCGGCAGCGGCAGCccctaagaaaaaacgaaaagttggcagcgggaagcaaaaggccggcgccacgaaaaaggccgg ccaggcaaaaaagaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCCTTGAG CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT TTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattccttcatatttgcatacagatacaaggctgtagagataatt ggaattaatttactgtaaacacaaagatattagtaacaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagittgcagitttaaaattatgt ttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggcttatatatcttggaaaggacgaaacaccGGAAG

ATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACTGGGTGCAGCCTGGGACCACTTGGC
ATGGTTTTTTgcggccgcaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggg
cgaccaaaggctgcccgcgcccgggctttgcccgggaggccicagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcaggggagcctga
tgcggtatfttctccttacgcatctgtgcggtatftcacaccgatacgtcaaagcaaccatagtagcgcacctgtagcggcgcattaagcg
cggggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcgcccgtcctttcgtttcttcccttcttctcgcc
acgttcgcccggctttccccgtcaagcttcaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgccttacggcaccctgacccccaaaaaactt
gattgggtgatggttacgtagtgggccaatgcccctgatagacgggttttgcctttgacgttggagtccacgttcttaatagtgactctt
gttccaaactggaacaacactcaactctatctcgggtattctttgattataagggattttgcccatttcggtctattggttaaaaaatgagct
gatttaacaaaaatftaacgcgaatfttaacaaaafattaacgtttacaatfttaggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagtt
aagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcacctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgacc
gtctccgggagctgcatgtgtagaggtttcaccgctacaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatftttatagg
ttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttggggaaatgtgcgcggaaccctatfttgttattttctaaafacatc
aaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtagtattcaacatttccgtgtcgc
ccttatccctttttgcggcattttgecttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcac
gagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcctccgaagaacgtttccaatgatgagcactfttaaa
gttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgaccccgggcaagagcaactcggctgccgcatacactattctcagaatgacttgggtga
gtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctgagtataactgc
ggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgt
tgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactat
taactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcggc
ccttccggctggctggtttatgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaa
gccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcact
gattaagcattggtactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgattaaaacttcattttaattaaaagatctaggtgaagatc
cttttgataatctcatgacaaaatcccftaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgag
atcttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggttgttggccgatcaagagctaccaactct
tttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgt
agcaccgctacatacctcgtctgctaatctgttaccagtggtctgctgccagtggcgataagtcgtgcttaccgggtggactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccga
actgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggg
tcggaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgccttgatctttatagctctgctgggttccacctctgacttgagc
gtcgattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacccagcaacgcggcctttttacggttcttgccttttctggcct

tttgctcacatgt

SEQ ID NO: 73 (靶向 VEGFA 的 gRNA 的指导序列) :

TGGGTGCAGCCTGGGACCACTTGGCATGG

SEQ ID NO: 74 (R210A+H215A 突变前的序列) :

AGAAACGCCACCGCCAC (SEQ ID NO: 74)

SEQ ID NO: 75 (R210A+H215A 突变后的序列) :

GCAAACGCCACCGCCGCC (SEQ ID NO: 75)

SEQ ID NO: 76 (R750A+H755A 突变前的序列) :

AGAAAGACCAAGAGACAC

SEQ ID NO: 77 (R750A+H755A 突变后的序列) :

GCAAAGACCAAGAGAGCC

SEQ ID NO: 78 (R785A+H790A 突变前的序列) :

AGAAACGACGTGGAGCAC

SEQ ID NO: 79 (R785A+H790A 突变后的序列) :

GCAAACGACGTGGAGGCC

SEQ ID NO: 80 (设计的 DR 序列, 即 DR2) :

CCGCACAGTCCCTACAGGTTTGTAGAGTCATCTCC

SEQ ID NO: 81 (设计的 DR 序列, 即 DR2rc) :

GGAAGATGACTCTACAAACCTGTAGGGACTGTGCGG

SEQ ID NO: 82 (设计的 DR 序列, 即 DR3) :

GGTGTACAGGGTGCCTGGATTTGACAGGGTTACAGC

SEQ ID NO: 83 (设计的 DR 序列, 即 DR3rc) :

GCTGTAACCCTGTCAAATCCAGGCACCCTGTACACC

SEQ ID NO: 84 (设计的 DR 序列, 即 DR4) :

GGTGTACAGGGTGCCTAGATTTGACAGGGTTACAGC

SEQ ID NO: 85 (设计的 DR 序列, 即 DR4rc) :

GCTGTAACCCTGTCAAATCTAGGCACCCTGTACACC

SEQ ID NO: 86 (设计的 DR 序列, 即 DR-hf1) :

GGAAGAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGAC

SEQ ID NO: 87 (设计的 DR 序列, 即 DR-hf2) :

GGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGAGTTCTGAGAC

SEQ ID NO: 88 (检测 VEGFA 所用的 qPCR 引物) :

ACCTCCACCATGCCAAGTGG

SEQ ID NO: 89 (检测 VEGFA 所用的 qPCR 引物) :

CAGGGTCTCGATTGGATGGC (SEQ ID NO: 89)

SEQ ID NO: 90 (靶向 GFP 的指导序列) :

tgcggtctctgcttgctggccatgat

SEQ ID NO: 91 (靶向 PTBP1 的质粒载体 CasRx-3NLS-PTBP1) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgaggccgcccggcgctggggcgacctttggcgcgcccgccctcagtgagcg
 agcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttcctcggcctctagactcaggcggtgacattgattattgacta
 gttattaatagtaataacacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataactacggtaaattggcccgctggctg
 accgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
 gagtattacggtaaactgccactggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc

cgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagfacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcgg
tttggcagtacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttgg
caccaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggagggtcta
tataagcagagctctctggtaactaccgggtgccaccatgccggcagctaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgacATCGAG
AAGAAAAAATCCTTTGCTAAGGGCATGGGCGTTAAGAGCACTCTGGTGTGTCAGGCTC
TAAAGTGTACATGACCACATTCGCCGAGGGCTCTGATGCTCGCCTGGAAAAAATTG
TGGAAGGAGACTCAATCAGATCCGTGAACGAGGGGGAGGCCTTCAGCGCCGAGAT
GGCCGACAAGAATGCCGGATATAAGATTGGAAACGCTAAGTTCAGCCATCCCAAGG
GATACGCCGTGGTTCGCCAACAATCCTCTGTACACTGGACCTGTGCAGCAGGACATG
TTAGGTCTGAAGGAGACTCTGGAGAAGAGGTACTTCGGCGAGTCCGCAGATGGCA
ACGACAACATTTGCATTCAGGTGATCCATAACATCCTGGACATTGAGAAGATCCTGG
CCGAGTATATACCAACGCAGCCTACGCTGTGAATAATATATCTGGTCTGGATAAGG
ATATCATTGGGTTCGGGAAATTTTCTACCGTGTACACCTACGATGAGTTTAAAGACCC
CGAGCACACAGAGCCGCCTTCAACAACAACGACAAGCTGATCAATGCCATTAAGG
CACAGTACGATGAGTTCGACAATTTTCTGGACAACCCCCGGCTGGGCTACTTCGGC
CAGGCTTTTTTTTCTAAGGAAGGCCGCAATTACATCATCAACTACGGCAACGAGTGC
TATGACATTCTGGCCCTTCTGAGCGGCCTGAGGCATTGGGTGGTGCATAACAACGA
AGAGGAATCCCGCATCTCAAGAACATGGCTGTACAATCTCGACAAAAACCTGGACA
ATGAGTACATTTCCACTCTGAACTATCTGTACGACAGGATCACGAATGAGCTGACCA
ATTCCTTTTCCAAGAATAGCGCCGCCAATGTGAACTACATCGCCGAAACCCTGGGG
ATCAATCCCGCCGAGTTCGCCGAGCAGTATTTTCGATTGAGCATCATGAAAGAGCAG
AAAAATCTGGGCTTTAATATACCAAACCTGAGAGAAGTGATGCTGGACAGGAAGGA
TATGTCTGAGATCAGGAAGAACCACAAGGTGTTTCGACAGTATCAGAACCAAGGTGT
ATACAATGATGGATTTTCGTGATCTATAGGTACTACATTGAGGAGGACGCCAAGGTGG
CCGCCGCCAACAATCCCTGCCTGATAACGAGAAGTCCCTGTCTGAGAAGGATATC
TTCGTCATCAACCTGAGGGGCAGCTTCAATGATGACCAGAAGGACGCTCTTTACTA
CGACGAAGCCAACCGGATCTGGCGGAAGCTGGAAAACATCATGCACAACATCAAG
GAGTTCCGCGGGAACAAAACACGGGAGTACAAGAAAAAAGACGCTCCCAGACTG
CCCAGAATCCTGCCTGCAGGCAGGGATGTGAGCGCATTCTCCAAGCTGATGTACGC
CCTGACAATGTTTCTGGATGGCAAGGAAATCAACGACCTGCTGACCACTCTGATCA
ACAAGTTTGATAACATTCAGAGCTTTTCTGAAAGTGATGCCCTGATCGGAGTGAATG

CAAATTCGTCGAAGAATACGCTTTCTTCAAGGATTCTGCTAAAATCGCCGACGAGC
TGAGGCTGATTAAGTCCTTTGCAAGGATGGGGGAGCCAATCGCCGACGCCAGAAGA
GCCATGTATATTGATGCTATCAGAATCCTGGGCACCAATCTGTCTATGACGAACTGA
AGGCCCTGGCTGACACATTTTCTCTGGATGAGAATGGTAACAAGCTGAAGAAGGGG
AAGCACGGCATGCGAACTTTATTATTAACAATGTTATCTCTAATAAGAGGTTCCATT
ATCTGATTCGCTACGGCGACCCCGCCATTTGCACGAGATCGCCAAGAATGAAGCG
GTGGTGAAGTTCGTCTCTGGGACGGATCGCCGACATCCAGAAAAAGCAGGGCCAGA
ATGGCAAAAACCAGATCGACAGATATTATGAGACTTGCATCGGCAAGGATAAGGGT
AAAAGTGTCTCCGAGAAAGTGGATGCCCTGACTAAGATCATTACGGGGATGAATTA
CGACCAGTTTGACAAAAAGAGGAGCGTGATCGAGGACACCGGCAGAGAGAATGCC
GAGCGGGAGAAGTTTAAGAAGATCATCAGCCTGTATCTGACCGTGATTTACCATATC
CTGAAGAATATCGTGAATATCAATGCCAGATACGTGATCGGCTTCCACTGCGTGAA
AGAGACGCCAGCTCTACAAAGAGAAAGGCTACGACATCAATCTGAAGAAGCTGG
AGGAAAAGGGCTTTAGCAGCGTGACAAAAGTGTGTGCAGGAATCGACGAGACTGC
CCCTGACAAGAGGAAGGACGTGGAGAAAGAGATGGCCGAACGCGCCAAGGAGTC
TATCGACTCCCTGGAGTCCGCCAACCCCAAGCTGTACGCCAACTACATCAAGTATAG
CGACGAGAAGAAGGCAGAAGAGTTCACCCGGCAGATCAATAGAGAGAAGGCCAA
AACCGCACTGAATGCCTATCTGAGGAATACAAAGTGGAACGTGATTATTAGAGAAG
ATCTGCTGAGGATTGACAATAAGACCTGTACCCTATTCAGGAACAAGGCCGTGCATC
TGGAGGTGGCCAGGTACGTGCATGCCTATATTAATGATATAGCTGAAGTCAACTCCT
ATTTCCAGCTGTATCATTACATCATGCAGCGTATTATTATGAACGAAAGATATGAAAA
GAGCTCCGGCAAAGTGTCTGAGTACTTCGATGCCGTGAACGACGAAAAAAGTAC
AATGATCGCCTGCTGAAGCTGCTGTGTGTGCCCTTCGGGTAAGTGTATCCCCAGATTT
AAGAATCTGTCCATTGAAGCCCTGTTTCGATAGAAACGAAGCCGCAAATTCGACAA
GGAGAAGAAGAAGGTGAGCGGCAATAGTACAGGCGGCGGCCCCCGCGGCGGCGC
CGCCGCCGGCAGCGGCAGCcaataagaaaaacgaaaagttggcagcggaagcaaaaggccggcgccacgaaaa
aggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCC
TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTG
GAATTTTTTGTGTCTCTCAggtaccgaggccctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacaaggctgttagag
agataattggaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttcagtttta
aaattatgttttaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgtgaaaggacgaaacacc

GCAAGTAAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAACGTGGTTGGAGAACTGGATG
TAGATGGGCTGTTTTTgcggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcac
tgaggccgggaccaaaggtcggcgacggcggttggccggggcctcagtgagcgagcgagcgagcgcagctgcctgcag
ggcgccctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgcgcctgtagcgg
cgcattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtaccgctacacttccagcgccttagcggccgctcctttcgttttccct
tctttctgccacgttccggcgttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtctttacggcacctcgacc
ccaaaaacttgattgggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttcgcctttgacgttgagtcacgcttcttaa
tagtggactcttgtccaaactggaacaacactcaactctatctcgggctattctttgattataaggattttgccgatttcggtctattggtta
aaaaatgagctgatttaacaaaaatthaacgcgaatthtaacaaaatattaacgtttacaatthtatggtgcactctcagtagaacctctgctctgat
gccgcatagttaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctctcctccggcatccgcttacagac
aagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgc
ctatthtataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttthtatttt
ctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaggaagatgagattcaacat
ttccgtgcgccttattccctttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcag
ttgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggcccgaagaacgthtccaatgatga
gcactthaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaat
gacttggttgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtccataacatgagtg
ataacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcctttttgcaacaatgggggatcatgtaactc
gccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaacaacgtt
gcgcaaacatttaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagtgcaggaccactt
ctgcgctcggccctccggctggctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggatcattgcagcactgggg
ccagatggtaagccctcccgtatcgtatgttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagat
aggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattthtaattaaagatct
aggtgaagateccttttggataatctcatgacaaaatccctaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaag
gatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgtgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaaga
gtaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagttagccgtagtagccaccactt
caagaactctglagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtctgctccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggt
tgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggtctgtcacacagcccagcttgagcgaacga
cctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaa
gcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagctctgcgggttccaccct
ctgacttgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccgcaacgcggccttttaccggttctggcc

ttttgctggccttttgcacatgt

SEQ ID NO: 92 (靶向 PTBP1 的质粒载体 PspCas13b-3NLS-PTBP1) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccgggctcgggacaccttggctcggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggttctcggcctctagactcaggcgttgacattgattgacta
gttattaatagtaataaattacggggtaattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacgglaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgctggcattatgccagtlacatgacctatgggactttctacttggcagtlacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
tttggcagtlacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggattccaagtctccaccctgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaaacactccgccccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggtaactaccggtgccaccatgccggcagtaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgacATGaat
ccccgctctggtggaaaaccagaagaagtactttggcacctacagcgtgatggccatgctgaacgctcagaccgtgctggaccacatcc
agaaggtggccgatattgaggcgagcagaacgagaacaacgagaatctgtggttccaccctgatgagccacctgtacaacgcaa
gaacggctacgacaagcagcccagaaaaacctgttcatcatcgagcggctgcagagctacttccatctctgaagatcatggccgaga
accagagagagtlacagcaacggcaagtacaagcagaaccgctggaagtgaacagcaacgacatcttcaggtgctgaagcgcgcc
ttcggcgtgctgaagatgtacaggacctgaccaaccactacaagacctacgaggaaaagctgaacgacggctgcgagttctgacca
gcagagcaacctctgagcggcatgatcaacaactactacacagtgccctcgggaacatgaacgagagatacggctacaagacag
aggacctggccttcatccaggacaagcggttcaagttcgtgaaggacgcctacggcaagaaaaagttccaagtgaataaccgattctc
ctgagcctgcaggactacaacggcgacacacagaagaagctgcacctgagcggagtggaatcgccctgctgatctgcctgttctgg
acaagcagtlacatcaacatctttctgagcaggctgccatcttctccagctacaatgccagagcgggaacggcggatcatcatcagat
ccttcggcatcaacagcatcaagctgccaaggaccggatccacagcgagaagtccaacaagagcgtggccatggatgtctcaacg
aagtgaagcgggtccccgacgagctgttcaaacactgtctgccgagaagcagtcgggttcagaatcatcagcgcgaccacaatga
agtgtgatgaagcggagcagcgcagattcgtgcctctgctgctgcagtlatacgtattacggcaagctgttcgaccacatcaggttcca
cgtgaacatgggcaagctgagatacctgctgaaggccgacaagacctgcatcgacggccagaccagagtcagagtgatcgagcagc
ccctgaacggcttcggcagactggaagaggccgagacaatgccgaagcaagagaacggcaccttcggcaacagcggcatccggatc
agagacttcgagaacatgaagcgggacgacgccaatcctgccaactatccctacatcgtggacacctacacacactacatcctggaaaa
caacaaggtcgagatgtttatcaacgacaaaaggacagcggccccactgctgccctgatcgaggatgatagatacgtggtcaagaca
atccccagctgccggatgagcacctggaaattccagccatggccttccacatgtttctgttcggcagcaagaaaaccgagaagctgatc
gtggacgtgcacaaccggtlacaagagactgttccaggccatgcagaaagaagaagtaccgccgagaatatgccagcttcggaatc
gccgagagcgcacctgcctcagaagatcctggatctgatcagcggcaatgccacggcaagatgtggacgccttcatcagactgaccg

gccccttgacgttgagtcacgttctttaafatggactctgtfccaactggaacaacactcaactctatctcgggctattcttttgattata
 agggattttgccgatttcggctattggttaaaaatgagctgatttaacaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattaacgttfacaattta
 tggcgcactctcagtaacaatctgctctgatgccgatagtaagccagccccgacccccgcaacacccgctgacgcgccctgacgggc
 ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgc
 gcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatatttataggtaatgcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcgggga
 aatgtgcgcggaacccctatttgtttatcttaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatatt
 gaaaaaggaagatgatgattcaacatttcgctgctccctattccctttttgcggcattttgccttctgttttgctcaccagaaacgc
 tggtaaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
 tcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggattatcccgtattgacgccgggcaagagcaac
 tcggtcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagaga
 attatgcagtgtgccataacctgagtataactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttt
 ttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccac
 gatgctgtagcaatggcaacaacggttcgcaaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatg
 gagggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgga
 agccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatgga
 tgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgat
 taaaacttcattttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgctcactgag
 cgtcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgctgcaaacacaaaaaacaccgctac
 cagcgggtggtttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttcgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgttcttc
 tagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactcctgttaccagtggtctgctcc
 agtggcgataagtcgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtcgt
 gcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagafacctacagcgtgagctatgagaaagcggcacgcttcccgaag
 ggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagcttcaggggggaaacgcctggt
 atctttatagctctgctgggttcgccacctctgacttgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgcc
 agcaacgcggccttttacggttctggtcctttgtggtcctttgctcacatgt

SEQ ID NO: 93 (靶向 PTBP1 的质粒载体 Cas13X.1-3NLS-PTBP1) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgagggcccccggcgtcgggcgaccttggctccccggcctcagtgagcg
 agegagcgcgcagagaggagtggtcccaactccatcactaggggtcctcggcctctagactcagggcgttgacattgattattgacta
 gttattaataglaatcaattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacgglaaatggccccctggctg
 accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg

gagtatttacggtaaactgcccacttggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgectggcattatgcccagtagatgacctatgggactttctacttggcagtagatctactgattagtcacgtattaccatgggtgatggg
tttggcagtagatcaatggcggtggatagcgggttgactcacggggalltccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccgggtgccaccatgccggcagtaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgacGCCAG
GTGTCCAAACAGACCAGCAAGAAAAGGGAACTGAGCATCGATGAGTACCAGGGTG
CTAGAAAGTGGTGCTTCACAATCGCCTTTAACAAAGCTCTGGTCAATAGGGATAAA
AACGATGGCCTCTTCGTGGAGTCCCTGCTGAGACACGAGAAGTACAGCAAACACG
ACTGGTACGACGAGGATAACCAGAGCCCTGATCAAGTGCTCCACTCAGGCCGCCAAT
GCAAAGGCCGAGGCTCTGAGAAATTATTTTCAGCCACTACCGGCACTCCCCGGGTG
TCTGACCTTCACTGCAGAGGATGAGCTTAGGACAATTATGGAGCGCGCCTACGAGA
GGGCCATTTTTGAGTGTCGGCGAAGAGAACTGAGGTGATCATCGAGTTTCCATCT
CTGTTTGAAGGGGACCGCATCACAACCGCCGGAGTGGTATTTTTTTGTGAGTTTCTTC
GTGGAACGGAGAGTGCTGGACCGGCTGTACGGGGCAGTTAGTGGCCTGAAGAAGA
ACGAGGGGCAGTACAAGCTGACAAGGAAAGCTCTGAGCATGTACTGTCTGAAAGA
TTCCAGATTTACAAAGGCATGGGATAAGAGAGTGCTCCTCTTTCGCGATATCCTGGC
CCAGCTGGGCAGAATCCCAGCTGAGGCTTACGAGTACTACCACGGCGAACAGGGC
GACAAAAGAGGGCCAACGACAATGAGGGCACCAACCCCAAAAGGCACAAGGAT
AAGTTTATTGAGTTTGCCTGCACTACCTGGAGGCCAGCACTCTGAGATCTGCTTT
GGCAGAAGGCACATCGTGAGAGAGGAAGCTGGCGCCGGCGATGAGCACAAGAAG
CACAGAACCAAAGGGAAGGTGGTGGTGGACTTCTCCAAGAAGGATGAGGATCAGT
CTTACTACATCAGTAAGAACAACGTGATTGTGAGGATCGATAAGAATGCCGGCCCTC
GCTCCTACCGCATGGGGCTCAATGAACTGAAGTACCTGGTCCTGCTCTCTCTGCAGG
GGAAGGGCGATGACGCTATCGCCAAGCTGTATAGGTATCGGCAGCATGTGGAGAAC
ATTCTGGACGTGGTGAAGGTGACTGATAAAGATAACCACGTGTTCTGCCAAGGTT
TGTGCTCGAACAGCACGGAATCGGCCGGAAGGCCTTCAAGCAGAGAATTGACGGG
CGCGTGAAACATGTGCGCGGGGTGTGGGAAAAGAAGAAGGCCGCCACAAACGAG
ATGACGCTGCACGAGAAGGCCCGCGACATCCTCCAGTACGTGAATGAGAATTGCAC
TCGCAGCTTCAATCCTGGCGAGTATAACAGGCTGCTGGTGTGCCTGGTGGGTAAAG
ACGTGGAGAACTTCCAGGCCGGCCTGAAGCGGCTTCAGCTGGCTGAGAGAATTGA
CGGCCGGGTGTATTCTATCTTCGCCAGACTTCTACCATCAATGAAATGCACCAGGT

caccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagct
gcatgtgtcagagggtttaccgctatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTataggTaatgtcatgata
ataatggTttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctattgtttatTTTTtaatacattcaaatatgtatccg
ctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgagattcaacattccggtgcgccttattccctTTTT
gcggcattttgccttctgTTTTgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacat
cgaactggatctcaacagcgglaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttfaaagttctgctatgtgg
cgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttggtgagtaactcaccagtc
acagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgccataacctgagtgataaactgcggccaacttacttc
tgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctTTTTgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggag
ctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacattactggcgaact
acttactctagctccccggcaacaattaagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggc
tggTttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatc
gtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgg
taactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaactcattttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctc
atgacaaaatcccttaacgtgagtttctccactgagcgtcagacccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTTctgc
gcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggta
actggcttcagcagagcgcagataccaaactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
atacctcgtctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccgg
ataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacttac
agegtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggaga
gcgcacgagggagcttccagggggaacgccttgatctttatagtcctgtcgggttccaccctctgactgagcgtcgattttgtgat
gctcgtcagggggcggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtcctggccttttctgaccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 94 (靶向 PTBP1 的质粒载体 Cas13Y.1-3NLS-PTBP1) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgagggcccgccggcgtcggggcacccttggctcggccgctcagtgagcg
agegagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctcggccctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaataglaatcaattacggggctattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacgglaaatggccccgctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagttttacggtaaacctgccacttgccagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccaglacatgaccttatggactttctacttggcagfacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
tttggcagfacatcaatggcgctggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttgg

cacaaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccggtgccaccatgccggcagtaagaaaaaagaactggatggcagcgtcgacAATGGC
ATCGAGCTCAAAAAGGAGGAAGCCGCATTTTATTTCAACCAGGCAGAACTCAATCT
GAAGGCTATTGAGGATAATATCTTCGACAAGGAGAGAAGAAAGACCCTGCTGAATA
ACCCTCAGATTCTGGCCAAGATGGAAAATTTTATTTTAACTTTAGAGACGTGACCA
AGAACGCCAAGGGCGAAATCGACTGCCTGCTCCTGAAGCTGCGGGAGCTGAGAAA
TTTCTACTCACATTATGTGCACAAAAGAGATGTGAGGGAACTGAGCAAGGGGGAGA
AGCCAATTCTGGAGAAGTATTATCAGTTTGCCATCGAGTCTACTGGCTCTGAGAACG
TGAAACTGGAGATCATTGAAAACGACGCCTGGCTGGCAGACGCCGGGGTGCTGTTT
TTTCTGTGCATCTTCCTGAAAAAGTCCCAGGCGAACAAGTTGATCAGCGGCATCTCT
GGTTTTAAGAGAAACGACGATACCGGCCAACCTCGCAGAAACCTGTTCACTTATTT
CAGCATCAGGGAGGGGTACAAAGTGGTGCCAGAGATGCAGAAACACTTCCTGCTG
TTCTCCCTCGTGAATCACCTGAGCAACCAGGACGATTACATTGAGAAGGCCACCA
GCCATACGATATCGGCGAGGGCCTGTTCTTTCATCGCATCGCCAGTACCTTCCTGAA
CATCAGCGGAATCCTGAGGAATATGAAGTTTTACACCTATCAGAGCAAACGGCTGGT
GGAGCAGAGAGGCGAGCTGAAGAGAGAGAAGGATATTTTCGCCTGGGAGGAGCCA
TTTCAGGGCAACTCCTACTTCGAGATCAATGGGCACAAAGGAGTGATTGGCGAGGA
CGAGCTGAAAGAGCTCTGCTATGCCTTCCTGATCGGCAATCAGGACGCCAACAAGG
TGGAGGGCAGGATTACACAGTTTCTGGAGAAGTTCAGAAACGCCAATAGCGTGCA
GCAGGTGAAGGACGATGAGATGCTGAAACCCGAATACTTCCCCGCCAATTACTTCG
CAGAGAGCGGGGTGGGACGGATCAAGGATCGAGTGCTGAATAGGCTGAACAAGGC
TATCAAGTCCAACAAGGCCAAAAAAGGGGAGATTATCGCCTATGACAAGATGAGGG
AGGTGATGGCCTTCATCAACAACCTCACTGCCTGTGGACGAGAAGCTGAAGCCCAA
AGATTACAAGAGGTATCTGGGCATGGTCCGGTTCTGGGACAGGGAGAAAGATAATA
TCAAGAGGGAGTTTGAGACTAAGGAGTGGAGCAAGTATCTGCCCTCCAACCTTCTGG
ACCGCCAAGAACCTGGAGCGCGTGTATGGCCTGGCACGCGAGAAAAACGCCGAAC
TGTTCAATAAGCTGAAAGCCGATGTGGAGAAGATGGACGAGCGGGAGCTGGAGAA
GTACCAGAAGATCAATGATGCAAAGGACCTGGCCAATTTGAGACGGCTCGCCTCCG
ACTTTGGAGTGAAGTGGGAGGAGAAAGACTGGGATGAATACAGCGGACAGATCAA
GAAGCAGATTACAGACTCCCAGAAACTGACTATCATGAAACAGAGGATCACCGCTG
GCCTGAAAAAAAACACGGAATCGAGAATCTGAATCTGAGGATCACCATCGACATT

AACAAATCCCGGAAGGCGGTGCTGAACAGAATTGCCATCCCCCGGGGGTTCGTGA
AGAGGCACATCCTGGGTGGCAGGAGAGCGAGAAAGTGAGCAAGAAGATTAGGGA
GGCTGAATGTGAAATTCTGCTGTCCAAGGAGTACGAGGAGCTGAGCAAACAGTTTT
TCCAGTCTAAAGACTACGACAAGATGACCAGGATAAACGGACTGTACGAGAAGAA
CAAGCTGATCGCCCTGATGGCCGTGTACCTCATGGGGCAGCTGAGAATCCTGTTCA
AAGAGCACACTAAGCTGGACGACATCACCAAGACTACCGTGGACTTCAAGATCAGT
GATAAGGTCACCGTGAAAATCCCCTTCAGCAATTACCCTAGCCTGGTGTACACAATG
TCCTCCAAATACGTGGACAATATCGGGAACTACGGATTCTCCAACAAGGATAAGGAT
AAGCCCATTCTGGGCAAATCGATGTGATCGAAAAACAGAGAATGGAGTTCATCAA
GGAAGTGCTGGGGTTTGAGAAGTATCTTTTCGACGACAAGATTATCGATAAAAGTA
AGTTCGCAGACACCGCCACTCACATCTCTTTTGCCGAGATCGTGGAGGAGCTGGTG
GAGAAGGGCTGGGACAAGGACCGCCTGACTAAGCTCAAAGACGCTAGAAACAAA
GCCCTGCACGGCGAGATCCTGACGGGCACCAGCTTTGACGAAACCAAGTCTCTGAT
CAATGAGTTGAAGAAGACAGGCGGCGGCCCGGCGGGCGCCGCCGCCGGCAGC
GGCAGCcctaagaaaaaacgaaaagltggcagcgggaagcaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaa
gaaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCCTTGAGCATCTGAC
TTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGT
CTCTCAggtaccgaggcctatttccatgatctctcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattggaattfaattga
ctgtaaacacaaagatattagtagcaaaaacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgacagtttaaaattatgtttaaatggact
atcatatgcttaccgtaacttgaagatatttctgatttcttggcttatatatcttggaaaggacgaaacaccgGTGGTTGGAGAA
CTGGATGTAGATGGGCTGgctgtgatagacctgatttggggtagtaacagcTTTTTgcgccgcaggaacc
ctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtegccgaccccgggctttgc
ccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcagctgcctgcaggggcgctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtattt
acaccgcatacgtcaaagcaacctagtagcgcacctgtagcggcgcaataagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgacc
gctacacttggcagcgccttagcgcccgtctcttctgctttcttcccttcttctcgcacagttcgccggtttcccgtcaagctetaatcg
gggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcaacctgacccccaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtggccategc
cctgatagacgglttttgcctttgacgttggagtcacgltcttfaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaactctatctcg
ggctattctttgattataagggattttgccgatttcggtctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaatttaacaaaa
tattaacgtttacaattttatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgacaccgccaacaccgctg
acgcgccctgacgggctgtctgctcccgcacccgttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagaggtttcac
cgctcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcag

gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatftgtttatftttctaaatacaatfcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctga
 taaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgagattcaacattccgtgctgcccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttt
 gctcaccagaaacgctgggtaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatcacaacagcgg
 taagatccttgagagttttgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgtatgtggcgcgggtattatcccgattgacg
 ccgggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatg
 gcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacctgagtgataaacactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccga
 aggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
 acgagcgtgacaccacgatgectgtagcaatggcaacaacgttcgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaac
 aattaatagactggatggaggcggafaaaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctgggtttattgctgataaatctgga
 gccggtgagcgtggaagccgcgggtatcattgcagcactggggccagatggtaaagccctcccgatcgtatgttacacgacgggga
 gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactc
 atafatactttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtg
 agtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgtagatcctttttctgcgcgtaactctgtctgttcaaca
 aaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcag
 ataccaataactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaatcctgt
 taccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataagggcgcagcggctgggc
 tgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagc
 gccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttcca
 gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcggag
 cctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttctggccttttctggccttttctcacaatgt

SEQ ID NO: 95 (单碱基编辑实验靶向 EGFP 的指导序列) :

tgccgttcttctgcttgcggccatgatatagacgttgtggctgtttagttgtactccagcttgtgcc

SEQ ID NO: 96 (单碱基编辑实验中的 dC13-2-BsaI 载体序列) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgtcgggcgacctttggcgcgccgacctcagtgagcg
 agcgagcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggttctcgtcggcctctagactcagggcgttgacattgattattgacta
 gttattaatagtaataaattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctg
 accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
 gagtattfacggtaaacgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc

cgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagfacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatcggg
tttggcagfacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgtttgg
caccaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggagggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccgggtgccaccatgccggcagctaagaaaaagaaactggatggcagcgtcgacATGAGC
AAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAGAATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCAC
GGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACCTTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCG
AGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAGCCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCAT
CAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGACGAGAACGTGGACCTGTGCGGGCAGCTG
GAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTGCTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGC
GAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCTGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGT
TCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTGATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGA
TCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTGTACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACC
GAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAGCCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGG
AGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATGGGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATC
AGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAGAGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGA
TGCATCAGCGTGCTGGCAAACGCCACCGCCGCCGACAAGCAGGACGAGTACCCCT
GGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAAAGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAA
GATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATCAAGAAGGTGAACAAGGACTTCCTG
AGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGTTTCGACCTGCTGAACGCCAGAGACG
TGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTTCTACAGATTCACCATCAGAAAGGA
CGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAGATCAGAGAGATCATCATCGACAGAT
ACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACGACCCCCACAGACAGAAGATCAACG
TGATCGCCGACTTCCTGATCTTCAGAGCCCTGAGCCAGAACCAGGGCATCATCGAC
AAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGGACGAGGAGGAGAAGGACCACGTG
TACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCATGGTGAGCAACTGCCTGACCCCCCTA
CTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGAAGTACAAGGACGCCAAGACCCCC
GGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGATCAGCGAGGACGACGGCGAGCCCT
TCGTGAAGGTGCTGAGCTTCCTGTGCAACTTCCTGGAGGGCAAGGAGATCAACGA
GCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGTGCATCCAGGACTTCCTGAACGTGA
TCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCCAGCCAGATTCGCCCTGTTCAACAAC
GCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCTGAGAATCCTGGCCAGCATCGGCA

AGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGGCCCTGTACAAGGCCGCCATCAG
AATGCTGTGCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTACACCAGCGACGAGTGGCTGGAG
AAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAAGAACGACAAGAAGAAGAAGCAG
GTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAACGTGATCGAGAGCAGAAGATTCAT
GTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGTGAGAGCCATCATGCAGAACAGA
AGCATCGTGAACTACGTGCTGCACAGACTGCCCAGCGAGCAGGTGCACAGATACGC
CAGCGTGTTCCTCCGAGAACTTCGCCGACCTGGAGCAGGAGATCGACTTCCTGACCA
AGAAGCTGTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGCTGCACGAGAAGGACGTGATCCT
GAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGAGATCGAGAGACTGAAGGCCATC
ACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCATCAAGAACATCGTGAAGGCCAA
CGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAGAGAGACAAGGAGCTGGTGAAGG
CCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCGAGACAGACTTCCCCGACTACTTC
TGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAGGAGAAGAAGTTCCCCGGCGACC
CCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGGCAAAGACCAAGAGAGCCTTCAG
CAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGATCGCCGACGCCAAGAGCAGCCA
GGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCGCAAACGACGTGGAGGCCCTGAACGTG
CTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCAGACACGGCGAGAAGGGCGAGA
CAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTACCTGATGCAGAGACTGATGCTG
AAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGCGGCTGGATCATGAGAAGCGGCA
GACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGTGAGCCTGGCCTACAACCTGCCC
AGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTCGACGACACCGTGCTGCAGAAGA
TCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACACAGGCGGCGCCCCGGCGGGCGGCCGCCG
CCGGCAGCGGCAGCcctaagaaaaaacgaaaagttggcagcgggaagcaaaaggccggcgccacgaaaaaggccgg
ccaggcaaaaaagaaaagctcgagTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTtgagaattcCCCTTGAG
CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT
TTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattccttcatatttgcatacagatacaggctgtagagagataatt
ggaatttaatttgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagittgcagtttaaaattatgt
tttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttggtaaaggacgaaacaccGGAAG
ATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACggagaccacggcaggtctcaTTTTTTgcgggccgag
gaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcactgaggccggggcgaccaaaggctgcccgacgcccgg
gctttgcccggggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcgagctgcctgcagggggcgctgatgcggtattttctcttacgcatctgtgc

ggtafttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtacgcgcctgtagcggcgcaattaagcgcggcgggtgtgggttacgcgcagc
 gtgaccgctacacttgccagcgccttagcgeccgctccttctgctttcttcccttcttctcgccacgttcgccggttccccgtcaagctc
 taaatcgggggctccctttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattgggtgatggttcacgtagtgggc
 catcgcctgatagacgggttttcgcccttgacgttgagtcacgttcttaafagtggactctgttccaaactggaacaactcaactct
 atctcgggctattctttgattataagggatttggcgttcggctctattgggttaaaaaatgagctgattaacaaaattaacgcgaatttaa
 caaaafattaacgtttacaattttatgggtgcactctcagtacaactctgctctgatgccgatagtaagccagccccgcacccccaacacc
 cgctgacgcgcctgacgggcttctctccccggcatccgcttacagacaagctgtagcctctccgggagctgcatgtgcagaggtt
 taccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgcatgataataatggttcttagac
 gtcagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatcttaafacattcaaatatgtaaccgctcatgagacaataac
 cctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgagatfcaacattccgtgctgccttattccctttttgcggcattttgccttc
 tgttttctcaccagaaacgctgggtaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaac
 agcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgt
 ttgacccgggcaagagcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtagctcaccagtcacagaaaagcatctac
 ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcctaccataaccatgagtgataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggagg
 accgaaggagctaacctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
 aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccg
 gcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggctggtttattgctgataaa
 tctggagccgggtgagcgtggaagccgcggatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatcttacacgac
 ggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagt
 ttactcatatacttttagattgatttaaaactcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatccctta
 acgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgc
 aaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagc
 gcagataccaaactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaat
 cctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtc
 gggctgaacggggggtctgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaga
 aagcggcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggggagct
 tccagggggaaacgctggtatctttatagctctgctgggttccaccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcaggggggc
 ggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctggccttttctgaccttttgcacatgt

SEQ ID NO: 97 (单碱基编辑实验中的 dC13-2-EGFP 载体序列) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcg

agcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggttcctgcggcctctagactcgagcggtgacattgattattgacta
ggtattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccatatattggagttccgcgttacataacttacggtaaattggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgcccaattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaaactgcccaactggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgctggcattatgccagtacatgacctatgggactttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatggg
ttttggcagtacatcaatggcggtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtcaccaccattgacgtcaatgggagttgttttg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccggtgccaccATGAGCAAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAG
AATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCACGGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACC
TTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAG
CCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCATCAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGA
CGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTGGAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTG
CTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCC
TGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGTTCACCCACGACAACATCAGAATCCAGCTG
ATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGATCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTG
TACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACCGAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAG
CCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGGAGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATG
GGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATCAGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAG
AGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGATGCATCAGCGTGCTGGCAAACGCCACCGCC
GCCGACAAGCAGGACGAGTACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAA
AGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAAGATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATC
AAGAAGGTGAACAAGGACTTCTGAGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGT
TCGACCTGCTGAACGCCAGAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTT
CTACAGATTCACCATCAGAAAGGACGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAG
ATCAGAGAGATCATCATCGACAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACG
ACCCCCACAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTTCTGATCTTCAGAGCCCTG
AGCCAGAACCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGG
ACGAGGAGGAGAAGGACCACGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCAT
GGTGAGCAACTGCCTGACCCCTACTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGA
AGTACAAGGACGCCAAGACCCCGGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGAT
CAGCGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGTGAAGGTGCTGAGCTTCTGTGCAACTTC

CTGGAGGGCAAGGAGATCAACGAGCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGT
GCATCCAGGACTTCCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCAG
CCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCT
GAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGG
CCCCTGTACAAGGCCGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTA
CACCAGCGACGAGTGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAA
GAACGACAAGAAGAAGAAGCAGGTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAAC
GTGATCGAGAGCAGAAGATTCATGTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGT
GAGAGCCATCATGCAGAACAGAAGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCCA
GCGAGCAGGTGCACAGATACGCCAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGA
GCAGGAGATCGACTTCCTGACCAAGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGC
TGCACGAGAAGGACGTGATCCTGAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGA
GATCGAGAGACTGAAGGCCATCACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCA
TCAAGAACATCGTGAAGGCCAACGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAG
AGAGACAAGGAGCTGGTGAAGGCCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCG
AGACAGACTTCCCCGACTACTTCTGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAG
GAGAAGAAGTTCGCCGCGACCCCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGG
CAAAGACCAAGAGAGCCTTCAGCAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGA
TCGCCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCGCAA
CGACGTGGAGGCCCTGAACGTGCTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCA
GACACGGCGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTA
CCTGATGCAGAGACTGATGCTGAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGC
GGCTGGATCATGAGAAGCGGCAGACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGT
GAGCCTGGCCTACAACCTGCCAGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTC
GACGACACCGTGCTGCAGAAGATCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACctgcctccactgaaa
gactgacactgggatcccagctgcattaccgcaggttttagctgacgctgtctcacgcctggctctgggtaagtttggtgacctgaccga
caacttctctcccctcacgctcgcagaaaagtgtgctgggctggagtcgtcatgacaacaggcacagatgltaaagatgccaaggtgataag
tgtttctacaggaggcaaatgtattaatggtgaatacatgagtgatcgtggccttgcattaaatgactgccatgcagaaataatatctcggag
atccttgctcagatttctttatacacaacttgagctttacttaataacaaagatgatcaaaaaagatccatcttcagaaatcagagegaggg
gggttaggctgaaggagaatgtccagtttcatctgtacatcagcacctctccctgtggagatgccagaatcttctcaccacatgagccaat
cctggaagaaccagcagatagacacccaatcgtaaagcaagaggacagctacggacaaaaatagagctctggctcaggggacgattcc

agtgcgctccaatgcgagcatcaaactgggacgggggtgctgcaaggggagcggctgctcaccatgtcctgcagtgacaagattgca
cgctggaacgtggtgggcatccagggatcactgctcagcattttctggagcccatttacttctcagcatcactctgggacgctttacca
cggggaccacctttccagggccatgtaccagcggatctccaacatagaggacctgccacctctctacacctcaacaagcctttgctcag
tggcatcagcaatgcagaagcacggcagccaggggaaggcccccaacttcagtgtcaactggacggtaggcgactccgctattgaggtc
atcaacgccacgactgggaaggatgagctgggcccgcgctcccgcctgtgtaagcacgcgttgactgtcgtggtgctgacg
gcaaggttcccctccacttactacgctccaagattaccaagcccaactgtaccatgagtccaagctggcgggcaaaggagtagcagcc
gccaaggcgcgctctgttcacagccttcatcaaggcggggctgggggctgggtggagaagcccaccgagcaggaccagttctcactc
acgtaagaattcCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA
ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCAggfaccgagggcctatttccatgattccttcatatttgcataatag
atacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagataattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataattctt
gggtagtttgcagttttaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttgctttatatacttgtgg
aaaggacgaaacaccGGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACTgcccgttcttctgctgtg
cggccatgatatagacgttggctgtttagttgactccagcttggcccTTTTTgcggccgcaggaaccctagtgatggagtt
ggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggaccaaaggctgcccagcggccgggctttgcccgggcccctc
agtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgctgatgcggatttttctccttacgcactctgtcggatitcacaccgcatac
tcaaagcaaccatagtagcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcca
gcgecttagcggccgctccttcgctttcttcccttcttctcgcacgctcgcggcttcccgtcaagctctaaatcgggggctccctta
gggttccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattgggtgatggttcacgtagtgggcccacgcccgatagacggt
tttccgctttgacgttgagtcacgcttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaactctatctcgggctattctttgat
ttataagggattttgccgatttcggctctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatctaacgcgaatttaacaaaatattaacgtttaa
ttttatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgcccatagtaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgac
gggcttctctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgacagaggtttaccgctacaccgaa
acgcgcgagacgaaaggccctcgtgatacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcg
gggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaat
aatattgaaaaaggaagagtagtattcaacatttccgtgctcgccttattccctttttgcggcattttgcttctgttttctcaccaga
aacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttga
gagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggfaffatcccgtattgacggcgggcaaga
gcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagta
agagaattatgcagtgctgccataacctagtgataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaac
cgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga
caccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagact

ggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggfttattgctgataaatctggagccggtgagc
gtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaact
atggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgccicactgattaagcattgglaactgtcagaccaagtttactcatatatactttag
attgattaaaacttcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtcca
ctgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttcaaaaaaaaccacc
gctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataact
gttcttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggct
gctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggg
gttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccagcttcc
cgaagggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacg
cctggtatctttatagctctgcgggttccaccctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgcagggggcggagcctatggaaaa
acgccagcaacgcggccttttacggttctgaccttttctggccttttctgctcacatgt

SEQ ID NO: 98 (单碱基编辑实验中的 dC13-2-ADAR-EGFP 载体序列) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgcctcactgaggccgcccggcgtcgggacaccttggctgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctcgcggcctctagactcagggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggcccgcctggctg
accgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaaactgcccacttgacgtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgectggcattatgcccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctcgtattagtcacgtattaccatgggtgatcggg
ttttggcagctacatcaatggcggtggatagcgggttgactcacggggatttccaagctccaccccattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttcaaaaatgtcgttaaacactccgcccattgacgcaaatgggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggttaactaccggtgccaccATGAGCAAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAG
AATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCACGGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACC
TTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAG
CCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCATCAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGA
CGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTGGAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTG
CTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCC
TGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGTTCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTG
ATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGATCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTG
TACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACCGAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAG

CCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGGAGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATG
GGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATCAGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAG
AGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGATGCATCAGCGTGCTGGCAAACGCCACCGCC
GCCGACAAGCAGGACGAGTACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAA
AGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAAGATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATC
AAGAAGGTGAACAAGGACTTCTGAGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGT
TCGACCTGCTGAACGCCAGAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTT
CTACAGATTCACCATCAGAAAGGACGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAG
ATCAGAGAGATCATCATCGACAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACG
ACCCCCACAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTTCTGATCTTCAGAGCCCTG
AGCCAGAACCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGG
ACGAGGAGGAGAAGGACCACGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCAT
GGTGAGCAACTGCCTGACCCCTACTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGA
AGTACAAGGACGCCAAGACCCCCGGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGCAAGAT
CAGCGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGTGAAGGTGCTGAGCTTCTGTGCAACTTC
CTGGAGGGCAAGGAGATCAACGAGCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGT
GCATCCAGGACTTCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGGCGAGAACGTGCAGTTCAG
CCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCT
GAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGG
CCCCTGTACAAGGCCGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTA
CACCAGCGACGAGTGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAA
GAACGACAAGAAGAAGAAGCAGGTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAAC
GTGATCGAGAGCAGAAGATTCATGTACCTGGTGAAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGT
GAGAGCCATCATGCAGAACAGAAGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCCA
GCGAGCAGGTGCACAGATACGCCAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGA
GCAGGAGATCGACTTCTGACCAAGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGC
TGCACGAGAAGGACGTGATCCTGAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGA
GATCGAGAGACTGAAGGCCATCACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCA
TCAAGAACATCGTGAAGGCCAACGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAG
AGAGACAAGGAGCTGGTGAAGGCCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCG
AGACAGACTTCCCCGACTACTTCTGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAG

GAGAAGAAGTTCCCCGGCGACCCCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGG
CAAAGACCAAGAGAGCCTTCAGCAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGA
TCGCCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCGCAAA
CGACGTGGAGGCCCTGAACGTGCTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCA
GACACGGCGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTA
CCTGATGCAGAGACTGATGCTGAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGC
GGCTGGATCATGAGAAGCGGCAGACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGT
GAGCCTGGCCTACAACCTGCCCAGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTC
GACGACACCGTGCTGCAGAAGATCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACggatccCTTCAA
CTGCCTCCACTTGAAAGACTGACACTGGGATCCcagctgcattaccgcaggttttagctgacgctgtctca
cgectggtcctgggtaagtttggtgacctgaccgacaacttctcctcccctcacgctgcagaaaagtgtggtgagtcgtcatgaaa
caggcacagatgftaaagatgccaaggtgataagtggttctacaggaGGCaaatgtattaatggtgaatacatgagtatcgtggcctg
cattaaatgactgcatgcagaaataatctcggagatcctgtcagattctttatacacaactgagctttactaaataacaaagatgat
caaaaaagatccatcttcagaaatcagagcagggggggttaggctgaaggagaatgtccagtttcatctgtacatcagcacctctcct
gtggagatgccagaatcttctaccacatgagccaatctggaagaaccagcagatagacacccaaatcgtaaagcaagaggacagct
acggaccaaaatagagtctggtCaggggacgattccagtgctccaatgcgagcatccaaactggggacgggggtgctgcaagggg
ageggctgctcaccatgtcctgcagtgacaagattgcacgctggaactggtgggcatccagggatcActgctcagcatttctgagg
cccatttactctcagcatcactctgggcagcctttaccacggggaccaccttccagggccatgtaccageggatctccaacatagagg
acctgccactctctacacctcaacaagcctttgctcagtggtcagcaatgcagaagcacggcagccagggaaagggcccccacttc
agtgtaactggacggtaggcgactccgctattgaggtcatcaacgccacgactgggaaggatgagctgggcccgcgctcccgctgt
gtaagcacgcgttactgtcgtggatgctgtgcacggcaaggttccctcccacttactacgctccaagattaccaagcccaacgtgla
ccatgagtccaagctggcggcaaaggagtaccaggccgcaagggcgcgtctgttcacagccttcatcaaggcggggctgggggcctg
ggtggagaagcccaccgagcaggaccagttctcactcagTAAGcggccgctcagcttagagggcccgttaaaccgctgatca
gcctcgagaatcCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA
ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCAggtaccgaggcctatttcccatgattccttcatattgcatatag
atacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataattctt
gggtaglttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaactgaaaglatttgcatttctggctttalatatcttgg
aaaggacgaaacaccGGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACTgcccgttcttctgcttgt
cgcccatgatatagacgttggctgttagttgactccagcttgtcccTTTTTTgcgccgcaggaaccctagtgatggagtt
ggccactcccctctctgcgcgctcgtcactgaggccggggcaccaaaggtcggccgacggccgggcttggccggggcggcctc
agtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcaggggcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttccaccgcatacg

tcaaagcaaccatagtacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcggtgtggtggftacgcgcagcgtgaccgctacacttgeca
gcgccttagcgcggcctcttctgctttcttccctcttctcgcacgctcgcggcttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctta
gggtfccgalltagtgccttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattgggtgatggtcacgtagtgggccatcgccctgatagacggt
tttcgcccttgacgtggagtccacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaactctatctcgggctattctttgat
ttataagggttttgcgatttcgggtctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaatgaacgcgaatttaaaaaatgaacgtttaca
ttttatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgccgatagtaagccagccccgacacccccaacacccgctgacgcgccctgac
gggcttctctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctcatcaccgaa
acgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcactttcg
gggaaatgtgcgcggaacccctatttGTTatttttclaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaat
aatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgctgcccttattccctttttgcggcattttgcttctgttttctcaccaga
aacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcctga
gagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggfaffatcccgtattgacgccgggcaaga
gcaactcggctcggcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagta
agagaattatgcagtgctgccataacctgagtgataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaac
cgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga
caccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagact
ggatggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagc
gtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaact
atggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtactgtcagaccaagtactcatatatactttag
attgattfaaaacttattttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtcca
ctgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgaacaaaaaaaccacc
gctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtactggcttcagcagagcgcagataccaaact
gttctctagtgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggct
gctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggg
gtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttcc
cgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacg
cctgglatctttatagctctgctgggttccaccctctgacttgagcgtcattttgtgatgctcgtcaggggggaggcctatggaaaa
acgccagcaacgcggccttttacggttctgaccttttctggttctgtcaccatgt

SEQ ID NO: 99(单碱基编辑实验中的 dC13-2-A(EAAAK)3A-ADAR-EGFP 载体序列):
cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccggcgtcgggcgacctttggtcggccggcctcagtgagc

agcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggttctgcggcctctagactcgagcggtgacattgattattgacta
ggtattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgcccaattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaaactgcccaactggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgctggcattatgccagtacatgacctatgggactttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatggg
ttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggattccaagtcaccaccattgacgtcaatgggagttgttttg
caccaaaatcaacgggactttcaaaatgtcgaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggttagcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggetaactaccggtgccaccATGAGCAAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAG
AATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCACGGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACC
TTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAG
CCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCATCAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGA
CGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTGGAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTG
CTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCC
TGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGTTCACCCACGACAACATCAGAATCCAGCTG
ATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGATCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTG
TACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACCGAGCTGGACATCGACATGTTTCGGCCAGAG
CCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGGAGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATG
GGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATCAGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAG
AGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGATGCATCAGCGTGCTGGCAAACGCCACCGCC
GCCGACAAGCAGGACGAGTACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAA
AGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAAGATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATC
AAGAAGGTGAACAAGGACTTCTGAGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGT
TCGACCTGCTGAACGCCAGAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTT
CTACAGATTCACCATCAGAAAGGACGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAG
ATCAGAGAGATCATCATCGACAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACG
ACCCCCACAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTTCTGATCTTCAGAGCCCTG
AGCCAGAACCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGG
ACGAGGAGGAGAAGGACCACGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCAT
GGTGAGCAACTGCCTGACCCCTACTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGA
AGTACAAGGACGCCAAGACCCCGGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGAT
CAGCGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGTGAAGGTGCTGAGCTTCTGTGCAACTTC

CTGGAGGGCAAGGAGATCAACGAGCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGT
GCATCCAGGACTTCCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCAG
CCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCT
GAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGG
CCCCTGTACAAGGCCGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTA
CACCAGCGACGAGTGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAA
GAACGACAAGAAGAAGAAGCAGGTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAAC
GTGATCGAGAGCAGAAGATTCATGTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGT
GAGAGCCATCATGCAGAACAGAAGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCCA
GCGAGCAGGTGCACAGATACGCCAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGA
GCAGGAGATCGACTTCCTGACCAAGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGC
TGCACGAGAAGGACGTGATCCTGAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGA
GATCGAGAGACTGAAGGCCATCACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCA
TCAAGAACATCGTGAAGGCCAACGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAG
AGAGACAAGGAGCTGGTGAAGGCCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCG
AGACAGACTTCCCCGACTACTTCTGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAG
GAGAAGAAGTTCGCCGCGACCCCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGG
CAAAGACCAAGAGAGCCTTCAGCAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGA
TCGCCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCGCAA
CGACGTGGAGGCCCTGAACGTGCTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCA
GACACGGCGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAACAGCTACTTCGAGCTGTACCACTA
CCTGATGCAGAGACTGATGCTGAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGC
GGCTGGATCATGAGAAGCGGCAGACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGT
GAGCCTGGCCTACAACCTGCCAGATACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCCTTC
GACGACACCGTGCTGCAGAAGATCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACGCCGAGGCC
GCCGCCAAGGAGGCCGCCGCCAAGGAGGCCGCCGCCAAGGCCggatccCTTCAACTG
CCTCCACTTGAAAGACTGACACTGGGATCCcagctgcatttaccgcaggttttagctgacgctgtctcacgcc
tggtcctgggtaagtttggtgacctgaccgacaacttctctcccctcacgctcgcagaaaagtgctggctggagtcgtcatgacaacag
gcacagatgftaaagatgccaaggtgataagtggttctacaggaGGCaaatgtattaatggtgaatacatgagtgatcgtggccttgatt
aatgactgccatgcagaaataatctcggagatccttgcagattttttatacacaacttgactttacttaataaacaagatgatcaaa
aaagatccatctttcagaaatcagagcagggggggttaggctgaaggagaatgtccagtttcatctgtacatcagcacctctcccctgtg

agatgccagaatcttctcaccacatgagccaatcctggaagaaccagcagatagacacccaaatcgtaaagcaaggagacagctacgg
acccaaatagagtctggtCaggggacgattccagtgcgctccaatgcgagcatccaaacgtgggacggggtgctgcaaggggagcg
gctgctcaccatgtcctgcagtgacaagaltgcacgctggaacgtggtgggcatccagggatcActgctcagcatttctgaggccat
ttacttctcagcatcatcctgggcagccttaccacggggaccaccttccagggccatgtaccagcggatctccaacatagaggacctg
ccacctcttacaccctcaacaagccttctcagtggtcagcaatgcagaagcacggcagccaggggaaggcccccactcagtg
caactggacggtaggcgactccgctaltgaggtcatcaacgccacgactgggaaggatgagctgggcccgcgctcccgcctgtgtaag
cacgcgttgactgtcgtggtgacggcaaggtccctcccacttactacgctccaagattaccaagcccaactgtaccatg
agtccaagctggcggcaaggagtagcaggccgccaaggcgcgctgttcacagccttcatcaaggcggggctgggggcctgggtg
gagaagcccaccgagcaggaccagtctcactcacGTAAGcggccgctcagcttagagggcccgtttaaaccgctgatcagcct
cgagaattcCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattccttcatattgcatatacgata
caaggctgtagagagataaltggaaltfaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctgg
gtagttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttgctttatatactgtgtaa
ggacgaaacaccGGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACTgcccgttctctgcttgcgg
ccatgatatagacgttggctgttagttgtactccagcttgcctTTTTTgcccgcaggaaccctagtgatggagtggc
cactccctctctgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcggcgacggccgggcttggccggcggcctcagt
gagcgagcgagcgcgagctgcctgcaggggcgctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtca
aagcaaccatagtagcgccttagcggcgcaataagcgcgggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactgccagcg
ccttagcggccgctcttctgcttctccttctcttctcggcagcttcccgcttcccgtcaagctctaaatcgggggctccccttaggg
ttccgattagtgttacggcacctcgaccccaaaaaactgattgggtgatggttcacgtagtgggcatcgcacctgatagacggtttct
gcccttgacgttggagtcacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaactctatctcgggctattctttgattata
agggatttgcgattcggctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaattaacgcgaatttaacaaaatattaacgttacaattta
tggtgcaactctcagtacaatctgctctgatgcccatagttaagccagccccgacacccgccaacaccgctgacgcgacctgacgggc
ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgctccgggagctgcatgtgcagaggtttaccgctcatcaccgaaacgc
gcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttatagggttaatgcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcgggga
aatgtgcggaaccctatttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatatt
gaaaaaggaagagtagatattcaacattccgtgtcgccttattccctttttgcccattttgccttctgttttgcacaccagaaacgc
tggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagttt
tcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgtatgtggcgcggtattatcccgtattgacggcgggaagagcaac
tcggctgcgcatalactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagaga
attatgcagtgctgcataaccatgagtataactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttt

ttgacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcggtgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccac
gatgcctgtagcaatggcaacaacgftgcgcaaactattaactggcgaactacttacttactgcttcccggcaacaattaatagactggatg
gaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgga
agccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatgga
tgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgat
ttaaacttcaattttaattaaaggatctaggtgaagatccttttggataatctcatgaccaaactccctaacgtgagtttctgctccactgag
cgctcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactgctgcttgaacaaaaaaaccaccgctac
cagcgggtggtttgttccgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaatactgttcttc
tagttagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacataacctcgtctgctaatcctgttaccagtggctgctgcc
agtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttcgt
gcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaaagcggcacgcttcccgaag
ggagaaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagcttcaggggggaaacgcctggt
atctttatagctcgtcgggttccacactctgacttgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgcc
agcaacgcggccttttacgggttctggccttttctggccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 100(单碱基编辑实验中的 dC13-2-(GGGGS)3-ADAR-EGFP 载体序列):

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccggcgtcgggcgaccttggtcgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctcgggctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtattacggtaaactgcccacttggcagctacatcaagtgtatcatatgccaaglacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgctggcattatgccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctacgtattagctatgctattaccatgggtgatgagg
tttggcagctacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttcaagtctccaccattgacgtcaatgggagtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggctaactaccggtgccaccATGAGCAAGGACAAGAAAACCAAGGCCAAGAG
AATGGGCGTGAAGGCCCTGCTGGCCCACGGCGAGGACAAGCTGACCATGACCACC
TTCGGCAAGGGCAACAGAAGCAAGATCGAGTTCACCGAGGGCTACCACGGCAGAG
CCCTGGAGACACCCAAGCACTTCGGCATCAGAGGCTTCGAGGTGAGAAGAATCGA
CGAGAACGTGGACCTGTGCGGCGACCTGGAGGAGGGCAAGACCATCGAGGCCCTG
CTGGTGAACCCAGCGAGAAGGTGGGCGAGGACTACCTGAAGCTGAAGGGCACCC
TGGAGAAGAGATTCTTCGGCAGAGAGTTCCCCACGACAACATCAGAATCCAGCTG

ATCTACAACATCCTGGACATCTACAAGATCCTGGGCATGAACGTGGCCGACATCCTG
TACGCCCTGGGCAACATGCAGGACACCGAGCTGGACATCGACATGTTCCGGCCAGAG
CCTGAACAACGAGGACAACCTGAAGGAGTGCCTGAAGAGAATGAGGCCCTACATG
GGCTACTTCGGCGACATCTTCAAGATCAGCCCCAAGGGCGAGAACATCGCCGACAG
AGAGCACAACAAGAAGGTGCTGAGATGCATCAGCGTGCTGGCAAACGCCACCGCC
GCCGACAAGCAGGACGAGTACCCCTGGTTCAAGAGCAGCGACATCTACGAGACAA
AGATCTTCAAGGCCGACATGTGGAAGATCATCAAGGACCAGTACAGAGAGAAGATC
AAGAAGGTGAACAAGGACTTCCTGAGCAAGAACGCCGTGAACATGGCCATCCTGT
TCGACCTGCTGAACGCCAGAGACGTGGAGCAGAAGAAGCAGATCACCGACGAGTT
CTACAGATTCACCATCAGAAAGGACGGCAAGAACCTGGGCATGAACCTGGTGAAG
ATCAGAGAGATCATCATCGACAGATACGCCAGCGGCCTGAGAGACAAGAAGCACG
ACCCCCACAGACAGAAGATCAACGTGATCGCCGACTTCCTGATCTTCAGAGCCCTG
AGCCAGAACCAGGGCATCATCGACAAGACCGTGAGCAGCCTGAGACTGACCAAGG
ACGAGGAGGAGAAGGACCACGTGTACCAGAACGCCGCCGAGCTGGTGTGGGGCAT
GGTGAGCAACTGCCTGACCCCCTACTTCAACGACCCCAAGAACAAGTACATCCTGA
AGTACAAGGACGCCAAGACCCCCGGCGACTTCGAGGACTGGATCACCAAGCAAGAT
CAGCGAGGACGACGGCGAGCCCTTCGTGAAGGTGCTGAGCTTCCTGTGCAACTTC
CTGGAGGGCAAGGAGATCAACGAGCTGCTGACCGCCTACATCCACAAGTTCGAGT
GCATCCAGGACTTCCTGAACGTGATCAGCAGCCTGGGCGAGAACGTGCAGTTCAG
CCCAGATTCGCCCTGTTCAACAACGCCAGCTTCGCCCAGAACGTGGCCGTGCAGCT
GAGAATCCTGGCCAGCATCGGCAAGATGAAGCCCGACCTGACCGAGGCCAAGAGG
CCCCTGTACAAGGCCGCCATCAGAATGCTGTGCCCCCGAGAAGTGGGAGAAGTA
CACCAGCGACGAGTGGCTGGAGAAGAACATGCTGCTGAACAGCGAGGACAGAAA
GAACGACAAGAAGAAGAAGCAGGTGAACCCCTTCAGAACTTCATCGCCGGCAAC
GTGATCGAGAGCAGAAGATTCATGTACCTGGTGAGATACAGCAAGCCCAAGGCCGT
GAGAGCCATCATGCAGAACAGAAGCATCGTGAACACTACGTGCTGCACAGACTGCCCA
GCGAGCAGGTGCACAGATACGCCAGCGTGTTCGCCGAGAACTTCGCCGACCTGGA
GCAGGAGATCGACTTCCTGACCAAGAAGCTGTTTCGAGTTCAGCTTCGAGGAGCTGC
TGCACGAGAAGGACGTGATCCTGAACAACAGCAGAAGCCACAAGCCCAGCCTGGA
GATCGAGAGACTGAAGGCCATCACCGGCCTGTACCTGAGCGTGGCCTACATCGCCA
TCAAGAACATCGTGAAGGCCAACGCCAGATACTACATCGCCTTCGCCGTGTTTCGAG

AGAGACAAGGAGCTGGTGAAGGCCAAGGACGCCAGAATCCAGACCAAGATCCCCG
 AGACAGACTTCCCCGACTACTTCTGCCTGACCCAGTACTACCTGGACAGAGACGAG
 GAGAAGAAGTTCCCCGGCGACCCCAGAGACAAGGAGGCCTTCTTCGAGCACCTGG
 CAAAGACCAAGAGAGCCTTCAGCAAGCAGTGGAGAGAGTGGCTGAACGAGAAGA
 TCGCCGACGCCAAGAGCAGCCAGGCCACCGGCCTGCTGCTGAGAGAGGCCGCAAA
 CGACGTGGAGGCCCTGAACGTGCTGAGAGCCATCCCCGACTACATCCAGGACTTCA
 GACACGGCGAGAAGGGCGAGACAGCCATGAACAGCTACTTTCGAGCTGTACCACTA
 CCTGATGCAGAGACTGATGCTGAAGAACACCGAGCTGGACCTGAGCCACTGGAGC
 GGCTGGATCATGAGAAGCGGCAGACCCGACAGAGACTTGATCCAGATCGCCTTCGT
 GAGCCTGGCCTACAACCTGCCAGATAACAGAAACCTGACCAAGGAGCACCACTTC
 GACGACACCGTGCTGCAGAAGATCAGAGAGAAGGAGAGCCTGGACGGTGGCGGA
 GGTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGGTTCTggatccCTTCAACTGCCTCCAC
 TTGAAAGACTGACACTGGGATCCcagctgcattaccgaggttttagctgacgctgtctcacgctggctctgggta
 agtttggtagctgaccgacaacttctctcccctcacgctcgcagaaaagtgctggctggagtcgcatgacaacaggcacagatgta
 aagatgccaaggtgataagtgtttctacaggaGGCaaatgtattaatggtgaatacatgagtgatectggccttgcattaatgactgcca
 tgcagaaataatctcggagatccttgetcagatttcttatacacaactgagctttacttaataacaaagatgatcaaaaaagatccatct
 ttcagaaatcagagcgaggggggttaggctgaaggagaatgtccagttcatctgtacatcagcacctctcctgtggagatgccagaat
 ctctcaccacatgagccaatctggaagaaccagcagatagacaccaaatcgtaaagcaagaggacagctacggacaaaafagag
 tctggtCaggggacgattccagctgcgctcaatgcgagcatcaaacgtgggacggggtgctgcaaggggagcggctgctcacatg
 tctgcaagtgacaagattgcacgctggaacgtggtgggcatccaggatcActgctcagcatttctgtggagcccatttacttctcgagca
 tcatctgggcagcctttaccacggggaccaccttccagggccatgtaccagcggatctccaacatagaggacctgccacctcttaca
 cctcaacaagcctttgctcagtgccatcagcaatgcagaagcacggcagccagggaaggcccccaacttcagtgtaactggacggt
 aggegactccgctattgaggtcatcaacgccacgactgggaaggatgagctgggccgcgcgtcccgcctgtgtaagcacgcgtgtac
 tgtcgtggatgctgtgcaaggcaaggttccctcccacttactacgctccaagattaccaagccaacgtgtaccatgagccaagctg
 gcggcaaaggagtaccaggccccaaggcgcgtctgttcacagccttcatcaaggcggggctgggggcctgggtggagaagccac
 cgagcaggaccagtctcactcagTAAGcggccgctcagctagagggccgtttaaaccgctgatcagcctcgagaattcCC
 CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT
 GGAATTTTTTGTGTCTCTCAggtaccgagggcctatttccatgattcctcatattgcatatac gatacaaggctgtag
 agagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtgaaagtaataatttctgggtagttgcagttt
 taaaattatgttttaaatggactatcatatgcttaccglaactgaaaglatctgalltcttggctttatatacttgggaaaggacgaaacac
 cGGAAGATAACTCTACAAACCTGTAGGGTTCTGAGACtgcggttcttctgcttgcggcatgatataga

cgftgtggctggttagttgtactccagcttgcccTTTTTgcggccgcaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctg
cgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaagtcgcccagcggcggcttggccggcggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagctgctgcagggcgccgatgcggtatcttcttcttacgcatctgtcgggtatctcacaccgcatacgtcaaagcaacatag
tacgcgccctgtagcggcgcaatgaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttggcagcgcccttagcggccg
ctcctttcgctttcttcccttcttcttctgcccacgttcgcccggcttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagggftccgatttagt
ctttacggcaccctgacccccaaaaaacttgatfagggtgatggttacgtagtgggccatcgcctgatagacggfitttcgccctttgacgt
tggagtccacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaactcaactctatctcgggctattctttgattataagggattttgcc
gatttcggctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaatataacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaatttatggtgactctc
agtacaatctgctctgatgccgatagtaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttctgctgctccc
ggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaa
agggectcgtgatacgcctatctttataggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgagg
aaccctatfittgttttttctaaatacattcaaaatgtafccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaa
gagtatgagtattcaacattccgtgctgcccctattccctttttgaggcattttgcttctctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagta
aaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgcatcacaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaa
gaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtatfalcctgattgacgccgggcaagagcaactcggctgccc
catacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
ctgccataaccatgagtataactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacat
gggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgta
gcaatggcaacaacgttgcgcaactatfaactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggata
aagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtat
cattgcagcactggggccagatggttaagccctcccglatcglatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaata
gacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgattaaaacttcatt
tttaattfaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagacccc
gtagaaaagatcaaaggatctcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgtcgttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcggtggtt
tgtttggcggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagttagccg
tagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataa
gtcgtgcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagccc
agcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcaccgctcccgaaggagaaaggcg
gacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaacgcctggtatctttatagctct
gtcgggttccaccctctgactgagcgtcgaftttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggc
cttttacggttcctggccttttctggccttttctcacatgt

SEQ ID NO: 101 (单碱基编辑实验中的 pAAV-CMV-EGFP 载体序列) :

cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgaggccgccggcgctggcgacctttggcgcgccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggttcctgcggcctctagactcgaggcgttgacattgattattgacta
gttattaatagtaataaattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataactacggtaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgcccaattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtg
gagtatttacggtaaaactgcccaactggcagtaacaaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
cgectggcattatgccagtaacatgaccttatgggactttcacttggcagtaacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatggg
ttttggcagtaacaaatggcggtgatagcgggttgactcacggggattccaagtctccaccccaattgacgtcaatgggagttgtttgg
caccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaaacactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctctctggtaactaccgggtgccaccatggtagcaaggcgaggagctgtcaccgggggtgggtgccatcctggctg
agctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaag
ttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgacgtgcttcagccgctacc
cgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtccgcatgcccgaaggtacgtccaggagcgaccatcttctcaaggacgacggc
aactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggcgacacctgggaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaaggagga
cggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaa
gggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacg
gccccgtgctgctgccgacaaccactacctgagcaccagtcgccctgagcaaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggctc
tgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcggccgaattcctagagctcgtgatca
gcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgttttgccttccccctgccttctgacctggaaggtgccactcccactgtcctt
cctaataaaatgaggaaattgcatcgcaattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggggag
gattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtaccgagggcctatttccatgattcctcatattgcatatacagatacaaggctgtt
agagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagttgag
tttaaaatattgtttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagttttcgatttctggccttatatctgtggaaaggacgaaac
accggagaccacggcaggtctcagtttagtactctggaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgtgtttatctcgtcaactgtt
ggcgagattttgcggccgaggaacccctagtgtgagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcactgaggccggcgac
caaaggtcggcgacgcccgggctttgcccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagggggcctgatgcg
gtattttctccttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgcacctgtagcggcgcaftaagcggcg
gggtgtgggtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgccctagcggcctccttctgcttcttcccttcttctcgcacgtt
cgccggctttccccgtaagcttcaaatcgggggtccctttagggttccgatttagtgccttacggcaccctgacccccaaaaaacttgatt
gggtgatggttcacgtagtgggccatgccctgatagacggttttcgcctttgacgttgagtcacgttcttfaatagtgactctgttc

caaactggaacaacactcaacctatctcgggctattctttgattataaggatttggcatttcggcctattggtaaaaaatgagctgat
 ttaacaaaaatthaacgcgaatttaacaaaatattaacgtttacaattttatggcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaag
 ccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttctctgcccccgcacccgcttacagacaagcttgaccgtc
 tccgggagctgcatgtgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatftttataggtta
 atgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatftgttttttctaaatacattcaa
 atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatftgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatftccgtgtgcacct
 tattcccttttttgcggcattttgccttctctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacga
 gtgggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagtt
 ctgctatgtggcgcgggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagta
 ctcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctgagtgataaactgcggc
 caactactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgg
 gaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaa
 ctggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccct
 tccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagcc
 ctcccgtatcgtagtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgatt
 aagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcttttaatttaaaggatctaggtgaagatcctttt
 gataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgatcct
 tttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttc
 cgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagc
 accgcctacatacctcgtctgtaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgat
 agttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtctgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactg
 agatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcgg
 aacaggagagcgcacgaggagcttcagggggaaacgctggtatctttatagctctgctcgggttccaccctctgacttgagcgtcg
 atftttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacggcagcaacggcggcctttttacggctcctggccttttctggccttttgc
 tcacatgt

SEQ ID NO: 102 (单碱基编辑实验中的 PLKO-PURO-PspGRNA-EGFP 载体序列) :

ttgggggtgcgcctttccaaggcagccctgggttgcgcagggacgcggctgctctgggcgtggttccgggaaacgcagcggc
 gccgacctgggtctcgcacattcttacgtccttgcagcgtcaccggatcttcccgctaccttggggcccccggcagcgtt
 cctgctccgccctaaagtcgggaaggttcttgcgggtcggcggctgccggacgtgacaaacgggaagccgcacgtctcactagtacct
 cgcagacggacagcggcgggagcaatggcagcgcggcaccgcgatgggctgtggccaatagcggctgctcagcagggcgcgc

aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgftgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccg
gcaacaattaatagactggatggagggcgataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgctgataaa
tctggagccggtagcgtgggtctcgcgglatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacg
gggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtt
tactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaa
cgtgagtttctgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactgtctgcttga
aacaacccaccgctaccagcgggtggtttgctgggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcg
cagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaac
ctgttaccagtggtgctgctgccagtggcgataagtcgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctg
ggctgaacggggggtctgtcacacagcccagctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaa
agcggccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgaggagctt
ccaggggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgtttttgtgatgctcgtcagggggg
gagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctcctggccttttctgctcactatgttcttctgcttaccctg
attctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataaccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagtgtagtgagc
gaagcgggaagagcggccaatacgcacaaccgctctccccgcgctggccgattcaatgacagctggcagcagaggttcccgact
ggaaagcgggagcgtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattagccacccaggtttacactttatgcttccggctcgtat
gttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgccaagcgcgcaattaaccctactaaagg
gaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtctttagcaactctttagtcttgaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttac
aaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaagggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgac
atggattggacgaaccactgaattgccgactgacagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttagacca
gatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtctcaagtagtgtgtgcc
gtctgttgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaaatctctagcagtgggcggccgaacagggactga
aagcgaagggaaccagaggagctctctcagcgcaggactcggcttctgtaagcgcgcacggcaagaggcgagggggcggcgact
ggtaglacgcaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagatgggtgcgagagcgtcaglatfaagcgggggagaattag
atcgcgatgggaaaaaattcggtaaggccaggggggaaagaaaaatafaaattaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaa
cgattegcagttaatcctggcctgttagaacaatcagaaggctgtagacaataactgggacagctacaaccatecctcagacaggatca
gaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctallgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagaca
agatagaggaaagagcaaaaacaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggaggagatagaggga
caattggagaagtgaattatataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgca
gagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttcttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggggcgcagcgtcaatgacg
ctgacggtacaggccagacaattattgtctgtatagtcagcagcagaacaatttctgagggtattgaggcgcaacagcatctgttc

aactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgg
ggttgctctggaaaactcattgcaccactgctgtgccttggatgctagtggagtaataaatctctggaacagatttggatcacacgacc
tggatggagtgggacagagaaftaacaattacacaagcftaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaa
caagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattggftaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagta
ggaggcttggtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacct
cccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtg
aacggatctcgacggatcgcacgagactagcctcgagcggccgccccctcaccgagggcctatttccatgattccttcatattgc
atatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaat
aatttctgggtagttgcagtttaaaattatgfttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatac
ttgtgaaaggacgaaacACCTgcccgttcttctgcttgcggccatgatatagacgttggctgtttagttgtactccagcttgcgccg
ttgtggaaggtccagttttgaggggctattacaacTTTTTTGAATTCtcgacctcgagacaaatggcagttatccacaatttta
aaagaaaaggggggattggggggtacagtcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaa
aaciaaattacaaaattcaaaatttctgggtttattacagggacagcagagatccactttggccgcggtcagggggg

SEQ ID NO: 103 (单碱基编辑实验中的鉴定引物序列) :

agggcgaggagctgtt (SEQ ID NO: 103) ,

SEQ ID NO: 104 (单碱基编辑实验中的鉴定引物序列) :

gtacagctcgtccatgccg (SEQ ID NO: 104) 。

权利要求

1. 一种 Cas13 蛋白，其特征在于，其氨基酸序列具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 90% 的序列同一性。

2. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白能够与指导多核苷酸形成 CRISPR 复合物，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

3. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白在催化结构域中包含一个或多个突变并且具有降低的 RNA 切割活性。

4. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白在一个或两个 HEPN 结构域中包含一个或多个突变并且基本上缺乏 RNA 切割活性。

5. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，其具有与 SEQ ID NO: 1 相比至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性。

6. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白在与氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的氨基酸残基 40-91 位、146-153 位、158-176 位、182-209 位、216-253 位、271-287 位、341-353 位、379-424 位、456-477 位、521-557 位、575-588 位、609-625 位、700-721 位、724-783 位、796-815 位、828-852 位或 880-893 位的对应位置包含至少一个突变；和/或，

所述 Cas13 蛋白在与氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变：R11、N34、R35、R47、R58、R63、R64、N68、N87、N265、N274、R276、R290、R294、N299、N303、R308、R314、R320、R328、N332、R341、N346、R358、N372、N383、N390、N394、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、R308+N68、N394+N68、N87+N68、R308+N265、N394+N265、N87+N265、R308+N68+N265、N87+N68+N265、T7、A16、S260、A263、M266、N274、F288、M302、N303、L304、V305、I311、D313、H324、P326、H327、N332、N346、T353、T360、E365、A373、M380、S382、K395、Y396、D402、D411 和 S418；

较佳地，所述突变为 R11A、N34A、R35A、R47A、R58A、R63A、R64A、N68A、N87A、N265A、N274A、R276A、R290A、R294A、N299A、N303A、R308A、R314A、R320A、R328A、N332A、R341A、N346A、R358A、N372A、N383A、N390A、N394A、R47A+R290A、R47A+R314A、R290A+R314A、R47A+R290A+R314A、R308A+N68A、N394A+N68A、N87A+N68A、R308A+N265A、N394A+N265A、N87A+N265A、R308A+N68A+N265A、N87A+N68A+N265A、T7S、A16S、S260E、A263K、M266I、N274K、F288Y、M302F、N303S、L304I、V305K、I311M、D313E、H324Y、P326S、H327V、

N332Y、N346D、T353L、T360S、E365D、A373E、M380K、S382R、K395G、Y396D、D402L、D411E 和 S418K。

7. 根据权利要求 1 所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白在与氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的参比蛋白的以下氨基酸残基的对应位置包含任意一种或更多种突变：N34、R64、N68、N265、R276、R294、N299、R314、R47+R290、R47+R314、R290+R314、R47+R290+R314、N394+N265、N87+N265、A263、M266、N274、F288、V305、I311、D313、H324、T360、E365、A373、M380、D402 和 D411；

较佳地，所述突变为 N34A、R64A、N68A、N265A、R276A、R294A、N299A、R314A、R47A+R290A、R47A+R314A、R290A+R314A、R47A+R290A+R314A、N394A+N265A、N87A+N265A、A263K、M266I、N274K、F288Y、V305K、I311M、D313E、H324Y、T360S、E365D、A373E、M380K、D402L 和 D411E。

8. 根据权利要求 1~7 任一项所述的 Cas13 蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白来自包含与 CNGB 数据库（中国国家基因库）中编号为 CNA0009596 所示基因组的平均核苷酸同一性（ANI）≥95%的基因组的物种（species）。

9. 一种融合蛋白，其特征在于，其包含融合至蛋白结构域和/或多肽标签的根据权利要求 1~8 任一项所述的 Cas13 蛋白或其功能片段；可选的，融合后不改变所述的 Cas13 蛋白和/或功能片段的原有功能。

10. 根据权利要求 9 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与核定位信号(NLS)融合。

11. 根据权利要求 9 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与核输出信号(NES)融合。

12. 根据权利要求 9 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白或其功能片段与蛋白结构域共价连接。

13. 根据权利要求 9 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 Cas13 蛋白或其功能片段融合至选自以下的任意一种或更多种蛋白结构域和/或多肽标签：胞嘧啶脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域、翻译激活结构域、翻译抑制结构域、RNA 甲基化结构域、RNA 去甲基化结构域、核酸酶结构域、剪接因子结构域、报告域、亲和域、亚细胞定位信号、报告标签和亲和标签。

14. 根据权利要求 9~13 任一项所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的结构为 NLS-Cas13 蛋白-SV40 NLS-nucleoplasmin NLS。

15. 一种指导多核苷酸，其特征在于，其包含(i)与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项具有至少 50%的序列同一性的同向重复序列，该同向重复序列连接至(ii)工

程化以与靶 RNA 杂交的指导序列,所述指导多核苷酸能够与 Cas13 蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物与所述靶 RNA 的序列特异性结合;优选地,所述 Cas13 蛋白为 Cas13a、Cas13b、Cas13c 或 Cas13d;更优选地,所述 Cas13 蛋白具有与如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列相比至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

可选地,所述同向重复序列在对应于 SEQ ID NO: 3 的第 26 位碱基为 A;

可选地,所述同向重复序列为 GGAAGATN₁ACTCTACAAACCTGTAGN₂GN₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁;其中,N₁和 N₃-N₁₁任选自 A、C、G、T;N₂任选自 A 和 G;

进一步可选地,所述同向重复序列为 GGAAGATN₁₂ACTCTACAAACCTGTAGN₁₃GN₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁N₂₂;其中,N₁₂、N₁₃、N₁₉和 N₂₁任选自 A 和 G,N₁₄任选自 A 和 T,N₁₅和 N₁₆任选自 C 和 T,N₁₇和 N₁₈任选自 G 和 T,N₂₀和 N₂₂任选自 C 和 G。

16. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3、81、82、84 和 87 中任一项相比具有至少 80%、至少 90%或至少 95%的序列同一性。

17. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述指导序列位于所述同向重复序列的 3'端。

18. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述指导序列包含 15-35 个核苷酸。

19. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述指导序列与所述靶 RNA 杂交,错配不超过一个核苷酸。

20. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述同向重复序列包含 25 至 40 个核苷酸。

21. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述指导多核苷酸进一步包含适体序列。

22. 根据权利要求 21 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述适体序列被插入到所述指导多核苷酸的环(loop)中。

23. 根据权利要求 21 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述适体序列包括 MS2 适体序列、PP7 适体序列或 Q β 适体序列。

24. 根据权利要求 15 所述的指导多核苷酸,其特征在于,所述指导多核苷酸包含修饰的核苷酸。

25. 根据权利要求 24 所述的指导多核苷酸, 其特征在于, 所述修饰包含 2'-O-甲基、2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯或 2'-O-甲基-3'-硫代 PACE 修饰。

26. 根据权利要求 15~25 任一项所述的指导多核苷酸, 其特征在于, 所述靶 RNA 位于真核细胞的细胞核中。

27. 根据权利要求 15~26 任一项所述的指导多核苷酸, 其特征在于, 所述靶 RNA 任选自 TTR RNA、SOD1 RNA、PCSK9 RNA、VEGFA RNA、VEGFR1 RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA; 优选地, 所述靶 RNA 任选自 PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。

28. 根据权利要求 27 所述的指导多核苷酸, 其特征在于, 所述指导序列任选自如 SEQ ID NO: 5-6、SEQ ID NO: 42-49 所示序列; 优选地, 所述指导序列任选自如 SEQ ID NO: 5-6、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45-47 所示序列。

29. 一种 CRISPR-Cas13 系统, 其特征在于, 其包含:

如权利要求 1~8 任一项所述的 Cas13 蛋白或如权利要求 9~14 任一项所述的融合蛋白, 或编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的核酸; 以及

指导多核苷酸或编码所述指导多核苷酸的核酸; 所述指导多核苷酸包含连接至指导序列的同向重复序列, 所述指导序列被工程化以与靶 RNA 杂交;

所述指导多核苷酸能够与所述 Cas13 蛋白或融合蛋白形成 CRISPR 复合物并指导所述 CRISPR 复合物与靶 RNA 的序列特异性结合。

30. 根据权利要求 29 所述的 CRISPR-Cas13 系统, 其特征在于, 所述靶 RNA 任选自 TTR RNA、SOD1 RNA、PCSK9 RNA、VEGFA RNA、VEGFR1 RNA、PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA; 可选地, 所述靶 RNA 任选自 PTBP1 RNA、AQp1 RNA 或 ANGPTL3 RNA。

31. 根据权利要求 30 所述的 CRISPR-Cas13 系统, 其特征在于, 所述指导序列任选自如 SEQ ID NO: 5-6、SEQ ID NO: 42-49 所示序列; 优选地, 所述指导序列任选自如 SEQ ID NO: 5-6、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45-47 所示序列。

32. 根据权利要求 29~31 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统, 其特征在于, 所述同向重复序列与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 80-87 中任一项相比具有至少 70% 的序列同一性。

33. 一种 CRISPR-Cas13 系统, 其特征在于, 其包含权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸或编码其的核酸, 以及 Cas13 蛋白或编码其的核酸。

34. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的载体系统, 其中, 所述载体系统包含一个或多个载体, 所述载体包含编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白

的多核苷酸序列和编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列。

35. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的腺相关病毒载体，其中，所述腺相关病毒载体包含编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白和指导多核苷酸的 DNA。

36. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的脂质纳米粒，其中，所述脂质纳米粒包含所述的指导多核苷酸和编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA。

37. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的慢病毒载体，其中，所述慢病毒载体包含所述指导多核苷酸和编码所述 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA；优选地，所述慢病毒载体是用包膜蛋白假型化的；可选地，所述编码 Cas13 蛋白或融合蛋白的 mRNA 与适体序列连接。

38. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的核糖核蛋白复合物，其中，所述核糖核蛋白复合物由所述指导多核苷酸和 Cas13 蛋白或融合蛋白形成。

39. 一种包含如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的病毒样颗粒，其中，所述病毒样颗粒包含由所述指导多核苷酸和 Cas13 蛋白或融合蛋白形成的核糖核蛋白复合物；可选地，所述 Cas13 蛋白或融合蛋白与 gag 蛋白融合。

40. 一种包含如权利要求 1~8 任一项所述的 Cas13 蛋白、如权利要求 9~14 任一项所述的融合蛋白、如权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、或者如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统的真核细胞；可选地，所述真核细胞是哺乳动物细胞。

41. 一种药物组合物，其特征在于，其包含如权利要求 1~8 任一项所述的 Cas13 蛋白、如权利要求 9~14 任一项所述的融合蛋白、如权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、或者如权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统。

42. 一种体外组合物，其特征在于，其包含如权利要求 29~32 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统，以及不能与所述指导多核苷酸杂交的标记的 detector RNA。

43. 一种分离的核酸，其特征在于，其编码根据权利要求 1~8 任一项所述的 Cas13 蛋白或权利要求 9~14 任一项所述的融合蛋白。

44. 一种分离的核酸，其特征在于，其编码根据权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸。

45. 一种根据权利要求 1~8 中任一项所述的 Cas13 蛋白、权利要求 9~14 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、权利要求 29~33 中任一

项所述的 CRISPR-Cas13 系统或权利要求 42 或权利要求 43 所述的分离的核酸在检测疑似包含靶 RNA 的核酸样品中的靶 RNA 或制备检测疑似包含靶 RNA 的核酸样品中的靶 RNA 的试剂中的用途。

46. 一种根据权利要求 1~8 中任一项所述的 Cas13 蛋白、权利要求 9~14 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统或权利要求 42 或权利要求 43 所述的分离的核酸在以下任一项或制备实现以下任一项方案的试剂中的用途：切割一种或多种靶 RNA 分子或使一种或多种靶 RNA 分子产生切口（nicking），激活或上调一种或多种靶 RNA 分子，激活或抑制一种或多种靶 RNA 分子的翻译，使一种或多种靶 RNA 分子失活，可视化、标记或检测一种或多种靶 RNA 分子，结合一种或多种靶 RNA 分子，运输一种或多种靶 RNA 分子，以及掩蔽一种或多种靶 RNA 分子。

47. 一种诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的方法，其特征在于，向有需要的受试者的样品或向有需要的受试者施用根据权利要求 1~8 中任一项所述的 Cas13 蛋白、权利要求 9~14 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统或权利要求 42 或权利要求 43 所述的分离的核酸。

48. 一种如根据权利要求 1~8 中任一项所述的 Cas13 蛋白、权利要求 9~14 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 15~28 中任一项所述的指导多核苷酸、权利要求 29~33 中任一项所述的 CRISPR-Cas13 系统或权利要求 42 或权利要求 43 所述的分离的核酸在制备用于诊断、治疗或预防与靶 RNA 相关的疾病或病症的药物中的用途。



图 1

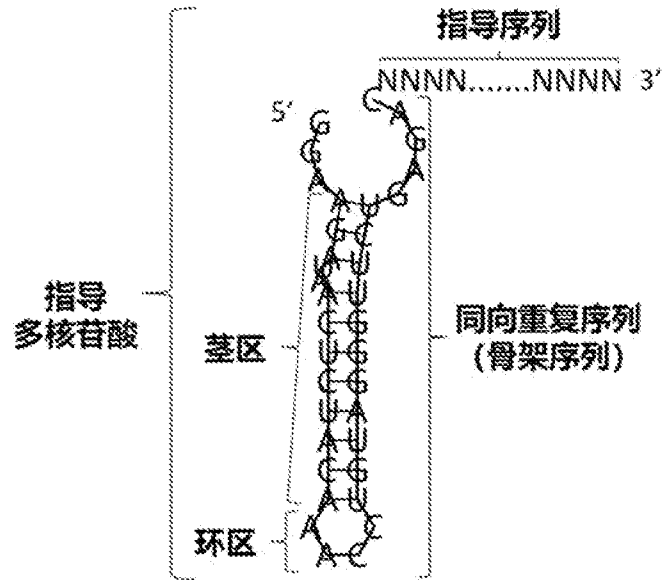


图 2

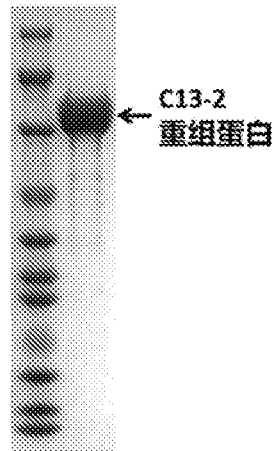


图 3

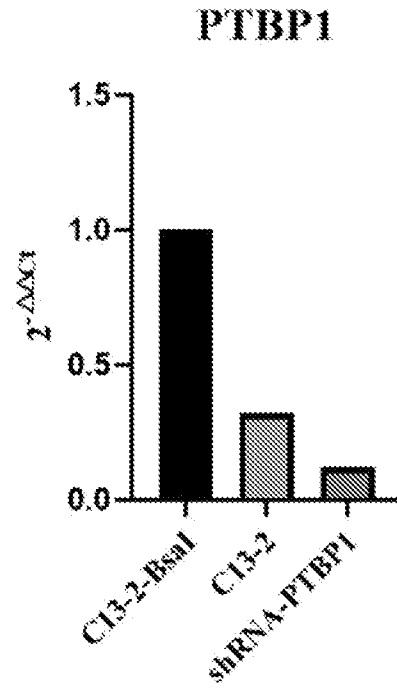


图 4

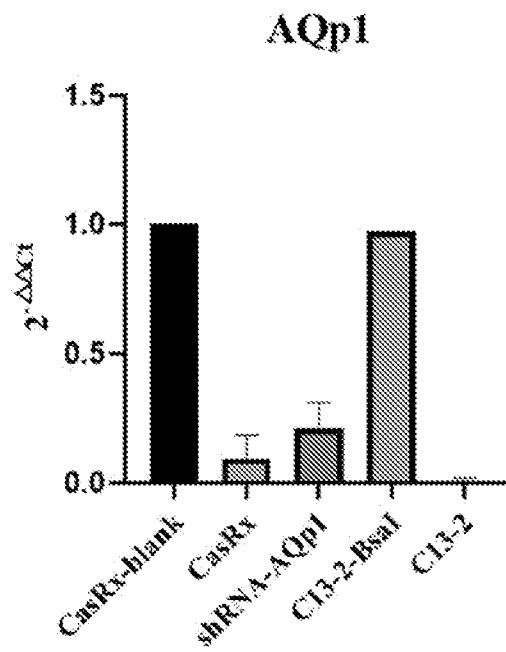


图 5

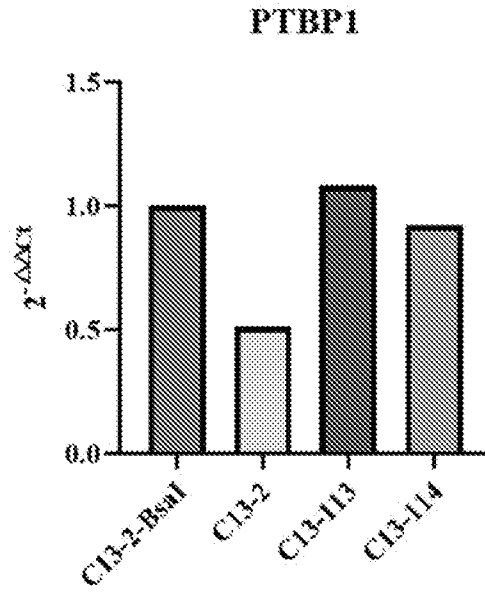


图 6

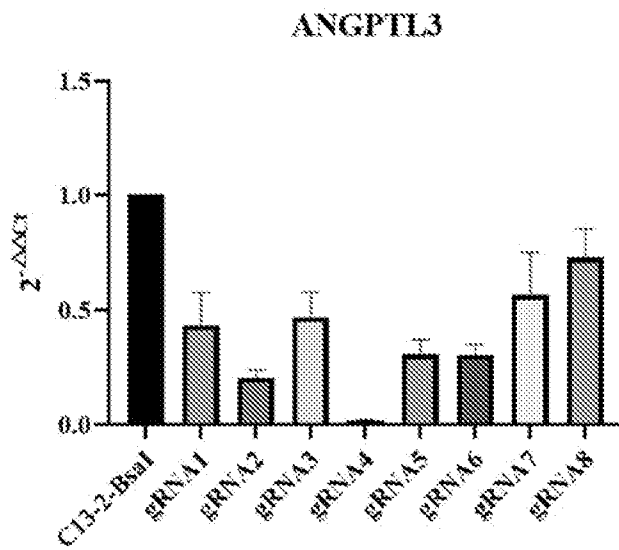


图 7

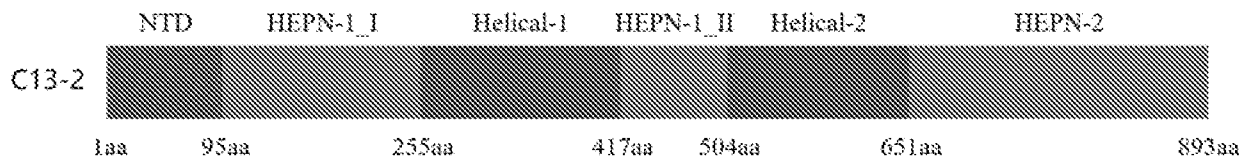


图 8

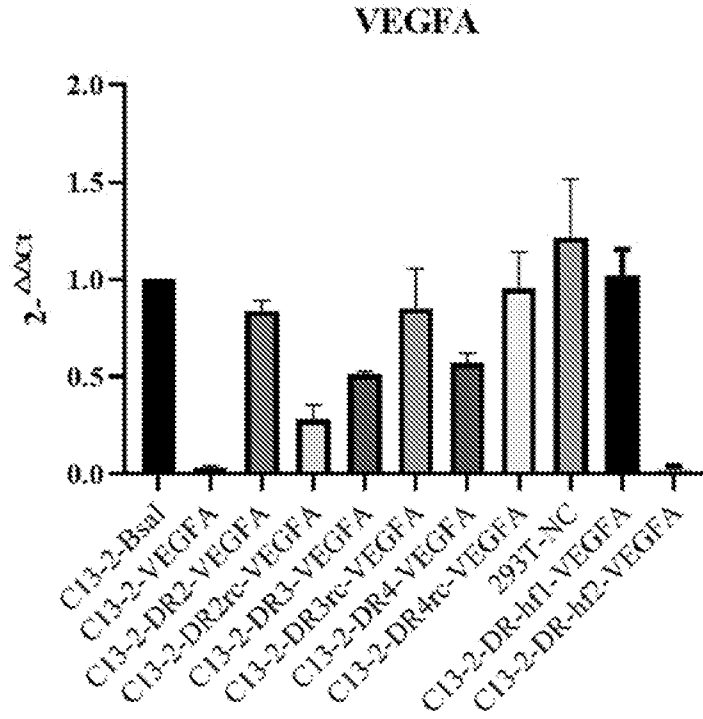


图 9

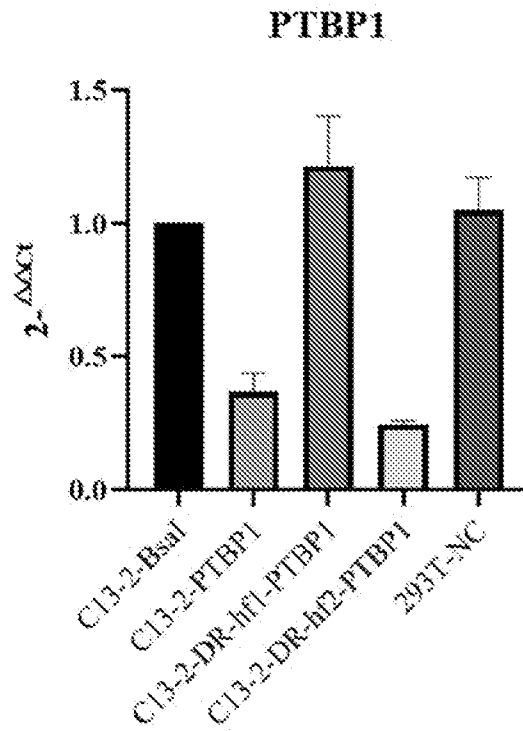


图 10

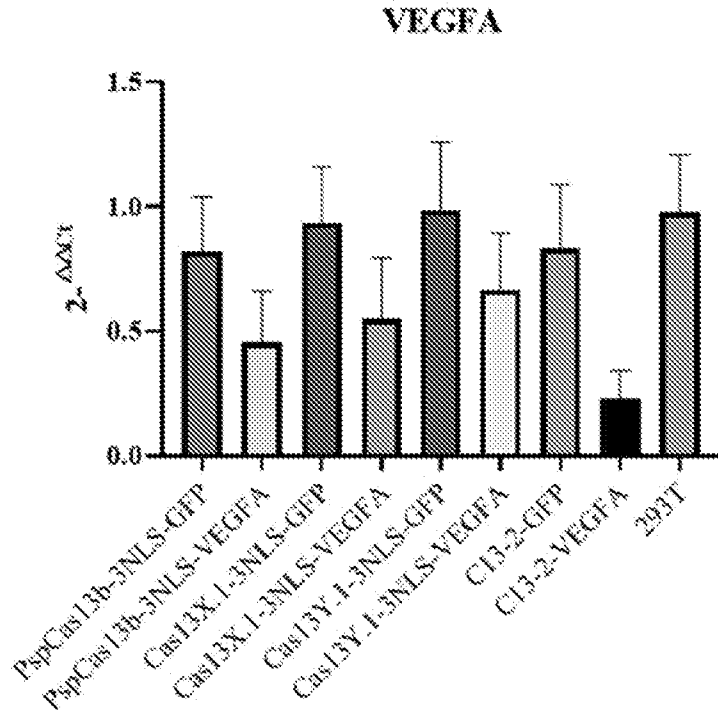


图 11

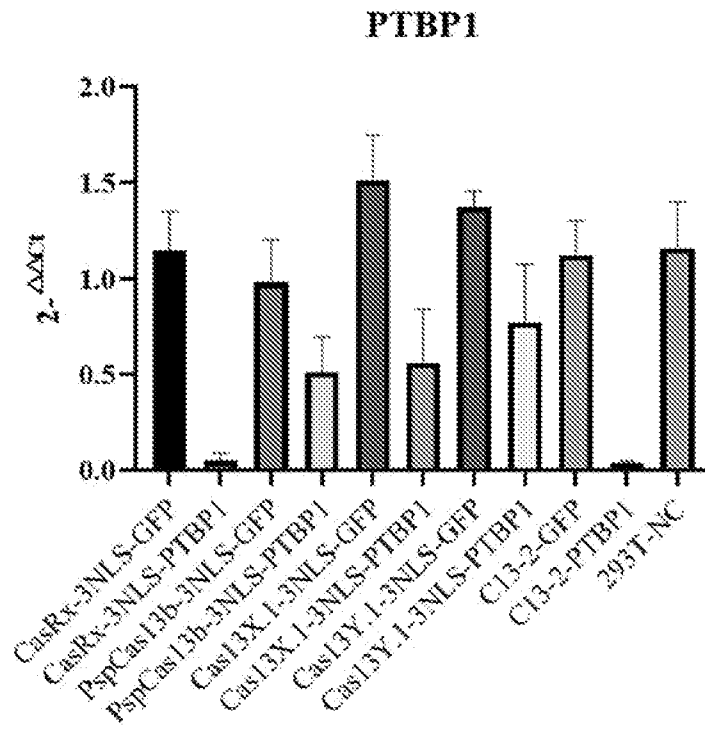


图 12

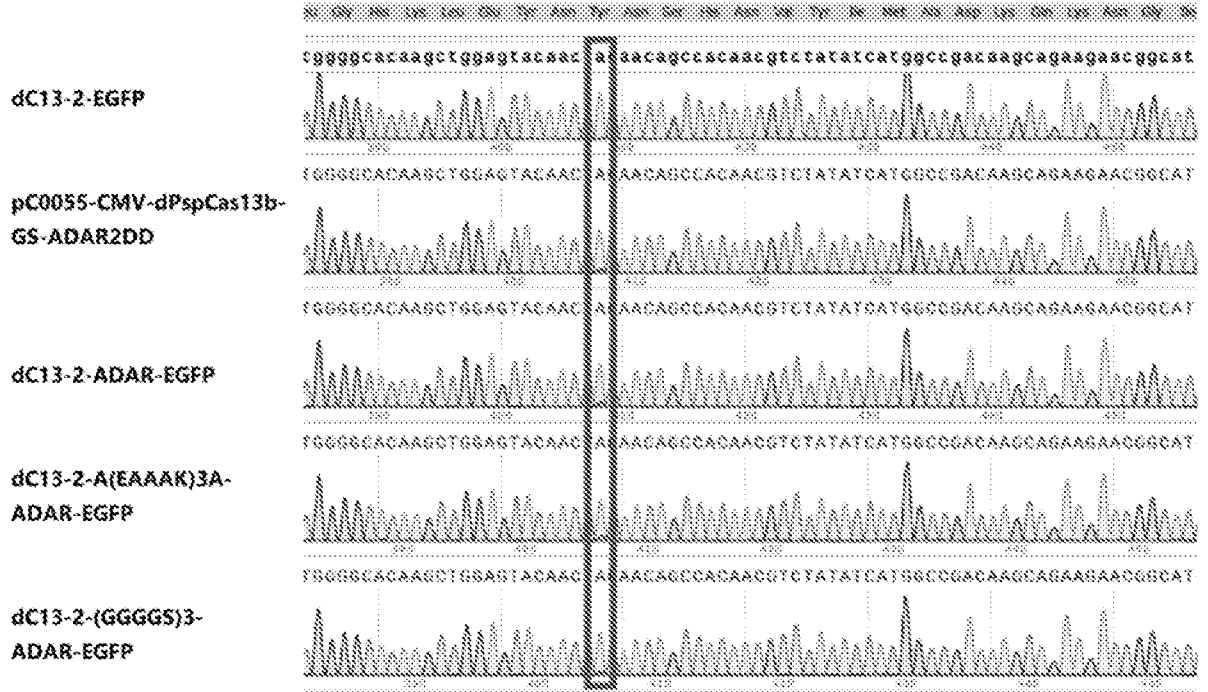


图 13

VEGFA

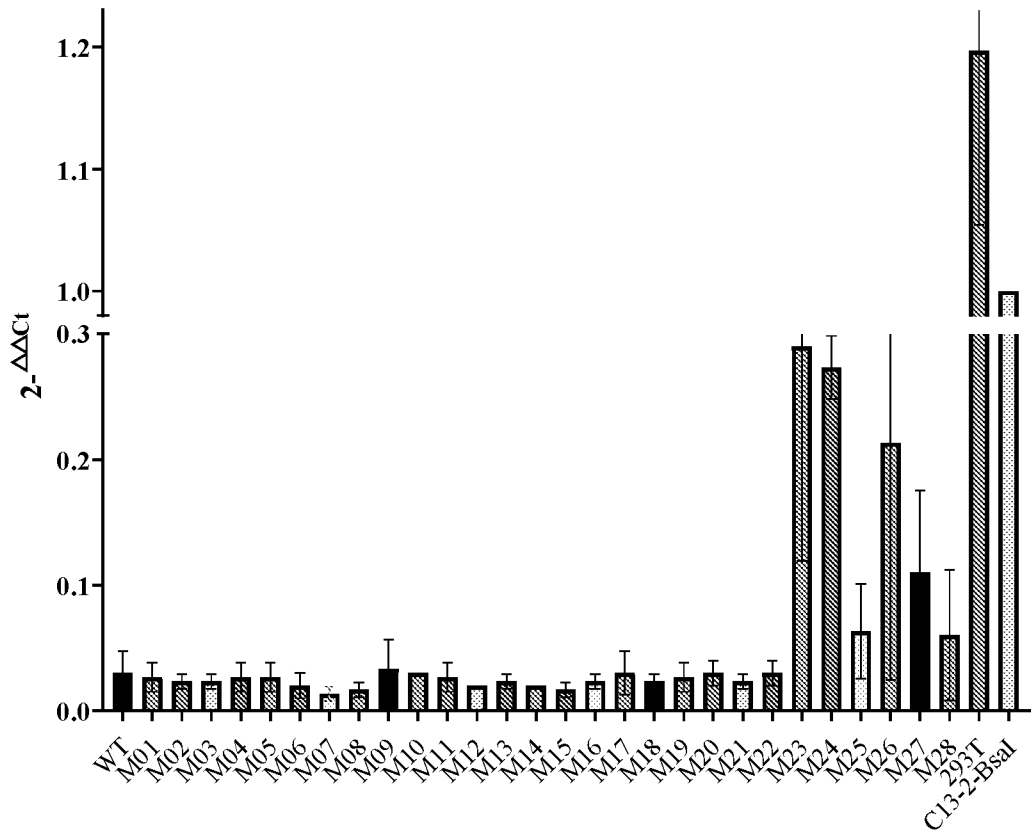


图 14

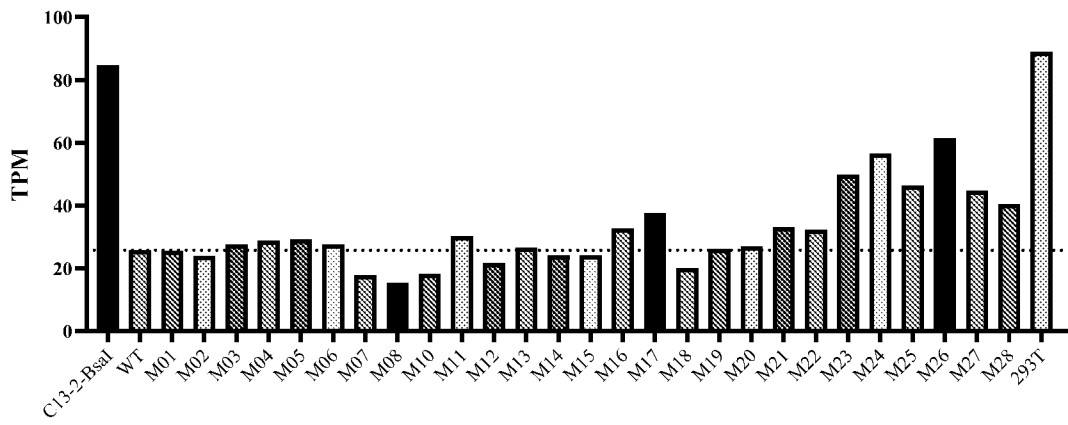


图 15

AR

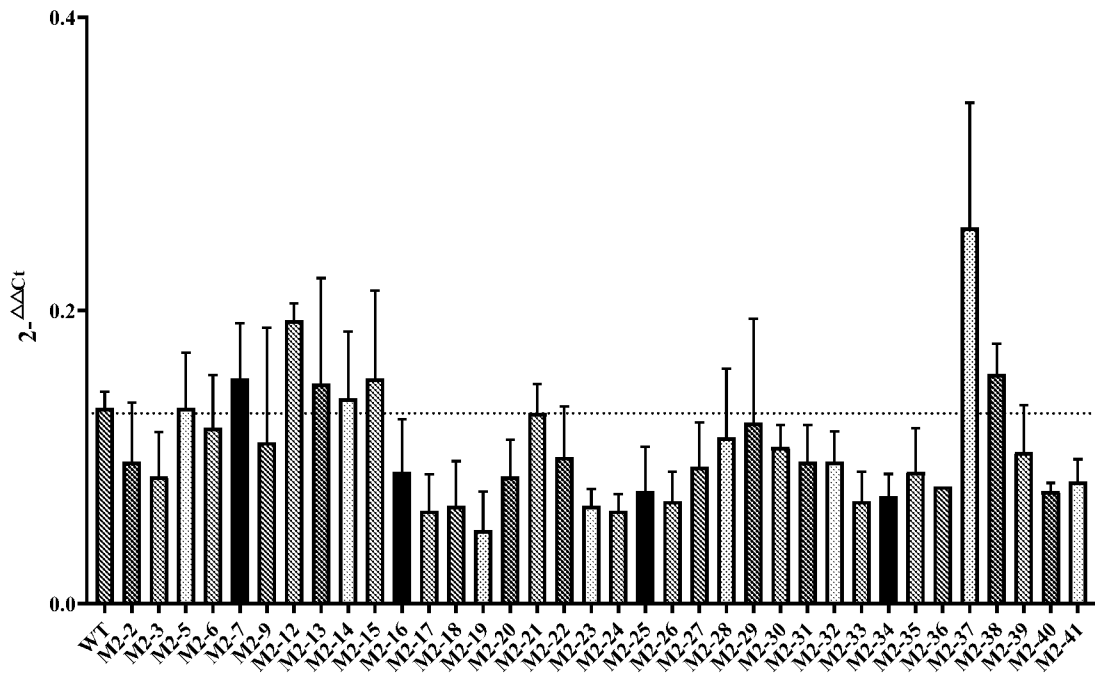


图 16

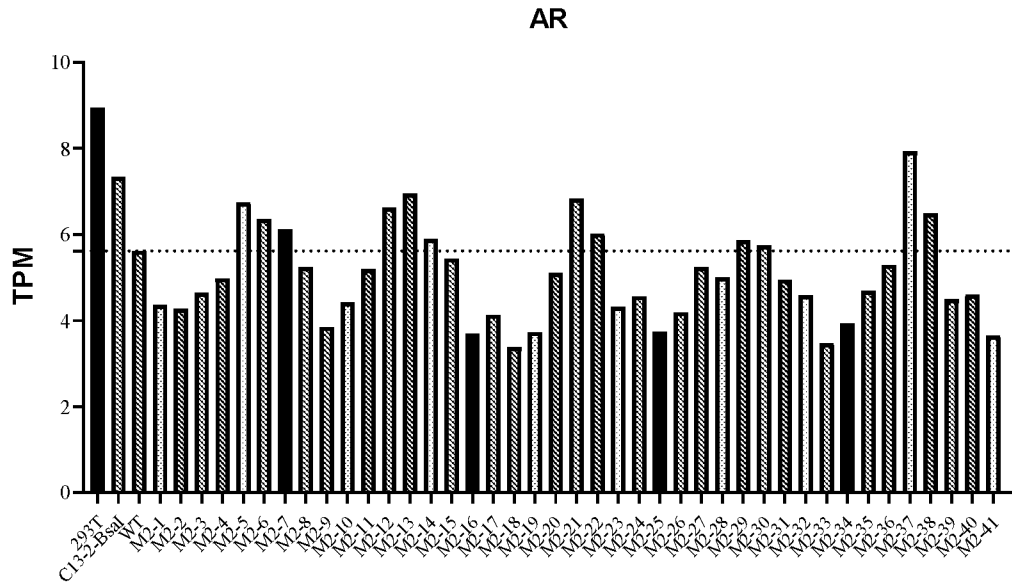


图 17

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511)

```

DRrc      ggaagataactctacaaacctgtagggttctgagac
DR-hf2    ggaagataactctacaaacctgtagagttctgagac
DR2rc     ggaagatgactctacaaacctgtagggactgtgagg
*****_*****_*****_* .. .
    
```

图 18

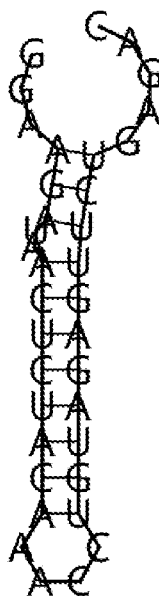


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/115093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N9/22(2006.01)i; C12N15/55(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, 百度学术, Baidu Scholar, HimmPat, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, CRISPR, 规律间隔成簇短回文重复序列, Cas13, gRNA, sgRNA, 向导RNA, 指导RNA, 同向重复序列, 骨架序列, direct repeat, scaffold sequence, 序列1-280, sequences 1-280		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 28 February 2019 (2019-02-28) description, paragraphs 8-21	1-48
A	CN 113234702 A (ZHUHAI SHUTONG MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 August 2021 (2021-08-10) claims 1-10	1-48
A	CN 113544267 A (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 22 October 2021 (2021-10-22) claims 1-30	1-48
A	WO 2020160150 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 06 August 2020 (2020-08-06) claims 1-56	1-48
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 06 December 2023		Date of mailing of the international search report 13 December 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIE, F. "MAG: Type VI-D CRISPR-associated RNA-guided Ribonuclease Cas13d [Thermoguttaceae Bacterium], Accession number MBR0191107.1" <i>NCBI_GenBank</i> , 21 April 2021 (2021-04-21), FEATURES, ORIGIN	1-48
A	叶阳苗 (YE, Yangmiao). "CRISPR系统-Cas13d效应蛋白的结构生物学研究 (Structural Insights into CRISPR-Cas13d Effector)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑 (Chinese Master's Dissertations Full-text Database, Basic Sciences)</i> , No. no. 12, 15 December 2021 (2021-12-15), article number: A006-286 abstract	1-48
A	GUPTA, R. et al. "Cas13d: A New Molecular Scissor for Transcriptome Engineering" <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i> , Vol. vol. 10, 31 March 2022 (2022-03-31), article number: 866800 abstract	1-48

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **47 (in part)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 47 (in part) relates to a method for treating a disease, which falls within technical solutions for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv). However, a search is conducted on the basis that the above-mentioned subject matter is amended to be a corresponding pharmaceutical use.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/115093

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019062724	A1	28 February 2019	CA	3072610	A1	28 February 2019
				US	2021344629	A1	04 November 2021
				US	11303593	B2	12 April 2022
				US	2021344630	A1	04 November 2021
				US	11303594	B2	12 April 2022
				US	2019207890	A1	04 July 2019
				US	2020127954	A9	23 April 2020
				US	10666592	B2	26 May 2020
				US	2020244609	A1	30 July 2020
				US	10931613	B2	23 February 2021
				US	2021344628	A1	04 November 2021
				US	11303592	B2	12 April 2022
				US	10476825	B2	12 November 2019
				WO	2019040664	A1	28 February 2019
				US	2022239615	A1	28 July 2022
				US	11706177	B2	18 July 2023
				US	2021344627	A1	04 November 2021
				US	11316812	B2	26 April 2022
				AU	2018320870	A1	27 February 2020
				US	2020322297	A1	08 October 2020
				US	11032225	B2	08 June 2021
				JP	2020532968	A	19 November 2020
				SG	11202001208	XA	30 March 2020
				US	2020351232	A1	05 November 2020
				US	11025574	B2	01 June 2021
				US	2021344626	A1	04 November 2021
				US	11310179	B2	19 April 2022
				JP	2023153907	A	18 October 2023
				US	2021344631	A1	04 November 2021
				US	11310180	B2	19 April 2022
				US	2020252359	A1	06 August 2020
				US	11005799	B2	11 May 2021
				US	2019169595	A1	06 June 2019
				US	11228547	B2	18 January 2022
				EP	3673055	A1	01 July 2020
				EP	3673055	A4	11 August 2021
				US	2023328020	A1	12 October 2023
				US	2020351231	A1	05 November 2020
				US	11032224	B2	08 June 2021

CN	113234702	A	10 August 2021	None			

CN	113544267	A	22 October 2021	CA	3126481	A1	23 July 2020
				US	2022090088	A1	24 March 2022
				WO	2020150287	A1	23 July 2020
				KR	20210126014	A	19 October 2021
				MX	2021008487	A	12 November 2021
				AU	2020208346	A1	29 July 2021
				JP	2022523632	A	26 April 2022
				EP	3911741	A1	24 November 2021

WO	2020160150	A1	06 August 2020	US	2022145297	A1	12 May 2022

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N9/22(2006.01)i; C12N15/55(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTEXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, 百度学术, HimPat, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, CRISPR, 规律间隔成簇短回文重复序列, Cas13, gRNA, sgRNA, 向导RNA, 指导RNA, 同向重复序列, 骨架序列, direct repeat, scaffold sequence, 序列1-280</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2019062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28) 说明书第8-21段</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113234702 A (珠海舒桐医疗科技有限公司) 2021年8月10日 (2021 - 08 - 10) 权利要求1-10</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113544267 A (罗切斯特大学) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 权利要求1-30</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020160150 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA等) 2020年8月6日 (2020 - 08 - 06) 权利要求1-56</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>XIE, F. "MAG: type VI-D CRISPR-associated RNA-guided ribonuclease Cas13d [Thermoguttaceae bacterium], 登录号MBR0191107.1" NCBI_GENBANK, 2021年4月21日 (2021 - 04 - 21), FEATURES, ORIGIN</td> <td>1-48</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	US 2019062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28) 说明书第8-21段	1-48	A	CN 113234702 A (珠海舒桐医疗科技有限公司) 2021年8月10日 (2021 - 08 - 10) 权利要求1-10	1-48	A	CN 113544267 A (罗切斯特大学) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 权利要求1-30	1-48	A	WO 2020160150 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA等) 2020年8月6日 (2020 - 08 - 06) 权利要求1-56	1-48	A	XIE, F. "MAG: type VI-D CRISPR-associated RNA-guided ribonuclease Cas13d [Thermoguttaceae bacterium], 登录号MBR0191107.1" NCBI_GENBANK, 2021年4月21日 (2021 - 04 - 21), FEATURES, ORIGIN	1-48
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	US 2019062724 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 2019年2月28日 (2019 - 02 - 28) 说明书第8-21段	1-48																		
A	CN 113234702 A (珠海舒桐医疗科技有限公司) 2021年8月10日 (2021 - 08 - 10) 权利要求1-10	1-48																		
A	CN 113544267 A (罗切斯特大学) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 权利要求1-30	1-48																		
A	WO 2020160150 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA等) 2020年8月6日 (2020 - 08 - 06) 权利要求1-56	1-48																		
A	XIE, F. "MAG: type VI-D CRISPR-associated RNA-guided ribonuclease Cas13d [Thermoguttaceae bacterium], 登录号MBR0191107.1" NCBI_GENBANK, 2021年4月21日 (2021 - 04 - 21), FEATURES, ORIGIN	1-48																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年12月6日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年12月13日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>冯晓亮</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961927</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	叶阳苗. "CRISPR系统-Cas13d效应蛋白的结构生物学研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第12期, 2021年12月15日 (2021 - 12 - 15), 文章号A006-286 摘要	1-48
A	GUPTA, R.等. "Cas13d: A New Molecular Scissor for Transcriptome Engineering" FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 第10卷, 2022年3月31日 (2022 - 03 - 31), 文章号866800 摘要	1-48

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：47(部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求47(部分)涉及疾病的治疗方法，属于PCT实施细则39.1(iv)规定的不要国际检索单位检索的技术方案。但是，基于上述主题修改为相应的制药用途进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/115093

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2019062724	A1	2019年2月28日	CA	3072610	A1	2019年2月28日
				US	2021344629	A1	2021年11月4日
				US	11303593	B2	2022年4月12日
				US	2021344630	A1	2021年11月4日
				US	11303594	B2	2022年4月12日
				US	2019207890	A1	2019年7月4日
				US	2020127954	A9	2020年4月23日
				US	10666592	B2	2020年5月26日
				US	2020244609	A1	2020年7月30日
				US	10931613	B2	2021年2月23日
				US	2021344628	A1	2021年11月4日
				US	11303592	B2	2022年4月12日
				US	10476825	B2	2019年11月12日
				WO	2019040664	A1	2019年2月28日
				US	2022239615	A1	2022年7月28日
				US	11706177	B2	2023年7月18日
				US	2021344627	A1	2021年11月4日
				US	11316812	B2	2022年4月26日
				AU	2018320870	A1	2020年2月27日
				US	2020322297	A1	2020年10月8日
				US	11032225	B2	2021年6月8日
				JP	2020532968	A	2020年11月19日
				SG	11202001208	XA	2020年3月30日
				US	2020351232	A1	2020年11月5日
				US	11025574	B2	2021年6月1日
				US	2021344626	A1	2021年11月4日
				US	11310179	B2	2022年4月19日
				JP	2023153907	A	2023年10月18日
				US	2021344631	A1	2021年11月4日
				US	11310180	B2	2022年4月19日
				US	2020252359	A1	2020年8月6日
				US	11005799	B2	2021年5月11日
				US	2019169595	A1	2019年6月6日
				US	11228547	B2	2022年1月18日
				EP	3673055	A1	2020年7月1日
				EP	3673055	A4	2021年8月11日
				US	2023328020	A1	2023年10月12日
				US	2020351231	A1	2020年11月5日
				US	11032224	B2	2021年6月8日
-----				-----			
CN	113234702	A	2021年8月10日	无			
-----				-----			
CN	113544267	A	2021年10月22日	CA	3126481	A1	2020年7月23日
				US	2022090088	A1	2022年3月24日
				WO	2020150287	A1	2020年7月23日
				KR	20210126014	A	2021年10月19日
				MX	2021008487	A	2021年11月12日
				AU	2020208346	A1	2021年7月29日
				JP	2022523632	A	2022年4月26日
				EP	3911741	A1	2021年11月24日
-----				-----			
WO	2020160150	A1	2020年8月6日	US	2022145297	A1	2022年5月12日
-----				-----			