



Roni Liimatta

CRISPR-Cas9-genomieditointipalvelun käyttöönoton edistäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

7.3.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Roni Liimatta
Otsikko:	CRISPR-Cas9-genomieditointipalvelun käyttöönoton edistäminen
Sivumäärä:	28 sivua + 6 liitettä
Aika:	7.3.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	genomibiologian keskuspalveluyksikön johtaja Saara Ollila lehtori Tiina Soininen

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston genomibiologian keskuspalveluyksikölle. Genomibiologian yksikkö eli GBU (Genome Biology Unit) tarjoaa erilaisia genomien laajuisten kloonikirjastojen jakelu- ja modifiointipalveluita Helsingin yliopiston ja muiden Biocenter Finland -yliopistojen tutkimusryhmien käyttöön. Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli edistää GBU:n CRISPR-Cas9-menetelmään pohjaavan uuden genomieditointipalvelun käyttöönottoa.

Työ aloitettiin suunnitteleamalla gRNA-Cas9-kompleksiin tarvittavat Opas-RNA:t eli gRNA:t tutkimusryhmän intresseissä oleville geeneille (STK11, STING1, ULK1, Ezh2, Met, Hgf, Il11, Axl ja Nrg1) Benchling-sovellusallustalla. gRNA:n sekvenssi vastaa modifioinnin kohdetta, ja sitä muokkaamalla pystytään vaikuttamaan siihen, mihin kohtaan genomissa gRNA-Cas9-kompleksi sitoutuu. Kohteeseen sitoutumisen jälkeen Cas9-proteiini katkaisee nukleaasidomainien avulla kaksijuosteisen DNA:n ja lopputuloksena syntyy kaksoisjuosteen katkos eli DSB (double-strand break). Tässä työssä gRNA:t suunniteltiin siten, että DSB syntyisi geenissä sellaiseen kohtaan, joka aiheuttaisi geenin inaktivaation. Tämän avulla voidaan tutkia geenin toimintaa.

Opas-RNA:n (gRNA1) ylä- ja alajuoksuun suunniteltiin etu- ja taka-alukkeet 150 ja 500 emäsparin päähän, näiden tarkoituksena on monistaa polymeerasiketjureaktion avulla (PCR) genomieditoinnin kohteena oleva alue geenistä. Sekvensoimalla kyseinen alue editoiduista soluista voidaan selvittää, onko genomieditointi onnistunut. Työn yhtenä tavoitteena oli määrittää, toimiiko sekvensointimenetelmä editoinnin varmistamisessa, ja voidaanko sitä täten tarjota palveluna. Etu- ja taka-alukkeiden sekä gRNA:n suunnittelulle luotiin uusi protokolla GBU:lle.

Työn seuraavassa vaiheessa kaikille geeneille suunnitellut gRNA:t kloonattiin lentivirusvektoriin (lentiCRISPRv2 Puro). Konstruktin valmistamiselle laskettiin tarvikkeiden kulutuksen ja ajankäytön kautta hinta-arvio, joka tulee määrittämään tarjottavan palvelun hinnan. Seuraavassa vaiheessa vektorit tullaan siirrostamaan lentivirusvektoriin, millä infektoidaan soluja. Jos menetelmä toimii odotetulla tavalla, niin lentivirus siirtää gRNA-Cas9 kompleksia koodaavan DNA:n haluttuun solulinjaan, jonka genomien haluttuun kohtaan muodostuu kaksoisjuosteen katkos.

Avainsanat: CRISPR-Cas9, opas-RNA, lentivirusvektori

Abstract

Author: Roni Liimatta
Title: The development of CRISPR/Cas9 genome editing service for Genome Biology Unit
Number of Pages: 28 pages + 6 appendices
Date: 7 March 2022

Degree: Bachelor of Laboratory services
Degree Programme: Degree Programme in Laboratory Sciences
Supervisors: Saara Ollila, Director of Genome Biology Unit
Tiina Soininen, Senior lecturer

This thesis was made for the Genome Biology Unit (GBU) which is a part of genome editing and stem cells core-unit platform Helsinki Institute of Life Science at the University of Helsinki. GBU provides genome-scale open reading frames and Gateway cloning services for research groups (Biocenter Finland research groups). The purpose of this thesis was to help forward the commissioning of a new CRISPR/Cas9 genome editing service.

The project started by designing gRNA:s for the Cas9-gRNA complex. The gRNAs were designed with Benchling platform for the research group's genes of interest (STK11, STING1, ULK1, Ezh2, Met, Hgf, Il11, Axl ja Nrg1). gRNA corresponds to the sequence that is the target of the editing by defining where the Cas9-gRNA complex will bind. After binding to the target DNA Cas9 will cut the double-stranded DNA and create a double-strand break (DSB). In this thesis the gRNAs were designed into a location that likely disrupts the gene's activity, allowing studies of the gene function.

Reverse and forward primers were also designed upstream and downstream (150 and 500 base pairs) of the gRNA binding site. The purpose for the primers is to multiply and isolate the sequence of interest from the gene by PCR (Polymerase Chain Reaction). By sequencing the PCR fragment, it is possible to evaluate the success of the gene editing. A new protocol was created for GBU for designing gRNAs and primers.

The next step of the project was to clone the designed gRNAs into a lentiviral vector (lentiCRISPRv2 Puro). The supply cost and work time was calculated for this step which will determine the price for this service. The final step of this service is to produce lentiviruses carrying Cas9 and the generated gRNA and infect target cells with the viruses. The virus will transfer the Cas9-gRNA complex encoding DNA to the cells allowing for gene editing in the desired position in the genome.

Keywords: CRISPR/Cas9, gRNA, lentiviral vector

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	CRISPR-Cas9	2
3	gRNA- ja PCR-alukkeiden (Primer) suunnittelu	6
4	Lenivirusvektoreiden valmistus ja tuotto	12
4.1	Plasmidit	12
4.2	Lentivirusvektoreiden valmistus, tuotto Stbl3-soluissa, eristys ja analysointi	13
5	PCR-alukkeiden testaus	19
6	Yhteenveto	25
	Lähteet	27

Liitteet

Liite 1: Geenien gRNA1 ja gRNA2 Off-target-listat

Liite 2: Konstruktioiden sekvenssit

Liite 3: Protokolla gRNA ja PCR-alukkeiden suunnittelulle

Liite 4: Näytteen nukleotidipitoisuus ja sekvensointitulokset

Liite 5: Konstruktioiden sekvenssit

Liite 6: Kustannusarvio lentivirusvektorin digestiolle, oligon yhteenliittämiseksi ja kloonaukselle digestoituun lentivirusvektoriin

Lyhenteet

CAS: CRISPR Associated Protein. CRISPR-systeemiin liittyvä proteiini.

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*. Bakteerin adaptiiviseen immuunijärjestelmään liittyvät toistojaksot.

DSB: *Double-stranded break*. DNA:n kaksoisjuosteen katkos.

Fwdprimer: *Forward primer*. Etualuke.

GBU: *Genome Biology Unit*. Genomibiologian keskuspalveluyksikkö.

gRNA: *Guide RNA*. Opas-RNA.

NEB: *New England Biolabs*. Reagensseja tuottava biolaboratorio.

NHEJ: *Non-homologous end joining*. Ei-homologinen päiden yhdistyminen.

OL: *Overlap*. Limittyminen.

PAM: *Protospacer Adjacent Motif*. Cas-entsyymin kiinnittymiskohta.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*. Polymeerasiketjureaktio.

Revprimer: *Reverse primer*. Taka-aluke.

1 Johdanto

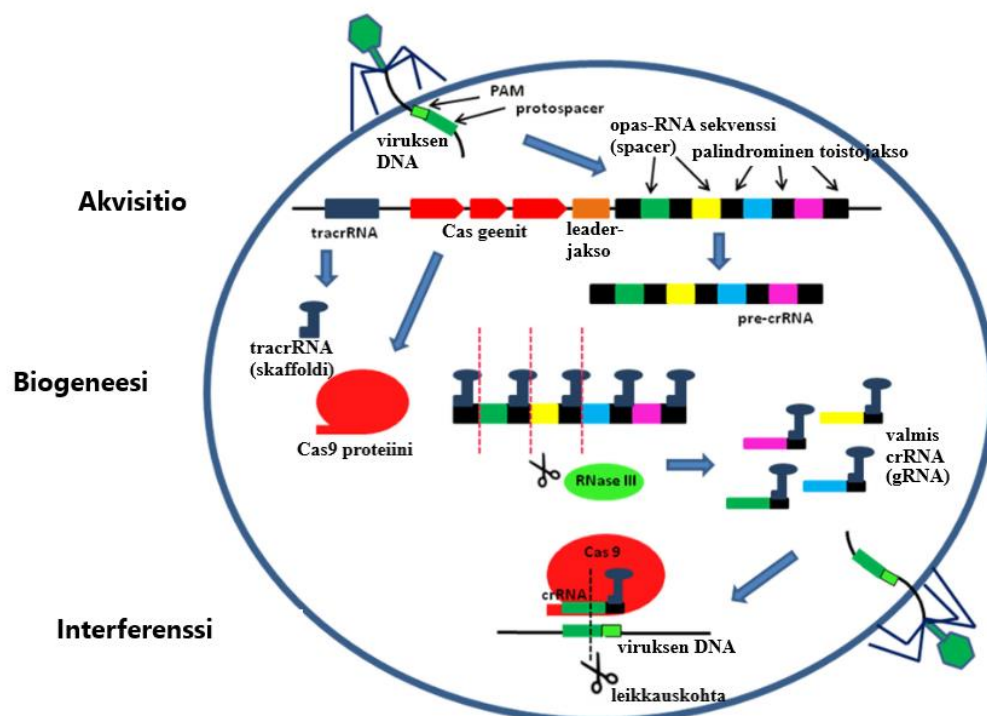
Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston genomibiologian keskuspalveluyksikölle (Genome Biology Unit). Genomibiologian yksikkö eli GBU tarjoaa erilaisia genomien laajuisten kloonikirjastojen jakelu- ja modifiointipalveluita Helsingin yliopiston ja muiden Biocenter Finland -yliopistojen tutkimusryhmien käyttöön. GBU:lla on laaja avoin lukukehyskirjasto eli ORF-kirjasto (Open Reading Frame), joka pitää sisällään 18600 täysin verifioitua kloonista sekä komplementaarisen DNA:n (cDNA) kokoelman 29000:lle eri kloonille (organismit *Homo sapiens* ja *Mus musculus*). GBU tarjoaa kohdennettua mutageneesiä kaikille ORF-kirjaston sisältämille klooneille sekä Gateway-kloonauspalvelun lukuisille ekspressiovektoreille. GBU:lla on myös TRC1 shRNA - ja Sanger CRISPR (knockout) -kloonikirjasto. Kirjastojen sisältämät kloonit ovat saatavilla esimerkiksi glyserolistokkeina tai petrimaljoina. [1.]

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli edistää CRISPR-Cas9-menetelmään pohjaava genomieditointipalvelun lisäämistä GBU:n palveluportfolioon. CRISPR-Cas9-menetelmän avulla on mahdollista tuottaa uutta tutkimustietoa geenien toiminnasta. Tämä onnistuu esimerkiksi tuottamalla CRISPR-Cas9-kompleksilla kaksoisjuosteen katkos sellaiseen kohtaan, joka tuottaa geenin inaktivaation. Geenin sammuttaminen johtaa proteiinin tuoton lakkaamiseen, mikä antaa tarkempaa tietoa siitä, että mikä on geenin ja sen tuottaman proteiinin merkitys elion kannalta.

CRISPR-Cas9-menetelmä tarjoaa mahdollisuuden myös uusiin hoitotoimenpiteisiin. Menetelmän avulla on käytännössä mahdollista poistaa perinnöllisiä geenisairauksia tuottavia variantteja ja korvata ne terveillä käyttämällä homologiasuunnattua päiden yhdistämistä kaksoisjuosteenkatkoksen korjaamiseen. GBU:n uusi genomieditointipalvelu tulee helpottamaan tutkimuksen tekoa ja mahdollisesti tarjoamaan myös välillisesti uutta tietoa geenien toiminnasta, kun eri tutkimusryhmät pääsevät käyttämään sitä hyväksi. GBU:lle uusi palvelu tulee puolestaan lisäämään liiketoimintaa.

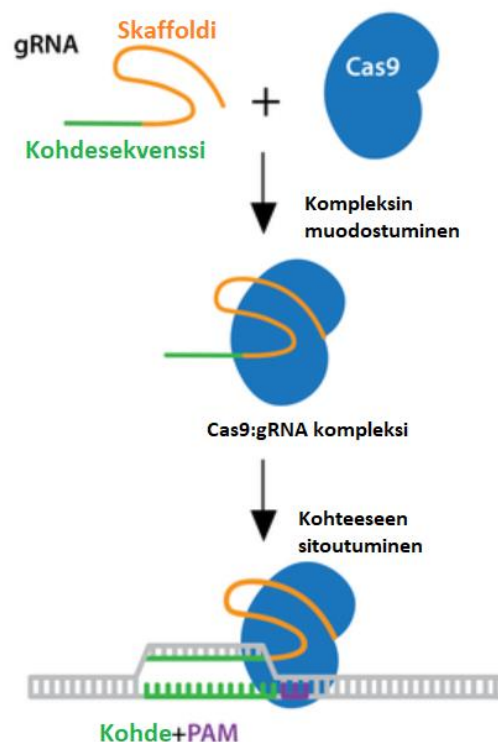
2 CRISPR-Cas9

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) on osa bakteerin adaptiivista immuunijärjestelmää. Kyseistä immuunijärjestelmää ei ole havaittu nisäkkäillä. Järjestelmä perustuu bakteerin/arkin genomista löytyviin noin 20 emäsparin toistojaksoihin, jotka vastaavat aiemmin infektion muodostaneiden bakteriofagien DNA:ta/RNA:ta. Kyseiset toistojaksot eivät koodaa mitään proteiinia. Lyhyet palindromiset toistojaksot erottavat eri bakteriofagien tunnistussekvenssit toisistaan. Cas (CRISPR associated protein) on entsyymi, joka käyttää CRISPR:stä löytyviä toistojaksoja bakteriofagin DNA:n tunnistamiseen. Cas-proteiinia koodaava sekvenssi löytyy genomista aina lyhyiden bakteri- ja arkkivirusten genomia vastaavien toistojaksojen läheisyydestä. Tämän kokonaisuuden avulla esimerkiksi Cas9-entsyymi löytää ja pilkkoo bakteerisoluun tunkeutuneen bakteriofagin DNA-juosteen tietystä kohtaa ja infektiio estyy. [2, s. 474–475.] (Kuva 1).



Kuva 1 Bakteerin CRISPR/Cas-immuunijärjestelmä bakteriofagia vastaan. [2, s. 234, muokattu.]

Bakteereissa aktiivinen CRISPR-CAS-systeemi on onnistuttu ottamaan käyttöön genomien muokkauksen apuvälineeksi myös muissa esimerkiksi nisäkkäiden soluissa. CRISPR-CAS-menetelmään (suomenkielisessä tekstissä käytetään usein termiä ”geenisakset”) sisältyy opas-RNA (gRNA/sgRNA) sekä Cas-proteiini (endonukleaasi, Cas9). Opas-RNA eli gRNA (guideRNA) on lyhyt synteettinen RNA-juoste, joka rakentuu gRNA:n Cas9-entsyymiin kiinnittävästä osasta (skaffoldi) sekä noin 20 nukleotidin pituisesta sekvenssistä, joka vastaa modifioinnin kohdetta genomissa (kuva 2). Sekvenssiä muuttamalla pystytään luonnollisesti vaikuttamaan siihen, mihin kohtaan genomieditointi kohdistuu. Kyseessä on ensimmäinen genomien muokkausmenetelmä, jossa kohdesekvenssi valitaan komplementaarisen sekvenssin perusteella, mikä tekee siitä helposti muokattavan. [3, s. 235.]

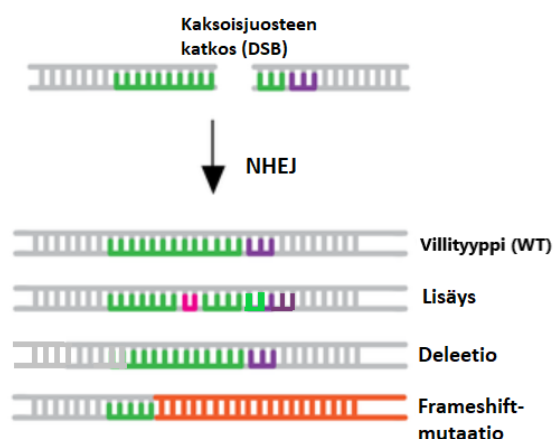


Kuva 2 CRISPR-Cas9-menetelmän muodostuminen ja rakenne. [4, muokattu.]

Kohdesekvenssin (20 nukleotidiä) tulee täyttää seuraavat kaksi ehtoa. Muuhun genomiin nähden kohdesekvenssin pitää olla uniikki, ja sen välittömästä läheisyydestä pitää löytyä PAM-sekvenssi (Protospacer Adjacent Motif), joka sijaitsee 2–6 nukleotidin päässä alavirtaan kohdesekvenssistä. PAM-sekvenssin läheisyys on välttämätöntä, sillä Cas-proteiini kiinnittyy siihen kohtaan. Cas9:n konformaatio muuttuu gRNA:han sitoutumisen myötä inaktiivisesta aktiiviseksi, DNA:han sitoutuvaksi konformaatioksi. Negatiivisesti varautunut skaffoldi kiinnittää Opas-RNA:n (gRNA) Cas9-proteiinin pinnalla oleviin positiivisesti varautuneisiin uriin. Opas-RNA jää vapaaksi, mikä mahdollistaa emäspariutumiseen perustuvan vuorovaikutuksen DNA:n kanssa. [3, s. 235.]

Kohteeseen sitoutumisen jälkeen Cas9-gRNA kompleksi aukaisee kaksijuosteisen DNA:n. Opas-RNA on homologisesti vastaava genomista löytyvän kohteen kanssa, ja aukeaminen tapahtuu 3'-5'-suunnassa. Tämän jälkeen Cas9-proteiini katkaisee nukleaasidomainien (RuvC:n ja HNH:n) avulla kaksijuosteisen DNA:n ja lopputuloksena syntyy kaksoisjuosteen katkos eli DSB (double-strand break).

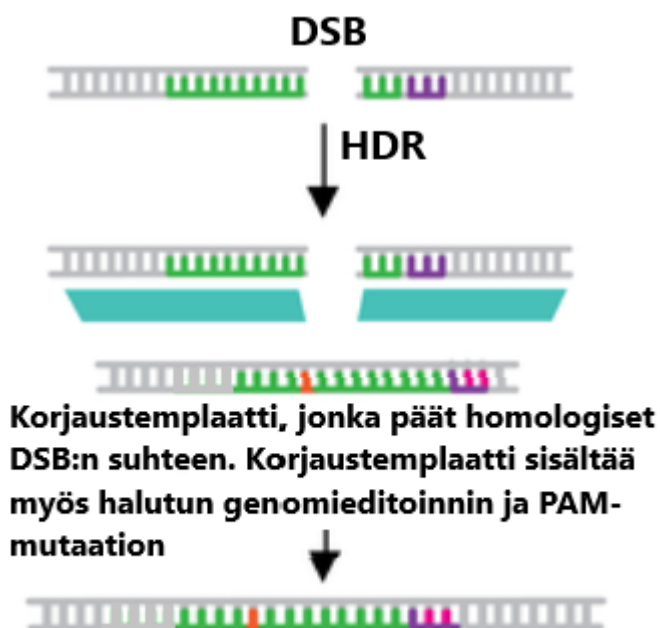
Tämän jälkeen solun DNA:n korjausmekanismit korjaavat muodostuneen katkoksen. Tähän on kaksi vaihtoehtoista polkua. Ensimmäinen polku on ei-homologinen päiden yhdistyminen eli NHEJ (non-homologous end joining). NHEJ-polku on nähtävissä kuvassa 3.



Kuva 3 Ei-homologinen päiden yhdistyminen (non-homologous end joining, NHEJ). [4, muokattu.]

NHEJ on aktiivinen solusyklin vaiheesta riippumatta, ja se korjaa DNA:n nopeasti, mutta ei virheettömästi (kuva 3). Ihmisen DNA:n korjaamiseen osallistuvat Ku70-Ku80-heterodimeerit proteiinikompleksit sitoutuvat kaksoisjuosteen katkoksten päihin ja ne ovat edellytys polymeraasi-, ligaasi- ja nukleasientsyymien sitoutumiskyvylle. NHEJ:n seurauksena edellä mainitut entsyymit saattavat muodostaa esimerkiksi ennenaikaisen lopetuskodonin, kun kohde-DNA:han syntyy nukleotidien deleetioita, lisäyksiä sekä näiden yhdistelmänä frameshift-mutaatioita (insertio ja deleetio → frameshift-mutaatio). [2, s. 235.] Kuvassa 4 näkyvissä deleetio (vrt. villityypin ja deleetion DNA-juosteen pituutta), lisäys vaaleanpunaisella ja näiden yhdistelmä frameshift-mutaatio oranssilla. NHEJ:n kautta kaksoisjuoste voi myös korjautua alkuperäiseen sekvenssiformaattiinsa (villityyppi, geenin ei mutatoitunut muoto). Geenien toiminnan poistoon tähtäävissä sovelluksissa on tarkoituksena luoda DSB siten, että muutos johtaa proteiinin tuoton estymiseen.

Toinen tapa korjata kaksoisjuosteen katkokset on homologiaa hyödyntävä päiden yhdistyminen eli HDR (homology-directed repair), joka on aktiivinen vain jakautuvissa soluissa. Kyseisessä polussa DSB korjataan korjaustemplaatin avulla. Luovuttaja-DNA (donor DNA) tulee viedä kohdesoluun samanaikaisesti Cas9-gRNA-kompleksin kanssa ja sen sekvenssin tulee olla homologinen kohdesekvenssin kanssa 5'-3'-päiden suhteen. [5, s. 2.] HDR-polku nähtävissä kuvassa 4.



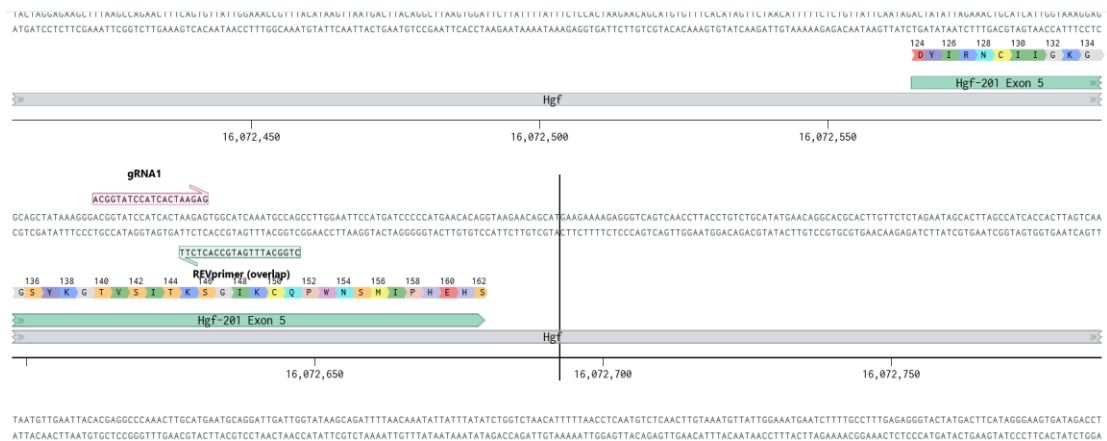
Kuva 4 Homologiasuunnattu päiden yhdistyminen eli HDR (homology-directed repair). [4, muokattu.]

Korjaustemplaatti pitää sisällään sekä halutun genomieditoinnin että PAM-mutaation, jonka tarkoituksena on estää genomieditoinnin jälkeen CRISPR-Cas9-kompleksin uudelleen sitoutuminen ja DSB:n muotoutuminen. HDR-polku kilpailee korjausmekanismina NHEJ:n kanssa. HDR-polun tehokkuutta pystytään parantamaan esimerkiksi inhiboimalla supressoriproteiini p53 (53BP1) toimintaa, joka rajoittaa HDR-korjausmekanismia. [6, s. 108–109.]

3 gRNA- ja PCR-alukkeiden (Primer) suunnittelu

Työ aloitettiin suunnittelemalla gRNA:t valikoiduille ihmisen (STK11, STING1 ja ULK1) ja hiiren (Ezh2, Il11, Met, Hgf, Axl ja Nrg1) geeneille. Geenit valikoituivat GBU:n kanssa yhteistyössä toimivan Makelab-tutkimusryhmän tutkijoiden tutkimuskohteiden mukaisesti. Ensimmäiseksi pyrittiin löytämään jokaisesta geenistä sellainen eksoni, johon toteutettu DSB CRISPR/Cas9-menetelmällä saisi aikaan geenin inaktivaation. Esimerkkinä käydään läpi Hgf-geenin suunnitteluprosessi. Hgf-geenille (*Mus musculus*) suunniteltiin gRNA1 eksoniin 5 (kodonit 140–146),

koska geenin toiminnalle tärkeä kohta Kringle 1 (kodonit 129–207) sijaitsee tällä alueella [7]. Kringle-alue (1–4) toimii kompetitiivisena vastavaikuttajana (spesifinen inhibiittori) Hgf:lle sekä inhibiittorina angiogeneesille (verisuonten uudismuodostus) [8, s. 846]. Geenien gRNA:t suunniteltiin Benchling-ohjelmistolla, joka myös ennustaa, millä tarkkuudella gRNA ohjaa leikkauksen oikeaan kohtaan genomissa (ON/OFF-targeting). Benchling-ohjelmisto muodostaa myös off-target-listan, joka kertoo, mihin ei-toivottuihin kohtiin genomissa luotu gRNA todennäköisimmin sitoutuu, ja näin luo DSB:n väärään geeniin. Geenien off-target-listat on esitetty liitteessä 1. Valitusta eksonista valittiin korkeimmat pisteet omaava gRNA, joka nimettiin gRNA1:ksi. Valmis gRNA1:n kohta on näkyvissä kuvassa 5.



Kuva 5 Vasemmalla ylhäällä (magenta) Hgf-geenin gRNA1. Kuvassa on näkyvissä myös gRNA1:n kanssa limittyvä taka-alue (reverse primer, overlap) PCR-ajoa sekä sekvensointia varten (vihreä).

Geeneille suunniteltiin gRNA2 noin 500 emäsparin päähän gRNA1:stä. Suunnitelma pohjasi siihen, että kun gRNA1 ja gRNA2 siirretään samaan soluun, saadaan aikaiseksi 500 emäsparin pituinen deletio. Esimerkiksi Hgf-geenille se luotiin 567 emäsparin päähän viidennessä eksonissa sijaitsevaan gRNA1:een nähden. Tämä kohta sijaitti intronissa, ja se valikoitui korkeimpien saatavilla olevien on/off-kohdeprosenttien perusteella. gRNA2-kohdan valintaan vaikutti aina myös Benchling-ohjelmistossa näkyvissä oleva geenin sekvenssi. Koko geenin sekvenssiä (intronia) ei kaikkien geenien kohdalla ollut saatavissa, mikä osaltaan rajoitti gRNA2:sen sekä PCR- ja sekvensointialukkeiden (polymeraasiketjureaktio) suunnittelua. Kuvassa 6 on esitetty Hgf-geenille suunniteltu gRNA2.

Taulukko 1 Geeneille suunnitellut gRNA1, gRNA2 sekä niiden sijainti, on/off-kohdetarkkuus ja valitun sijainnin selite.

Geeni	gRNA1 on/off-kohdetarkkuus (%)	gRNA2 on/off-kohdetarkkuus (%)	gRNA1 ja gRNA2 välinen ero (emäspareina)	Sijainti	Selite
STK11 (<i>Homo sapiens</i>)	65,8/89,6	71,2/91,4	550	gRNA1 eksoni 5 (kodonit 222–228) ja gRNA2 eksoni 6	Proteiinikinaasi domeeni (kodonit 49–309). [9].
ULK1 (<i>Homo sapiens</i>)	67,3/86,4	70,3/87,8	575	gRNA1 eksoni 1 (kodonit 24–30) ja gRNA2 eksoni 2	Proteiinikinaasi domeeni (kodonit 16–278). [10].
STING1 (<i>Homo sapiens</i>)	73,8/44,5	69/80,9	512	gRNA1 eksoni 5 (kodonit 162–168) ja gRNA2 eksoni 4 (kodonit 77–78)	sidoskohta (kodonit 162 ja 167). [11].
Ezh2 (<i>Mus musculus</i>)	61/55,4	57,9/69,3	591	gRNA1 eksoni 3 (kodonit 53–59) ja gRNA2 introni	interaktio EED:n kanssa (kodonit 39–68). [12].
II11 (<i>Mus musculus</i>)	64,3/86	74,4/83,7	447	gRNA1 eksoni 2 (kodonit 16–22) ja gRNA2 eksoni 4 (kodonit 106–112)	ik-kaltainen C2-tyyppi (kodonit 27–110) ja fibronectiini tyyppi-III (kodonit 112–219). [13].
Hgf (<i>Mus musculus</i>)	71,7/80,4	71,4/74,9	567	gRNA1 eksoni 5 (kodonit 140–146) ja gRNA2 introni	Kringle1 (kodonit 129–207). [7].
Met (<i>Mus musculus</i>)	50,4/82,3	59,1/77,5	602	gRNA1 eksoni 18 (kodonit 1155–1162) ja gRNA2 introni	Proteiinikinaasi (kodonit 1076–1343). [14].
Axl (<i>Mus musculus</i>)	67,8/76,1	50,2/81,7	506	gRNA1 eksoni 17 (kodonit 646–652) ja gRNA2 introni	Proteiinikinaasi (kodonit 530–801). [15].
Nrg1 (<i>Mus musculus</i>)	71,1/61,6	68,7/67,6	423	gRNA1 eksoni 2 (kodonit 231–238) ja gRNA2 introni	EGF-tyyppinen domeeni (kodonit 233–277). [16].

Lisäksi gRNA1:n ympärille suunniteltiin alukkeet PCR-monistusta sekä sekvensointia varten. Esimerkiksi limittyvä taka-aluke Hgf-geenille on esitetty kuvassa 5 ja 500 emäsparin päähän suunniteltu taka-aluke on esitetty kuvassa 6. PCR-ajon ja sopivien alukkeiden avulla on mahdollista monistaa mutatoidusta geenistä sekvenssi halutusta kohtaa. Sekvensoinnin avulla taas puolestaan pystytään selvittämään, onko geenille haluttu mutaatio onnistunut vertaamalla sitä esimerkiksi villityyppiin (geenin alkuperäinen, ei mutatoitunut muoto).

Alukkeet suunniteltiin aina pareittain, etu- ja taka-aluke (forward ja reverse primer). Ensimmäiseksi suunniteltiin etualuke noin 500 emäsparia (base pair = bp) ennen gRNA1:stä ja taka-aluke 500 emäsparia gRNA1:n jälkeen. Seuraavaksi suunniteltiin vastaavasta etu- ja taka-aluke 150 emäsparin päähän gRNA1:stä. Viimeiseksi suunniteltiin vielä kolmas taka-aluke (overlap, OL), joka sijaitsee liittämättä viiden gRNA1:n kohde-emäksen kanssa. OL-alukkeen avulla on mahdollista saada reaaliaikaista informaatiota genomieditoinnin onnistumisesta. Aluke ei kiinnity, jos mutaatio gRNA1:n kohdalla on tapahtunut (ks. kuva 5 ja kuva 7). Alukkeet suunniteltiin Benchling-ohjelmistolla noudattaen seuraavaa ohjeistusta

- sulamislämpötila 55–65 °C
- GC-osuus 45–55 %
- G/C-emäs alukkeen alku- ja loppupäähän
- etu- ja taka-alukkeen sulamislämpötilaero 1 °C
- taka-aluke (OL=overlap) limitty viisi emästä gRNA1:n kanssa
- alukkeen pituus 18–24 emästä. [17, s. 147–148.]

Ohjeistuksen toteutumista rajoitti sekvenssistä löytyvät korkeat GC/AT-pitoisuudet ja sekvenssin puuttuminen kokonaan geenin intronista Benchling-ohjelmistosta (kuva 6). Tällöin pyrittiin siihen, että parina käytettävän etu- ja taka-alukkeen (FWDprimer ja REVprimer) sulamislämpötilat (T_m) ovat mahdollisimman lähellä toisiaan. Edellä mainituista syistä johtuen etenkin alukkeen sijaintia halutusta (500/150 bp) jouduttiin usein muokkaamaan. Kaikkien alukkeiden kohdalla ei ollut myöskään mahdollista toteuttaa edellä mainittua ohjeistusta. Hgf- ja Met-geenien alukkeet ovat näkyvissä taulukossa 2. Kaikkien geenien alukkeet ovat näkyvissä liitteessä 2.

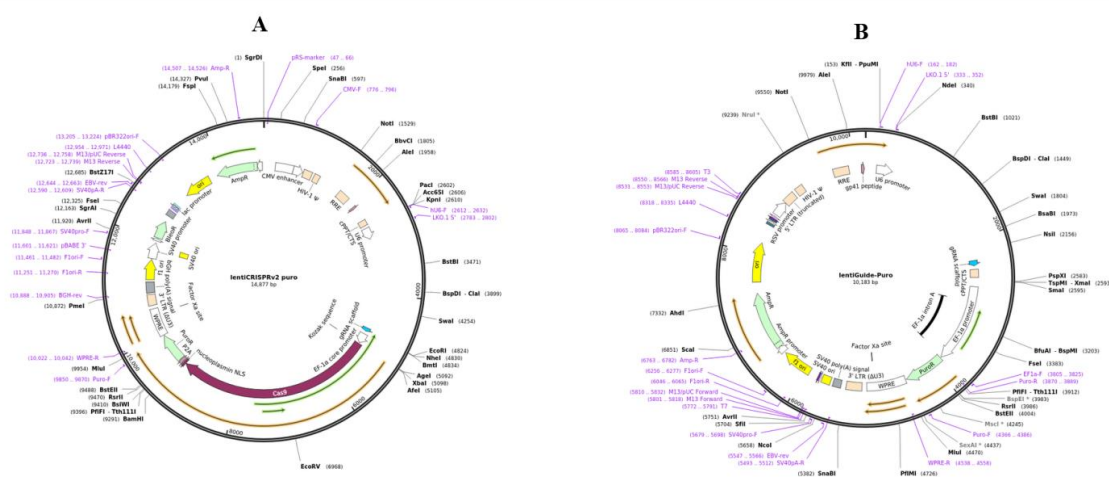
Taulukko 2 Hgf- ja Met-geeneille suunnitellut etu- ja taka-alukkeiden sulamis-
lämpötila (T_m), GC-prosentti, pituus, etäisyys gRNA1:stä ja sekvenssi

Aluke	T_m (°C)	GC-%	Pituus	Etäisyys gRNA1:stä	Sekvenssi
Hgf, FWDprimer (150 bp)	55,1	45,83	24	178	CTAGGAGAAGCTTTAAGCCAGAAC
Hgf, REVprimer (150 bp)	56,4	57,89	19	171	CATGCAAGTTTGGGCCTCG
Hgf, FWDprimer (500 bp)	55,94	47,83	23	330	CAATCAAGTCACCATGGCTTACC
Hgf, REVprimer (500 bp)	56,83	57,14	23	573	GAGACCACTGGTCAACCTGTG
Hgf, REVprimer (OL)	55,44	47,62	21		CTGGCATTGATGCCACTCTT
Met, FWDprimer (150 bp)	56,06	55	20	217	GGTGTCACCTGCTGGTTTTG
Met, REVprimer (150 bp)	56,85	52,38	21	169	CAAGAGGGCAAGCAAACCAAC
Met, FWDprimer (500 bp)	55,72	54,55	22	443	CTTCTCCCACCCCCACATATAC
Met, REVprimer (500 bp)	56,93	52,38	21	557	GCTTTTTATGAGAGCCGCACG
Met, REVprimer (OL)	54,64	43,48	23	overlap 4 emästä	CGAATGAAATTTGCGAGATCTCC

4 Lentivirusvektoreiden valmistus ja tuotto

4.1 Plasmidit

Plasmidivektoreina työssä käytettiin lentiCRISPRv2 Puro - ja lentiGuide Puro -lentivirusvektoreita. Vektoreita käytettiin konstruktioiden valmistuksessa. Molemmilla vektoreilla on selektiivisenä markkerina puromysiini, ja molemmat tuottavat transformoidulle solulle ampicilliiniresistenssin. Suurin ero plasmidien välillä on se, että toisessa on Cas9-proteiini valmiina (lentiCRISPRv2 Puro) ja toisessa ei (lentiGuide Puro). Vektorit ovat nähtävissä kuvassa 8.



Kuva 8 Lentivirusvektorit. A: lentiCRISPRv2 Puro ja B: lentiGuide Puro. [18, 19.]

Kuvassa 8 näkyvää lentiGuide Puro -lentivirusvektoria käytettäessä on Cas9-proteiini vietävä infektoitavaan soluun esimerkiksi toisella vektorilla. [18, 19.] Kaikki gRNA:ta vastaavat oligot kloonattiin lentiCRISPRv2 Puro -lentivirusvektoriin. STK11-geenin gRNA:ta vastaavat oligot kloonattiin myös lentiGuide Puro -lentivirusvektoriin.

4.2 Lentivirusvektoreiden valmistus, tuotto Stbl3-soluissa, eristys ja analysointi

Konstruktien valmistamiseen käytettiin GBU:n työohjetta, joka oli muokattu Target guide sequence -protokollasta [18]. Lentivirusvektori defosforyloitiin ja digestoitii *BsmB1*-restriktioentsyymillä (Esp31). Digestio- ja defosforylaatioreaktioon pipetoidut reagenssit nähtävissä taulukossa 3.

Taulukko 3 Digestio- ja defosforylaatioreaktioon pipetoidut komponentit

Komponentti	Reaktiivilavuus
lentiCRISPRv2 (c=1530 ng/ul)	5 µg (3,3 µl)
Fast Digest <i>BsmBI</i> (Fermentas, Esp31)	3 µl
Fast AP (Fermentas)	3 µl
10 X FastDigest Buffer	6 µl
100 mM DTT (Ditiotreitoli, tuore)	0,6 µl
ddH ₂ O	44,1 µl
Kokonaistilavuus	60 µl

Digestio- ja defosforylaatioreaktio toteutettiin PCR-laitteella. Ajo-ohjelma kesti 30 minuuttia ja lämpötila oli koko ohjelman ajan vakio 37 °C. Digestoitu plasmidi geelipuhdistettiin (ajo-ohjelma: 0,7 % AGE, 100 v ja 1 h) käyttäen DNA extraction

from agarose gels -protokollaa [20, s. 19]. Näytteen nukleotidikonsentraatio mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä. Konsentraatioksi saatiin 48,2 ng/μl.

Geeneille suunnitellut gRNA1 ja gRNA2 (etu- ja taka-aluke) fosforyloitiin ja liitettiin yhteen. Reaktioon pipetoidut komponentit esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4 Alukkeiden ligaatio- ja fosforylaatioreaktioon pipetoidut komponentit

Komponentti	Reaktiutilavuus
Oligo (etualuke, 100 μM)	1 μl (10 μM)
Oligo (taka-aluke, 100 μM)	1 μl (10 μM)
10 X T4 Ligation Buffer (NEB = New England Biolabs)	1 μl
ddH ₂ O	6,5 μl
T4 PNK (polynukleotidikinaasi, NEB M0201S)	5 U (0,5 μl)
Kokonaistilavuus	10 μl

Alukkeiden ligaatio- ja fosforylaatioreaktio tehtiin PCR-laitteella (ajo-ohjelma: 30 min 37 °C:ssa, 5 min 95 °C:ssa ja lämpötilan laskeminen 25 °C:seen nopeudella 5 °C/min). Alukeseos laimennettiin suhteessa 1:200. Ligaatioreaktio käynnistettiin, jossa gRNA:t liitettiin lentiCRISPRv2-lentivirusvektoriin. Reaktioon pipetoidut komponentit esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5 Ligaatioreaktioon pipetoidut komponentit

Komponentti	Reaktiutilavuus
<i>BsmBI</i>-restriktioentsyymillä pilkottu lentivirusvektori (c=48,2 ng/μl)	50 ng (1 μl)
1:200 suhteessa laimennettu alukeseos	1 μl
2 X Quick Ligase Buffer (NEB)	5 μl
ddH₂O	3 μl
välitilavuus	10 μl
Quick Ligase (NEB M2200S)	1 μl
Kokonaistilavuus	11 μl

Reagenssien pipetoimisen jälkeen ligaatioreaktiota inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Valmiit lentivirusvektorit transformoitiin kompetentteihin kaupallisiin *Escherichia coli* -soluihin (Stbl3, Thermo Fisher). Ligaatiotuotetta lisättiin 2 µl 20 µl:n Stbl3-kompetenttisoluihin (*E.coli*). Positiiviseen kontrolliin käytettiin pUC19-plasmidia (1 µg, NEB N3041S) ja pelkkää Stbl3-solua negatiivisena kontrollina. Näytteitä inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Tämän jälkeen tuotettiin vesihauteessa lämpösokki (42 °C ja 40 sekuntia), jonka jälkeen näytteet siirrettiin välittömästi jäähauteeseen. Viimeiseksi lisättiin S.O.C mediaa (2 % tryptoni, 0,5 % hiivauute, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ja 20 mM glukoosi). Transformaatiovaiheeseen käytettiin sekä kaupallisia että ei-kaupallisia *E. coli* -soluja. Transformoidut solut maljattiin LB+ampisilliini (Luria-Bertani, 100 µg/ml) maljoille ja niitä inkuboitiin 16 tuntia 37 °C:ssa.

Maljalta inokuloitiin kaksi pesäkettä LB+ampisilliini (100 µg/ml) -liemeen (5 ml) steriilillä siirrostustikulla omiin kasvatusputkiin. Kasvatuksia ravisteltiin 37 °C:ssa 280 rpm:n pyörimisnopeudella 16 tuntia. Inkuboinnin jälkeen valmistettiin glyserolistokit pipetoimalla 400 µl glyserolia ja 600 µl näytettä kryoputkeen. Näytteet asetettiin säilytykseen -80 °C:seen. Plasmidit eristettiin käyttäen muokattua (sentrifugauksen rpm:t ja ajanjaksot sekä eluentti) Isolation of transfection-grade plasmid DNA in low throughput (REF 740490) -protokollaa [21, s.17]. Protokollassa bakteerisolot pelletoitettiin sentrifugoimalla mikrosentrifuugilla (1 min ja 17000 x g), jonka jälkeen pelletti lyysattiin. Lyysauksen jälkeen lyaatti kirkastettiin sentrifugoimalla (10 min ja 17000 x g) ja supernatantti ladattiin plasmidin sitovaan kolumniin. Kolumnista eristettiin lopulta plasmidi MilliQ[®]-vedellä. Tämän jälkeen miniprep-näytteistä mitattiin konsentraatio NanoDropilla. lentiCRISPRv2 gRNA1- ja gRNA2-plasmideista tehtyjen minipreppien konsentraatiot Hgf- sekä Met-geeneille ovat näkyvissä taulukossa 6. Kaikkien näytteiden konsentraatiot ovat näkyvissä liitteessä 4.

Taulukko 6 NanoDropilla mitatut plasmidikonsentraatiot lentiCRISPRv2 gRNA1 (2 eristystä) ja gRNA2 (2 eristystä) Hgf- ja Met-geeneille.

Näyte	C (ng/μl)
lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1)	625,9
lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (2)	587,4
lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (1)	621,8
lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (2)	620,3
lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (1)	581,8
lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (2)	324,2
lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (1)	642,2
lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (2)	642,1

Taulukosta 6 nähdään, että jokaisesta näytteestä inokuloitiin kaksi pesäkettä (näytteet 1 ja 2). Konsentraatiomittauksen jälkeen näytteet valmisteltiin sekvensointiin. Näytteet sekvensoitiin FIMM:n sekvensointiyksikön toimesta.

Sekvensoinnilla varmistettiin gRNA:n ligoituminen vektoriin suunnitellusti. Sekvensointitulokset tarkistettiin käyttäen Clustal Omega -sivuston Multiple Sequence Alignment -työkalua. Työkaluun syötettiin sekvensointialukkeen (LKO primer) sekvenssi, lentiCRISPRv2-plasmidin sekvenssi, näytteen sekvenssi (esimerkiksi lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf) sekä gRNA:n (assembly) sekvenssi. Tämän jälkeen tarkistettiin, linjautuvatko sekvenssit keskenään suunnitelmien mukaisesti. Kuvassa 9 näkyvissä lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1) näytteen sekvensointitulokset, jotka linjautuivat odotetulla tavalla.

lentiCRISPRv2	TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTCGA	2820
LKO	-----GACTATCATATGCTTACCGT-----	20
lentiCRISPRv2+gRNA	-----	0
gRNA1	-----	0
lentiCRISPRv2	AACTGCGCTAAAATAATTTTTAAATCTTTTTAGCTTCTTGCTCTTTTTGTACGTCTC	4740
LKO	-----	20
lentiCRISPRv2+gRNA	YYTTGGCTTTTATATATCTTGT---GGAGGGACGAACACCGACGGTATCCATCACTAAGA	67
gRNA1	-----CACCACGGTATCCATCACTAAGA	24
lentiCRISPRv2	TGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG	4800
LKO	-----	20
lentiCRISPRv2+gRNA	GGTTTTASAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG	127
gRNA1	G-----	25
lentiCRISPRv2	TGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTG	4860
LKO	-----	20
lentiCRISPRv2+gRNA	TGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTG	187
gRNA1	-----	25
lentiCRISPRv2	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGG	4920
LKO	-----	20
lentiCRISPRv2+gRNA	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGG	247
gRNA1	-----	25

Kuva 9 LentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1) näytteen sekvensointitulokset Clustal Omega -sivuston Multiple sequence alignment -työkalussa

Kuvasta 9 nähdään, että ensin lentiCRISPRv2 Puro -plasmidin kanssa linjautuu LKO-sekvensointialuke. Tämän jälkeen linjautuu myös lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1) sekvenssi ja lopuksi nähdään, että myös gRNA1 linjautuu täydellisesti edellä mainitun sekvenssin kanssa. Kaikki sekvensointitulokset käytiin vastaavalla tavalla läpi. Saatujen sekvensointitulosten perusteella odotetulla tavalla linjautuneet miniprep- ja glyserol stock -näytteet säilytettiin ja linjautumattomat (Ezh2, gRNA2) hävitettiin. Sekvensointitulokset linjautumisen suhteen näkyvissä liitteessä 4 ja näytteiden kaikki sekvenssit liitteessä 5. Lentivirusvektoreiden

valmistuksesta tehtiin kuluihin ja työtunteihin pohjaavat laskelmat, jotka tulevat määrittelemään GBU:n uuden palvelun hinnan (liite 6).

5 PCR-alukkeiden testaus

PCR-alukkeiden testaamisella selvitettiin alukkeiden toimivuutta. Tarkoituksena oli saada etu- ja taka-alukkeella monistettua aina tietyn kokoinen sekvenssi siitä kohdasta kohteen genomista, johon genomieditointi CRISPR-Cas9-menetelmää tullaan käyttämään. Esimerkiksi 500 emäsparin (bp) päähän gRNA1:stä suunniteltujen etu- ja taka-alukkeiden (FWD ja REV primer) avulla pyrittiin monistamaan 1000 emäsparin pituinen sekvenssi. Etu- ja taka-alue, jotka oli suunniteltu 150 bp:n päähän gRNA1:stä, pyrittiin monistamaan 300 emäsparin pituinen sekvenssin gRNA1:n ympäriltä. Kyseiset sekvenssit sekvensoimalla on mahdollista päästä selville siitä, onko genomieditointi onnistunut vai ei. Testauksen yhtenä pyrkimyksenä oli tuoda esille, kumpi edellä mainituista alukepareista toimii paremmin.

Viimeiseksi oli tarkoitus saada vielä eristettyä 150 emäsparin päähän suunnittelun etualukkeen ja gRNA1:n kanssa limittyvän taka-alukkeen (REVoverlap) kanssa eristettyä 150 emäsparin pituinen sekvenssi. Tämä monistus ei luonnollisesti onnistu, jos genomieditointi gRNA1:n kohdalla on onnistunut. Kyseisen alukeparin toimiessa tästä saisi suoraa kvantitatiivista dataa kvantitatiivista PCR:ää (qPCR) hyödyttämällä genomieditoinnin onnistumisesta/epäonnistumisesta. Templaatti-DNA:na käytettiin valmiiksi eristettyä hiiren genomista DNA:ta.

PCR-alukkeita testattiin käyttäen DyNAzyme II Polymerase -protokollaa [22, s.1]. PCR-reaktioon pipetoidut komponentit näkyvät taulukossa 7. Protokollan

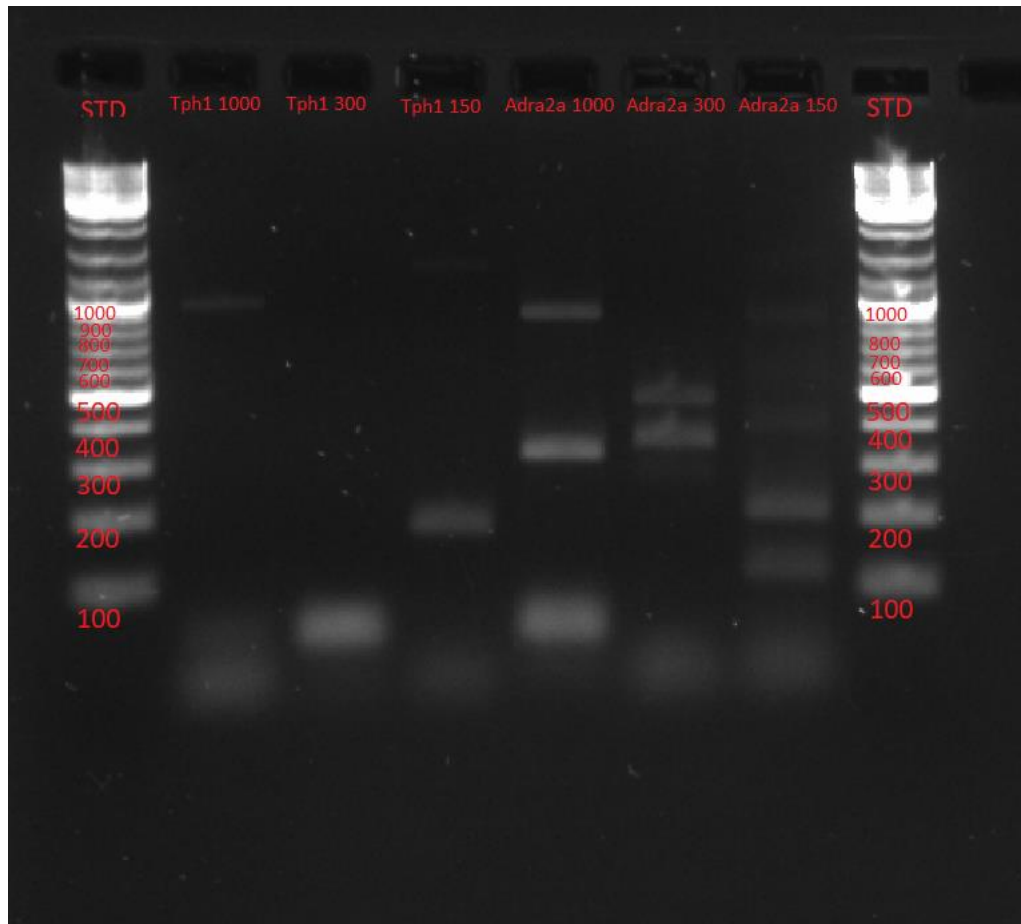
toimivuuden testaamiseksi käytettiin valmiiksi tehtyjä alukenäytteitä Tph1- ja Adra2-geeneille (*Mus musculus*).

Taulukko 7 PCR-reaktioon pipetoidut komponentit

Komponentti	Reaktiotilavuus (μl)	Loppukonsentraatio
ddH ₂ O	32	
10X Optimize DyNAzyme buffer	5	1X (1,5 mM MgCl ₂)
10 mM dNTP (deoksinukleotidi) Mix	1	200 μM
Etualuke (FWD primer)	5	5 μM
Taka-aluke (REV primer)	5	5 μM
Templaatti-DNA	1,5	99
DyNAzyme II DNA Polymerase	0,5	0,5 U/50 μl

PCR-ajon suorittamiseen käytettiin GBU:n työohjeen mukaista PCR-ajo-ohjelmaa: aluksi 2 min 94 °C:ssa, jonka jälkeen 30 sykliä: 30 s 94 °C:ssa, 30 s 50–51 °C:ssa ja 40 s 72 °C:ssa. Sykliä jälkeen 10 min 72 °C:ssa ja jäähdytys 4 °C:seen.

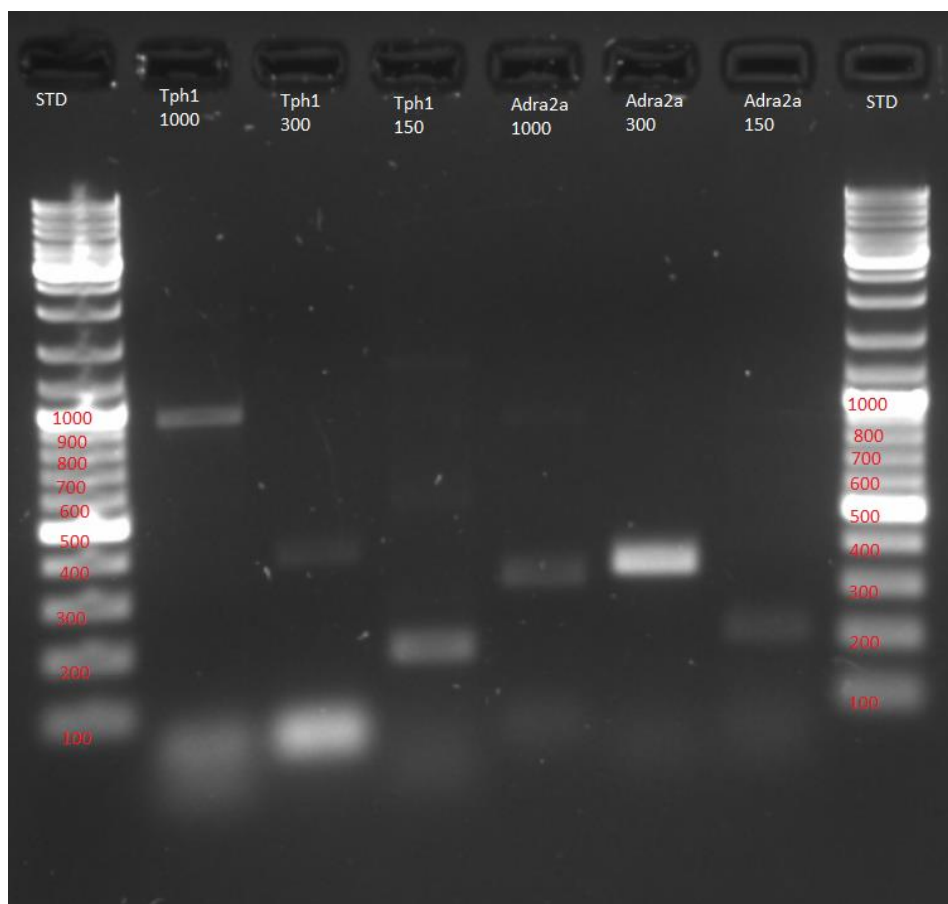
Annealing-lämpötilat (51 °C Tph1-alukkeille ja 50 °C Adra2a-alukkeille) valittiin laskemalla lämpötilaa 5 °C alimmasta sulamislämpötilasta alukeparia kohden. Ensimmäisen ajon tulokset ovat nähtävissä kuvassa 10.



Kuva 10 Tph1- ja Adra2a-geenien PCR-alukkeiden (150, 500 ja OL-etu- ja taka-alue) testaus.

Kuvasta 10 nähdään, että sekä Tph1- että Adra2a-geenin kohdalla on onnistuttu monistamaan 1000 emäsparin pituinen sekvenssi 500 emäsparin päähän gRNA:sta suunniteltujen etu- ja taka-alueiden avulla. Tph1-geenin kohdalla myös 150 emäsparin pituinen sekvenssi näyttää olevan geelillä oikeassa kohdassa ja puolestaan Adra2a:n kohdalta löytyy oikeasta kohdasta 300 emäsparin pituinen sekvenssi. Geelikuvan nähdään kuitenkin myös sisältävän paljon PCR-

sivutuotteita, eli alukedimeerejä (primer dimer). Alukedimeereistä pyrittiin pääsemään eroon muuttamalla seuraavaan PCR-ajon annealing-lämpötiloja. Lämpötila toisessa PCR-ajossa oli kolme astetta alhaisempi kuin alin sulamislämpötila (T_m) per alukepari. Näin ollen Tph1-näytteille sekä Adra2a 1000 -näytteelle saatiin annealing-lämpötilaksi 53 °C ja Adra2a 300- sekä 150-näytteelle 52 °C.

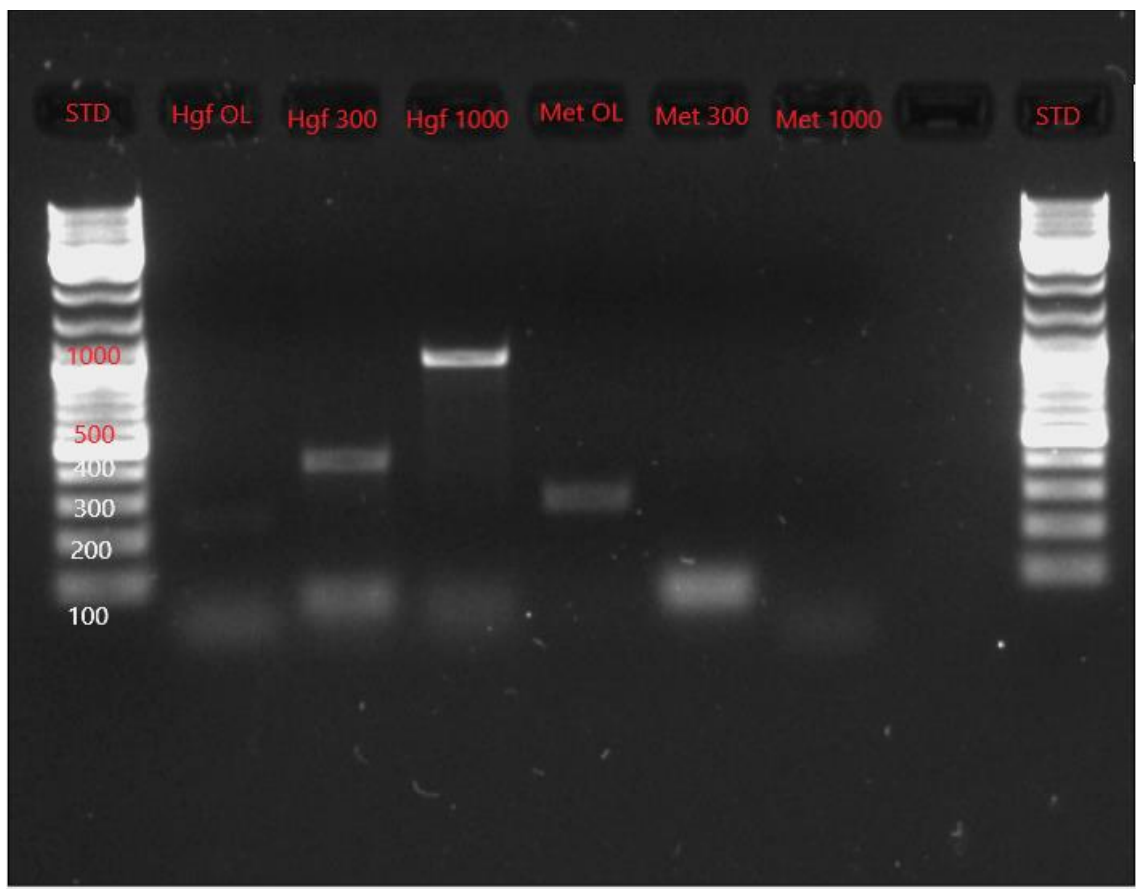


Kuva 11 Tph1- ja Adra2a-geenien PCR-alukkeiden toinen geelijaio. Annealing-lämpötila 53 °C kaikille Tph1-näytteille sekä Adra2a 1000-näytteelle ja 52 °C Adra2a 300 sekä 150-näytteelle.

Toinen PCR-ajo näyttää onnistuneen Tph1-näytteiden kohdalla paremmin kuin ensimmäinen (kuva 11). Bandit näyttävät olevan oikeissa kohdissa kaikkien näytteiden kohdalla. Adra2a-näytteistä vain 1000-bandi näyttää olevan väärässä kohdassa ja etenkin noin 300-bandi on hyvin vahva. Alukkeita ei ole suunniteltu täsmälleen esimerkiksi 500 tai 150 emäsparin päähän gRNA:sta (ks. kpl 3), joten ne eivät myöskään ole täysin oikeassa kohtaa edellä olevissa geelikuvissa. Bandeja

ei kuitenkaan tässä vaiheessa vielä eristetty ja sekvensoitu, joten täyttä varmuutta alukkeiden tai protokollan toimivuudesta ei vielä saatu.

Yksi PCR-ajo tehtiin vielä projektiin suunnitelluilla alukenäytteillä. Annealing-lämpötilaa 52 °C käytettiin Hgf(OL)-, Hgf(300)-, Met(300)- ja Met(1000)-alukepareille. Hgf(1000)- ja Met(150)-alukepareille käytettiin 53 °C annealing-lämpötilaa. Käytetty lämpötila oli kolme astetta alhaisempi kuin alin sulamislämpötila per alukepari. Kuvassa 12 on esitetty Hgf- ja Met-geenien alukenäytteiden PCR-ajon geelikuva.



Kuva 12 Geelajokuva Hgf- ja Met-geenien PCR-alukkeiden (150, 500, OL-etu- ja taka-alue) testauksesta.

Kuvasta 12 nähdään, että Hgf-geenien PCR-alukkeet näyttävät toimivan odotetulla tavalla. 150 etualukkeella ja OL-taka-alukkeella on saatu monistettua noin 200 emäsparin pituinen bandi (etualuke suunniteltu 178 emäsparin päähän gRNA1:stä, liite 2). 150 etu- ja taka-alukkeella on puolestaan onnistuttu monistamaan noin 400 emäsparin pituinen bandi (etualuke 178 ja taka-aluke 171 emäsparia gRNA1:stä, liite 2). Vahvin noin 1000 emäsparin pituinen sekvenssi saatiin monistettua 500:n etu- ja taka-alukkeella. Bandit eivät ole täysin oikeassa kohdassa, mikä todennäköisesti johtuu siitä, että alukkeita ei ole suunniteltu täsmälleen esimerkiksi 150 tai 500 emäsparin etäisyydelle gRNA1:stä (liite 2).

Met-geenille suunnitellut alukkeet eivät toimineet ensimmäisessä ajossa odotusten mukaisesti. Ainoastaan OL-taka-alukkeen sekä 150 etualukkeen avulla eristetty bandi on oikeassa kohdassa geelikuvassa. Hgf- ja Met-alukkeet sisälsivät molemmat epäpuhtauksia, eli alukedimeerejä (primer dimer). Alukedimeerien vähentämiseen auttaa mahdollisesti annealing-lämpötilan säätäminen. Mitään edellä mainituista näytteistä ei eristetty geeliltä ja sekvensoitu ajanpuutteen vuoksi, joten täyttä varmuutta ei alukkeiden toimivuudesta saatu.

6 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli edistää uuden CRISPR/Cas9-menetelmään pohjaavan palvelun viemistä GBU:n palveluportfolioon. Palvelun validointiprosessia ei päästy käytettävissä olevassa ajassa tekemään loppuun asti. Kaikille tutkimusryhmän intressissä oleville geeneille (STK11, STING1, ULK1, Ezh2, Met, Hgf, Il11, Axl ja Nrg1) saatiin kuitenkin suunniteltua gRNA:t sekä tuotettua lentivirusvektorit (lentiCRISPRv2 Puro vektoriin). Ainoastaan Ezh2 gRNA2-konstrukti ei onnistunut (sekvensoinnin analysointitulokset, liite 8). Kaikille geeneille suunniteltiin myös etu- ja taka-alukkeet sekvensointia varten ja niitä vastaavat oligot tilattiin.

Tämän opinnäytetyön pohjalta luotiin GBU:lle uusi protokolla gRNA ja sekvensointialukkeiden suunnittelulle. Lentivirusvektoreiden tuotolle laskettiin myös kustannusarvio, joka tulee määrittämään tarjottavan palvelun hinnan. Protokollan luomisessa ja hinta-arvion laskennassa käytettiin GBU:n sisäistä ohjeistusta.

Projektin seuraavassa vaiheessa tuotetaan lentivirusvektorin sisältäviä lentiviruksia ja niillä infektoidaan soluja (*Homo sapiens* ja *Mus musculus*). Tämän jälkeen suunnitelluilla etu- ja taka-alukkeella monistetaan infektoidun solun genomista mutatoinnin kohteena oleva kohta geenistä. Eristetystä kohdasta pystytään esimerkiksi sekvensoinnin avulla selvittämään, onko haluttu mutaatio ja geenin inaktivaatio saatu aikaiseksi esimerkiksi villityyppiin vertaamalla. Tätä kautta on myös mahdollista selvittää, millä todennäköisyydellä infektoidussa solussa tapahtuu haluttu mutaatio. Validointiprosessin loppuun saattamisen jälkeen GBU:lla on tarjottavana yksi palvelu lisää eri tutkimusryhmien käyttöön.

Lähteet

- 1 Genome Biology Unit. Verkkoaineisto. <<https://www2.helsinki.fi/en/researchgroups/genome-biology-unit>>. Luettu 24.2.2022
- 2 Haft, D. H., Selengut, J., Mogodin, E. F. & Nelson, K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*. 1 (6), e60–e60.
- 3 Hryhorowicz, M., Lipinski, D., Zeyland, J. & Slomski, R. 2016. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 65 (3), 233–240
- 4 CRISPR Guide. Verkkoaineisto. Addgene. <<https://www.addgene.org/guides/crispr/>>. Luettu 3.12.2021
- 5 Jayavaradhan, R., Pillis, D. M., Goodman, M., Zhang, F., Zhang, Y., Andreassen, P. R. & Malik, P. 2019. CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nature communications*. 10 (1), 2866–13.
- 6 Zimmermann, M. & de Lange, T. 2013. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in cell biology*. 24 (2), 108–117.
- 7 Hgf (Mus musculus). Verkkoaineisto. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q08048#family_and_domains>. Luettu 20.12.2021
- 8 Kuba, K., Matsumoto, K., Ohnishi, K., Shiratsuchi, T., Tanaka, M. & Nakamura, T. 2000. Kringle 1–4 of Hepatocyte Growth Factor Inhibits Proliferation and Migration of Human Microvascular Endothelial Cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 279 (3), 846–852.
- 9 STK11 (Homo sapiens). Verkkoaineisto. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15831#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 10 ULK1 (Homo sapiens). Verkkoaineisto. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/O75385#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 11 STING1 (Homo sapiens). Verkkoaineisto. Uniprot. <<https://www.uniprot.org/uniprot/Q86WV6>>. Luettu 26.1.2022
- 12 Ezh2 (Mus musculus). Verkkoaineisto. Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q61188#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022

- 13 Il11 (Mus musculus). Verkkoaineisto. Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q64385#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 14 Met (Mus musculus). Verkkoaineisto. Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/P16056#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 15 Axl (Mus musculus). Verkkoaineisto. Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q00993#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 16 Nrg1 (Mus musculus). Verkkoaineisto. Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q6DR98#family_and_domains>. Luettu 26.1.2022
- 17 Thornton, B. & Basu, C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*. 39 (2), 145–154.
- 18 lentiCRISPRv2 puro. Verkkoaineisto. Addgene. <<https://www.addgene.org/98290/>>. Luettu 3.1.2022
- 19 lentiGuide-Puro. Verkkoaineisto. Addgene. <<https://www.addgene.org/52963/>>. Luettu 3.1.2022
- 20 MACHERY-NAGEL. 2021. User manual. PCR clean-up and Gel extraction.
- 21 MACHERY-NAGEL. 2021. User manual. Plasmid DNA purification.
- 22 Thermo Scientific. 2014. DyNAzyme II DNA Polymerase

Geenien gRNA1 ja gRNA2 Off-target-listat

STK11

gRNA1_Exon5									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
AGGCCGTTGGCAATCTCGGG	CGG		100 ENSG00000118046	chr19	-1	1220650	0	true	
GCCTCGTTGGCAATCTCGGG	AAG	1.3255188679245282		chr11	1	6683449	4	false	
GTTCCCTGGCAATCTCGGG	AAG	0.839975543478261		chr7	-1	148245536	4	false	
AGGGTGTGGACCAATCTCGGG	GGG	0.7111377753303965	ENSG00000181392	chr19	1	36008272	4	false	
CGCCCGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.5594163291469195	ENSG00000244968	chr5	-1	38557207	4	false	
AGGAGCGTGGCAATCTAGGG	GAG	0.4614665948275863		chr1	1	158417152	4	false	
AGGCGTTAGCAATCTAGGG	AGG	0.39703125		chr2	1	152637434	4	false	
AGGTGGTTGGTAATCTAGGG	GAG	0.3903677884615384		chr4	-1	124515198	4	false	
AGGCGTGGCAATCTAGGG	AGG	0.3787150186567164		chr17	1	40219718	4	false	
AGGCTGTGAGAATCTAGGG	TAG	0.33226589084715635		chr15	1	40255201	4	false	
TGCCCGTTGGCAATCTCGCC	AGG	0.33194306249999994	ENSG00000174938	chr16	1	29873707	4	false	
AGGCGTGGCAATCTAGGG	CAG	0.32917500000000005		chr9	-1	129866097	4	false	
AGGCGTGTCCATCTAGGG	CAG	0.297367875		chr7	-1	3844537	4	false	
AGGCCTATGGCAATCTCTGG	CAG	0.27139553086419743		chr2	1	126405803	3	false	
CTGCCCTTGGCAATCTCAGG	AGG	0.24139499999999999		chr12	1	75564565	4	false	
ATTCCGTTAGCAATCTCAGG	TAG	0.23765984152542366		chr5	-1	155573809	4	false	
AGGACCTTGGCAATCTAGGG	AGG	0.23377482154187812		chr17	-1	74685676	4	false	
GGGCTGTGGCAATCTCGGG	AAG	0.21911426701570688	ENSG00000274279	chr15	-1	22404462	4	false	
GGGCTGTGGCAATCTCGGG	AAG	0.21911426701570688	ENSG00000258916	chr15	1	20595925	4	false	
AGTCCATAGGCAATCTCAGG	TAG	0.21807700130890045		chr2	-1	150495536	4	false	
AGGAGTGTGGCAATCTCAGG	AAG	0.20504166666666657		chr2	1	133945876	4	false	
AGGCCCTTCCCACTCTCGGG	AAG	0.19476235199805497		chr2	1	25281117	4	false	
GGGCCCTTGGCAGTCTGGG	AGG	0.18350330624999997	ENSG00000160360	chr9	-1	136359271	4	false	
GGGCTTGTGGCAATCTGGT	TGG	0.1686358215725806		chr1	1	27841375	4	false	
AGGCCGGAGGCAATCTAGGG	TGG	0.16861989375000003		chr2	-1	65562942	4	false	
TGGCCTTGGCAATCTCGGG	AAG	0.16784355039267013		chr16	-1	31874849	4	false	
AGGCGTGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.16060884213197965	ENSG00000127948	chr7	-1	75980360	4	false	
AGGCTGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.15446631393298063	ENSG00000227232	chr1	1	16975	3	false	
AGGCTGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.15446631393298063	ENSG00000234769	chr16	1	16658	3	false	
AGGCTGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.15446631393298063	ENSG00000146556	chr2	-1	113596462	3	false	

AGGCTGTGGCAATCTCGGG	CAG	0.15446631393298063	ENSG00000181404	chr9	1	17086	3	false	
AGGCCCTTGGCAATCTCGGG	TGG	0.15338812499999996		chr17	1	30554915	4	false	
AGGCCCTTGGCAATCTCGGG	TGG	0.15338812499999996		chr17	1	27420676	4	false	
AGGCTGTAGCAATCTCTGG	CAG	0.1435412818965517		chr6	1	21614029	4	false	
AGGCTGTGGCAATCTCGGG	GGG	0.12228805783839783		chr16	-1	88408599	4	false	
AGGATGTGGCAATCTCTGG	GAG	0.10338729281767953		chr5	-1	146128589	4	false	
AGGCTTGGCAATCTCTGC	CAG	0.10301637499999998		chr22	-1	44574180	4	false	
AGGCCGTTGTGAGTCTCGGG	GGG	0.1025355137323944		chr11	-1	10808162	4	false	
AGGCAATAGCAATCTCAGT	CAG	0.10051131228813559		chr16	1	67356508	4	false	
AGGCCGTAGGCAATCTCGCA	GGG	0.09009825699626865		chr3	1	137693355	4	false	
AGGCAATGGCAATCTCGGG	AGG	0.0801058536585366		chr3	-1	42709869	4	false	
AGGCCCTCGGCAAGCTCGGC	CAG	0.07085504315476192		chr22	-1	21488122	4	false	
AGGCCCTCGGCAAGCTCGGC	CAG	0.07085504315476192		chr22	-1	20734293	4	false	
AGGCCCTCGGCAAGCTCGGC	CAG	0.07085504315476192		chr22	-1	18548568	4	false	
AGGCCCTTGGCAATCTGGAG	CAG	0.06528003935596445		chr10	-1	68017355	4	false	
AGGCCCTTGGCAATCTGGGG	CAG	0.05849467051244075		chr6	-1	150592164	4	false	
AGGACGTTGGCAATCTCGGG	AAG	0.053812282383419674	ENSG00000171488	chr1	1	89762803	4	false	
AGGCTGTGGCAATCTCTGG	TGG	0.05335346153846154		chr16	1	86156413	4	false	
AGGCCCTTGGCAATCTCTGA	GAG	0.045857003499999986		chr1	-1	161070833	4	false	
AGGCTGTGGTAATGCGGG	CAG	0.04445874878048782	ENSG00000185596	chr15	-1	101973986	4	false	

gRNA2_Exon6									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromosom	Strand	Position	Mismatches	On-target	
TTCGAAGGGGTACAGACCCG	TGG		100 ENSG00000118046	chr19	-1	1221230	0	true	
ACCCAAGGGGAACAGACCCG	AGG	0.8946549773755654		chr8	-1	47764876	4	false	
TTAGAAGGGGAACAGATCCG	GGG	0.7712885260115606		chr20	1	61742174	3	false	
TCTGAAGGGGATACAGAGCCG	TGG	0.6881348815607735		chr2	-1	170535861	4	false	
TATGAAGAGTACAGACCCG	CAG	0.6237719475000001		chr3	1	108764178	4	false	
TTTGAAGGGGTAAGACCCG	CGG	0.48487649044585984		chr12	-1	97936129	3	false	
CACGAAGGGGTACAGACCCG	GGG	0.48403758278145703	ENSG00000167139	chr15	-1	73881645	4	false	
TCTGAGGGGATACAGACCCA	CAG	0.46581197033898303		chr17	-1	34604649	4	false	
TTGGAAGAGGGATACAGACCCG	GGG	0.4592906027542373		chr7	1	6521767	4	false	
ATCCAAGGATACAGACCCG	TAG	0.41057279191616763	ENSG00000135919	chr2	1	223975228	4	false	

TTCCAAGAGGGACAGACCAG	GGG	0.32953124999999994		chr15	1	77646584	4	false
ATGGAAGGGTAAAGAGCCG	TAG	0.3096825809911243		chr12	1	23233561	4	false
TTCCAGGGAGCAGACCCG	GGG	0.3083870233386075		chr1	1	19824247	4	false
TTCCAAGGGACACAGCCGG	TGG	0.29720816143134704		chr2	-1	239529852	4	false
TTCAAAGGGCTAAGACCCT	TGG	0.2893413033811476		chr2	-1	193132	4	false
TTTGAGGGGTACAGACCCA	TAG	0.2119132299864131		chr4	1	125548547	4	false
TTCTATGGGTAGAGACCCC	AGG	0.19875552910714284		chr1	-1	18752098	4	false
TGCTAAGGGTACACACCAG	CAG	0.18679891304347826	ENSG00000136383	chr15	-1	84869945	4	false
TCCTAAGGGGCACAGCCCC	GAG	0.18185895721925135		chr1	1	8351368	4	false
TGGGAAGGGCACAGCCCCG	AGG	0.18125145000000004		chr3	-1	14791870	4	false
TTTGAAGGGAAAAAGACCCC	AGG	0.17575948043610334		chr2	1	225498397	4	false
TTTGAAGGGTACAGAACTG	AAG	0.1721619092696006		chr5	-1	86488891	4	false
CTGGAAGGGTAGAGACACG	TGG	0.16345989662576682		chr7	-1	44573107	4	false
TTAGAAGTGTGCAGCCCCG	AAG	0.14937305427135683		chr5	1	11902438	4	false
TTCAAAGGTAAAGACCAG	TAG	0.14189790892379678		chr11	-1	77336798	4	false
TTAGAAAGGGCACAGCCCCG	GGG	0.11508556263693469		chr10	-1	97722372	4	false
TTGCGAGGGTCCGGACCCG	GAG	0.10595952852422909	ENSG00000150672	chr11	1	83633256	4	false
TTCAAAGGGTAGAGACCAC	GGG	0.10231496980932203	ENSG00000147485	chr8	-1	51408183	4	false
TTCTAGGAGTAAAGACGCG	GGG	0.08296788957286431		chr21	1	29991855	4	false
TTGGAAGGGTTACAGACTCT	GGG	0.08260244579999998		chr3	1	18658208	4	false
TTCAAAGGGTAGAGACTCT	GAG	0.06295133337988827		chr1	1	76905218	4	false
TTCAAAGGGTCCAGCTCCG	GAG	0.05832517839195982		chr1	-1	26539861	4	false
TTCAAAGGGGACAGCCCTG	GGG	0.057904875		chr12	-1	98639316	4	false
TTGGAAGGATAGAGCCCT	CGG	0.04777052282608697	ENSG00000105472	chr19	-1	50725241	4	false
TTTGAAGGGTACTGAGCCC	AAG	0.047472442210805106		chr7	-1	40080651	4	false
TTCTAAGGGTATGGACCAG	AGG	0.03352782270077206		chr16	-1	83046173	4	false
TTGGAAGGGCACAGCCACC	TGG	0.012244542759911894		chr9	-1	135117580	4	false
TTGGAAGCGTACTGGCCCT	TAG	0.010819529955000002	ENSG00000085872	chr19	-1	16518494	4	false
TTGGAAGGGTCTCACACC	AAG	0.00555392686153846	ENSG00000231185	chr5	1	142375629	4	false

ULK1

gRNA1_Exon1									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
AGACACCGCAAGGCGCGG	TGG		100 ENSG00000177169	chr12	-1	131895076	0	true	
GGATCACAGCCAAGGCGCGG	GAG	0.9111463133640552		chr10	-1	132794026	4	false	
CGAGCACAGCGGAGGCGCGG	GAG	0.8306872037914692		chr1	1	20213118	4	false	
ATGCTACGGCGAGGCGCGG	CGG	0.7819961538461537	ENSG00000122873	chr10	-1	58269150	4	false	
AGAACACAGGGAAGGCGCCT	GGG	0.7395692229729731		chr8	1	144538100	4	false	
CGCCACCGAGAAGGCGCAG	TGG	0.6251933753834353		chr9	1	135219864	4	false	
ACACCACTGGGAAGGCGCAG	GAG	0.5773936801675977	ENSG00000143774	chr1	-1	228145894	4	false	
AGAGCAAGGCAAGGCGCGG	CAG	0.5603398599585062	ENSG00000125651	chr19	-1	6381579	4	false	
GGCCACGCGCAGGCGCGG	CGG	0.5594163291469195		chr19	-1	54159514	4	false	
ACCCGCGCGGAGGCGCGG	CAG	0.4774282910958904		chrX	-1	40098188	4	false	
AGCCTAGCGCAAGGCCCCG	CAG	0.46886411516497467	ENSG00000249926	chr12	-1	131662925	4	false	
AGCCTAGCGCAAGGCCCCG	CAG	0.46886411516497467	ENSG00000279746	chr12	1	131297890	4	false	
AGACCATGTTGAGGCGCGG	TGG	0.4392649873505976	ENSG00000161904	chr6	-1	33778919	4	false	
CGATACCCCGAAGGCGCTG	GGG	0.41057279191616763	ENSG00000168418	chr16	1	84237133	4	false	
AGCCCTCCGTGAAGGCCACCG	GGG	0.3904363223073187		chr12	-1	124307656	4	false	
AGAGCCCGTGAAGGCTCCG	CAG	0.38404094613693474	ENSG000000057935	chr2	1	42494868	4	false	
TGAGCACCGAGAAGGCGCGG	CGG	0.37607499999999999	ENSG00000165066	chr8	1	41646489	4	false	
TGAACACCGGAGGCGCCT	AAG	0.3757599264705883		chr12	1	89354323	4	false	
AGCCGCGCGCAAGGCGCTG	CGG	0.35797781249999994		chr4	1	30718086	4	false	
AGAGCACAGCGGAGGCCCCG	GGG	0.33909987437185934		chr3	1	72590887	4	false	
AGACCAGGGGAAGGCGCGG	AAG	0.3377532017045454	ENSG00000175866	chr17	-1	81109040	4	false	
AGACCAGAGGGAAGGCGCTG	TAG	0.3377532017045454		chr4	-1	26082183	4	false	
ATTCAGCGCGAAGCGCGG	CGG	0.3230979550251257	ENSG00000163975	chr3	1	197003320	4	false	
AGAGCACTGCGGGGCGCGG	GGG	0.3041767937219731		chr14	-1	23548849	4	false	
AGTCCACCGGACGCGCTCG	GGG	0.2870730036363636	ENSG00000136156	chr13	-1	48233456	3	false	
AGACCAAGGCAAGGCGCCT	TGG	0.28016156669776127		chr16	-1	19067438	4	false	
GGACCCCGCGAAGGCGCGG	CGG	0.23339295580110492		chr4	-1	3292382	4	false	
AGCCCAAGGCAAGGCGCGG	CAG	0.23278794403077405		chr1	1	245210194	4	false	
AGTCCAGCGGAGGCGCGG	GGG	0.20771847104329608		chr1	-1	143451098	4	false	
AGTCCAGCGGAGGCGCGG	GGG	0.20771847104329608		chr2	-1	91686331	4	false	

AGTCCAGCGGGAGGCGCGG	GGG	0.20771847104329608		chr2	-1	89612071	4	false
TCACCACCGGGAGGACGGCC	GGG	0.20641801675977656	ENSG00000179954	chr19	1	55493895	4	false
AGGCCAACGTGAAGGGCGCG	CGG	0.18907952879328366	ENSG00000271654	chr8	-1	18387369	4	false
ACTCCCCCGGAAGTGC	TAG	0.1874480807692308	ENSG00000260230	chr9	1	109166948	4	false
AGACCACAGGAAGACGCCA	GGG	0.18062976391625615		chr13	-1	99926515	4	false
AGACCATCTGGAGGCGCTG	CAG	0.16617457523863635	ENSG00000275074	chr8	-1	22108248	4	false
AGACCACGGGAAGTGCAG	TGG	0.14837180281690143		chr8	-1	6898232	3	false
AGAGCACTCGAAGCGCTG	TAG	0.10041309221311473	ENSG00000110057	chr11	1	67996642	4	false
AGACCACCGTGAAGACCGCG	GGG	0.09799842937500002		chr10	1	22229288	4	false
AGACCCAGCCAAAGGAGCGG	GAG	0.0939480051369863		chr16	-1	867919	4	false
AGCCCACCGAAGTGGCGG	GGG	0.09185663993837838	ENSG00000275183	chr19	1	54463279	4	false
AGACTCCCGGAGGGGCGG	GGG	0.08811167391304349		chr11	-1	10304578	4	false
AGACCGCTCCAAGTGC	AGG	0.08628859107654184	ENSG00000184209	chr12	-1	123465955	4	false
AGACCACGGGGAAGGAGCTG	CGG	0.08587824456521741	ENSG00000126934	chr19	-1	4094941	4	false
AGACCACCTCAGAGGGGCGA	GGG	0.0839575699355381		chr16	1	24933800	4	false
AGACTACGGCCGAAGGCGG	CGG	0.08071136165158373	ENSG00000078795	chr5	1	13789447	4	false
AGACCCCGGGAAAGGGGCC	CGG	0.07533079930357146	ENSG00000186187	chr16	-1	74999710	4	false
AGACCACCGAGCACCGCGG	GAG	0.06873669984069039		chr1	-1	66930158	4	false
AGACCACCGAAAAGGAGCC	AGG	0.06074821597500001		chr1	1	235637964	4	false
AGACCACGGGAGGGCGCG	CAG	0.05204802914798208		chr6	-1	165827125	4	false

gRNA2_Exon2

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromosome	Strand	Position	Mismatches	On-target
GCAGCGTCTGAGACTTGGCG	AGG		100 ENSG00000177169	chr12	-1	131895651	0	true
GCATCTCTGGGACTTGGCG	CGG	0.9286353711790393	ENSG00000130309	chr19	-1	17581342	3	false
GAATGGTCTGAGACTTGGTG	TAG	0.6199930939226518		chr6	-1	70114173	4	false
ACAGTGGCTGAGACTTGGCA	GGG	0.6075683757485031		chr2	1	23503636	4	false
GAGGCGCTGGGACTTGGCG	GGG	0.5970911191143499		chr18	1	79873814	4	false
TGAGCCTCTGAGACTTGGCT	GAG	0.5513897622699386		chr1	1	40306065	4	false
AAAGCCTCTGGGACTTGGCG	TGG	0.5512435195852533	ENSG00000110651	chr11	-1	2393704	4	false
GCAGTGTCTTGAAGCTTGGTG	GAG	0.5246368972081217		chr3	-1	105644001	4	false
GCACCTCTCGGACTTGGCG	CAG	0.4688079833776595		chr9	1	134166493	4	false
AAAGCGACTGAGACTTGGTG	AGG	0.4589545284431138		chr8	-1	30442339	4	false

GCAGTGTAAACTTGGCT	TAG	0.3908538770053476		chr12	-1	82012529	4	false
GAGGCTCTGAGACTTGGAG	AAG	0.37820254766949146		chr11	1	125768613	4	false
GATGCTCTGAGACTTGGAG	AAG	0.37820254766949146		chr12	-1	125436875	4	false
CCAGAGTCTGTGACTTGGAG	AAG	0.37746306818181813		chr6	1	47002752	4	false
CCAGAGTCTGAGGCTTGGCT	GGG	0.3709114112903226		chr7	-1	131928345	4	false
GCTCGGGCCGAGACTTGGCG	AGG	0.3491650482947961	ENSG00000169926	chr15	1	31326907	4	false
GGACCGGCTGAGACTTGGCG	TGG	0.324425	ENSG00000205899	chr17	1	1271385	4	false
ACAGTCTGTGACTTGGCC	TGG	0.30982282511645964		chr7	-1	43251189	4	false
GCAGAGTCTAAGACTTGGCA	GAG	0.2910266182665746		chr10	-1	7379515	4	false
GCAGCCTCTGAGACTTGGCG	TGG	0.2909298121387283		chr20	-1	25042381	3	false
TCAGCGCCGAGACTTGGGG	AAG	0.2706956255419075	ENSG00000116062	chr2	-1	47783269	4	false
TCAGCACTGAGACTTGGTG	AAG	0.26497411874999993		chr9	1	1618619	4	false
GCACCTCTGAGACTTGGCA	AAG	0.2498262902542373		chr7	-1	101935814	4	false
GGAGCGACTGAGACTTGGCC	CAG	0.24881279438694273		chr17	1	60151935	4	false
GCTGCTGCTGAGACTTGGAG	CAG	0.2444988459375		chr8	1	19641412	4	false
GCAGTGTCTGAGACTTGGTC	AGG	0.24349376536016948		chr3	1	98735950	4	false
CCAGCGTCTGCCACTTGGCT	GGG	0.24002822263313608	ENSG00000068354	chrX	-1	48560259	4	false
GCACCTCCGAGGCTTGGCG	TGG	0.22650610124999998		chr7	1	1936142	4	false
ACAGCCTCTGTGACTTGGGG	AGG	0.22563024419910174		chr2	-1	199306185	4	false
TCAGCGCCTGAGACTTGGTA	GAG	0.2174226830357143		chr2	1	200854219	4	false
GCAGGCTGTGAACTTGGCA	GAG	0.21018015349740932	ENSG00000249175	chr5	-1	94792209	4	false
CCAGGCTCTGAGCCGTGGCG	TGG	0.19972337837837836		chr11	1	121621413	4	false
GCATGCTGAGCCCTTGGCC	TAG	0.1940727359461326		chr10	1	124726412	4	false
GCAGCATGTGAGTCTTGGCA	AAG	0.18210585127617804		chr4	1	71188082	4	false
GCAACAGCTGAGACTTGGCG	GAG	0.18180507891705072		chr5	-1	176830197	4	false
CCAGCGTCTGTACTTGGTG	TAG	0.17509972499999996	ENSG00000180806	chr12	-1	54002491	4	false
GAAGCGGCTGAGTCTTGGTG	GGG	0.17346065625		chrX	1	153494168	4	false
CCAGCCTCTGAGACTTGTG	TGG	0.1686358215725806		chr10	1	112926778	4	false
GCACCGGCTGAGACTTGTG	GAG	0.16861989374999997		chr1	1	30656365	4	false
GCAGATTCTGAGACTTGGGA	CAG	0.16752134522928994		chr15	1	100852178	4	false
GCAGTGTCTGGGCTTGGCA	GGG	0.16705578092277487		chr12	-1	51875332	4	false
TTAGCATCTGAGAGTGGCG	TAG	0.16137766959799		chr1	1	229877490	4	false
GCAGCCTCAGAGACTTGGCG	CGG	0.1578421274509804	ENSG00000075303	chr7	-1	87876226	3	false

GCAGGGCCTGAGCTCTGGTG	AGG	0.15694059374999997		chr12	-1	121086237	4	false
GCCGCCTTGACACTCGGGC	AGG	0.14937305427135683		chr5	-1	6370019	4	false
GCATCTCTGAGGCTTGGAG	AAG	0.14516208304558006		chr16	-1	66271580	4	false
GCAGCCTCTGGGAATTGGCG	GGG	0.14337541855203617		chr18	1	2846425	3	false
GCAGCTCTGAGCCTTGGCC	TGG	0.12569446887053573		chr7	1	47577482	4	false
GCAGCCACTGAGCCTTGGCC	TGG	0.12569446887053573		chr1	-1	22174042	4	false
GCAGCATCTGTAACCTGGCC	AGG	0.12332505338253767	ENSG00000244005	chr20	1	35698947	4	false

STING1

gRNA1_Exon5	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
CATATTACATCGGATATCTG	CGG		100 ENSG00000184584	chr5	-1	139480809	0	false
TATATTTTCATCTGATATCTG	TAG	1.0803187817258884		chr10	-1	7234709	3	false
ATTCCTACATGGGATATCTG	GGG	0.8946549773755654		chr9	1	97395676	4	false
CATTATAAATCGGATATCTC	TAG	0.811782786885246		chr5	1	104126764	4	false
CTTCTTAAATCTGATATCTG	GGG	0.8077188940092166		chr3	-1	148884193	4	false
CATCTTACATTGTATATCTG	AAG	0.6386408450704224		chr10	-1	114660269	3	false
AATGTTGCATAGGATATCTG	TGG	0.6166297089041096		chr4	-1	62117534	4	false
AATATTTTATAGGATATCTG	GAG	0.60556908632287		chrX	1	126074815	4	false
CAAATTACATCAGATATCTG	GAG	0.5800046400000001		chr15	-1	95937277	3	false
CAAAATCAATTGGATATCTG	CAG	0.5666013598404255		chr2	-1	153404991	4	false
TATTTTTCATCAGATATCTG	TGG	0.5620320422535211		chr21	-1	36197292	4	false
AAAATTCATCAGATATCTG	AGG	0.5594163291469195		chr8	1	36744883	4	false
CATATGTCATCAGATATCTG	TGG	0.5432818312236287		chr8	1	74797876	3	false
AATATGAAATAGGATATCTG	AAG	0.5412662613122171		chr15	-1	21266333	4	false
AATATGAAATAGGATATCTG	AAG	0.5412662613122171		chr2	-1	164974992	4	false
TATCTTACATTGGATATCTA	TGG	0.5251510748407643		chr14	1	57906696	4	false
CACATGAGATTGGATATCTG	CAG	0.5062024289163088		chr4	1	34389827	4	false
CAGAACACATGGGATATCTG	AAG	0.5018943231382978		chr3	-1	132603941	4	false
CATATCCATATGATATCTG	AGG	0.48210879183673466	ENSG00000215009	chr12	-1	7318052	3	false
CATTTTATTCAGATATCTG	AGG	0.45571500000000004		chr4	1	20412602	4	false
TATATTACACAGGATATCTC	TGG	0.4493211240754438		chr12	-1	106603006	4	false
CTTATCCATCGGATTCTG	AGG	0.4300662813102121	ENSG00000198792	chr22	-1	38230687	3	false
CACATTACTACAGATATCTG	TAG	0.4246804303958515		chr17	-1	46102217	4	false
CATACTAGATCAGATATCTT	CAG	0.3908538770053476		chr5	1	127865667	4	false
CAGATTCAGCCATATCTG	AAG	0.3904621776107877		chr4	-1	118763576	4	false
CCTATGAGATCGCATATCTG	TAG	0.38795625		chr14	1	98016250	4	false
AATATTATATAGTATATCTG	TAG	0.3696480978260869		chr1	1	148497347	4	false
CATTTTACATCTGATATG	GAG	0.35302658959537564		chr15	-1	36058150	3	false
CATATCCATCAAATATCTG	CAG	0.34752077468354436		chr20	1	24621149	3	false
AATATCACTGGGATATCTG	AAG	0.333733901969178		chr4	-1	65827964	4	false

TATATTATCATATATCTG	TAG	0.3308850000000004		chr9	1	10027212	4	false
GATATTTCAACGATATCTG	AAG	0.31488444449052132		chrX	1	124858768	4	false
TATATAACATTGGATATCTT	TGG	0.30982282511645964		chr2	-1	665041	4	false
CATTTGCCATCTGATATCTG	AGG	0.3081968473404255		chrX	-1	40806336	4	false
CATATTATAGCAGATACCTG	AAG	0.27378804350220265		chr1	-1	51270848	4	false
TATATTAGATTGGAATCTG	CAG	0.27173653846153845	ENSG00000239557	chr3	-1	52374004	4	false
TATATTAATGGGAGATCTG	GAG	0.27173653846153845		chrX	1	134249030	4	false
CATCTTACTTATGATATCTG	AGG	0.2550928277896995		chr3	1	188540887	4	false
CAAAATTAGATGGGACATCTG	CAG	0.2523999239130434		chr15	-1	71328810	4	false
CATATTATCAGGATATCTT	AAG	0.24103429261363632		chr4	1	57634269	4	false
CATGTTTCATGATATATCTG	GGG	0.2343552364069507		chr13	-1	111392444	4	false
AATATTATATCGGATATATT	GAG	0.1928279801324503		chr13	1	53374092	4	false
CATATTAAGTTGATATCTG	GGG	0.18626287836155372		chr2	-1	173454077	4	false
CATTTCCAGCGGATTCTG	AGG	0.18620584456521747		chr12	1	42609464	4	false
CATAGTACATAGGATAACTT	CAG	0.17345768698770492		chr10	-1	34400674	4	false
CAAAATACATTTTATATCTG	AAG	0.1664546668284753		chrX	-1	51665838	4	false
TATATTACCTTGGACATCTG	TAG	0.16434543083756342		chr3	-1	165299781	4	false
CATATTGCTTCTGATATCTT	TAG	0.15174761961828362		chr11	1	133137576	4	false
CAGATTAATCCGATTCTG	AGG	0.14937305427135683		chr4	-1	113324737	4	false
CATATTAATTCATATCTG	AAG	0.1488001615612648		chr5	-1	98456108	4	false

gRNA2_Exon4

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
CCAGTCACTCACAGTACCC	AGG	1.9579142857142857		chr3	1	71197491	3	false
GCTGCCACTCACAGGACCG	AGG	1.601960784313726		chr11	-1	77165364	2	false
CCTCACACTAACAGGTACCG	TAG	1.4327783842794761		chr18	1	23882049	4	false
GAGATCCCTCACAGGTACCG	TGG	0.9482699110671937		chr8	-1	30442802	4	false
GCTGGCACTCAAGGTACCG	AAG	0.7551877729257642		chr3	-1	37358826	3	false
TCTGTCACTCAAGGTACAG	CAG	0.696127659574468		chr9	-1	109924739	3	false
GGCCTCACTCACAGGTACTG	CAG	0.6113131906077346	ENSG00000153902	chr19	1	35133698	4	false
GATGCTTTCCACAGGTACCG	AAG	0.5897026473799127		chr16	-1	51286092	4	false
GGTATCACACAGGTACCA	GGG	0.5435201721556888		chr17	-1	34443698	4	false

GCAATGACTCACAGGTACCT	AAG	0.4950740771648045		chr6	1	31481022	4	false
GCAGGAACCTCACAGGTACCA	CAG	0.48960364537292816		chr7	1	30544634	4	false
GCATTCACCTCAGGTACCA	CAG	0.4810321697485207		chr8	1	29202418	4	false
TCTGTCTTCACAGGTACTG	TGG	0.43797374999999994		chr8	-1	500876	4	false
CCTGCCACTCTCAGGTCCCG	GGG	0.43006620762711856		chr11	1	2882114	4	false
GATGCCACACACAGGTACCG	GAG	0.39180374999999999		chr19	1	16371345	4	false
ACTGTGACTCACAGGTACAG	AAG	0.3699931869452663		chr5	1	138195892	4	false
GCTTTGCCCCACAGGTACCG	GGG	0.3555098519021739		chr2	-1	240461368	4	false
GCTGTCAAGGACAGGTCCCG	AGG	0.3370396232259826		chr16	-1	9155135	4	false
GCTATCAGTACAGGTACAG	CAG	0.3271967326748704		chr1	1	84665786	4	false
GCTGTCACTCAGATACCA	CAG	0.3179867063414635		chr1	-1	21469409	3	false
TCAGTCACTCACAGGTCCCG	AAG	0.3096825809911243	ENSG00000187244	chr19	-1	44819486	4	false
ACTGTCAACCCAGGTACCA	TGG	0.3016536955464072		chr10	1	111031072	4	false
GCTTTGCCCCACAGGTACCA	TGG	0.30007956608606556		chr11	1	115812479	4	false
GGCCTCACTTACAGGTACCA	CAG	0.29496139039258484		chr3	1	36635670	4	false
ACGTCACCTCGCAGGTACCG	CAG	0.28241505	ENSG00000160789	chr1	1	156138667	4	false
GCTGCTACCCAGGTACCT	GAG	0.26962959375		chr8	-1	84208879	4	false
CCTATCACTCACAGGTACCC	TGG	0.267201845637584		chr3	-1	20939800	4	false
GTTGTCACTCACAGGTCCCG	AAG	0.26184375		chr9	1	126401369	4	false
TCTGTGCTCAGAGTTCGG	AGG	0.25748289175977657		chr19	-1	2763004	4	false
GCAAGTCTCACAGGTACAG	AGG	0.2444988459375		chr1	-1	172092532	4	false
CCTGTCACTCACAGGAACAG	GAG	0.2433617021276596		chr16	1	19851550	3	false
GGTGTCACTTACAGTACCT	CGG	0.2195679166167665	ENSG00000167123	chr9	1	128434413	4	false
CCTGACCTCACAGGACCG	TGG	0.21911426701570688		chr7	-1	4789078	4	false
GCAGTGACTCACAGGTCCCG	AGG	0.2119132299864131		chr1	1	229024836	4	false
GCAGTCACTGACGATACCC	CAG	0.20898550454306364		chr19	1	43352415	4	false
TCTTCACTCACAGGTAACCT	TAG	0.20361555944055942		chr7	-1	21291314	4	false
CCTGTCACTCCAGGTCCCG	AGG	0.19963997936320751		chr18	1	48667823	4	false
CCTGTCACTCACAGTACTT	GGG	0.19524901616379306		chr4	-1	1715143	4	false
GCTGTCACTCACAGTACCG	GGG	0.1806661568627451		chr6	-1	157228426	3	false
TTTGTCACTCACAGGACCA	AAG	0.17868304195804202		chr12	1	111066498	4	false
GCTGTCTGCAGATACCG	AGG	0.16954450500000004	ENSG00000198597	chr19	-1	30548594	4	false
GCTGTCACTCCAGGACCG	GGG	0.16919216417910451		chr19	1	5316904	4	false

GCGGTCACTCAGAGTCCCC	TGG	0.16037902616618502	chr20	1	63547614	4	false
GTTGTACACACAGTCCGG	AGG	0.15807052488772455	chr16	-1	17228706	4	false
GCTGTCACTCATAGATACCA	CAG	0.1575709031674208	chr1	-1	152019351	3	false
ACTGTCAACCCAGATACCT	GAG	0.15299238254716982	chrX	1	126579140	4	false
GCTGTGCGCTAACGGTGCCG	AGG	0.15246241215025688	chr16	-1	55016624	4	false
GCTTTCTCACACAGGTAACG	AGG	0.14791309758883245	chr2	-1	3466847	4	false
GAAGTCACTCACATGTACCC	AAG	0.1408064058870968	chrX	1	145098402	4	false
GTTGGCACTCACAAAGTACCC	AAG	0.13921308962264153	chr15	1	60136233	4	false

Ezh2

gRNA1_Exon3								
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
CTGAAGCCTCAAACCAAGAG	AGG	3.350283227848102	ENSG00000102317	chrX	1	48576005	2	false
CTGA AACCTGAAACCAAGAA	AGG	3.31685590909091		chr2	1	130288968	2	false
CTGAGACCTTAAACCAAGAG	AGG	2.314545454545455		chr12	-1	5312292	2	false
TTGACATCTTAAACCAAGAG	AGG	1.8251758087201129		chr3	1	168053317	3	false
CTGAAATGTCAAACCAAGAG	GGG	1.5264134099616862		chr11	-1	43109495	3	false
GTAAACTTAAACCAAGAG	AGG	1.463858653846154		chrY	1	16375110	4	false
GTA AACTTAAACCAAGAG	AGG	1.463858653846154		chrY	-1	16210234	4	false
TTCAAACATAAAACCAAGAG	TGG	1.463858653846154		chr4	1	37030949	4	false
GTGTTACCTGAAACCAAGAG	AAG	1.4327783842794761		chr1	-1	199720942	4	false
CTTGAACTTAAACCAAGAG	CAG	1.3766500531914896		chr3	-1	96942767	4	false
CGGAAATCTTAAACCAAGAA	TGG	1.2792929078014186	ENSG00000106462	chr7	-1	148846542	3	false
ATGAACCCCTAAACCAAGAG	CAG	1.0593431372549018		chr5	-1	142841930	3	false
TAGAAATATTAACCAAGAG	GAG	1.0442864806866952		chr9	-1	71306419	4	false
ATAAAAAATTAACCAAGAG	TAG	1.02090335106383		chr7	1	41654397	4	false
CTGAGAGCTTCAAACCAAGAG	AGG	1.0129725738396624		chr2	1	167988947	3	false
ATGGAATCTAAACCAAGAG	GAG	0.9959847500000002		chr1	1	20793659	4	false
CTGAAAAAATAACCAAGAG	AGG	0.9825213135068154		chr13	1	92063580	3	false
GCGAAACTATAACCAAGAG	TAG	0.9674166666666668		chr3	-1	60050379	4	false
CTGTTATTTTAAACCAAGAG	TGG	0.9467655642023346		chr9	1	30974266	4	false
ATTAACAGTAAACCAAGAG	CAG	0.9454686674008809		chr2	-1	19236395	4	false
CTTTAACTTAAACCAAGAG	AGG	0.9323173704113926		chr1	1	61400042	4	false
GTGCAACCGAAACCAAGAG	GAG	0.9071172794117647	ENSG00000255874	chr13	1	110867313	4	false
TTGTATCCTGAAACCAAGAG	AGG	0.874468199339207		chr10	-1	67513843	4	false
CTGAAACAGTAAACCAAGAT	AGG	0.853783597883598		chr11	1	129858349	3	false
CAAATACCTTAAACCAAGAT	AAG	0.8466847543352602		chr14	1	68715815	4	false
CCTGAACCTTAAACCAAGAA	TGG	0.8370083571428572		chr14	-1	60625497	4	false
CACAAACCTGAAACCAAGAT	CAG	0.8276369445552147		chr6	1	25818586	4	false
CTTAATCTTCAAACCAAGAG	CAG	0.8189339803870291		chr15	1	92115995	4	false
CTGAAAAATTAAGCAAGAG	TAG	0.7214824626865673		chr4	1	185241686	2	false
ATGAGACCTAAACCAAGAG	TGG	0.7057033868715085		chr16	1	3279796	4	false

CCAAAACCTGAAACCAAGGAG	CAG	0.6881348815607735		chr18	1	62950717	4	false
CCAAAACCTCAAAACCAAGGAG	AGG	0.6881348815607735		chr2	-1	240935170	4	false
ATGTAACCTTTAAGCCAAGAG	TGG	0.6725304878048782		chr10	-1	94023524	4	false
CTGAAATCTGAAACCAAGGG	AAG	0.6639898333333334		chrY	1	13027624	3	false
TAGTAACCTTAAACCAAGGG	TGG	0.6486632947976878		chr1	-1	185288953	4	false
TTCAAAACCTCAACCAAGAG	TGG	0.6136005509792627		chr8	-1	39453245	4	false
CTGAAGCCTCAAGCCAAGAG	AGG	0.5963796746724893		chr11	1	3291500	3	false
CTGAAGCCTCAAGCCAAGAG	AGG	0.5963796746724893		chr11	1	3219501	3	false
ATGAAAACCTAAAACCAAGAA	TAG	0.566353146477273		chrX	-1	113729094	4	false
CTAGATGCTTAAACCAAGAG	CAG	0.5647740620136187		chr3	1	113595860	4	false
CTGCTGACTTAAACCAAGAG	AAG	0.5555012971698113		chr2	1	196428901	4	false
CAAAAACCTTAAACCAAGAC	CGG	0.5424067793181819		chr20	1	7799205	4	false
CAGAAATCTTAAACCAAAAG	GAG	0.5400195329087049		chr1	-1	208223941	3	false
CTGACCTTAAACCAAGAG	CAG	0.5358830991847826		chrX	1	95845530	4	false
GTGAAACCTTAAACCAAGAA	AGG	0.5321714285714286		chr17	-1	52008873	3	false
CAGAAACTGTAAACCAAGAG	TGG	0.5275378002183405		chr5	1	15369063	4	false
CTGAAAAGGAAACCAAGAG	AGG	0.516690579268868		chr11	-1	85461239	4	false
CTGAAATAAAACCAAGAG	AAG	0.516690579268868		chr4	1	38415175	4	false
CTGAAAGAGCAACCAAGAG	TGG	0.516690579268868		chr9	1	96563059	4	false
GTGAAGCTTTATACCAAGAG	GGG	0.49321569767441853		chr8	-1	19719656	4	false

gRNA2_Exon3

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
TTAATCATCTATTAAGGGA	TGG	1.2441624365482233		chr2	-1	155523513	3	false
AAAAATGTTCTAGTAAGGGA	AAG	1.0180700836820085		chr4	-1	23584926	4	false
AAAAATCCCTGGTAAGGGA	GAG	0.9664345177664975		chr11	-1	128609389	3	false
GTAATACCTCTAGTAAGGGA	GAG	0.8655873493975903		chr3	1	94196701	4	false
TAAAATCCTCTAATAAGGAA	GAG	0.8155616197183098		chr20	1	34180536	2	false
TCAAAGCCTCTAGTAAGGCA	AAG	0.8100503355704697		chr15	-1	75773621	3	false
AAAACCTCATTAATAAGGGA	GGG	0.666032608956522		chr5	1	167377095	4	false
TTAGATCATCTAATAAGGGA	GAG	0.6534063981042654		chr11	-1	65001633	4	false
TCATTTCTCTAATAAGGGA	GGG	0.6353398617511521		chrX	-1	152247433	4	false
TGGACTCCTCTAATAAGGGA	GAG	0.6322725		chr2	1	136417570	4	false

TACAATCATATAGTAAGGGA	AGG	0.6322457541243656		chr1	1	14071136	4	false
AAACATTCTCCAGTAAGGGA	GGG	0.6166297089041096		chr2	1	88103214	4	false
TATGATCATCTAGTAAGGGA	CGG	0.6113131906077346		chr22	-1	33101228	4	false
TACCATGCTCAAGTAAGGGA	AGG	0.5764126387987013		chr14	-1	22649585	4	false
TATCATCTTTAGTAAGGAA	GAG	0.5757430519067795		chr8	1	136873107	4	false
AAAAATCTTAAGTAAGGGA	AGG	0.567915961900685		chrX	-1	79170341	4	false
GAAAATGCTATAGTAAGGCC	AAG	0.566353146477273		chr3	1	116688713	4	false
TAAATCATTTAATAAGGGA	CAG	0.5593705671806168		chr16	-1	47154010	4	false
AGAAAAGCCTCAAGTAAGGGA	AAG	0.5512435195852533	ENSG00000177570	chr8	1	118190639	4	false
GAAAATCCTCTAATAAGGAA	GAG	0.547563829787234		chr20	-1	8815311	3	false
GAAAATACTGTTAAGGGA	CAG	0.517631510915493		chr18	-1	32074998	4	false
TCTAATCCTCAAGTAAGGCC	CAG	0.504934389363354		chr11	-1	35629228	4	false
TACAGGCCTCAAGTAAGGGA	TGG	0.5018943231382978		chr10	1	101309709	4	false
CAAAAGTCTCTAGTTAAGGGA	CAG	0.4896153846153846		chr17	1	33982942	4	false
TAAAATATCTAGTAAGGGA	CAG	0.4853767810880831		chr14	-1	41379405	4	false
TAATGTCCTCAAGTAAGGGT	CAG	0.46581197033898303		chr7	1	84367124	4	false
GAAGATCCTGTAGTAGGGA	GGG	0.4652511904761905	ENSG00000112902	chr5	1	9040683	4	false
GAAAATGCTCTAGTAGGGA	GGG	0.45091797979798		chr8	1	127988840	3	false
CAACATGCTCTAGTAAGGCA	CAG	0.44821874999999994		chr14	1	47682511	4	false
TAATCCTCGGGTAAGGGA	CAG	0.432345		chr3	1	15299817	4	false
TAACTACTATAGTAATGGA	GAG	0.4292396963619404		chr11	1	41700905	4	false
TAAAATCAAGCAGTAAGGGA	AAG	0.4198583770047169		chr5	1	143060092	4	false
TAAAAGCTTATGTAAGGGA	AGG	0.398629005612245		chr13	-1	79354023	4	false
TAAAATGTTAGTAAGGGA	AAG	0.39039447497171953		chr14	1	27129185	4	false
GAGAATCCTCTGTAAGGGA	AGG	0.38910025000000004		chr4	1	4340960	4	false
TAAGATACTTACTAAGGGA	AGG	0.3854460982500001		chrX	1	147917241	4	false
AAATATCCTCCAGTAAGGGA	GAG	0.38209451687116547		chr3	1	176698076	4	false
TCAGATCCTCTAGTAAGGG	AAG	0.3787692466887418		chr18	-1	42874739	4	false
TAAATCTTCAAGTAATGGA	AAG	0.36773777173913036		chr11	-1	28742350	4	false
TGAAATCCTCAAGTAATGGA	AAG	0.36325441952720205		chr4	1	29210999	4	false
GTAATCCTCTGTAAGGTA	AGG	0.3516664012738853		chr2	-1	82013226	4	false
CTAAATCCTCTTAAGGGA	GAG	0.35145816062176166		chr2	-1	233237072	4	false
TAAATCTACTAGTAAGGTA	GAG	0.3445510364321608		chr7	1	108028988	4	false

TAATATCTCAACTAAGGGA	GAG	0.34007624999999997		chr6	1	134431707	4	false
CAAACTCTCTGGTAAGGGA	AAG	0.33376156278801844		chr13	-1	94965469	4	false
AAAAATCATCTGTAAAGGCA	AAG	0.32669600591715975		chr9	-1	11373494	4	false
TAAACTCATTAGTAAGTGA	TGG	0.3167922413793102		chr15	-1	33014881	4	false
TTAAATCCTTTATTAAGGGC	TAG	0.3096459562500001		chr8	1	107076298	4	false
GAAAATTCCTAGTAAAGGA	AGG	0.30938965489864867		chr14	-1	95803202	4	false
AAATATCCTGTAGTAGGGGA	AAG	0.3083840163934427		chr20	1	8587059	4	false

II11

gRNA1_Exon2									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
CAGTTCTAGTCGTTGCCCT	TGG	1.002692848020434		chr4	1	186192190	3	false	
CGGGGAGAGTGTGGCCCT	GAG	0.863400655021834	ENSG00000260063	chr1	1	26693994	4	false	
CAGACACAGTCGCTGCCCT	AAG	0.7574809954751132	ENSG00000126243	chr19	1	35993545	3	false	
CATCTAGAGTCGTTGCCCT	TGG	0.741790707070707	ENSG00000111785	chr12	-1	106842676	3	false	
CAGAAAGGGCGTTGCCCA	GGG	0.7163366819371728		chr3	1	52289907	4	false	
CAGACACAGCCCTTGCCCT	TGG	0.46521313006329124		chr5	-1	55495382	4	false	
CATATAGTTTCCCTGCCCT	TGG	0.46110795917030567		chrX	-1	65739215	4	false	
CACAGAGAGTGATTGCCCT	TGG	0.43797140753424646		chr6	-1	64243199	4	false	
CAAATAGTGCAATTGCCCT	CGG	0.4118081117142857		chr9	1	128397656	4	false	
CAGTTAGAGCGTTGCCCT	TGG	0.38124550053191486		chr8	-1	74091769	4	false	
CATATAAAATGGTTGCCCT	TGG	0.3491650482947961		chr2	1	76467090	4	false	
CAAATTGAGGCGCTGCCCT	GGG	0.34905834399971203	ENSG00000153815	chr16	1	81697781	4	false	
GAGAAAGAGTCACTGCCCT	GAG	0.34086143216080406		chr4	1	134562575	4	false	
CAGATGGGACGCTGCCCT	TAG	0.32142743449267785		chr13	1	60396251	4	false	
CACATGGAATGGTTGCCCT	GAG	0.3119675168303571		chr18	-1	13245145	4	false	
CATAAAGAGTCATTGCCCT	TAG	0.31107806999999999		chr12	1	92065963	4	false	
CAGAGATAATCCTTGCCCT	GGG	0.3060440839958159		chr12	-1	106271755	4	false	
CAGATGAAGGGGTTGCCCT	TAG	0.30219287298004516		chr4	1	819797	4	false	
CAGATACCCCTTGCCCT	CAG	0.2891088382411068		chr1	1	206857789	4	false	
CAAGTAGAGTTGTTGCCCT	AGG	0.26254665452261305		chr12	-1	83479820	4	false	
TAGATATAGTCATTGCTCT	CAG	0.25748289175977657		chr3	-1	64288572	4	false	
CAGCCAGAGTGTTGCCCT	GAG	0.2559836956521739		chr11	-1	61628257	4	false	
GAGTTAGAGTCTTTGCCCT	TAG	0.2539118918918919		chr4	1	21303264	4	false	
AAAATAGAGTCATTGCCCT	TGG	0.25309326885245903		chr11	1	31288515	4	false	
CAGATACTCGGTTGCCCT	TGG	0.23293288125		chr19	1	30303836	4	false	
AATATAGAGTAGTTGCTCT	TAG	0.22880439970059868		chr15	1	58890703	4	false	
AAGATAAAGTCCTTGCCCT	AAG	0.22580562799401196		chr14	1	76886969	4	false	
AAGATAGAGTGTTCACCT	GAG	0.2002774632352941		chr4	-1	126982651	4	false	
CAGACTGAGTCGTTGCCCA	TGG	0.20001424584537575	ENSG00000255874	chr13	1	110869882	4	false	
CAGACATAGTCCTTGCCCT	TGG	0.19743214594240832	ENSG00000279184	chr22	-1	35174014	4	false	

CAGAGAGAGCCCTCCCCCT	TGG	0.19575917511312219	ENSG00000206262	chr3	1	138952263	4	false
CAGACAGAGCCCTCCCCCT	AAG	0.19575917511312219		chr9	-1	76964984	4	false
GAGAGAGAGTTGTTGCCCT	GGG	0.18583401639344263		chr18	1	12190230	4	false
GAGAGAGAGTTGTTGCCCT	GGG	0.18583401639344263		chr18	-1	10639383	4	false
CAGAGAGGTTGTTCCCTCT	GGG	0.18471293969849248		chr12	-1	113940302	4	false
CAGATAGTACTTCCCCCT	CAG	0.18101580627615063		chr14	1	65625357	4	false
CAGATACGCCCTGCCCCG	GAG	0.17992278690699634	ENSG00000244005	chr20	-1	35698541	4	false
CAGAGAGAGAGTTGCCACT	CGG	0.17410437987804872		chr7	1	47188779	4	false
AAAATAGAGTCTTGGCCCT	TAG	0.16793919661016954		chr10	1	74011923	4	false
CGGATTGAGTCTTCCCT	GAG	0.1457389153846154		chr12	1	124681580	4	false
CAGATCTCTGCTTGCCACT	TGG	0.1367428311611374	ENSG00000139266	chr12	-1	57758232	4	false
AAGATAGAGATGTGCCCT	CAG	0.13235486021341464	ENSG00000182179	chr3	-1	49809347	4	false
AAGATAGAGTCTGTGCCCT	TAG	0.12209656499999996		chr10	1	114647368	4	false
CAGATACAGTTTTGCTCT	AAG	0.11470689633127802		chr10	1	10453391	4	false
CAGCTAGAGGCATCGCCCT	CAG	0.1088362578054299		chrY	-1	5001050	4	false
CAGCTAGAGGCATCGCCCT	CAG	0.1088362578054299		chrX	-1	91780129	4	false
CAGATAGTCTTCCCCCT	GGG	0.10817594813278006		chr7	-1	144950363	4	false
AAGATAAGTCTGCTGCCACT	AAG	0.10793107499999999		chr2	-1	208096698	4	false
AAGATAGAGTAATGCCACT	AGG	0.10533930662983422		chr3	-1	17413130	4	false
CAAATAAGTCTTGTCCCT	GAG	0.10305755034213201		chr5	-1	166633888	4	false

gRNA2_Exon4

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromosor	Strand	Position	Mismatches	On-target
GCAGACATTGTACATGCCTG	GAG	3.8365384615384612		chr7	-1	155429745	2	false
GCATGCAGTTTACATGCCGG	AGG	1.3502314814814813		chr7	-1	91201663	4	false
GGAACCAATGTACATGCCGT	CAG	0.8790310650887576		chr5	-1	139020736	4	false
TCAGCCATTTTACATGCAGG	AAG	0.7672939597315435	ENSG00000097033	chr1	-1	86728471	3	false
GCAGGCAATAAATCGCCGG	GGG	0.7432610969387754		chr7	-1	156071620	4	false
TAAGCCATTTTACATGCCAG	AGG	0.6419470108695652	ENSG00000120885	chr8	1	27599410	4	false
ACAGGCTTTGACATGCCGG	AGG	0.6110493495475113	ENSG00000160957	chr8	-1	144512856	4	false
ACAACCATGAACATGCCGG	GGG	0.5618890988372092		chr10	1	109244985	4	false
GCAGTCACTTACATGCCAG	TAG	0.5246368972081217		chrX	-1	40646382	4	false
GCTGCAATGTACATGCCGA	AAG	0.4950740771648045		chr22	-1	47030794	4	false

GCTTCCAGTGTACAGCCGG	GAG	0.45921146341463426		chr16	1	11093462	4	false
ACAGCCATTCTCCATGCCGT	CAG	0.4030873693113774		chr12	-1	64261467	4	false
AGAGACATTGTACATGCCTG	AAG	0.3944915254237288		chr12	-1	3928824	4	false
TGAGCCATTGCACATGCCTG	GGG	0.39170695754716967		chr10	-1	118512619	4	false
CCAGACATTGACATGCCTG	TGG	0.37746306818181813	ENSG00000092203	chr14	1	21487629	4	false
GCAGTCACTGACATGTCGG	AGG	0.36773777173913036		chr20	1	57671272	4	false
GCAGCAATGGAACATGCCGG	CAG	0.3007725289351851		chr10	1	76034527	4	false
GCAGCCACATACATGCCAG	AAG	0.2910090756048387		chr4	1	10093831	4	false
AGAGCCATTGTAGATGCCTG	GGG	0.280184879032258		chr19	1	33347643	4	false
ACAGCCACTGCACAGCCGG	TGG	0.27173653846153845		chr10	1	15345587	4	false
ACAGCCACTGCACAGCCGG	TGG	0.27173653846153845		chr10	1	15343698	4	false
GTTGCCAGTACTCCGCCGG	TGG	0.2578232142857143	ENSG00000239809	chr17	1	62381869	4	false
TCAGCCATGAAAAATGCCGG	TAG	0.22369369602272723		chr3	-1	24683730	4	false
GCAGCCACCGTACATGCCGG	CAG	0.21795747124352324	ENSG00000104825	chr19	-1	38907499	4	false
GCAGCCCTGACATGCCTG	GAG	0.20549855298913036	ENSG00000137106	chr9	-1	37429939	4	false
GCTGCCATGGAACATGCCAG	AAG	0.20281721118749987		chr16	-1	75195648	4	false
ACAGCCATGGTCTATGCCGG	GAG	0.20021739456521737		chr9	-1	1891955	4	false
TCAGCCACTGTCATGCAGG	TGG	0.19630799999999995		chr6	1	43877242	4	false
ACAGCCATTTTTCATGCTGG	AGG	0.17675945195530723		chr6	1	47812200	4	false
GCAGCCCTGTAATGCCCTG	TGG	0.16523450512817797		chr2	-1	19028837	4	false
GCAGCCACTAACATGCAGG	TGG	0.16005111154708515		chr2	-1	95043262	4	false
GCAGCCAGTGTACCTGCCTG	CAG	0.15089086294416243		chr1	1	228062261	3	false
ACAGCCAGTGTACATGCAAG	CAG	0.14009474522292986		chr6	-1	161858300	4	false
GTAGCCATTGTACATGCAAG	AGG	0.14009474522292986		chr5	1	57768758	4	false
GCAGCCTGGGACATGCCAG	CAG	0.12435808845170451		chr11	-1	79601195	4	false
TGAGCCATTGTACAGGCTGG	AGG	0.11919171974522291		chr21	1	43478808	4	false
TGAGCCATTGTACAGGCTGG	AGG	0.11919171974522291		chr21	-1	6059756	4	false
GCAGCAATGGCAGTGCCTG	TAG	0.11341198634159474		chr2	1	182753423	4	false
GAAAGCAATGTACTGGCCGG	GGG	0.11167366803278689		chr13	1	100525761	4	false
GCTACCATTGTACAAGCAGG	AAG	0.10665385317919075		chr16	1	81701499	4	false
CCAGCCACTGTACTGCCAG	AGG	0.10133693181818182		chr5	-1	6657419	4	false
GCAGCCATCCAAATGCCAG	AAG	0.09779195940735129		chr7	-1	8670126	4	false
GCAGCCATGCCACATGCCAG	TGG	0.09522901354421394		chr1	1	34946448	4	false

GCAGCCATTCTGCATGACAG	CAG	0.08858467896210406		chr13	1	48520275	4	false
GCAGACATGGTACATACCGT	CAG	0.08625454930939229		chr12	-1	103755719	4	false
GGAGCCATTGAACATGTAGG	CAG	0.08429297669491524		chr12	-1	5740740	4	false
GGAGCCATTGAAGATGCAGG	GGG	0.08106682499999998		chr18	-1	55149436	4	false
TCAGCCATTGCCATGTGGG	GAG	0.07645232080924855		chr9	1	133247248	4	false
GCAGCCATTGTACATGGGGA	CAG	0.0763562681992337	ENSG00000162761	chr1	-1	165202336	3	false
GCAGCCAGTGTTTCATGCTGA	CAG	0.071271523880597		chr1	-1	108029269	4	false

Hgf

gRNA1_Exon5									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
ACAGTATCTACTCAAGAG	TGG	4.030448591549296	ENSG00000019991	chr7	-1	81757240	2	false	
AGTGTATCCCTCACTAAGAG	AGG	2.602415384615385		chr2	-1	153356458	3	false	
GAGGTATCCATCACTAAGAT	TGG	1.9857142857142858		chr11	-1	92928238	3	false	
ACTTTATCCATACTAAGAG	AGG	1.4424300469483569		chr3	1	60014713	3	false	
CAGGAAACCATCACTAAGAG	GAG	1.0013117283950617		chr1	-1	25254232	4	false	
AGGGTATGCATCACCAAGAG	TGG	0.9377532228360957		chr8	-1	93425393	3	false	
AGGGATCCATCACTAAAAG	AAG	0.7906581740976644		chr13	-1	36133824	3	false	
ATGCCATCCATACTAAGAG	CAG	0.7859865470852018		chr2	1	9601633	4	false	
ACTGCATACACTAGGAG	AGG	0.6935182692307693		chr6	-1	121482818	4	false	
ACGGCATCCATGACTACGAG	AGG	0.6347407407407407		chr2	1	170158722	3	false	
AGTCTATCCATCTCTAAGAG	GGG	0.6264451036866361		chr20	-1	32521288	4	false	
ACATTAACCATGACTAAGAG	AAG	0.524608202		chr3	-1	96900234	4	false	
ACTCTCTCCAGCACTAAGAG	TAG	0.5062024289163088		chr18	1	75386302	4	false	
CCTCTATCCATCACAAGAG	CAG	0.4730570351758795		chr10	-1	114519694	4	false	
AGGATACCCATCACTAAGGG	AGG	0.4330248940677966		chrX	1	149009590	4	false	
TCCGTATCCAACACTAAGGG	AAG	0.38142525815217376		chrX	1	133368449	4	false	
AGGGTCCATCACTAAGGG	AAG	0.37509582182320433		chr1	1	47413163	4	false	
ATGGAATCCATACTATGAG	CGG	0.3728225138121547	ENSG00000164941	chr8	1	94875965	4	false	
ACAGTGCCTATCACTAAGAG	GAG	0.3590476786875		chr2	-1	58420956	4	false	
ACGATAACTAACACTAAGAG	AAG	0.3452326557269874		chr11	1	36507044	4	false	
CCGGCATCCATCACAAAGAC	CAG	0.2636627483443709		chr10	1	21287147	4	false	
AGGGTAACATCACTAAGGG	CAG	0.2616220291550279		chr1	-1	58149469	4	false	
ACAGTATACAGCACAAAGAG	AAG	0.2523999239130434		chr15	-1	50738716	4	false	
ACTGTAGGCATCACTAAAAG	TAG	0.2436414940414508		chr14	-1	61408355	4	false	
ACAACATCCATCAGTAAGAG	TAG	0.24118945852534568		chr12	-1	66375717	4	false	
ACATTATCCATGACCAAGAG	GGG	0.23510694517766498		chr12	-1	123702453	4	false	
TAGGTATCCATCGCCAAGAG	AGG	0.20641801675977656		chr1	1	108015817	4	false	
ACCATATCCATCACATGAG	AAG	0.20247633938547488		chr1	1	177683235	4	false	
ACTGCATCCATCACGAGGAG	AAG	0.20023903176795582		chr1	1	30028735	4	false	
AGAGTATCCATGACTAATAG	TGG	0.19808739999999999		chr8	-1	138461159	4	false	

ACTGTTCCATAGCTAAGAG	AGG	0.1899693894612676		chrX	1	14319460	4	false
AGGGGCTCCATCACTCAGAG	TGG	0.18628831658291461		chr8	1	12651042	4	false
ACAGTCCCATCACAAAGAG	AAG	0.18435724310545026		chr2	1	2456369	4	false
ACTGTCTGCATCACTTAGAG	GAG	0.1800609642857143		chr13	1	52154604	4	false
ACCATAACCATCAATAAGAG	AGG	0.1678259663732395		chr3	-1	168472474	4	false
ACAGCATCCATCACTTAGAA	TAG	0.15648417111801247		chr5	1	149939505	4	false
ACTGCATCAATCATTAAAGAG	AAG	0.15155728311611374		chr12	-1	24758990	4	false
ATGGTATCCATCTCTAGGAC	CAG	0.13097123354289944	ENSG00000232409	chr2	1	208516989	4	false
AACGTATCCATCACTTAGGG	CAG	0.12121912261146499	ENSG00000061455	chr5	-1	123189155	4	false
AAGGGATCCATCACTGAGGG	AAG	0.1198858695652174		chr17	1	62746518	4	false
ACGGTTTCCAGTACTAGGAG	GGG	0.1044165474798387		chr5	-1	109652943	4	false
ACTGTTTCCACCACTGAGAG	TAG	0.10297750528553301		chr6	-1	73178519	4	false
ACGGTATTCTTAAATAAGAG	AAG	0.09817474683673473		chr3	-1	102253292	4	false
AAGGAATCCATCACACAGAG	AGG	0.09072762430939228		chr2	-1	219952166	4	false
ACGGTTTCCCTCACAAAGGG	CAG	0.08506462651332487		chr13	-1	71621789	4	false
AGGGTATCCAGAACTTAGAG	GGG	0.08407915326633168		chr1	-1	63895946	4	false
ACTGTATCCCTCACCAGAG	GGG	0.07569870203147211		chr10	1	4121270	4	false
ACTGTATCCATCCCAATGAG	AGG	0.07119869775761423		chr4	1	54375373	4	false
ACAGTGTCCATCAATAGGAG	AAG	0.06589651272466217		chr8	-1	53379909	4	false
ACGCTCTCCATCATATGAG	GAG	0.06473272333115185		chr20	-1	49205226	4	false

gRNA2_Intron(Exon5)

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
TTCTAACTAAGTTGACCAG	GAG	1.6099119549929672		chr3	1	156146143	3	false
GTTTCAACCAAGTTGACCAG	TGG	1.0180700836820085		chr10	-1	132937700	4	false
TTTCAACACAGCTTGACCAA	GAG	0.8276254777070065		chr20	-1	21221570	3	false
TGACAGCACAGTTGACCAG	CAG	0.8205166505791508		chr7	1	139873211	4	false
AGTCAACACAGTTTGACCAG	GAG	0.8152325581395349		chr7	-1	86211539	4	false
TTTGAACGCGTGTGACCAG	TGG	0.761920371338912	ENSG00000119929	chr10	1	99747330	4	false
TTTTAACCTGGTTTACCAG	TGG	0.6826393013100438	ENSG00000213959	chr20	-1	38615354	3	false
TTTTACCTCAGGTGACCAG	CGG	0.6475349344978166		chr19	-1	45137203	3	false
TATTAACACAGTGTGACCAG	GGG	0.6121279187817259		chr12	1	131526734	3	false
CTTCAAACATGTTGACCAG	AAG	0.6110493495475113		chrX	1	149145586	4	false

Liite 1
12 (18)

TTAGAAAACAGGTTGACCAT	GGG	0.5652170841101696		chr3	1	60162509	4	false
TATTATCTAAGTTGACCAG	GAG	0.5510024843096233		chr16	-1	13845536	4	false
TTTGACTACTGGTTGACCAG	TAG	0.5489005024038461		chrX	-1	15394932	4	false
TTATTACAAAAGTTGACCAG	AAG	0.5201522710152837		chr3	-1	162698671	4	false
CTTTTACACAAGTTGACCAC	AGG	0.5185454009433962		chr5	1	140302090	4	false
TTGTTCCACAGGTTGACCAA	AAG	0.48960364537292816		chr1	-1	106057353	4	false
TTGAAAGACAGGCTGACCAG	AGG	0.4239545902397261		chr7	1	42077160	4	false
CTTTAACACTTCTTGACCAG	GAG	0.41286955126728103		chr15	-1	38186289	4	false
TTTCTGCACAGGTTGAGCAG	GAG	0.40477820121951225		chr20	1	55656228	4	false
TTCAAACACAGGTTGAACAG	GGG	0.40136906249999993		chr11	1	56582727	4	false
TATTAAGTGAAGGCTGACCAG	AGG	0.3881926555299539	ENSG00000126351	chr17	1	40090105	4	false
GTTTATAAAAAGTTGACCAG	AGG	0.38274039374999996		chr4	1	76978471	4	false
TGTTAACACTAGTTGAGCAG	AAG	0.36325441952720205		chr12	1	22934196	4	false
TCCTAACACAGGTTGACCAC	AAG	0.3610598152070065		chr6	-1	149421528	4	false
TTGTGACACAGATTGAACAG	AGG	0.35580825000000005		chr4	-1	162763821	4	false
TTTATACACAGTTGAACAG	CAG	0.3496418393782384		chr16	-1	35406474	4	false
TTCTAAGAGATGTTGACCAG	AGG	0.3491650482947961		chr5	-1	27863408	4	false
TTTGCACACAGGTTGACAC	TAG	0.34663125000000006		chr20	1	56927232	4	false
TGTTGATACAGGTTCAACAG	AAG	0.3212286945812808		chr3	1	20691305	4	false
TTATGACACAGAATGACCAG	GAG	0.3169752845971564		chrX	1	151120579	4	false
TTTAAAAACAGGTTGACCAG	AAG	0.3144021138211383		chr12	-1	74744119	3	false
TTTTAAACACAGGATGAACAG	AAG	0.3143915634146342		chr1	-1	169320838	3	false
AGTTAACAGAGTTTACCAG	AGG	0.3119530748663102		chr9	-1	113257369	4	false
TTTTACGCAGGTTGACCAC	AGG	0.3107636148648649		chr12	1	124995442	4	false
TTGGAACCCAGGTTGGCCAG	AAG	0.30360376884422124		chr10	-1	50627980	4	false
TTTTAAGAGGTTGACCAG	TAG	0.2934064360848215		chr7	-1	54424428	4	false
TTTAAAAACAAATTGACCAG	CAG	0.290133702510917		chr4	-1	149823777	4	false
TTATAACAAAGTTGACCAG	TGG	0.28858284703891707		chr11	-1	66646685	3	false
TTGAAACACAGGATGATCAG	AGG	0.2859910174180328		chr11	1	41586681	4	false
TTTTAATACAGGTTGAACAG	AAG	0.27756361111111111		chr3	-1	90099798	3	false
ACTTAATACAGGTTGACTAG	GAG	0.27566748554913295		chr1	1	207838092	4	false
TTTAAACCCAGGATGAACAG	CAG	0.2694389276649746		chr10	1	128962791	4	false
TTTTCACTCAGGATGATCAG	AGG	0.26147521551724134		chr7	1	108684024	4	false
TTTGAAAACATGTTGAGCAG	TGG	0.261261979428392		chr1	1	185295863	4	false
TTTTAACAAAGGATGATCAG	AAG	0.2608873235294118		chr14	-1	26868279	3	false
GTTTAAACACAGATTGAACAG	AGG	0.25748289175977657		chr4	1	181039190	4	false
TTTTAGCCCATCTTGACCAG	AGG	0.24219326388888884		chr6	1	31316790	4	false
GTTTATCACAGTTGATCAG	TGG	0.23065496822033899		chr1	1	89838794	4	false
TCTTAACCAAGTTGACAAG	TAG	0.22814478609625663		chr6	1	133404443	4	false
TTCTAAACACAGGATGACCAA	AGG	0.22641406458750002		chr13	1	40010731	4	false

Met

gRNA1_Exon18									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
CTTCATGGTTCCTATAGGGC	CAG	1.4424300469483569		chr9	1	130683455	3	false	
TGCCATGCTCCTTATAGGGC	AGG	0.7952131773399015		chr14	1	102554249	4	false	
CTCITTTGTTTCATATAGGC	AGG	0.6823694029850746		chr15	-1	85112984	4	false	
TTACATGATTCACATAGGGC	TGG	0.6696482142857143		chr13	1	70849495	4	false	
TGCCCTGCTTCATATAGGAC	CAG	0.6562499999999999		chr2	-1	147684302	4	false	
CTCAATGCTTCATATAAGGT	TGG	0.6476337579617835		chr10	-1	19329843	3	false	
ATGAATGCTTCACATAGGGC	TGG	0.6442587085308057		chr13	1	93757824	4	false	
TTTCAATCTTCATATAGGGC	AAG	0.5973124853395062		chr8	1	8409922	4	false	
CTTTATTCTTTATATAGGGC	TGG	0.5764126387987013		chr3	-1	62533059	4	false	
CTCCCTGGTGCACATAGGGC	AGG	0.5449661748927038		chr19	1	5035210	4	false	
CTCCATGCTGAAAATAGGGC	AAG	0.480015672413793		chr1	-1	208414277	3	false	
CTACATTTTTCATATAGGC	CAG	0.46415191300251263		chr1	-1	175249600	4	false	
ATGCATCCTCACATAGGGC	CAG	0.45290758664634156		chr6	-1	45462995	4	false	
CTGCTGCTACATACAGGGC	AAG	0.42710059285714286		chr1	1	165530954	4	false	
TTCCATTCTTGATATAGGGT	TAG	0.34547530617331285		chr4	1	101070078	4	false	
TTTCATACCTCATAAAGGGC	TGG	0.3331424510362695		chr5	-1	4243036	4	false	
CTGTATGCTTCATATAGGCA	GAG	0.30156918749999995		chr9	-1	9398954	4	false	
CTCCCTACTTTATATAGGGG	TGG	0.3011362294451872		chrX	-1	28418235	4	false	
CTGCTGATTCATATTGGGC	AAG	0.3005828358208956		chr1	1	65340397	4	false	
CTCCGTGCTGGAGATAGGGC	TGG	0.29988213151595744	ENSG00000173452	chr7	-1	19772639	4	false	
CTCITTTGTTTCATATTGGC	AAG	0.29601449275362324		chr14	1	40268584	4	false	
CTTCCTGCTCATAAAGGGC	CAG	0.2805782041463415	ENSG00000066084	chr12	1	50747952	4	false	
CTCTATGCTTCATATACAGC	AGG	0.2762504816955684		chr14	1	65986630	3	false	
CTGCAGGGTTCATAAAGGGC	GAG	0.27250575		chr5	1	149619069	4	false	
CTCCATGATTCATAAAGGAC	TAG	0.27140101522842636		chr13	-1	86007561	3	false	
TTCCAAACTTCAAATAGGGC	TGG	0.26999732479265404		chr9	-1	18868614	4	false	
CTCCTTGTCCCATAGGGC	TAG	0.2681233580472103		chr11	-1	72738503	4	false	
ATCCATTCTCAAATAGGGG	CAG	0.2469593494103774		chrX	-1	3595757	4	false	
GTTCAAGCTTCATATAGTGC	AAG	0.2353260296610169		chrX	1	112057499	4	false	
TTCCATGCTTCATTAAGGC	CAG	0.23140870488322718		chr8	-1	139116427	3	false	

CTGCAAGCTTCTATACGGC	TGG	0.21298606541666665		chr11	1	64659156	4	false	
CTCCAGGAATCATATAGGTC	GGG	0.2023523025914634		chr5	-1	36488302	4	false	
CTCAATATTTTCATATTGGGC	AGG	0.19834514218009486		chr4	1	114539892	4	false	
CTCCTTCTCCATATGGGGC	AGG	0.18096060950704235		chr18	-1	67477158	4	false	
ATCCATGCTCATATAGAGG	AGG	0.17301148403225805		chr11	-1	25751620	4	false	
CTCCCTGCCTCGTATAGGCC	TGG	0.17299642499999995		chr1	-1	41740881	4	false	
CTCAATGCTTAAATAGGGT	AGG	0.17247380625000003		chr2	1	166472695	4	false	
CTCCATGTTTCATGATGGC	AGG	0.17056885758998436		chr1	-1	148172600	3	false	
CTCCATGTTTTCTATAAGGC	CAG	0.16354535207423582	ENSG00000237382	chr17	-1	18312814	4	false	
CCCCATGCTTCTGATAGGGA	AAG	0.16163259557142856		chr20	1	43348966	4	false	
CTCCATGTTAAATATAGTC	TGG	0.16005111154708515		chr1	1	90793683	4	false	
CTCCAAGCTCCTAATAGGGC	TGG	0.1581422977703975		chr5	1	139061993	4	false	
CTCCCTGCTCCTTATAGTGC	TAG	0.15586178275862067		chr1	-1	216749067	4	false	
CTAAATGCTTCGTATTGGGC	TAG	0.15562951727748695		chr3	-1	117477317	4	false	
CACCATGAATCATTAGGGC	TGG	0.15370921208530808		chr16	1	13483260	4	false	
TTCCATGCTTATATAGGAC	AGG	0.14532328125		chr3	-1	31598225	4	false	
CCCCATGCTTCATGAAGGGC	AAG	0.1397252302025783	ENSG00000259581	chr15	1	76259889	3	false	
CCCCATGCTTCATGAAGGGC	AAG	0.1397252302025783	ENSG00000092445	chr15	-1	41572501	3	false	
CCCCATGCTTCATTAGGGC	CAG	0.1397252302025783		chr1	1	143553027	3	false	
CTCCAGGCTGCAGATAAGGC	TAG	0.13885514265184862		chr17	1	34445795	4	false	

gRNA2_Intron(Exon18)									
Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target	
TCCCTCTCTTAAACATCCAT	CAG	2.73849765258216		chr8	1	103369933	3	false	
TCCCTCTCTGTAACATCCCT	GGG	1.414893617021276	ENSG00000111713	chr12	-1	21604561	3	false	
GCAATCTCTTAAACATCCAC	AGG	0.7889170875000002		chr2	1	160920578	4	false	
GCCCTGCTTGTGACATCCAT	GGG	0.7587662337662339		chr9	1	12185084	4	false	
TCCATCTATGAAATGTCAT	GGG	0.7577693370165746	ENSG00000197885	chr3	1	23891856	4	false	
CCCCTCTGTATATCCAT	GGG	0.6725304878048782		chr4	1	121781828	4	false	
ACCATCTGTGTAACATCCCT	CAG	0.664016272189349		chr8	-1	69962896	4	false	
GACATCTGTGTAACATCCCT	GAG	0.6412499999999998		chr5	-1	96924026	4	false	
GTCATCTCTAAACATCCCT	GGG	0.6044062499999999		chr11	1	7948203	4	false	
GCAGCCTCTAATCAATCCCT	GGG	0.5693101686452514		chr8	1	101129510	4	false	

Liite 1
14 (18)

CACGTTTCTGAAACATCCAT	CAG	0.5512435195852533		chr2	1	237743932	4	false
ACCGTCTTGGAAACATCCAT	TGG	0.5417316423766815		chr21	-1	23753786	4	false
GCCTCATCTGTAACATCCAA	GGG	0.480623161764706	ENSG00000107201	chr9	1	32456138	4	false
GCTGACTCTGAAACATCCAA	AAG	0.47540606249999995		chrX	1	100373979	4	false
GCATTCACCTGTAACATCCAT	GAG	0.47367297788461543		chr11	1	3608209	4	false
TCCTTCTCTGTGACATCCAG	GAG	0.47154629032258066	ENSG00000235820	chr20	-1	5535659	4	false
GACTTCTCTGTGACATCCAC	AAG	0.4539731366459627		chr17	-1	37723561	4	false
GCCTTCTCTGTAACATCCAC	AAG	0.4508203821656052		chr13	1	20668487	3	false
TCCTTTTCTGTAACATCCAT	TGG	0.44853800675675676		chr5	1	40377453	4	false
GTCCTCACTGTATCATCCAT	GGG	0.4420861795774648		chr9	1	74871149	4	false
TCCTTCTCTGAAACATACAT	AAG	0.43498124999999993		chr7	1	115446052	4	false
GCAATCTCTGTACATCCAG	AGG	0.43153544640718566		chr2	1	21251636	4	false
GCTGGCTCTGTGACATCCAG	TGG	0.4264285180473374		chr6	-1	41534652	4	false
GCAATCACTGTAACATCCCT	TAG	0.41296377356557373		chr15	-1	95076672	4	false
GCCTTCTGAGTAACATACAT	CAG	0.4087925304878049		chr14	-1	38874879	4	false
GTCATTTCTGTACCATCCAT	TGG	0.38795625		chr3	1	147666164	4	false
ACTGTCTCTTAACATCAAT	TGG	0.37519823343195263		chr2	1	83681549	4	false
GACCTCTCTGTATCATCCAA	CAG	0.3615803066037736		chr5	1	168860994	4	false
CCCTTCTCTGTTTATCCAT	CAG	0.3443219543147208		chr14	1	21892798	4	false
GCTCTCTGTACCATCCAG	AAG	0.3435538847727274		chr3	1	119364032	4	false
GCAGTCACAGTAACATCCAA	AGG	0.34148900556012574		chr19	1	16621532	4	false
GCCAGCTCTTAACATCTAT	TGG	0.33669541884816745		chr14	-1	98943402	4	false
GAAGTCTCTGTGCCATCCAT	CAG	0.33274519925373136		chr9	-1	120482198	4	false
GCAGTCTCTGAAACATCCAT	GAG	0.32934579005524867		chr2	1	105954705	3	false
TCTGTCTTTGTAACAGCCAT	CAG	0.32657918918918927	ENSG00000226921	chr13	1	113878520	4	false
GCTGCCCTCTGTCCATCCAT	TGG	0.3169752845971564		chr15	1	98609312	4	false
ACCGTCTATGTATCATTCCAT	GGG	0.29653334497206707		chr4	1	181237271	4	false
TCCATTTCTGTAACATCCAT	AAG	0.29321002538071067		chr1	1	67669386	4	false
GCAGTCTCTGTACAGCCAT	CAG	0.2919605922651934		chr8	1	96408367	3	false
GCCGTCTCTAAAACATCAAT	TGG	0.2871102895927601		chr17	-1	51945251	3	false
TCTGTCTGTAAACATCATT	TAG	0.2859017428691275	ENSG00000172667	chr3	-1	179021655	4	false
GCAGTTTCTGAAAATCCAT	CGG	0.285748972927242		chrX	-1	146285664	3	false
CCAGTCTCTGAAACCTCCAT	AAG	0.28241505	ENSG00000158023	chr12	1	121953829	4	false
GCCATATCTGTAAGATCCAT	TAG	0.27849674796747975		chr16	1	84994785	3	false
GCCCTCTCTGAAAATCCAA	AGG	0.2506426751592357		chr5	-1	173248911	3	false
GCAGTCAGTGAACATCTAT	AGG	0.2436414940414508		chr3	-1	43635421	4	false
GCCCTTTTGTAACTTCCAC	AGG	0.22750328571428574		chr5	1	51510878	4	false
GCCCTCTATTTAAAATCCAT	TAG	0.22121190610859728		chr7	1	111436272	4	false
GCCATCACTGTGTATCCAT	GAG	0.20963286549773755		chr11	1	134343911	4	false
GCCATCCCTGTGTATCCAT	TGG	0.20963286549773755		chr3	1	101817496	4	false

Axl

gRNA1_Exon17

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
TTCATGGCAGACATCGCCAG	TGG	1.0954971830985916	ENSG00000167601	chr19	1	41253643	2	false
ATGAGGGCTGACATTGCCAG	GAG	0.9211218347639482		chr10	-1	96479295	4	false
TTCATGGGTGACATTGCCAT	GAG	0.853783597883598		chr8	1	28744355	3	false
TCCATGGAAACATTGCCAG	AGG	0.8530762500000001		chr2	-1	13230637	4	false
TCTCTGGCCGTATTGCCAG	AAG	0.8513130458515282		chr6	-1	122734299	4	false
TGCAGGGCCCGCATTGCCAG	TAG	0.8239772341628957		chr1	1	116417685	4	false
TTAATGGTTACATTGCCAG	CAG	0.8201921074170124		chr11	1	123325045	4	false
TCCATGGCAACATTGCCAA	AGG	0.7908688222543354		chrX	-1	150842200	4	false
TTCAGGGACTCCATTGCCAG	TGG	0.7432610969387754		chr22	-1	19674860	4	false
GCCATGGCCACATTGCCAG	AGG	0.7301786488439308		chr9	1	12928949	4	false
TTTCTGGCCCAATTGCCAG	GAG	0.7267957952054795		chr4	1	124199988	4	false
TTCATGGTGGACATTGCCTG	CAG	0.6187538071065989	ENSG00000259581	chr15	-1	76259796	3	false
TTATGGTGGACATTGCCTG	CGG	0.6187538071065989	ENSG00000092445	chr15	1	41573046	3	false
TGCCTGGCCACCTTGCCAG	GGG	0.6134160326086957	ENSG000000265222	chr17	-1	32510660	4	false
TTATTGCCAGACATTGCCAG	CAG	0.6032362455246915		chr1	1	108679764	4	false
CTCCTGGCTGGATTGCCAG	AGG	0.5618890988372092		chr14	1	66272921	4	false
TTCTGGACTACTTTGCCAG	GAG	0.5593705671806168		chr2	1	80191136	4	false
TTCAAGTCTACCTTGCCAG	AGG	0.5449661748927038		chr21	-1	39652335	4	false
TGCCTGGCTGACATTGCCAA	AAG	0.5435201721556888		chr17	-1	81037500	4	false
TCCCTGGCTGACATTGCCAC	AGG	0.5435201721556888		chr19	-1	57932992	4	false
TTCACTCCACATTGCCAG	GAG	0.5358830991847826		chr7	-1	9963051	4	false
ATCAGTCCGACATTGCCAC	AAG	0.5318137943786984		chr8	1	76537958	4	false
TTCAGGGTTGACATTGCCAG	AGG	0.4890937499999999		chr1	1	55931196	4	false
TTCTGGCTCCCATTGCCAG	TAG	0.46166999961099575		chr1	1	168093089	4	false
ATCATGGCCTTATTGCCAA	CAG	0.4493211240754438		chr11	-1	131725136	4	false
TTCAAAGCTCATTGCCAT	TGG	0.4426539319852942	ENSG00000107611	chr10	-1	16904059	4	false
TTGATTGCCAAAATTGCCAG	AGG	0.4318242550930494	ENSG000000238189	chr13	-1	43459279	4	false
CTCATGGCTTACATTGCCAG	TGG	0.41273836213235293	ENSG00000100796	chr14	1	91473244	4	false
TTCTGGGCCACATTGCCAG	AGG	0.4089882558139535		chr17	1	20555942	4	false
TGCATGGCAACATTGACAG	TGG	0.39990711771373055		chr8	-1	52877687	4	false
TTCATGGTTACATTGCCAT	AAG	0.39619529440165885		chr1	1	218905731	4	false
TCCATGGCAGACATTCCAG	TAG	0.384729865125241		chr6	-1	103449305	3	false
TTAATGGCGCACATTGCCAG	AGG	0.3824197220436558		chr14	-1	46828807	4	false
CTCATGGCCAGCATTGCCAG	GAG	0.3749096415441176		chr20	1	1037129	4	false
TTCATGGCCACATTGCCGC	TGG	0.3737530317073171		chr5	-1	66300101	3	false
TCCATGCCAGGCATTGCCAG	CAG	0.3634828401707048		chr2	-1	76821626	4	false
TTAATCACAGACATTGCCAG	AGG	0.3590476786875		chr5	-1	91517515	4	false
TTCTTAGCCAACTTTGCCAG	AGG	0.34448949257287004		chr14	-1	49441079	4	false
TTCTTGGCCAGCTTTGCCAG	AAG	0.30773930526746723		chr22	1	15643873	4	false
TTCTTGGCCAGCGTTGCCAG	TGG	0.30773930526746723		chr1	-1	32744048	4	false
TTCTTGGCCAGCTTTGCCAG	AAG	0.30773930526746723		chr14	-1	19480450	4	false
TTCTTGGCCAGCTTTGCCAG	AAG	0.30773930526746723		chr14	1	18921498	4	false
CTCATGGCCACATTTCCAG	GAG	0.29546740837696345		chr15	1	93830822	4	false
TTCAGGCCACATGGCCAG	AAG	0.2742368969178083		chr11	-1	75350838	4	false
TTCTTGGCCACATTTGCCCT	AGG	0.25203740625		chr6	1	69240280	4	false
TTCAGGGCTGGAATTGCCAG	GAG	0.24868882374476983		chr6	1	92638850	4	false
TTCTGGCAGAGATTGCCAA	GAG	0.24403164713114753		chr22	1	44574188	4	false
TTCAGGGCCAACATTGCCCT	GGG	0.24349376536016948		chr15	1	53207385	4	false
TACCTGGCCCACTGCCAG	AAG	0.24322304104477618		chr11	1	77011463	4	false
TCCAGGGCCACAGTGCCAG	GAG	0.24082675492610836	ENSG00000261143	chr15	-1	77982006	4	false

gRNA2_Intron(Exon17)

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromosor	Strand	Position	Mismatches	On-target
GCTGCGGAGGCGCCGAAGCA	GGG	2.1743377659574468	ENSG00000130307	chr19	1	17259705	2	false
GCTGCGGAGGCGCCGAAGGA	CGG	1.3800936507936508	ENSG00000261221	chr19	1	55615040	2	false
GGTCTGCAAGCCCCGAAGGA	GGG	0.7859865470852018		chr5	-1	14417025	4	false
GCTGGAAAGCGCGGAAGGA	CAG	0.7574809954751132	ENSG00000269883	chr14	1	77141307	3	false
GCTCTGCGGCGCGGAAGGA	GGG	0.61275		chr14	-1	52951152	4	false
GAGGCTGAGGCGCCGAAGGA	GGG	0.5829194134036145		chr1	-1	39408861	4	false
CCTGAGCAGGTGCCGAAGGG	CGG	0.5185454009433962		chr9	1	136743367	4	false
CTTGAGCAGGCGCCGAAGGA	CAG	0.4896153846153846		chr9	-1	123412165	4	false
GCTGGGCGGCACTCAAGGA	AAG	0.40736		chr22	1	19764723	3	false
GAGTGCAGGGCGGAGAGGA	CAG	0.3971217708333333		chr2	-1	127653047	4	false

GCTTAGCAGGGGACGAAGGA	GGG	0.3493934075342465		chr1	-1	7515709	4	false
GCTCCGAGCTGCCGAGGGA	AAG	0.34199074618902436		chr22	1	37930512	4	false
GAGGCGCAGGCTGCCAAGGA	AGG	0.33274519925373136	ENSG00000135333	chr6	-1	93419250	4	false
GCTTAAAGGCGCCGAAGGC	CGG	0.3282656194852941		chr17	-1	81397508	4	false
GCTGCACAGGCACGAAGGA	GAG	0.3185871877729258		chr14	-1	93774601	3	false
GCTGGGAGGGGCCGAAGGG	TGG	0.3011362294451872	ENSG00000140398	chr15	-1	75355530	4	false
GCTAGGCGGGCGCCGAGGA	GAG	0.29601449275362324	ENSG00000080644	chr15	1	78621266	4	false
TCTGCTCAGACCCCAAGGA	AAG	0.2756432506476684		chr11	-1	4637337	4	false
CCTCCGCGGGCGCGAAGGA	GGG	0.2667399497487438	ENSG00000096872	chr9	-1	26956501	4	false
GCTGGGCTGCCCAAGGA	TGG	0.261592937219731		chr2	1	110584176	4	false
GCTGGGCTGCCCAAGGA	TGG	0.261592937219731		chr2	-1	109787315	4	false
CCTGGCAGGCTCCAAGGA	AAG	0.25119625668449197	ENSG00000100226	chr22	1	38732612	4	false
GCTGTGATGTTCCGAAGGA	AGG	0.24868882374476983		chr7	1	25525831	4	false
GCTGGGAGGAGCAGAAGGA	GAG	0.2458849765258216		chr17	1	74388189	3	false
GCTGCACAGGCACCAAGGA	AGG	0.23719635680751178		chr20	1	39168034	3	false
GCCGCGGGCGCCCAAGGG	CGG	0.23228220088757404	ENSG00000149596	chr20	-1	44160140	4	false
TCTGCACAGGCTCCGAGGGA	CAG	0.23065496822033899		chr2	-1	10860794	4	false
GCTTTCAGGCTCCTAAGGA	TGG	0.22914000000000004		chr8	-1	25179929	4	false
GCTTCTGCTCCGAGAAGGA	AAG	0.22121190610859728		chr17	1	68053515	4	false
GCAGCGCAGGCGCAGAGGGA	AGG	0.20706664932562627		chrX	1	48004109	3	false
GCTGCCCGGGCGCGACGGG	AAG	0.1890845056352459		chr17	1	4950140	4	false
GCTGTGACAGGGCCGAGGGG	CGG	0.17345768698770492		chr2	-1	219510935	4	false
GCCGGGAGGAGCGGAGGGA	CAG	0.17195650384615385	ENSG00000187122	chr10	1	97060747	4	false
GCTGAGCAGGCGAGGAAGGA	CAG	0.1714549295774648		chrX	1	153554854	3	false
GGGGCGCAGGCCCGCAGGA	GAG	0.16243299344262296		chr1	1	116570645	4	false
TGTGCCAGGCGCTGAAGGA	TGG	0.16137766959799	ENSG00000132199	chr18	-1	688589	4	false
GCTGAGCCGGGGCCGAGGA	AAG	0.15966021126760566	ENSG00000242802	chr7	1	4792698	4	false
GCACCGCAGGCGCCGAGTGA	CGG	0.156841823964497		chr4	-1	150254186	4	false
GCTTCCAGGGGCCAAGGA	CAG	0.15338812499999996		chr17	1	78130101	4	false
GCTGGGAGGCGCCAAAGGG	CGG	0.1519124593575419		chr14	1	95875675	4	false
CCTGTGAGGTGCAGAAGGA	CAG	0.15107740384615384		chr1	-1	223505062	4	false
TCTGCGTGGGCGAGAAGGA	AGG	0.14656763059701494		chr4	1	146235759	4	false
GGTGGGACAGTGCAGAAGGA	GGG	0.14656763059701494		chr2	-1	19727928	4	false
GGTGGGAGGGGCGAGAAGGA	GGG	0.14656763059701494		chr9	-1	17406852	4	false
AATGCGCAGGCGCCGCGGA	GGG	0.1465271739130435		chr5	1	177312530	4	false
GCTCCAGAGGCGCCAAAGA	GGG	0.1449886300251256	ENSG00000233101	chr17	1	48601659	4	false
ACTGCGCGGGCGCCGCGGA	AGG	0.13636343930635844		chr6	1	107028187	4	false
TCTGCGCAGGCGCGATGGG	TGG	0.13579226054447854		chr1	-1	207823670	4	false
CCTGCGCAGGTGCCAAAGGG	CAG	0.135559856595092		chr8	1	98948776	4	false
GCTGTGAAGCCCAAGGC	CAG	0.13292780778688526	ENSG00000006451	chr7	-1	39624395	4	false

Nrg1

gRNA1_Exon2

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromos.	Strand	Position	Mismatches	On-target
CTGCCATCTCATAAAGTGTA	CAG	8.611956521739131		chr22	-1	16624295	2	false
AAACCATCTAATAAAGTGTTG	TGG	2.7001586854460093		chrX	1	31035921	3	false
AAGCGATCTCATAAAGTGTT	GGG	1.9857142857142858		chr14	-1	58565855	3	false
CTGGCATCTCATAAAGTGTA	CAG	1.8730496453900711		chr13	1	19512968	3	false
CAACCATCAGATAAAGTGTTG	GGG	1.5345273004366813		chr2	-1	58924974	3	false
GGGGCATGTCTAATAAAGTGTTG	TGG	1.4905857740585773	ENSG00000272746	chr18	1	13526322	4	false
CATAA		022683397685		chr12	1	100538815	4	false
GAACC		4738372093	ENSG00000213064	chr1	1	168251389	4	false
CTGTTCATCAGATAAAGTGTTG	AGG	0.8831406112334801		chr1	1	39925645	4	false
CACCCATCTCAAAAAGTGTT	GGG	0.859852880536913		chr1	-1	170504310	3	false
TAGGCATCTTTAAAGTGTTG	AAG	0.8549247359154928		chr2	-1	3380827	4	false
CAAGCTTATCATAAAGTGTTG	CAG	0.846668575697211		chrY	-1	6133675	4	false
CAAGCTTATCATAAAGTGTTG	CAG	0.846668575697211		chrX	-1	93017408	4	false
CATCTATCATATAAAGTGTTG	CAG	0.8411331825		chr10	1	90917352	4	false
GAGCAATTCAGAAAAGTGTTG	TGG	0.8228873239436619		chr2	1	52592531	4	false
CAGGCATCTCTGAAAAGTGTTG	AGG	0.7825248868778281		chr5	-1	14744685	3	false
CCAACATCTCAGAAAAGTGTTG	CAG	0.774982735426009		chr2	-1	159750932	4	false
CCCCATCTTCAAAAAGTGTTG	TGG	0.754352033886256		chr2	1	176112922	4	false
CAGGAATATCATAAAGAGTG	AAG	0.6823694029850746		chr4	1	180561888	4	false
CAGTAATTCATAAAGAGTG	AGG	0.6823694029850746		chrX	1	130748679	4	false
CTGGCATCTCATAAATGTGTG	CAG	0.6296724470134877		chr22	-1	43288312	3	false
CAGTGATTCATCAAGTGTTG	AAG	0.61275		chr3	-1	124777449	4	false
CAGTGATTCATCAAGTGTTG	CAG	0.61275		chr2	-1	218365039	4	false
CAGCCATCTCCTAAAGTGTTG	CAG	0.6045800000000001		chrX	1	109533656	2	false
CAGTCATCTCAGAAAAGTGAG	AGG	0.5948727272727273		chr8	1	26437849	3	false
CACCCAAAACATAAAGTGTTG	AAG	0.5934672375		chr6	1	142119466	4	false
CTGCCATTTAATAAAGTGAG	CAG	0.5773936801675977		chr4	-1	185437203	4	false
CATTATCTTATAAAGTGGG	GAG	0.5757430519067795		chr6	1	127000344	4	false
CATCCAGGTCAATAAAGTGTA	TGG	0.5527260988259669		chr1	-1	5041172	4	false
CAGCTAAATCTTAAAGTGTTG	AAG	0.5467283653846153		chr3	-1	183594763	4	false

TATCCATCTCTAAAGTGTT	GGG	0.5244802366935484		chr11	1	95850865	4	false
CTTCCCTCTCTAAAGTGTTG	TGG	0.5242007375		chr4	-1	138876063	4	false
AAACCATTTCAATGTGTG	TGG	0.492870942408377		chr9	-1	22338850	4	false
GAGACATCTCTAAAAGTGTTG	GAG	0.47452500000000003		chr9	1	3272679	4	false
AAGGCATCTCAGAAAAGTGTT	AAG	0.47154629032258066		chr4	1	180528865	4	false
AAGCAATCTCAGAAAAGTGTTG	TAG	0.4655393312101911		chr14	-1	70909773	4	false
CAGGCATCAGTAAAAGTGTTG	TGG	0.46166999961099575		chr6	1	17914658	4	false
CAGCCTCTCATCAAGTGTTG	TGG	0.4422663602620088	ENSG00000124198	chr20	1	49023084	3	false
AACCCATCTCTAAAAGTGTTG	AGG	0.43384979588150285		chr11	1	28968401	4	false
CAGCAAGCTTATAAAGAGTG	CAG	0.41679796603260877		chr17	1	27500158	4	false
AAGCCAGCTGATAAAGTGAG	CAG	0.41280946875		chr14	-1	93642870	4	false
ATGCCATTTCTAATAAAGTGTTG	AGG	0.4083333333333333	ENSG00000118200	chr1	1	200860283	4	false
GAGC		139423076923		chr9	-1	110319939	4	false
CAGCCATGAAATAAAGTGTTG	AAG	0.39619529440165885		chr8	-1	84026349	4	false
AAGTCATCTCTAAAAGTGGG	TAG	0.37746306818181813		chr12	1	55187337	4	false
CTGCCATCTCATAAAGTATA	CAG	0.36711773049645385		chr21	-1	10528814	3	false
CAGGGATCTCTTAAAGTGTTG	GGG	0.3493934075342465		chr7	1	142327101	4	false
CAGCAGCCACATAAAGTGTTG	GGG	0.3472741024372587		chr14	-1	103745130	4	false
GAACCATCTCAGCAAGTGTTG	AAG	0.3429835130769231		chr22	-1	20091840	4	false
TAACCATCTCAAGAGTGTTG	CAG	0.3429835130769231		chr13	-1	66499468	4	false

gRNA2_Intron(Exon2)

Sequence	PAM	Score	Gene	Chromoso	Strand	Position	Mismatches	On-target
AAATATTAAGCAACACCAGG	AGG	1.6271314553990606		chr3	-1	182912250	3	false
ATGTATTAAGGTACACCAGG	GGG	1.4987199999999998		chr7	-1	130301621	3	false
AGCTCTGAGGAACACCAGG	GAG	1.4680715197956575		chr11	1	18743893	3	false
TGGTATTGAAGAACACCAGG	GGG	1.463858653846154		chr10	-1	69800299	4	false
AGCTATTGTTGAACACCAGG	CAG	1.3248933085501855		chr7	-1	131640986	3	false
ACTTATTAAGGAACACCATG	GAG	1.320181208053691	ENSG00000181830	chr11	-1	45805966	3	false
AGCAAGAAAGAACACCAGG	CAG	1.002692848020434		chr7	1	1485708	3	false
AGAAATACAGGAACACCAGG	AAG	0.9635031626506027		chr6	-1	40710387	4	false
CTCTGTTAGGGAAACACCAGG	TAG	0.9422889610389611		chr7	-1	67456422	4	false
TCCTATTAGGAACACCAGT	AAG	0.9343160377358491		chr12	1	83540848	4	false

Liite 1
18 (18)

AAATAATGAGGAACACCAGG	AAG	0.8745424382716048		chr11	1	75827065	4	false
AGGTATAAAGGAACACCAAG	AGG	0.8557380955414011		chr6	-1	161450125	3	false
ATTTTTAAGGAACACCAGT	GAG	0.8466847543352602	ENSG00000160172	chr11	-1	67797064	4	false
ATTTTTAAGGAACACCAGT	GAG	0.8466847543352602		chr11	-1	3414235	4	false
AGGTCCTGAGTAACACCAGG	AAG	0.84394237012987		chrX	1	151978614	4	false
TTCTATTAATGCACACCAGG	GAG	0.7952131773399015		chr15	1	45983463	4	false
AGTAATTAATGAACACCAGA	TGG	0.7889170875000002		chr2	-1	137796631	4	false
AGCTATTAGAAACACCAGT	GAG	0.775531746031746		chr6	1	55452943	3	false
AACTTTTCAGGAACACAAGG	AAG	0.7256944444444444		chr15	-1	89608175	4	false
GTCTATAAAGGAACACCAGG	GAG	0.6281018895348837	ENSG00000140396	chr8	1	70110438	4	false
AGGTGTTTAGGAGACCAGG	CAG	0.6207241438356165		chr6	-1	99629761	4	false
AGATCTTTAGGAACACCATG	TGG	0.6046321721311474		chr5	-1	163622679	4	false
AGCTATTAATAACACCAGG	TAG	0.5921037100371745		chr10	-1	27223016	3	false
AGAAAAGAGGAACACCAGG	AAG	0.5647740620136187		chr12	1	6631116	4	false
TGATATTAAGGAACACCAGT	AGG	0.5628749596698113		chr15	1	99273149	4	false
AGCCATCAGTGAACACCAGG	GGG	0.5588694020663266		chr19	-1	11204005	4	false
AGCTCTGAGGAACACCAGG	AAG	0.545509974128486		chr7	-1	149755678	4	false
GGGTAGTAAGGAACACCAGA	GAG	0.5370803625000001		chr15	-1	41036380	4	false
AGCAGATAAGTAACACCAGG	GAG	0.49634789937759327		chr12	1	67060981	4	false
AGGAAATAAGGAACACCAGA	AAG	0.4950740771648045		chr5	1	130745737	4	false
TGCAATTAAGGGACACCAGT	GAG	0.47154629032258066		chr10	-1	76784457	4	false
AAATGTTAAGGAACCCAGG	CAG	0.46373571428571425		chr10	1	69807397	4	false
AGTTTTTCAGGAACCCAGG	CAG	0.4547746376811595	ENSG00000078403	chr10	1	21673369	4	false
GGCTCTCAAGGACCACCAGG	TAG	0.45054715909090914		chr3	1	107207926	4	false
TGCTATTAATAACACCAGA	AGG	0.4493211240754438		chr7	-1	71861398	4	false
AGCTAGTAAGCCACACCAGG	CGG	0.4414662025316454	ENSG00000065923	chrX	1	46613336	3	false
ACTTATAAAGGAACACCATG	AAG	0.4318421175		chr7	-1	136080192	4	false
AGCTATTACTGAATCCAGG	AGG	0.4030135375527426	ENSG00000008853	chr8	1	22998948	3	false
TGCTAGTCAGGACCACCAGG	GAG	0.39909374999999997		chr12	1	128259673	4	false
AGATATAAAGATCACCAGG	AAG	0.3904621776107877		chr6	1	109397786	4	false
AGATATTAATAACACCAGG	AGG	0.3857571830927948		chr2	-1	12151713	4	false
AGCCATTAGGAACACTAGG	AAG	0.37649792057926834		chr19	-1	41641039	4	false
AGCTGCTAAAGAACACTAGG	GGG	0.3728007233231708		chr5	1	90793382	4	false
AGCTTCAAGAACACCAAG	GAG	0.36200214951923076		chr8	1	101137189	4	false
AGCTTGTCAGGATCACCAGG	AAG	0.3579853809012875		chr1	1	27121017	4	false
GGCTCTTAAGGGACACCAAG	GGG	0.3387216257668711		chr10	-1	118542356	4	false
TTCTATTGAGGAACACGAGG	TAG	0.33483606557377055		chr8	1	127859380	4	false
AACAATTAAGGGTCACCAGG	AAG	0.3341449507389162		chrX	-1	36407178	4	false
AACAATTAAGGGTCACCAGG	CAG	0.3341449507389162		chrX	1	35416858	4	false
AGCTAGGAGAAACACCAGG	CAG	0.3229262975543478		chr11	-1	104522328	4	false

PCR- ja sekvensointialukkeet

Aluke	Tm (°C)	GC- %	Pi- tuus	Etäisyys gRNA1:stä	Sekvenssi
STK11, FWDpri- mer (150 bp)	59,98	54,55	22	200	CAGGGCATTGTGCACAAGGACA
STK11, REVpri- mer (150 bp)	58,99	54,17	24	175	CATAAAGTAAGCACCCCCTAGCGG
STK11, FWDpri- mer (500 bp)	60,63	59,09	22	531	GCCTGTGGCCACAGGAAAATG
STK11, REVpri- mer (500 bp)	60,05	59,09	22	494	GGTCAGTCAAGGTGGTTGACGC
STK11, REVpri- mer (OL)	56	66,67	18		CGGAGAAGGTGTCCAGGCC
ULK1, FWDpri- mer (150 bp)	59,86	76,47	17	113	GAGTCCCCCGCGCCTTG
ULK1, REVpri- mer (150 bp)	56,8	54,55	22	188	CGGGAGTCTGAACTGGAAAGTC
ULK1, FWDpri- mer (500 bp)	59,33	57,14	21	393	GCCGCGGCTCTTTTGTTC
ULK1, REVpri- mer (500 bp)	59,85	57,14	21	509	GGCGACCTCCAAATCGTGCTT

ULK1, REVprimer (OL)	57,8	66,6	18		GTGGCGGCCCTTGAAGAC
STING1, FWDprimer (150 bp)	57,46	52,17	23	159	GGCAAAGAGGGATCAAGTCAGG
STING1, REVprimer (150 bp)	58,51	54,55	22	148	gcaacatcctcatgccttggg
STING1, FWDprimer (500 bp)	56,33	57,14	21	563	CTCCTTGAACCTCTCTGGCTG
STING1, REVprimer (500 bp)	57,33	54,55	22	498	cctgtaatcccagcacttggg
STING1, REVprimer (OL)	56,19	57,89	19	overlap 6 emästä	GCAGGATCAGCCGCAGATA
Ezh2, FWDprimer (150 bp)	56,42	52,17	23	111	GGTCATGGTACTTCTGGTGAGTC
Ezh2, REVprimer (150 bp)	54,09	50	22	151	GAGAGACATCCTGAAGTCTGTG
Ezh2, FWDprimer (500 bp)	56,57	60	20	386	GGATTACTCAGCCTGCTGGG

Ezh2, REVprimer (500 bp)	55,91	52,17	23	529	GGTGACTAAGATCTCCCTCACAC
Ezh2, REVprimer (OL)	57,48	60	20	overlap 6 emästä	CTCCGCTGCTTCCACTCTTG
Il11, FWDprimer (150 bp)	55,46	54,55	22	147	CCCTAGCTTACCTCACTCAGAC
Il11, REVprimer (150 bp)	56,52	54,55	22	149	GCCCAAGAGAGAGAAGTGACTG
Il11, FWDprimer (500 bp)	55,44	57,14	21	406	CCTGAGACTCAAGACCTCCAG
Il11, REVprimer (500 bp)	56,33	54,55	22	487	GCTCTGGCTCCAGAGCTTTAG
Il11, REVprimer (OL)	59,35	76,47	17	overlap 4 emästä	CAGCTGGTGGCCAGGG
Hgf, FWDprimer (150 bp)	55,1	45,83	24	178	CTAGGAGAAGCTTTAAGCCAGAAC
Hgf, REVprimer (150 bp)	56,4	57,89	19	171	CATGCAAGTTTGGCCTCG
Hgf, FWDprimer (500 bp)	55,94	47,83	23	330	CAATCAAGTCACCATGGCTTACC

Hgf, REVprimer (500 bp)	56,83	57,14	23	573	GAGACCACTGGTCAACCTGTG
Hgf, REVprimer (OL)	55,44	47,62	21		CTGGCATTGATGCCACTCTT
Met, FWDprimer (150 bp)	56,06	55	20	217	GGTGTCACCTGCTGGTTTTG
Met, REVprimer (150 bp)	56,85	52,38	21	169	CAAGAGGGCAAGCAAACCAAC
Met, FWDprimer (500 bp)	55,72	54,55	22	443	CTTCTCCCACCCCCACATATAC
Met, REVprimer (500 bp)	56,93	52,38	21	557	GCTTTTTATGAGAGCCGCACG
Met, REVprimer (OL)	54,64	43,48	23	overlap 4 emästä	CGAATGAAATTTTCGAGATCTCC
Axl, FWDprimer (150 bp)	56,02	54,55	22	164	GCCCAAATCAGAGAGGAGTAGG
Axl, REVprimer (150 bp)	57,13	57,14	21	145	CCTCCCAAAGGCTCCAGTTTC
Axl, FWDprimer (500 bp)	57,19	52,38	21	517	GAACAATTAGCAGCTGCGCAG

Axl, REVprimer (500 bp)	57,02	57,14	21	579	CATCTCCTTGCTGGCCTTCTC
Axl, REVprimer (OL)	56,12	57,14	21		CAGGTACTCCATACCACTGGC
Nrg1, FWDprimer (150 bp)	56,35	60	20	106	CTCTTGAGCCGTGCTAGAGG
Nrg1, REVprimer (150 bp)	56,84	47,83	23	152	GGAAAAAAGCCAGGGGTTTCATG
Nrg1, FWDprimer (500 bp)	56,65	57,14	21	510	GCCTCAGGAGTGGGTATTTGG
Nrg1, REVprimer (500 bp)	57,23	57,14	21	550	CCTTGCAGGTAAGCACTGAGG
Nrg1, REVprimer (OL)	55,82	52,38	21		GTTTTCTCCTTCTCCGCACAC

Designing gRNA:s and PCR primers with Benchling

1. Creating a folder and importing the sequence

1. Create project folder by choosing “+” next to “Projects” (or use an already existing project).
2. Name the project and choose parameters in “manage collaborators” as you will. Then create project.
3. Import the sequence of the gene by choosing “+” on the left panel. Then choose “DNA Sequence” and “New DNA sequence”. There are couple of ways how you can import the sequence. For example, you can import the sequence in with file format (convert file) or by searching from external databases. If you choose to use “Search External Databases” you can find the gene for example with genes name or ensemble ID. Save the sequence to folder of choice.

2. Designing gRNA1

1. Open the sequence of the gene with left mouse click. You can go straight to the exon of interest from linear map if you use split workspace. You can turn it on from the right down corner. Otherwise, you can also just scroll to the right exon.
2. Open the split workspace on the right down corner if it isn't already activated. Activate the exon of interest with left mouse click.
3. Choose the CRISPR tool from the right and click “DESIGN AND ANALYZE GUIDES” with left mouse click. Check the guide parameters (length: 20, genome: CRCh38(hg38, Homo Sapiens)/CRCm38_Ensemblerelease_102(Mus musculus) and PAM: NGG (SpCas9, 3' side)) and click “Finish” from the down right corner. Check that the target is correct and click “+” (create) with left mouse click.
4. Wait until the program has calculated the “Off-Target Score”. Then you can arrange them in the order of magnitude by clicking On-Target / Off-Target Score with left mouse click. Choose the “Guide Sequence” which has the highest combination of On-Target and Off-Target scores and save it to the folder of choice.
5. Assemble the gRNA1 with “Assemble” tool by activating the guide sequence on CRISPR tool. You can use bookmarked plasmids, plasmids from Benchling folders or upload a whole new plasmid. Then choose next. Assemble the gRNA1 to the folder of choice.

3. Designing gRNA2

1. Calculate a 500 base pair difference upstream and downstream from the gRNA1.
2. Activate an area around the spot which is 500 base pairs upstream from gRNA1 (for example 400-600 bp). Check the On-Target / Off Target scores with CRISPR tool as shown in *designing gRNA1*.
3. Activate an area around the spot which is 500 base pairs downstream from gRNA1 (for example 400-600 bp). Check the On-Target / Off Target scores with CRISPR tool as shown in *designing gRNA1*.
4. Choose the guide sequence which has the highest On-Target / Off Target score combination upstream or downstream.
5. Save the guide sequence to the folder of choice and assemble it as shown in *designing gRNA1*.

4. Designing PCR primers

1. Calculate a 500/150 base pair difference upstream and downstream from gRNA1.
2. Find a sequence 500/150 base pairs (bp) upstream (forward primer) and downstream (reverse primer) from gRNA1 which suits the following requirements (parameters can be seen in the bar below when the sequence is activated with left mouse button):
 - primer melting temperature 55-65 °C
 - GC content 45-55%
 - G/C base at the beginning and end of the primer
 - length 18-24 bases
 - maximum 1 °C melting temperature difference between forward and reverse primer.

3. Activate the chosen sequence and create a primer by clicking right mouse button and choose "Create Primer". Then choose "Forward" if you are designing the primer 500/150 bp upstream and "Reverse" if you are designing the primer 500/150 bp downstream from gRNA1. Depending on the gene sequence the requirement might have to be altered. Make sure that the difference is maximum 1 °C between forward and reverse primer which are used together. Save the primer to a folder of choice.
4. Create a reverse primer (same requirements as above) which overlaps 5 bases with gRNA1 at the 3' end. Overlap primer is used with 150 bp forward primer.

Näytteen nukleotidipitoisuus ja sekvensointitulokset

Näyte	c (ng/μl)	Sekvensoinnin analysointi
lentiGuide Puro gRNA1, STK11 (1)	439,7	OK
lentiGuide Puro gRNA1, STK11 (2)	512,9	OK
lentiGuide Puro gRNA2, STK11 (1)	442,6	OK
lentiGuide Puro gRNA2, STK11 (2)	437,4	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, STK11 (1)	614	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, STK11 (2)	435,7	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, STK11 (1)	505,7	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, STK11 (2)	364,1	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, ULK1 (1)	241,3	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA1, ULK1 (2)	440,9	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, ULK1 (1)	618,7	OK

lentiCRISPRv2 gRNA2, ULK1 (2)	223,9	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, STING1 (1)	225,4	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, STING1 (2)	511,4	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, STING1 (1)	63,1	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA2, STING1 (2)	152,7	OK
lentiCRISPRv2 CRISPR19-IEA (1)	534,9	OK
lentiCRISPRv2 CRISPR19-IEA (2)	590,2	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (1)	581,8	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (2)	324,2	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (1)	642,2	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (2)	642,1	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1)	625,9	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (2)	587,4	OK

lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (1)	621,8	Ei linjauđu
lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (2)	620,3	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Ezh2 (1)	751,4	Ei linjauđu
lentiCRISPRv2 gRNA1, Ezh2 (2)	744,4	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Ezh2 (1)	674	Ei linjauđu
lentiCRISPRv2 gRNA2, Ezh2 (2)	636,1	Ei linjauđu
lentiCRISPRv2 gRNA1, Il11 (1)	640,3	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Il11 (2)	536,8	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Il11 (1)	646,7	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Il11 (2)	601,4	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Axl (1)	664,5	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Axl (2)	551,2	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Axl (1)	644,9	OK

lentiCRISPRv2 gRNA2, Axl (2)	728,6	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA1, Nrg1 (1)	698,2	OK
lentiCRISPRv2 gRNA1, Nrg1 (2)	336,3	Ei linjaudu
lentiCRISPRv2 gRNA2, Nrg1 (1)	583,9	OK
lentiCRISPRv2 gRNA2, Nrg1 (2)	593,7	OK

Konstruktion sekvenssit

STK11

lentiGuide Puro gRNA1, STK11 (1)

```
TTYSGATTTCTTGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGAGGCCGTTGG-  
CAATCTCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG  
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTAAGCTTGGCGTAACTAGATCTTGAGACAAATGGCAG-  
TATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA  
CATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATT-  
CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCGCCGGCTCGAGGGGGCCCCGG  
GTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTT-  
CTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC  
AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGTTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGG-  
CGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA  
CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC-  
CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCCGCGGGCCTGGACTCTTTACGGGTTATGGGCCCTTG  
CGTGCCTTGATTACTTCCACCTGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCGAGCTT-  
CGGGTGGAAAGTGGGTGGGARAGTTTCGAGGCTTGCCTTAAGAGCCCTTCGCCTCTGCTTGATGAGC  
TGCTGGGCGCCTGGGCGCCGCGKGGCGAATYTRGTGRGCACTTCGCGCCTGGAAY
```

lentiGuide Pur gRNA1, STK11 (2)

```
AYCGAATTCCTTGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGAGGCCGTTGG-  
CAATCTCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG  
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTAAGCTTGGCGTAACTAGATCTTGAGACAAATGGCAG-  
TATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA  
CATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATT-  
CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCGCCGGCTCGAGGGGGCCCCGG  
GTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTT-  
CTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC  
AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGTTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGG-  
CGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA  
CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC-  
CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGGCCCTT  
GCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTT-  
CGGTTGGAAGTGGGTGGAGAGTTTCGAGGCTTGCCTTAAGAGCCCTTCGCCTCTGCTGAGTGAGG  
CTGCTGGGCGCTGGGGCAGCGGTGCGATCTGTGCACCTCGCGCCTGWYCGCTGCTTCGA-  
WAAGYCTYTAGC
```

lentiGuide Puro gRNA2, STK11 (1)

```
AYSATTCCTTGCTTTAWATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGTTTCAAGGGG-  
TACAGACCCGGTTTTAGAGCTAGRAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA  
GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTAAGCTTGGCGTAACTAGATCTTGAGACAAATGGCAG-  
TATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA  
CATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATT-  
CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCGCCGGCTCGAGGGGGCCCCGG  
GTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTT-  
CTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC  
AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGTTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGG-  
CGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA
```

CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC-
CAGAACACAGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCG
TGCCTTGATTACTTCACCTGGCTGCAGTACGTATTCTTGATCCGAGCTT-
CGTTTGAAGTGGGTGGGARAGTCGAGTCTTGCCTTAAAGAGCCCTTCGCCTCGTGCTGATGAGCT
GCTGGGCGCTGGGCGCGCGKGRCGATCTGRKGAMCTTCCCGCKGWYTCGCKKGCTTTTS

lentiGuide Puro gRNA2, STK11 (2)

AATSGKATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGTTCGAAGGGG-
TACAGACCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTAAGCTTGGCGTAACTAGATCTTGAGACAAATGGCAG-
TATTATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA
CATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATT-
CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCGCCGGCTCGAGGGGGCCCGG
GTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTT-
CTAGGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC
AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGTCCGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGG-
CGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA
CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGACA-
CAGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTT
GAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTATTCTTGATCCCGAGCTT-
CGGGTTGGAAGTGGGTGGARAGTTCGAAGTCTGCGCTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTGA
GGTCTGTCGGCTGGGGCCCGCGCTGMGAATYTAGGKGCAMCTTCSGCCCTGGTTYCYST

lentiCRISPRv2 gRNA1, STK11 (1)

ATTCGAWTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGAGGCCGTTGG-
CAATCTCGGGGTTYTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA
GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGATGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCAGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCAGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTCTGG
TGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGTGG-
CCTACACGAGAGTACCCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGTGTGACAGCACCGACAGGCGACTG
CGCTGATCTATCTGCCCTGACCACATGATCAGTTCGGGGTCACTTCTGAATCGAAGC

lentiCRISPRv2 gRNA1, STK11 (2)

ATCGAWTTTCTTGCCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGAGGCCGTTGG-
CAATCTCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCAGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCAGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTCTGG
TGGAAGAGATAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCACATCGTGGACGAGTGGCCTAC-
CACGAGAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGTGGTGGACAGCACGACAGCGACTGCGCT
GATYATCTGACCTGACCACATGATCAGTCCGGGGCACTCTGATCGAGGGGSG

lentiCRISPRv2 gRNA2, STK11 (1)

ATYSAATTCTTGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTTTGAAGGGG-
TACAGACCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGCAGAGTCCTTCCTGTG
CAYGAGATAAGAACGACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCACATCGTGACGACGACGAGCGACTGCGCTGATCT
ATCTGCTGTCCAMTGATCAGTCCGGTCTCCTGATCGAGGGCKACCTGAACYCGACAACMG

lentiCRISPRv2 gRNA2, STK11 (2)

AWCSAAWTTCTTGGCTTTWTATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGTTTGAAGGGG-
TACAGACCCGGTTYAKAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAGAGTCCTTCCTGTG
GAAGAGGATAGAAGCAGGAGCGGCACCCCATCTTCGGCACATCGTGACGAGGGKGGCCTAC-
CACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGARAAGAAGTGGTGACAGCACGACAAGCGACCTGCGC
TGATCTATCTGCCTTGACCACATGATCAAGTCCGGGTCTTCTYCTKGATYC

ULK1

lentiCRISPRv2 gRNA1, ULK1 (1)

TTCSGWWTYYTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAMACCGGAGACGTTTGTAAAT-
GAGCACACAAMATACACRTGCTAAAATATTATATTCTATGACCTTTATAAAATCAACCAAAATCTTCTTT
TTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTATGTTCTTTTTGCAAAC-
TTTTAATAAAAATGAGCAAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTTCACCTTTAAT
AATAGCTACTCCACCATTGTTCCCTAAGCGGTCAGTCCCTGCTTCAAT-
CATTTTTTGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTTAACTAAAGCATTGTCTTTAACAAC
GACTTCATTAGTTTAAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAAAATCCTGTTGAT-
GTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTACAAAGCTTTCATGATTTCTTCTTTGTTAATAA
ACAATTTCCATAATACATTTAACACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTACAGCTTTCAT-
GTCTTCTAAAATAATTATAATTTTTGTCTTTAATGCACCAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTG
CACCATCTTTAATTGCTTCAGAACTTCGAATGCTTTTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTA-
GAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTTAATAATCTTTACAATAGCTTGTTC
WATGAATTAAMACAACTGTTGCAAAAATCAAATTCATTCAMATAATT-
GTTAATTTAGCTTCGTAGCATCTGTTTTAAWATGYGTGATCTATATATTGTTTAGTTTCTTTTTTCY
CCTATWATTCMATTTAAATTTGATCCTGAAAAGTTTCGGTCCACTTAACT-
TAGCGTTTTGAAAMCAGAATC

lentiCRISPRv2 gRNA1, ULK1 (2)

ACCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGAGACCACCGCAAGG-
CGCCGTTYAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCRAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGG
TRGAGAGATAAGAAGCAGCAGCGGCACCCCATCTTCGGCACATCGTGGACGAGTGGCCTAC-
CACGAGAGTACCCCAACCATCTACCACTGAGAAAGAAGTGTGACAGCACCGACAAGCGACCTGCGCT
GATCTATCTGCCTGACCACATGATCAGTTCGGTCACGTCTGATCGAGGGCGACCTGGACCCGA

lentiCRISPRv2 gRNA2, ULK1 (1)

AYSRRWWTCTTTGCCTTTAWTATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGCAGCGTCTGAGACTTGG-
CGGTTTTYMKAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC
GAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGG
TGGAGAGATAAGAAGCAGCAGCGGCACCCATCTTCGGCACATCGTGGACGAGTGGCCTAC-
CACGAGAAGTACCCCAACCATCTACCACTGAAGAAAGAAGTGGTGGAACAGCACCGACAGCCGACC
TGCGCTGAATCTATCTGCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGTCAMTCTGATCGAGGGCSAC-
CTGAACCGGAMAAMAAG

lentiCRISPRv2 gRNA2, ULK1 (2)

AYYGATTTCTTGGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGWAACACCGCAGCGTCTGAGACTTGG-
CGGTTTTMGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC
GAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTRGAAGAGTCCTTCCTGG
TGAGAGATAAGAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGCACATCGTGGACGAGTGGCCTACACGA-
GAGTACCCCAACCATCTACACTGAGAAAGAAGTGTGGACMGCACGACAAGCGACTGCGCTGATCTATC
TGCTGCCACATGATCAAGTTCGGGTCCACTTCTGTWTCGAAG

STING1

lentiCRISPRv2 gRNA1, STING1 (1)

CYSAATTTTTYTGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGCATATTACATCGGA-
TATCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCCTCCTGG
TGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCYCATCTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGG-
CTACACGAGAGTACCCACCATCTACCMCTGAAAAGAAGTGGTGAACAGCACCGACAGCGAACTGCG
CTGATCATCTGCCTGACCACATGATCAGTCCGGGGCCMAC

lentiCRISPRv2 gRNA1, STING1 (2)

AYSAWTTTCTTGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGCATATTACATCGGA-
TATCTGGTTYTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCCTCCTGG
TGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCATCTCGGCACATCGKGACGAGGTGG-
CCTACACGAGAGTACCCACATCTACCACTGGAGAAGAAGTGTGACAGCACGACAGCCGACCTGCGC
TGGATCTATCTGCCTGCCACATGATCAGTCCGTCMMCTTCTKATYSARGGGC

lentiCRISPRv2 gRNA2, STING1 (1)

NNNNN

lentiCRISPRv2 gRNA2, STING1 (2)

ATYAAATYYTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGCTGTCACTCACAGGTAC-
CGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC
GAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCCTCCTGG
TRGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCATCTTCCGCACATCGTGGACGAGGTGG-
CCTACCACGAGAAGTACCCMTCATTCTACCACTGAGAAGAAGTGTGAMGCACGACAAGCGACTGCGC
TGAATCTTWTYTTGGGCCCTGGCCMMATGGAWTCAAGTTTCCGGGGTC

CRISPR19-IEA

lentiCRISPRv2 CRISPR19-IEA (1)

CTCSAWTTCCTGGCTTWTATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGCGCGA-
TAGCGCGAATATACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAG-
GAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGAGGGGTCCGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAAC-
TGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTG
CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGAC-
CGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTG
TGGGCTGGGCGTGATCACCAGCAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAGAGATAGAAGCAGAGCGCACCCCATCTT-
CGCAACATCGTGACGAGTGCCTACCACGAGAGTACCCAYCATYTACCACCTGARAAAGAAACTGTG
AMAGCACCGACAGCCGACCTGCGCTGATCTWTCTGCCCTGACCACATGATCAGTTCGGTC-
CATCTGATCGAGGCGACTKGAACCCCGAMAAMCATS

lentiCRISPRv2 CRISPR19-IEA (2)

ATCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGCGCGA-
TAGCGCGAATATACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAG-
GAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGAGGGGTCCGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAAC-
TGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTG
CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGAC-
CGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTG
TGGGCTGGGCGTGATCACCAGCAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCAGCAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGACGAGTGCCTACCACGAGAGTACCCACCATCTACCACCTGARAAAGAAACTGGKG
ACAGCACGACAGGCGACTGCGCTGATCTWTCTGCCCTGCCACATGAT-
CAGTCCGGTCACGTCTGATCGAGGCGACTKGACCCCGAMACACGGSWACGT

Met

lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (1)

ATSYATTTCTTGTCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGCTCCATGCTTCATA-
TAGGGCGTTTTYAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG
CACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGAGTCTTCTGGT
GGAGAGGATAAGAAGCMCGAGCGGCACCCCATCTTCGCAACATCGTGAGAGGTGG-
CCTACACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGTGGTGAACAGCAGCAGCAGCGAC
TGGCGCTGATCTATCTGCCTGACCMAATGATCAGTCCGGTMCCTYTCTGKAMTCGAGGGG

lentiCRISPRv2 gRNA1, Met (2)

ATCGATTTCTTTGTCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGCTCCATGCTTCATA-
TAGGGCGTGGYCGGAGGTCGTGTCCACGAACTCCGGGACGCCTCCGGGCGGCCATGACCGAGA
TCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGCGCCGCAACTGCGTGAC-
TTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAA
GGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCT-
CATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTATTGACAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
CATCACAATAATTCACAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC-
TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT
AGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA-
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT-
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTG
ACTCGTGCCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGATCAGCTCMCTCAAGCGG-
TAATACGTTTATCCACAGAATCAGGGAWAACCGCAGAAAGAACATGTGGAGCAAAGCCAGCAAATGC
CAGTACCGTAAAAGCCGCGTGTGCGTTTCATAGGCTCCSCCCTGACAGCTTCCAAATCGG-
MASSCTYCAAGTTCC

lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (1)

TMYTSYCYYSKMMSSTTMWATRCTYGTGSAMAGGACGAAACACCGCCGCTCTG-
TAACATCCATGTTTTAKWKYTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGYCCGTTATCAACTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGTCTTGAAGGAGTGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTGCTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCGCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAAACCGCAGAAAGAAGATACACCAGAGCGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGAGTCTTCTG
TGGAAGAGATAGAAGCACGAGCGGCACCCATCTCGCAACATCGTGGACGAGGTGCTACACGA-
GAGTACCCACATCTACCMCTGAAAAGRAACTGTGGACGCCACGACAGGCGAACTGCGCTGATYTATY
TGCTGACCCAATGATCAGTTCCGGTCACTCCKGATCGAGGCGACCTGGAATCCCSGCA

lentiCRISPRv2 gRNA2, Met (2)

AYGWATTTCTTGACTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGGAGACGGTTGTAAAT-
GAGCACACAMMMTACACATGCTAAAATATTATATTCTATGACCTTTATAAAATCAACCAAAATCTTCTTT
TTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTATGTTCCTTTTTGCAAAC-
TTTTAATAAAAATGAGCAAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTTCACCTTAAAT
AATAGCTACTCCACCACTTGTTCCTAAGCGGTCAGCTCCTGCTTCAAT-
CATTTTTTGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACAGCTGCTTAACTAAAGCATTGTCTTTAACAAC
GACTTCATTAGTTTAAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAAAATCCTGTTGAT-
GTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTACAAGCTTTTATGATTTCTTTTGTAAATAA
ACAATTTTCCATAATACATTTAACAAACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTTACAGCTTTCAT-
GTCTTCTAAAATAATTCATAATTTTTGTCTTTTAAATGCACCAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTG
CACCATCTTTAATTGCTTCAGAACTTCGAATGCTTTTTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTA-
GAGGAAAACCTAMAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTTAAATAATCTTTACATAGCTGTCATAT
GAATTAACACAAACTGTTGCAAATCAATTCATGCTCATCMCAWAATTGTTATTCAGCTTTTCG-
TAGCATCTGTTAKATGGGGGATCATAWTTGTAAGTCATTTTCCGWCATTATTTTGTGAATCTAAAT
CGCCACTTACTASGTTGAACARWTTCCCCA

Hgf

lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (1)

CTACYGAATTTYTTGGCTTTTATATATCTTGTGGAGGGACGAACACCGACGGTATCCATCAC-
TAAGAGGTTTTASAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAG
AGAACCGCCAGAAGAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTT-
CAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTGTGAGAGA
TAGAAGCMCGAGCGCACCCCATCTCGGCAMATCGKACGAGTGCTACACGAGAG-
TACCCCMCATCTACACTGAAARGACTGTGAACGCACCGACAGCCGACTGCGCTGWTCTATCTGTCC
TACCCATGATCAGTGCCGGTCCACTCCTGGATGCGAGGGCTACT

lentiCRISPRv2 gRNA1, Hgf (2)

AYCAWTTTTYTTGGCTTTTATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGACGGTATCCATCACTRA-
GAGTTTTAGAGCTAGRAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAWTTGATCCGGTGCCTASAGAAGGTGGCGCGGGGTRAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCRGAACACAGGACCGGKTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGYCTGSACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGTGGCCAGCWAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGATKAAGATACWYACAGACGGAAGAASCCGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAWCGAGATGGTTCGAAGTGSACGAYAGCTTKCTTCCACAGACTGGCAKAGTCTTCT
GTGATGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCATCWTCGCAWCRTCGTGGACGAGGTGG-
CCTACAYGAGAGTACCCACCATTCTAGCYACTGAAAAGAACYTGGTGAMTGGCAYGACAGCTGAWCT
TGCGCTGATCTATCTGGTCCATGTCTACTGGATCAGTCCGGTCCACTTCTKATCGAAGGGY-
GAACCTGGAATCTCGCA

lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (1)

AWCGAWTCTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTTTTACACAGTTGAC-
CAGGYTYMAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAG
AGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTT-
CAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGAGTCTTCTGTGGAAGA
GGATAGAGCACGAGCGCACCCATCTTCCGCACATCGKACGAGGTGGCTACACGAGAG-
TACCCACCATCTACACTGAGAAAGRAACTGGKGGAMCGCACCCAGCGAACTGGCGCTGATCTA
TCTGGCTGACACTGATCAGTCCGGTCMATTCTTGTATTTCGAGGGCGCACCCCTGTGA

lentiCRISPRv2 gRNA2, Hgf (2)

AYCSATTCTTGACTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCGTTTTAACACAGGTTGAC-
CAGGTTTTYAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCAGACGCGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTT-
CAGCAACGAGATGGCCAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAG
AGGATAGACGACGAGCGGCACCCCATCTCGGCAACATCGKGGACGAGGTGGCTACACGA-
GAAGTACCCCACTTACCCTGAAAAGAACTGGTGGAMGCACGACAGCCGAACCTGCGCTGATCT
ATCTGTCTGGCCATGATCAGTTCCGGTCACTTCTKAATCAGGGCTAC

Ezh2

lentiCRISPRv2 gRNA1, Ezh2 (1)

GSCYYWWMKARTTTSTTKKCTYCTATAYATMTTGTGKCMWGGACGTATAYAYCGCGA-
GACGGYGTWAATGAGCACACCAAATACWCWTGCTAAAAYATTATATYCTATGACCTTTATAAAATCA
ACCAAAATCTTCTTTTTAATAACTTTAGTATCAATAATTARAATTTTTAT-
GTTCTTTTTGCAAACCTTTAATAAAAATGAGCAAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGT
TTTCTTACCTTTAATAATASCTACTCCACCCTTGTTCCTAAGCGGTCAGCTCCTGCTT-
CAATCATTTTTTGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTTAACTAAAGCATTGTCTTTAAC
AACTGACTTCATTAKTTTAAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTTGAAAATCCTGTTGAT-
GTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTACAAGCTTTTCATGATTTCTTCTTTGTTAATAA
ACAATTTCCATAATAACATTTAACAACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTACAGCTTTTCAT-
GTCTTTAAAACATAATTTAATAATTTTGTCTTTTTAATGCACCAATTTAATACCATATCAATTTCTGTTG
CACCATCTTTAATTGCTTCAGAAACTTCKAATGCTTTTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTA-
GAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTTTAATAATTTTACAATAGCTTGTTC
ATATGAATTAACACAAACTGYTGCAAATCAATTCAATTGCTTCATCACATAATTGT-
TATTTAGCTTTTCGTAGCATCTGTTTATAATGTGTGATCTAWAWATTGTTAGTCAATTTTCTCTAWATT
CATTTTATTGATTCTTACATTTGCCTACTTGAWCTTAAGCGGTTAGAACGATTGCTGAACCGTATC

lentiCRISPRv2 gRNA1, Ezh2 (2)

TCCSGTTTTCKWTTYTTGGCTTATATATCTTGTGGAAGGACGAWACACCGCTGAAAC-
CTTAAACCAAGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAMATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTKCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATT-
GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGG
GGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGAT-
GTGGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTTGCCGCCAGAACACWGGACCGGTTCTAGAGCGCTGC-
CACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGAT
CACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCWAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA-
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCAGACGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCG
GCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGAC
TGGAAGAGTCTTCTGGTGGAGAGGATAGAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGTGCCTACCACGAGAGTACCCCACTTACACTGAAAAGAAACTGGTGGGA
MGCACGAMCAGCGACTGCGCTGATCTWCTGACTTGACCAATGATCAGTTCCGGGTCCACTYYC

lentiCRISPRv2 gRNA2, Ezh2 (1)

CTYGWATTCTAATTCTTGGCTTATATATCTTGTGKAAGGACGAACWYCGTAAATCCTCTAG-
TAAGGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
GCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTYAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAKAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTTCGCAACGGGTTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGWCATCGGYACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
CGAGTACAAGGTGCYAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGAYCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACTGATCGGAGYCCTGCTGTTCCGACAGCGGYGAAACAGCCGAGGCCACCCGCTGAA
GAGAACYGYCAGAAGAAGATACWCCAGACGGAAGAAYCGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATYTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCAMAGACTGGAAGAGTCTTTCT
GGTGAAGAGGATAGAAGCWCAGCGGYAYCCYCATYTTTCGGCAACATCGTGGACGAGTGG-
CCTACACGAGAAGTTACYCTCMTTCATTYATCCACCTGAGAAAGAAACTGGTGAMCGCATCGACAA
GTGCGACTTGGGCTGATCTATYTGACTGACYCACATGATCAAGTTTCGGACCMCTTYCTT-
GTAWTCGRGGGGCSTA

lentiCRISPRv2 gRNA2, Ezh2 (2)

AMMWTTTCTTGGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAACACCCGGAGACGGTTGTAAT-
GAGCACACMAMATACACATGCTAAAAATTATATTCTATGACCTTTATAAAAATCAACCAAAATCTTCTTT
TTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTATGTTCTTTTTGCAAAC-
TTTTAATAAAAATGAGCAAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTTACCTTTAAT
AATAGCTACTCCACCCTTGTTCCTAAGCGGTCAGCTCCTGCTTCAAT-
CATTTTTTGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTTAACTAAAGCATTGTCTTTAACA
GACTTCATTAGTTTAAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAAAATCCTGTTGAT-
GTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTACAAGCTTTTCATGATTTCTTCTTTGTTAATA
ACAATTTCCATAATACATTTAACAACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTTACAGCTTTTCAT-
GTCTTCTAAAATAATTCATAATTTTTGTCTTTAATGCACCAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTG
CACCATCTTTAATTGCTTCAGAAACTTCGAATGCTTTTTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTA-
GAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTTAATAATTCTTTACAATAGCTTGTCA
ATATGAATTAACACAAACTGTTGCAAATCAAATTCATTGCTTCATCACATAATTGTTAATT-
CAGCTTTTCGTAGCATCTGTTTATAATGKKGKATCTATATATTGTTAGTTTCATYTTTCGCTAWATATCATT
TTAACTTAATTCATCAAAAGTCGGYCACTTACTTTAGCSGTTTGGCACAGAARTTTMACA

II11

lentiCRISPRv2 gRNA1, II11 (1)

CCCGAATTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCCGACGATA-
GAGTCGTTGCCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAG-
GAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAC-
TGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTG
CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGAC-
CGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTG
TGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGAAGAGGATAAGAAGCAGCAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGAT-
CAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTCCGAGGAAAACCCCATCAACGC-
CAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCT

GATCGCCCAGCTGCCCGGCGAAAAAATAATGGCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAAC-
CGGGGCCTGACCCCCACTTTCCGA

lentiCRISPRv2 gRNA1, II11 (2)

CCCGAATTCGATTTCTTGGGCTTTATATATCTTGTGGGAAAGGACGAAACACCGCAGATA-
GAGTCGTTGCCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCAGTCCGGTCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAG-
GAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCTGAGTGGGACAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAC-
TGGGAAAGTGTATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTG
CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGGAC-
CGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTG
TGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAAGAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGAT-
CAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGC-
CAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAACAGACGGCTGGAAAATCT
GATCGCCCAGCTGCCCGGCGAAAAAATAATGGCCTGTTCGGAAACCTGATT-
GCCCTGGACCCGGGGCCGGACCCCAATTCAGAAGAAATTTCCAACCTGGGCCAAGGAGGCCAAAT
GGGGCCTGAAAAAGGGAACCCTAAAAAATAACTGGGAAAAACGGG

lentiCRISPRv2 gRNA2, II11 (1)

GATTYCAWTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGCAKCCATTGTACAT-
GCCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCCGGTCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCTGAGTGGGACAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGTATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAWATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGYCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGTAGAGTCTTCTCTGG
TGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGAC-
TACACGAGAAGTACCCACATCTACCACTGARAAAGAAGTGTGAMGCACGACAGCGACTGCGCTGA
TCTATCTGGACCTGGTCCAMTGAYCAGTCGGCCACCTYCTTGAATYGA

lentiCRISPRv2 gRNA2, II11 (2)

GTTYCGAATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGCAGCCATTGTACAT-
GCCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCCGGTCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCTGAGTGGGACAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGTATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTCTG

GTGGAAGAGGATAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCACATCGTGGAACGAGTGG-
CTACCACGAGAGTACCCCCACCATCTACACTGAGAAGAAGTGTGAMGGCACGACAGGCGACTGCG
CTGATCTAYAGGCTGGCCAMTGATCAGTTCGGGTCTMCTTYCTKAWTCGAGGGCCGA

Axl

lentiCRISPRv2 gRNA1, Axl (1)

TCCGTATTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAAGGACGAAACACCGTTCATGG-
CCGACATTGCCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATT-
GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGG
GGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGAT-
GTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGACAGACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGC-
CACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGAT
CACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA-
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCG
GCTGAAGAGAACCAGCAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGAT-
CAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGC-
CAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCT
GATGCCCTGACCCGCGCAGAAAAAAATGGCCTGTTTCGGAACCTGATTGCCCTGAAC-
CTGGGCCTGACCCCAACTTCAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAAGATGCCAAATGGCAGCTGAACAG
GGAACCCTACAGAGAACAACCTGAAAACCGGGTGGCCCAAATGGGGAACAAAAACCCCAAC-
TGTTTTGGGCCCAAAAACCTGGCCAAACCCCTGGTGTAC

lentiCRISPRv2 gRNA1, Axl (2)

TCCGAATTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAAGGACGAAACACCGTTCATGG-
CCGACATTGCCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATT-
GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGG
GGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGAT-
GTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGACAGACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGC-
CACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGAT
CACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA-
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCG
GCTGAAGAGAACCAGCAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGAT-
CAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGC-
CAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGTTCGACAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCT
GATCGCCAGCTGCCCGCGCAAAAAAAATGGCCTGTTTCGGAACCTGATT-
GCCCTGAACCCGGGGCCTGACCCCAATTTCAAAAACAACCTTCGACCTGGGCCAAGGAAGGCCAAA
CTGGAGCTGAACCAGGGAACCTTAAGAAAGAAGAAGTGGAAAACCGGGTGGGCCCAAAT-
GGGGAACAAAAACCCAAACCTTTTTGGGCCCAAAAACCTGGGCCAAACCCCTGGGGTGA
GAAACCTCT

lentiCRISPRv2 gRNA2, Axl (1)

TCCGATTCAATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCTGCGCAGG-
CGCCGAAGGAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA
GTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCCTCCTG
GTGGAAGAGGATAAGAAGCAGCAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGG-
CCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGC
CGACCTGCGGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTT-
CCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCA
GACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGG-
CCATCCTGTCTGCCAGACTGAACAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGC
AGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAAC-
TTTCAGAAGCAACTTCAAACCTGGCCCAAGAATGCCAACTGGCACCTGAACAAGGGAACCCCTACGA
CGAAGAACC GGAAAAACCTGGTGGGCCAAAAATGGGGAAAAAAAAAAAAACCCACATTGGTTT

lentiCRISPRv2 gRNA2, Axl (2)

CCCGAATTCGATTCTTGGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGA-
GACGGTTGTAATGAGCACACAAAATACACATGCTAAAATATTATATTCTATGACCTTTATAAAATCAAC
CAAAATCTTCTTTTTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTAT-
GTTCTTTTTGCAAACCTTTAATAAAAATGAGCAAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGT
TTTCTTACCTTTAATAATAGCTACTCCACCACTTGTTCCCTAAGCGGTGAGCTCCTGCTT-
CAATCATTTTTGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTTAACTAAAGCATTGTCTTTAAC
AACTGACTTCATTAGTTAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAAAATCCTGTTGAT-
GTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTCAACAAGCTTTCATGATTTCTTTTGTAAATAA
ACAATTTTCCATAATACATTTAACAACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTTACAGCTTTCAT-
GTCTTCTAAAATAATTCATAATTTTTGTCTTTAATGCACCAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTG
CACCATCTTTAATTGCTTCAGAACTTCGAATGCTTTTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTA-
GAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTTAATAATTCTTACAATAGCTTGTTC
ATATGAATTAACACAAAATGTTGCAAAATCAAATTCATTCATCACATAATT-
GTTTAATTTAGCTTTTCGTAGCATCTGTTTTAATAATGTGTGATCTATATATTTGTTTAGTTTCATTTT
TCTCCTATATATTCATTTTTAATTTAATTTCTTTAATAATTTTCGTCTACTTTAACTT-
TAGCGTTTTGAACAGATTCACCAACACCTATAAAAATAAATTTTTAGTTTAGGTTCCAGTTCCACTTGGGC
GAACAGCAAATCATGACTTATCTTCTAAATAAAATTTTAGTAAGTCTTGTCCCTGG-
CATATTATACATTCCATCGATGTAGTCTTCAACATTAACAACCTTAAAGTCCAGCAATTTGAGTTAAGGG
GGTTGCTCTCAAGGATTTCAATTAAGGGGTCAATTTTTAATTTCTTTTCTTCGGGTTAAAATT-
CAAGTTTTAAAGGGAAAGGGGAAAATGCACCCATTTCTTTAAAAAACCTTCCAAAAAGCCCCAAG

Nrg1

lentiCRISPRv2 gRNA1, Nrg1 (1)

TCCGAATTCGATTTCTTGGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCAGCCATCT-
CATAAAGTGTGGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA
GTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGG-
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG

TCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTG-
TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGTTCTAGAGCGCTGCCACCAT-
GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGCTGGGCCGTGATCACCGA
CGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT-
CAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAA
GAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGA-
GATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCCTCCTG
GTGGAAGAGGATAAGAAGCAGGACGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGG-
CCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCCACAAGGC
CGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTT-
CCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCA
GACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGG-
CCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCC
AAAAAAAAAATGGCCTGTTCCGAAACCTGATTGCCCGAACCTGGG-
CCTGACCCCAATTTGAGAAGAAATTTCAACCTGGCCAAGATGCCAAATGGACCTGAACAAGGGACC
CTTCAAGAACTGGAAAACCGGTGGGCCAAATTTGGGAACAGAACGCCAACTGTTTTTGGG-
CCCCAAAACTGTCCAACCCCGGGGAACAAAATCCAGAAAGAGAAACCAATAACCAAGGCCCC
CGGGCCCCCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCCACAGAAA-
TAGCCCCGGGGAAGAATTTGGGGGAGAAGGTG

lentiCRISPRv2 gRNA1, Nrg1 (2)

TAAGGGAATCAGTGTGTTGGAATTTGTGCTCATTACCGGTGAGCGGAAAAGATGGGCGT-
CATCTAGGTTGCTAACGCTCATCACCTTCATCTTGTCTCCTCAGTTTTCTCTCTTTCGCCGACGACGA
ATAGAATCCCATCTTCGCAAACGATCTCTCCCTCTGAAGAAAAGATCTCACCGGA-
GATCGCTCCTCTCCCTTCCACCCCGCTCCTCCTCAAACTCAAACCATCCCTTCTTCTTCGACACTTC
CTGAACCAGAAAACGACGACGTTTTCCGAGATCCTGAGCCCGCCTTCGCTCCATCGGCTT-
CTCCTCCGGCTTCATCTCTTGTCTCTGTCTTCTCAAGCTCCCGAGTTTTTCATCTACTTTGTCTTCG
CCGCCGTCTATTGTTTCTCGCTCCGGCTTCTTCCGTTTCAGCTATATAGGTCATT-
CATATATTTTAGACCACGTACGTCATTATTTTCATGAGTTTTATTTGTCCCTAAAAATAACGAATAATATT
AGATTTAGTTTTGATTTTTCAATTTTTTTTACTATTTGTATTTTTTATTGTTCTCCAC-
TTAACATTTTGTACAGTTTTAGATTGGTTAAGGGAAAAACAAAAAAGAATAATGAGCTGTCTG
GCTGTGTAGTTATGCACATCCCTACATGCCAAAACATGAGCGCATTTATATGACAAGG-
TAATGAGAGATGGTGTTCGTAAGGTAGG

lentiCRISPRv2 gRNA2, Nrg1 (1)

CCCGAATTCGATTCTTGGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGAGCTAT-
TAAGGAACACCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA
AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAGGAGT-
GGGAATTGGCTCCGGTGCCTGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG
GGGAGGGTGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGT-
GATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCG
CCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTA-
GAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTG
GGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGA
CTGGAAGAGTCCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGG-
CCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACG
TGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCA-
GACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCT
GTCTGCCAGACTGAACAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCCA-
GAAAAAAAAATGGCCTGTTTCGAAAACCTGATTCCTGAACCGGGGCTGACCCCAATTTGAGAAGA
AATTTGACCTGGCCCAAGAATGCCAAATGG-
CGTGAACAGGGAACCCCTCAACAACAACCTGGGAAACC

lentiCRISPRv2 gRNA2, Nrg1 (2)

CCCGTATTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGAGCTAT-
TAAGGAACACCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA
AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGT-
GGGAATTGGCTCCGGTGCCTGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG
GGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGT-
GATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCG
CCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTA-
GAGCGCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTG
GGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGG-
CAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAAC
AGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCG-
GATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGA
CTGGAAGAGTCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG-
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTG
GTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGG-
CCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACG
TGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCA-
GACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCT
GTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCGGATCGCCAGCTGCCCGG-
CAAAAAGAAGAATGGCCTGTTTCGAAACCTGATTGCCCTGAACCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGA
GCAACTTCCAACCTGGCCGAGGATGCCAACTG-
GAGCTGAACAAGGACCCCTACAAGAAGAACCTGGAAAACCTGGTGGGCCATATCGGGACAATACGC
GAACTGTTTTGGGCCCAAGAAGTGTCAAAAACCCCGGTGAGGAAACCCTGA

Price for lentiviral vector digestion, oligo annealing and cloning into digested vector

Lentiviral vector digestion, oligo annealing and cloning into digested vector						
Plasmid extraction (midprep)	kit/supply	reaction (pc.)	kit (pc.)	kit price (ALV 0%)	price for midi (100 ul)	
	Nucleobond Extra midi kit 100 preps+10 preps (740410.100)		1	100	818	8,18
	Falcon (50ml)		1	500	64	0,128
	Reagent	reaction (ul)	kit (ul)	kit price (ALV 0%)	price for midi (100 ul)	
	HyClone H2O		100	1000	13,54	1,354
	LB-broth (BM040)		200	1000	8	1,6
	Ampicillin(100 mg/ml), cn: A0166-5G		50	50000	54,54	0,05454
	Mittapipetti 5 ml (cn:86.1253.001)		3	500	72,2	0,4332
	Mittapipetti 10 ml (cn: 86.1254.001)		4	500	72,2	0,5776
	Mittapipetti 25 ml (cn: 86.1685.001)		1	500	72,2	0,1444
	1000 ul refill tips 10x96 (705-1111-6700)		1	960	33,6	0,035
	Estimated price for one reaction	5 ug per reaction (~1,8 ug/ul)	midi stock	midi price		estimated price per reaction
			2,77	100	12,50674	0,346
Phase1	Reagent/kit	reaction volume (ul)	Kit (ul)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	FastDigest Esp31 (BsmBI), cn:FD0454		3,5	20	61,69	10,80
	FastAP (cn:EF0651)		3,5	1000	61,8	0,22
	100 mM DTT		0,6	2,5	0,00589615	0,0014
	HyClone H2O (dilution added)		1047,1	100000	13,54	0,142
Phase 2	PCR tubes 0,2 ml, thin-walled tubes with flat cap (AB-0620)	reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	10/20 ul refill tips 10x96 tips (70-S1110-3700)		1	1000	26,4	0,026
			6	960	25,6	0,160
	Reagent/kit	reaction volume (ul)	Kit (ul)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	SYBR Safe DNA gel stain 1000x (cn:S33102)		10	400	66,71	1,668
	Agarose (g not ul), cn:443025T		0,7	500	806	1,128
	DNA ladder		10	5000	103,69	0,207
	Supply	reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	Nucleospin Gel and PCR clean up (cn: 740609.250)		1	250	287	1,15
	10/20 ul refill tips 10x96 tips (70-S1110-3700)		2	960	25,6	0,053
Microcentrifuge tubes 1,5 ml Eppendorf (KART279)		2	500	11,29	0,045	
1000 ul refill tips 10x96 (705-1111-6700)		3	960	33,6	0,105	
200 ul refill tip 10 x 96 (70-S1111-0700)		1	960	21,4	0,022	
Phase 3 & 4	Reagent	reaction volume (ul)	Kit (ul)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	T4 PNK (M02015)		0,5	50	58	0,58
	HyClone H2O		205,5	100000	13,54	0,0278
	Oligos (FWD+REV+dispatching costs)					19,5
	Supply	reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
PCR tubes 0,2 ml, thin-walled tubes with flat cap (AB-0620)		2	1000	26,4	0,053	
10/20 ul refill tips 10x96 tips (70-S1110-3700)		6	960	25,6	0,160	
Phase5	Reagent	reaction volume (ul)	Kit (ul)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	Quick Ligation (M2200S)		1,5	30	124	6,20
	HyClone H2O		3	100000	13,54	0,0004
	Supply	reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	PCR tubes 0,2 ml, thin-walled tubes with flat cap (AB-0620)		1	1000	26,4	0,03
10/20 ul refill tips 10x96 tips (70-S1110-3700)		5	960	25,6	0,13	
Phase6	Supply	Reaction volume (ul)	STK (ul)	STK price (ALV 0%)	Price per reaction	
	one shot stb13 com E.coli, 80 ul (C737303)		100	1000	460,97	46,10
	PUC19		1	100	83,5	0,835
	Supply	reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	LB+ampicillin plate (sample+controls)		3			19,95
	Microcentrifuge tubes 1,5 ml Eppendorf (KART279)		1	500	11,29	0,02
	greiner pyöreäpohja sentrifugiputki 14 ml (187261)		1	800	98,6	0,12
	Inoculation spreader (R6.1569.005)		1	500	150,36	0,30
	10/20 ul refill tips 10x96 tips (70-S1110-3700)		1	960	25,6	0,03
	200 ul refill tip 10 x 96 (70-S1111-0700)		1	960	21,4	0,02
	LB-broth (BM040)		5	1000	8	0,04
	Ampicillin(100 mg/ml), cn: A0166-5G		5	50000	54,54	0,01

Phase7		reaction (pc.)	Kit (pc.)	Kit price (ALV 0%)	Price per reaction	
	Supply					
	Nucleospln plasmid mini kit Transfection grade (740490)		2	250	411	1,64
	glycerol 100 % → 50 % (Kit price/2)		800	1000000	5,645	0,005
	Microcentrifuge tubes 1,5 ml Eppendorf (KART279)		4	500	11,29	0,090
	Cryotubes		2	500	83,5	0,334
	1000 ul refill tips 10x96 (705-1111-6700)		12	960	33,6	0,420
	200 ul refill tip 10 x 96 (70-51111-0700)		2	960	21,4	0,045
				Total		112,71 €
				Total (110%)		124,0 €
Time		time(h)				
	Phase					
	Gel+pipeting (p1)			1,00		
	Gel purification (p2)			0,83		
	phosphorylate and anneal oligos (p3)			0,25		
	dilute and ligation reaction (p4 and p5)			0,67		
	Transformation into Stb13 bacteria			1,47		
	Inoculation to LB-ampicillin broth + plasmid DNA isolation and purification+cryotubes			2,50		
	Total			6,72 h		
	Price 10€/h			67,17 €		
				Total (costs+time)		179,87 €
				Total (costs+time, 110%)		191,14 €