**I. Complete Sequence of Construct (both strands and amino acid sequence): Using 4 pc. Assembly**

**5’-GTCTCGATCC CGCGAAATAA TACGACTCAC TATAGGGAGC ACACAACGAG TTCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT**

**3’-cagagctagg gcgctttatt atgctgagtg atatccctcg tgtgttgctc aagggagatc tttattaaaa caaattgaaa**

**AA**GA**AGGAGG TATACCATG-3’**

**ttCTTCCTCC ATATGGTAC-5’**

001 010 020

**Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L**

**CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**gtc caa gtc gac gtt ctt tcg cca cca cca gac caa gtc cgt ccg cca tcg gac gca gac**

021 **027 028 029** 030 **032 033 034** **036** 040

**S C A A S G R A A S G H G H Y G M G W F**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT DKT DMA DMA TCA GGT MWK DRT MWK TAT DKT ATG GGT TGG TTT**

**tcg aca cgt tcg tcg cca gca cgt cgt agt cca gta cca gta ata cca TAC CCA ACC AAA**

041 050  **055** **056**  060

**R Q V P G K E R E F V A A I R W S G K E**

**CGT CAG GTT CCG ggt aaa gaa cgt gaa ttt gtt gca gca att dkt dkk agc ggt aaa gaa**

**GCA GTC CAA GGC CCA TTT CTT GCA CTT AAA CAA CGT CGT TAA ZMA ZMM TCG CCA TTT CTT**

061 070 080

**T W Y K D S V K G R F T I S R D N A K T**

**acc tgg tat aaa gat agc gtg aaa GGT CGT TTT ACC ATC AGC CGT GAT AAT GCA AAA** **ACC**

**TGG ACC ATA TTT CTA TCG CAC TTT CCA GCA AAA TGG TAG TCG GCA CTA att acg ttt TTG**

081 090 100

**T V Y L Q M N S L K G E D T A V Y Y C A**

**ACC GTT TAC CTG CAG ATG AAT AGT CTG AAA GGT GAA GAT ACG GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**gtg gca aat gga cgt cta ctt atc aga ctt tcc act tct** **tgc** **CGT CAC ATA ATA ACA CGT**

101 **103 104 106 107** 110 120

**A R P V R V A D I S L P V G F D Y W G Q**

**GCA CGT mmk dwt cgt dwt dma gat att agc ctg ccg gtt ggt ttt gat tat tgg ggc cag**

**CGT GCA KKM ZWA GCA ZWA ZKT** **CTA TAA TCG GAC GGC CAA CCA AAA CTA ATA ACC CCG GTC**

121 128

**G T Q V T V S S**

**ggg acc cag gtt acc gtt agc agc**

**CCC TGG GTC CAA TGG CAA TCG TCG**

**NbPRBS1: (108 bases) \*Current Oligo**

**5’-GTCTCGATCC CGCGAAATAA TACGACTCAC TATAGGGAGC ACACAACGAG TTCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT**

**AA**GA**AGGAGG TATACCATG GGT CAG CTG-3’**

**NbPRBS1: (108 bases + 8 bases NE + - 9 bases (old Nb) + 24 bases (new Nb overlap) = 131 bases \*Desired Oligo**

**5’- NCTTCTCG GTCTCGATCC CGCGAAATAA TACGACTCAC TATAGGGAGC ACACAACGAG TTCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT**

**AA**GA**AGGAGG TATACCATG CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT -3’**

**NbCDS1: (132 bases)**

**5’ -CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT DKT DMA DMA TCA GGT MWK DRT MWK TAT DKT ATG GGT TGG TTT**

**CGT CAG GTT CCG -3’**

**NbCDS2: (120 bases)**

**3’ TAC CCA ACC AAA**

**GCA GTC CAA GGC CCA TTT CTT GCA CTT AAA CAA CGT CGT TAA ZMA ZMM TCG CCA TTT CTT**

**TGG ACC ATA TTT CTA TCG CAC TTT CCA GCA AAA TGG TAG TCG GCA CTA-5’**

**5’ ATC ACG GCT GAT**

**GGT AAA ACG ACC TTT CAC GCT ATC TTT ATA CCA GGT TTC TTT ACC GCT MMZ AMZ AAT TGC**

**TGC AAC AAA TTC ACG TTC TTT ACC CGG AAC CTG ACG AAA CCA ACC CAT -3’**

**NbCDS3: (102 bases)**

**5’ -GGT CGT TTT ACC ATC AGC CGT GAT AAT GCA AAA** **ACC**

**ACC GTT TAC CTG CAG ATG AAT AGT CTG AAA GGT GAA GAT ACG GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GCA CGT -3’**

**NbCDS4: (102 bases) + NE Site (8 bases) = 110 bases**

**3’- CGT CAC ATA ATA ACA CGT**

**CGT GCA KKM ZWA GCA ZWA ZKT** **CTA TAA TCG GAC GGC CAA CCA AAA CTA ATA ACC CCG GTC**

**CCC TGG GTC CAA TGG CAA TCG TCG NCTTCTCG -5’**

**5’- GCTCTTCN GCT GCT AAC GGT AAC CTG GGT CCC CTG GCC CCA ATA ATC AAA ACC AAC CGG**

**CAG GCT AAT ATC TKZ** **AWZ ACG AWZ MKK ACG TGC TGC ACA ATA ATA CAC TGC -3’**

**[GTCTC GATCC CGCGA AA**

**TAATA CGACT CACTA TA**

**GGGAGCACACAACGAGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA**

**{**GA**AGGAGGT** **ATACC** **ATG**

**CAG GTT CAG] CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT CGT GCA GCA TCA GGT CAT GGT CAT TAT GGT [ATG GGT TGG TTT**

**CGT CAG GTT CCG}1,149 GGT AAA GAA CGT GAA TTT GTT GCA GCA ATT CGT TGG AGC GGT AAA GAA**

**ACC TGG TAT AAA GAT AGC GTG AAA {GGT CGT TTT ACC ATC AGC CGT GAT]2,120 AAT GCA AAA ACC**

**ACC GTT TAC CTG CAG ATG AAT AGT CTG AAA GGT GAA GAT ACG [GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GCA CGT}3,102 CCG GTT CGT GTT GCA GAT ATT AGC CTG CCG GTT GGT TTT GAT TAT TGG GGC CAG**

**GGG ACC CAG GTT ACC GTT AGC AGC]4,102 . . . insert NE site (bottom strand SDA)**

**I.B. Modifications of existing oligos**

**NbPRBS1: (108 bases) \*Current Oligo**

**5’-GTCTCGATCC CGCGAAATAA TACGACTCAC TATAGGGAGC ACACAACGAG TTCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT**

**AA**GA**AGGAGG TATACCATG GGT CAG CTG-3’**

**NbPRBS1: (108 bases + 8 bases NE + - 9 bases (old Nb) + 24 bases (new Nb overlap) = 131 bases \*Desired Oligo**

**5’- NCTTCTCG GTCTCGATCC CGCGAAATAA TACGACTCAC TATAGGGAGC ACACAACGAG TTCCCTCTAG AAATAATTTT GTTTAACTTT**

**AA**GA**AGGAGG TATACCATG GGT CAG CTG-3’**

**II. Complete Sequence of Construct (both strands and amino acid sequence): Using OP Assembly**

Nt.BspQI  

001 010 020

**Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L**

**CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**gtc caa gtc gac gtt ctt tcg cca cca cca gac caa gtc cgt ccg cca tcg gac gca gac**

021 **027 028 029** 030 **032 033 034** **036** 040

**S C A A S G R A A S G H G H Y G M G W F**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT DKT DMA DMA TCA GGT MWK DRT MWK TAT DKT ATG GGT TGG TTT**

**tcg aca cgt tcg tcg cca gca cgt cgt agt cca gta cca gta ata cca tac cca acc aaa**

041 050  **055** **056**  060

**R Q V P G K E R E F V A A I R W S G K E**

**CGT CAG GTT CCG GGT AAA GAA CGT GAA TTT GTT GCA GCA ATT DKT DKK AGC GGT AAA GAA**

**gca gtc caa ggc cca ttt ctt gca ctt aaa caa cgt cgt taa cgt tgg TCG CCA TTT CTT**

061 070 080

**T W Y K D S V K G R F T I S R D N A K T**

**ACC TGG TAT AAA gat agc gtg aaa ggt cgt ttt acc atc agc cgt gat aat gca aaa** **acc**

**TGG ACC ATA TTT CTA TCG CAC TTT CCA GCA AAA TGG TAG TCG GCA CTA ATT ACG TTT TTG**

081 090 100

**T V Y L Q M N S L K G E D T A V Y Y C A**

**acc gtt tac ctg cag atg aat agt ctg aaa ggt gaa gat acg GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GTG GCA AAT GGA CGT CTA CTT ATC AGA CTT TCC ACT TCT** **TGC** **CGT CAC ATA ATA ACA CGT**

101 **103 104 106 107** 110 120

**A R P V R V A D I S L P V G F D Y W G Q**

**GCA CGT CCG GTT CGT GTT GCA GAT ATT AGC CTG CCG GTT GGT TTT GAT TAT TGG GGC CAG**

**CGT GCA MMK DWA GCA DWA DMT** **CTA TAA TCG GAC GGC CAA CCA AAA CTA ATA ACC CCG GTC**

121 128

**G T Q V T V S S**

**GGG ACC CAG GTT ACC GTT AGC AGC**

**CCC TGG GTC CAA TGG CAA TCG TCG**

**[NE--CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT CGT GCA GCA TCA GGT CAT GGT CAT TAT GGT {--ATG GGT TGG TTT**

**CGT CAG GTT CCG->] GGT AAA GAA CGT GAA TTT GTT GCA GCA ATT CGT TGG {<-AGC GGT AAA GAA**

**ACC TGG TAT AAA->} GAT AGC GTG AAA GGT CGT TTT ACC ATC AGC CGT GAT AAT GCA AAA ACC**

**ACC GTT TAC CTG CAG ATG AAT AGT CTG AAA GGT GAA GAT ACG [<-GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GCA CGT--NE} CCG GTT CGT GTT GCA GAT ATT AGC CTG CCG GTT GGT TTT GAT TAT TGG GGC CAG**

**GGG ACC CAG GTT ACC GTT AGC AGC--NE]**

**NbCDS1: (10 end sequence + Nt.BsmAI 6 bp + 132 bases) = 148 bases**

**5’ –** **ACCCGGTGTA GTCTCG CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT CTG GTT CAG GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG**

**AGC TGT GCA AGC AGC GGT DKT DMA DMA TCA GGT MWK DRT MWK TAT DKT ATG GGT TGG TTT**

**CGT CAG GTT CCG- 3’**

**NbCDS2: (84 bases)**

**5’ -ATG GGT TGG TTT**

**CGT CAG GTT CCG GGT AAA GAA CGT GAA TTT GTT GCA GCA ATT DKT DKK AGC GGT AAA GAA**

**ACC TGG TAT AAA- 3’**

**NbCDS3: (138 + Nt. BsmAI 6 bases + 10 end sequences) = 154 bases**

**3’ -TCG CCA TTT CTT**

**TGG ACC ATA TTT CTA TCG CAC TTT CCA GCA AAA TGG TAG TCG GCA CTA ATT ACG TTT TTG**

**GTG GCA AAT GGA CGT CTA CTT ATC AGA CTT TCC ACT TCT** **TGC** **CGT CAC ATA ATA ACA CGT**

**CGT GCA GCTCTG TAGC GATC CC -5’**

**5’ -AGC GGT AAA GAA**

**ACC TGG TAT AAA GAT AGC GTG AAA GGT CGT TTT ACC ATC AGC CGT GAT AAT GCA AAA** **ACC**

**ACC GTT TAC CTG CAG ATG AAT AGT CTG AAA GGT GAA GAT ACG GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GCA CGT -3’**

**NbCDS4: (102 bases + 20 end sequence + 6 bases Nt. BsmAI + 8 bases Nt. BspQI) = 136 bases**

**3’ -CGT CAC ATA ATA ACA CGT**

**CGT GCA MMK DWA GCA DWA DMT** **CTA TAA TCG GAC GGC CAA CCA AAA CTA ATA ACC CCG GTC**

**CCC TGG GTC CAA TGG CAA TCG TCG GCTCTG TAGC GATC CC TCTTCTCG GTGT CAGC CA - 5’**

**5’ –AC CGAC TGTG GCTCTTCT CC CTAG CGAT GTCTCG GCA GTG TAT TAT TGT GCA**

**GCA CGT MMK DWT CGT DWT DWA GAT ATT AGC CTG CCG GTT GGT TTT GAT TAT TGG GGC CAG**

**GGG ACC CAG GTT ACC GTT AGC AGC- 3’**