年 月 日 修正 補充 87.5.06

附件 3 ：第 81102785 號專利申請案
中文說明書修正頁 民國 87 年 5 月呈

申請日期	81 年 4 月 10 日
案號	81102785
類別	C12N 15/52, 15/85, C12P 19/34

（以上各欄由本局填註）

393511
A4
C4
公告本
393511

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	使用反式接合核糖酶以切除一部份細胞之方法
	英文	Cell ablation using trans-splicing ribozymes
二、發明創作人	姓名	(1) 賀華德・古德曼 Goodman, Howard M. (2) 詹姆斯・海斯羅夫 Haseloff, James (3) 安狄魯・布朗德 Brand, Andrea
	國籍	(1) 美國 (2) 澳洲 (3) 英國
	住、居所	(1) 美國麻州〇二一五九・紐頓・岩架路十號 10 The Ledges Road, Newton, MA 02159, USA (2) 美國麻州〇二一三九劍橋楓木路二六號 26 Maple Avenue, Cambridge, MA 02139, USA (3) 美國麻州〇二一三九劍橋楓木路二六號 26 Maple Avenue, Cambridge, MA 02139, USA
三、申請人	姓名（名稱）	(1) 通用醫院有限公司 The General Hospital Corporation (2) 哈佛大學董事暨榮譽會員會 The President and Fellows of Harvard College
	國籍	(1) 美國 (2) 美國
	住、居所（事務所）	(1) 美國麻州〇二一一四・波士頓・福錄特街五五號 55 Fruit St., Boston, MA 02114, USA (2) 美國麻州〇二一三八劍橋昆西路一七號 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, USA
	代表人姓名	(1) 大衛・葛拉斯 Glass, David J. (2) 喬伊斯・布里頓 Brinton, Joyce

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

年 月 日 修正 補充 87.5.06

附件 3 ：第 81102785 號專利申請案
中文說明書修正頁 民國 87 年 5 月呈

申請日期	81 年 4 月 10 日
案號	81102785
類別	C12N 15/52, 15/85, C12P 19/34

（以上各欄由本局填註）

393511
A4
C4
公告本
393511

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	使用反式接合核糖酶以切除一部份細胞之方法
	英文	Cell ablation using trans-splicing ribozymes
二、發明創作人	姓名	(1) 賀華德・古德曼 Goodman, Howard M. (2) 詹姆斯・海斯羅夫 Haseloff, James (3) 安狄魯・布朗德 Brand, Andrea
	國籍	(1) 美國 (2) 澳洲 (3) 英國
	住、居所	(1) 美國麻州〇二一五九・紐頓・岩架路十號 10 The Ledges Road, Newton, MA 02159, USA (2) 美國麻州〇二一三九劍橋楓木路二六號 26 Maple Avenue, Cambridge, MA 02139, USA (3) 美國麻州〇二一三九劍橋楓木路二六號 26 Maple Avenue, Cambridge, MA 02139, USA
三、申請人	姓名（名稱）	(1) 通用醫院有限公司 The General Hospital Corporation (2) 哈佛大學董事暨榮譽會員會 The President and Fellows of Harvard College
	國籍	(1) 美國 (2) 美國
	住、居所（事務所）	(1) 美國麻州〇二一一四・波士頓・福錄特街五五號 55 Fruit St., Boston, MA 02114, USA (2) 美國麻州〇二一三八劍橋昆西路一七號 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, USA
	代表人姓名	(1) 大衛・葛拉斯 Glass, David J. (2) 喬伊斯・布里頓 Brinton, Joyce

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

申請日期	81 年 4 月 10 日
案號	81102785
類別	

A4
C4

（以上各欄由本局填註）

發明 新型 專利說明書

一、發明 新型 名稱	中文	
	英文	
二、發明 創作 人	姓名	⑷ 諾伯特・比利蒙 Perrimon, Norbert
	國籍	⑷ 法國
	住、居所	⑷ 美國麻州０２１４６布魯克林麗晶圓環７６號 76 Regent Circle, Brookline, MA 02146,USA
三、申請人	姓名（名稱）	
	國籍	
	住、居所（事務所）	
	代表人姓名	

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85. 8. 12 修正
年 月 日 補充
A7
B7

五、發明說明（ 41）

實例 3

Ｇａｌ４－白喉毒素Ａ鏈反式接合核糖酶之構築及鑑定

依據本發明及實例１所述之方法，已設計一種Ｇａｌ４－白喉毒素Ａ鏈反式接合的融合核糖酶。（圖６）。此核糖酶之序列以ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．６示出。ＧＡＬ４－ＤＴＡ核糖酶匣是一種ＳａｌＩ－ＸｈｏＩ片段。ＳｃａＩ位置位在３´接合位置上游５個鹼基處。此核糖酶可將白喉毒素Ａ鏈之編碼序列接合，至ＧＡＬ４ｍＲＮＡ　５´區中的位置上。此反式接合活性，活體外（如上）及活體內（如下），均具活性。ＧＡＬ４－ＤＴＡ核糖酶成功設計之主要準則，以及任何可將編碼毒性產物之序列反式接合之反式接合核糖酶，不僅在於有效且精確之反式接合催化作用，同時毒性產物（例如ＤＴＡ）之表現沒有反式接合就不會發生。

依據上述之設計，構築核糖酶之催化部份，且在ＧＡＬ４及ＤＴＡ之５´編碼區內分別選擇５´及３´接合位置。相當於ＤＴＡ基因之３´表現子序列，已於眞核細胞中表現，除了除去第一個ＡＵＧ密碼子及許多近端的胺基酸。ＤＴＡ原先的白喉棒桿菌型於其５´區也有異，以一個ＣＵＧ密碼子啓動轉譯作用。原先的ＤＴＡ序列也含有一個不存在的訊號肽前導序列。

這些核糖酶分子可在３´接合位置進行自動的切割。由於ＤＴＡ極具毒性，因此任何釋出之３´表現子序列不

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明範圍

本發明是有關可反式接合反應之新穎的核糖酶。

背景技藝之簡要說明

Ⅰ. Ⅰ群不表現子

具有催化活性之ＲＮＡ分子稱為核糖酶或ＲＮＡ酵素(Cech, T.R. Am. Rev. Biochem. 59:543-568 (1990)。嗜熱四膜蟲(Tetrahymena Thermophila)前驅體ｒＲＮＡ含有一個可催化自身切除作用之不表現子（一種核糖酶）。此核糖酶是結構上有關之Ⅰ群不表現子中的一類。

經修飾的嗜熱四膜蟲不表現子，其接合活性需存在有鳥嘌呤核苷酸輔因子及二價陽離子，不論是Mg^{+2}或Mn^{+2}，且經由二個相繼的轉酯基作用反應而發生（圖１）。首先，自由態的鳥嘌呤核苷結合至核糖酶，且其３´羥基經定位以將磷厚子粘附在５´接合位置。鳥嘌呤核苷共價粘附至不表現子序列，並釋出５´表現子。其次，位在３´接合位置之磷酸二酯鍵，自５´表現子新游離的３´羥基進行粘附，因而有連接之表現子序列產生。接下來切出的不表現子進行，系列轉酯基作用反應，包括其３´羥基及內部序列，因而形成縮短之環狀。

這些相繼反應在化學上類似，且似乎在單一活性位置處發生。自身接合之反應特徵在於，當不同的ＲＮＡ連接在高度保留之不表現子四週互相形成相似之構型時，可形

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85. 8. 12
85. 8. 14 修正
A7 年 月 日
B7 補充

五、發明說明（ 42）

會造成毒性轉譯作用產物此點是十分重要的。3′表現子在第13位置上含有一個在架構上之甲硫胺酸，其可想像地生成經截斷但具毒性之多肽。爲減少此一可能性，野生型序列（R_z-DTA_{met}）自此位置上改變，即於二個不同的核糖酶構體中，甲硫胺酸變化成異白胺酸（R_z-DTA_{ile}）或白胺酸（R_z-DTA_{leu}）（圖6）。

實例4

本發明核糖酶之活體內活性

I．前言

研究以此中所示之準則所設計之核糖酶活體內活性，及此核糖酶遞送新基因活性至宿主細胞之能力，利用所述之Gal4－白喉毒素A鏈反式接合核糖酶（實例3及圖6）遞送高度毒性之白喉毒素A鏈產物至宿主細胞中而明示。於此系統中，選中果蠅爲宿主細胞，且在果蠅宿主中可以組織特異方式控制本發明核糖酶之表現。

白喉毒素是由對噬菌體具溶原性之白喉棒桿菌所分泌者。此毒素係爲單一多肽產物，可進行蛋白水解，成A及B鏈。A鏈（DTA）具有强力之ADP核糖基酶活性，其對眞核細胞轉譯加長作用因子EF－2具特異性。此酵素即使極少量存在也可造成轉譯作用之停止，且最後是各種眞核細胞之死亡。B鏈可藉著與甘露糖殘基結合而粘附

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (2)

成不同的ＲＮＡ結構。接合需賴不表現子一表現子接頭越過稱之為〝內部引導序列〞或ＩＧＳ之互補序列之排列。

於５′接合位置處之第一次解離需在ＩＧＳ及接合位置鄰接序列間有鹼基－配對之螺旋（Ｐ１）形成。在此螺旋Ｐ內Ｕ：Ｇ〝不穩定〞鹼基對之出現，表明一個將會在核糖酶催化反應中被打斷之磷酸二酯鍵。此鍵解離後，置換部份的Ｐ１螺旋，及由於ＩＧＳ和鄰接３′接合位置之序列間之互補性，會形成一個新的螺旋Ｐ１０。一個無變化的鳥嘌呤核苷殘基位在３′接合位之磷酸二酯前，類似被置換之Ｐ１序列部份。因此，表現子之連接發生在第一解離反應反面，但此中新的表現子序列已置換不表現子序列。可注意到，接在表現子連接作用後之不表現子環化反應，也涉及５′序列越過ＩＧＳ之鹼基配對，及由不表現子末端鳥嘌呤殘基３′羥基調介之粘附(Been, M.D., et al., 〝 Selection of Ciircularizaton Sites In A Group I IVS RNA Requires Multiple Alignments of An Internal Temlate-Lkie Sequence, 〞Cell 50:951 (1987))。

Ⅱ．催化活性

為了更佳地定義Ｉ群不表現子之結構及催化特性，已自嗜熱四膜蟲不表現子〝核心〞中除去表現子序列。Cech, T.R. et al., WO 88/04300, 描述由四膜蟲不表現子核糖酶所具有的至少三種催化活性：（１）去磷醯化活性

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 43）

毒素至細胞表面受體上，因此可胞內遞送，是採細胞攝粒作用且以胞腺融合方式進入胞質中。

於缺乏B鏈下，A鏈當於胞外存在時較不具毒性。此特性及其劇毒，已被提議可用於異位切除實驗。如，編碼DNA之序列已於導入對來基因的老鼠中表現，利用視蛋白啓動基因來驅動於發展眼睛中之表現。結果老鼠眼殘而盲(Breitman, M.L., Science 238:1563-1565(1987))。於另一研究中，進行老鼠胰臟之切除(Palmiter, R.D. et al., Cell 50:435-443(1987))且Wert, S.E. et al., Am. Rev. Respir. Dis. 141(no.4,part 2):A695(1990)描述利用嵌合基因來切除肺泡細胞，基因中含啓動基因及人類界面活性劑蛋白質C基因之5´鄰接序列（表現於II型肺胞細胞）及DTA基因。

然而，以此途徑，無法保持或增殖轉形之有機體，其可能有更嚴重，或致命的表現型。此外，迄今尚無以完整DTA序列轉形於某一種類（如果蠅）之報告。於此轉形過程中DTA基因之有缺失的表現可造成即刻的死亡。

II. 果蠅系統

於果蠅中對準基因表現之一般方法已發展出來了。首先，系統可使個別株有快速的生殖作用，其中異位基因表現可集中於不同的組織或細胞型式中：利用加强子偵測技術(O'Kane, C.J. and Gehring, W.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA:9123-9127(1987); Bellen et al., Gene-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（3）

，可以序列一特異的方式移去ＲＮＡ之３´末端磷酸，（２）ＲＮＡ聚合酶活性（轉核苷酸基酶），可催化寡核苷酸至多核苷酸之轉化作用，及（３）序列一特異的核糖核酸內切酶活性。

經分離之核糖酶活性，不與受質ＲＮＡ呈反式地交互作用，且此乃交互作用特色之處。例如，當截斷型之不表現子與相當於５´接合接頭之序列共置，位置可在模倣接合中第一步驟方式進行依賴鳥嘌呤核苷之解離。受質與經核糖核酸內切解離之不表現子ＲＮＡ鹼基配對，形成Ｐ１螺旋，且於第４－６位置之Ｕ：Ｇ配對後發生解離。遺傳分類比較及突變分析顯示，緊接在５´接合位置保留性尿嘧啶殘基處序列之本質，只要螺旋Ｐ１之鹼基配對被保持，則對催化作用而言是不重要的(Doudna, J.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7402-7406(1989))。

對３´接合位置選擇之序列需求，似乎主賴不表現子本身之結構，包括螺旋Ｐ９．０及以下描繪３´不表現子界線之鳥嘌呤核苷殘基。然而，３´表現子內之鄰接序列對於形成螺旋Ｐ１０及有效的接合是必需的，如突變分析中所示的(Suh, E.R. et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2960-2965(1990)。此外，寡核苷酸已呈反式地連接，利用截斷型之不表現子及〝外在的〞領導序列及已由５´鳥嘌呤核苷殘基伸長之寡核苷酸。相當於３´表現子序列之受質寡核苷酸，於連接之前藉著在外在模板上形成類Ｐ１０螺旋Ｐ而單獨地排列(Doudna, J.A. et al., Nature

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (4)

339:519-522(1989))。

藉著將不連續的"雜交"區基因操作之核糖酶，則核糖酶之解離活性可對準特異的ＲＮＡ，此種雜交區可與欲求的ＲＮＡ特異地雜交。例如，Gerlach, W.L. et al., EP 321,201構築一個含有與標的ＲＮＡ互補序列之核糖酶。增加此互補序列之長度可增加此序列對標的之親和力。然而，此核糖酶之雜交及解離區互相是不可缺少的部份。經由互補區雜交至標的ＲＮＡ後，核糖酶的催化區可解離標的。有人提議，核糖酶可用於活體內鈍化或解離標的ＲＮＡ，如治療其特徵是產生外來宿主ＲＮＡ之人類疾病。然而，當未描述或提議關於核糖酶指令之反式－接合（和反式－解離相反）。

各種自然生成之核糖酶，其核糖核酸內切酶活性（解離活性）已被充份研究。由這些核糖酶之結構及序列分析顯示，於解離位置四週之某些核苷酸具有高度保留性，但鄰接序列則並未如此具保留性。此訊息可用來設計自然界未有之新穎的核糖核酸內切酶活性。例如，Cech及其同事構築具有不同質序列特異性之新穎的核糖酶(Cech, T.R. et al., WO 88/04300; Koizumi, M. et al., FEBS Lett. 228:285-288(1988); Koizumi, M. et al., FEBS Lett. 239:285-288(1988); Haseloff, J. et al., Nature 334:585-591(1987); 及 Heus, H.A. et al., Nucl. Acids Res. 18:1103-1108(1990)。由早期自體解離植物類病毒及衛生ＲＮＡｓ之研究(Buzayan, J.M. et al.,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (5)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8859-8862(1986),已發展出可設計核糖酶之原則，此酶可以高度序列特異方式，反應地解離其他的ＲＮＡ分子。(Haseloff, J. et al., Nature 334:585-591(1988)。然而，這些構體無法催化有效且達成目標之反式－接合反應。

於分別ＲＮＡ上表現子之連接，即反應－接合，對由ＳｎＲＮＰ－調介之且自身催化之Ｉ群及Ⅱ群不表現子而言均是自然發生的。於錐蟲及Caenorhabditis eleqans mRNAs,共同的５´前導序列由不同的基因開始轉錄，並接合至ｍＲＮＡ之３´部份(Agabian, N., Cell 61:1157-1160(1990);Hirsh, D. et al., Mol. Biol. Rep. 14:115(1990)。這些小的〝接合前導〞ＲＮＡｓ（ｓｌＲＮＡｓ）包括５´表現子融合至功能上取代哺乳動物ＳｎＲＮＰ－接合萃取物中Ｕ１　ＳｎＲＮＡ之序列。

同時，Ｉ及Ⅱ群自身一接合的不表現子，均可在人工系統中反式地行表現子連接作用(Been, M.D. et al., Cell 47:207-216(1986); Galloway-Salvo, J.L. et al., J. Mol. Biol. 211:537-549(1990);Jacquier, A. et al., Science 234:1099-1194(1986);and Jarrell, K.A. et al., Mol. Cell Biol. 8:2361-2366(1988))。葉線體中之分裂基因，其Ⅱ群不表現子可行活體內之反式－接合(Kohchi, T. et al., Nucl. Acids Res. 16:10025-10036(1988))，且在大腸桿菌的人工化分裂基因中，其Ｉ群不表現子也示出如此(Galloway-Salvo, J.L. et al.,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（6）

J. Mol. Biol. 211:537-549(1990))。於後一例中，含I群不表現子之噬菌體T4胸苷酸合成酶基因（td）在連接不表現子螺旋P6a之環處分裂。已示出td基因片段之轉錄子進行活體外之反式接合，且援救失去功能之大腸桿菌宿主細胞。已知之鹼基配對（P3、P6及P6a）及在不表現子片段間之可能的三段交互作用，使基因一方可正確的組合及處理修飾。

於活體外，四膜蟲核糖酶可催化單股模式寡核糖核苷酸受質之反應接合。有4種組份是必要的：核糖酶，3´單股RNA，5´表現子及GTP。於此一反應中採用縮短型式之四膜蟲核糖酶（L-21 ScaI IVS RNA），始於內部之前導序列，且終止於U_{409} (Flanegan, J.B. et al., J. Cell. Biochem. (Supp.)12 part D:28(1988))。在5´接合位置為GTP所粘附可釋出5´表現子，其再藉3´ 接合位置處之轉酯化作用反應由核糖酶連接至3´表現子。

有人提議核糖酶對準及破壞特異RNA之活體外用法，此有別於抗意識RNA的此用法(Gerlach, W.L. et al., EP321,201; Cotten, M., Trends Biotechnol. 8:174-178(1990);Cotten, M. et al., EMBO J. 8:3861-3866(1989); Sarver, N. et al., Science 247:1222-1225(1990)),例如，於HIV-1感染時所表現之RNA，若表現對此RNA之催化性核酸內切活性之核糖酶，則有人提議此點可充作拮抗人類免疫缺失病毒1型（HIV-1

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (7)

)感染之有力之療法(Sarver, N. et al., Science 247: 1222-1225(1990);Cooper, M., CDC AIDS Weekly, April 3, 1989, page 2; Rossi, J.J., Abstract of Grant No. IR01AI29329 in Dialog's Federal Research in Progress File 265)。然而此類的嘗試均未成功。

於檢視核糖酶充份人類免疫缺失病毒1型（ＨＩＶ－1）感染之治療劑研究中，焦點所在之核糖酶係對準ＨＩＶ－1 ｇａｇ轉錄子(Hutchins, C.J. et al., Nucl. Acids Res. 14:3627(1986); Keese, P. et al., in Viroids and Viroid-Like Pathogens, S.I.S. Semanck, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, pp. 1-47)。於人類細胞培養中表現對準ｇａｇ之核糖酶，可造成ＨＩＶ ｇａｇ ＲＮＡ及抗原ｐ２４水平之減低（但並非完全的消失）(Sarver, N. et al., Science 247:1222-1225(1990))。因此，Sarver的核糖酶，在醫學上之有效性受限於其低的效力，因此逃脫的任何病原體ＲＮＡ均留給宿主極大的難題。

核糖酶活體內應用的另一難處在於，核萃取物中為達核糖酶抑制功能需有高的核糖酶對受質比率，且此種比率是難以達成的。Cetter等人為達到高的核糖酶對受質比率，係將含有核糖酶產製基因，且其操作性鍵結至質ｔＲＮＡ啓動基因（一種聚合酶Ⅲ啓動基因）之表現匣，微量注射入蛙卵中，並加上含有核糖酶解離序列之受質ＲＮＡ(Cotton, M. et al., EMBO J. 8:3861-3866(1988

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (8)

)。然而，對於遞送至多細胞有機體而言，微量注射並非適當方法。

有人報告核糖酶之活體內活性，此酶用以拮抗指導合成大腸桿菌β－半乳糖苷酶之mRNA(Chuat, J.-C. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 162:1025-1029(1989))。然而，此活性只見於當核糖酶及標的均轉感至細菌細胞相同分子上時。當所對準之mRNA係由細菌之F基因附體所轉錄，其係處理修飾β－半乳糖苷酶基因之標的部份，則活性將無效力。

因此，目前核糖酶活性之技術性應用只限於被提議，可利用核糖酶之解離活性來破壞標的RNA之活性。不幸地，此種應用通常需將所有的標的RNA分子完全破壞，及／或有相當高的核糖酶：受質比例，以確保其有效性，但此完全難達成。更重要的，技藝中經修飾之核糖酶無法有效地指令反應接合。

因此，有必要發展高度有效的核糖酶及核糖酶表現系統。尤其，技藝中尚未描述一種有效的方法，利用新的RNA序列反式接合至宿主RNA中，以破壞既存之RNA序列或改變既存RNA之編碼序列。

發明要點

認識到設計新穎核糖酶之可能性，並既知需有高度有效之方法，以改變高等真核動物活體內之遺傳特性，本發明於是檢視核糖酶之用法，以改變天然RNA之活體內遺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（9）

傳資訊。這些努力終致可發展成高度有效的反式接合核糖酶，及其遺傳工程之準則。

依據本發明，首先提出一種ＲＮＡ或ＤＮＡ分子，此種分子編碼反式－接合核糖酶，此種核糖酶可有效地以高度精確方式將一個新的３´表現子序列接合位至任何選定之標的ＲＮＡ序列上，可注體外或活體內進行，且此分子在容納任何所選擇之標的ＲＮＡ或３´表現子序列能力上係新穎的，且在可加強此核糖酶特性之添加上亦然。

依據本發明，也提出一種ＲＮＡ或ＤＮＡ分子，此分子編碼一種核糖酶，該核糖酶之編碼序列為一種融合的ＲＮＡ，此融合的ＲＮＡ提供一段第一ＲＮＡ序列，其足以對準此種核糖酶以與標的ＲＮＡ雜交，進一步是一段第二ＲＮＡ序列，此第二ＲＮＡ序列可換位至標的ＲＮＡ，且此第二ＲＮＡ序列編碼一段與標的ＲＮＡ序列無關之ＲＮＡ序列。

依據本發明，再來是提出一種ＲＮＡ或ＤＮＡ分子，此分子編碼核糖酶，此核糖酶之編碼序列如上述的是一種融合ＲＮＡ，由融合ＲＮＡ提供的第一ＲＮＡ序列，為可對準此ＲＮＡ分子以與ＧＡＬ４　ＲＮＡ雜交之序列，且融合ＲＮＡ的第二ＲＮＡ序列提供白喉毒素Ａ鏈（ＤＴＡ）之編碼序列。

依據本發明，也提出一種ＲＮＡ或ＲＮＡ分子，此種分子編碼一種構型上分裂之本發明核糖酶，即一種原核糖酶，此原核糖酶可為受質活化，即此種原核糖酶具有幾可

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝・・・訂・・・線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (10)

忽略或無自身解離或反式接合之活性，直到標的ＲＮＡ特異地與之交互作用後才可再被活化。

依據本發明，進一步提出一種含有核糖酶或原核糖酶表現匣之ＲＮＡ或ＤＮＡ分子，此種匣可穩定保持在宿主中，或嵌入宿主基因中，且此種匣使啓動基因之序列可於此宿主中有功能，操作性鏈活至本發明核糖酸或原核糖酶之序列。

依據本發明，進一步提出含有核糖酸或原核糖酶表現匣之ＲＮＡ或ＤＮＡ分子，此匣可穩定地嵌入宿主之基因體中，此核糖酶表現匣提供ＧＡＬ４－反映性啓動基因之序列，其並操作性鏈結至本發明的核糖酸或原核糖酶序列上。

依據本發明，進一步提出一種活體外反式接合之方法，此方法包括以下步驟：（１）提出本發明之核糖酸或原核糖酶，及此種核糖酸或原核糖酶活體外之適當受質，（２）進一步地提出活體外之反應條件，可促進此核糖酸或原核糖酶欲求之催化活性；及（３）令此種核糖酸或原核糖酶在此種條件下與此種受質反應。

依據本發明，進一步提出活體內反式接合之方法，此方法包括以下步驟：（１）提供本發明之ＲＮＡ或ＤＮＡ分子至宿主細胞中，（２）於此宿主細胞中表現為此分子編碼之核糖酸或原核糖酶，（３）於此宿主細胞中表現此核糖酸或原核糖酶之受質，及（４）令此種核糖酸或原核糖酶，在此宿主細胞中與此受質反應。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (11)

依據本發明，進一步提出鈍化標的ＲＮＡ活性之方法，此方法包括：（１）提出本發明之核糖酸或原核糖酶，其可催化地活化拮抗此標的ＲＮＡ，（２）提出此標的ＲＮＡ，（３）提出可令此核糖酸或原核糖酶表現其對此標的ＲＮＡ之催化活性之條件。

依據本發明，進一步提出一種方法，以將欲求之遺傳序列提供至宿主細胞活體內，此方法包括：（１）對欲求之宿主細胞提供本發明之核糖酸或原核糖酶，其可在此宿主細胞中催化地活性拮抗標的ＲＮＡ，（２）提供可編碼此欲求之遺傳序列之核糖酸或原核糖酶，及（３）提供條件，以令此核糖酸或原核糖酶可反應接合此欲求之遺傳序列，至標的ＲＮＡ序列上。

依據本發明，進一步提出於多細胞植物或動物中行細胞切除之方法，此方法包括提供本發明之核糖酸或原核糖酶至任何宿主細胞中，尤其是至受精（受胎）之胚胎宿主細胞中，此核糖酸或原核糖酶編碼對此宿主細胞具有毒性之基因序列，且此核糖酸或原核糖酶可於此宿主細胞中，與欲求之標的進行反應接合。

依據本發明，進一步提出一種於農業上重要的作物種類中，操作雄性或雌性不育之方法，此方法包括利用本發明之核糖酸或原核糖酶，割除任何生育必需之細胞。

依據本發明，進一步提出免疫植物以拮抗植物病原體之方法。此方法包括構築一個導入外來基因之植物，其可表現本發明與植物病原體具特異性之融合核糖酶，且此核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (13)

圖７圖示Ｐ－要件調介之〝加強子－捕獲〞方法，以表現Ｇａｌ４蛋白質。

圖８示出野生型ＤＴＡ及ＤＴＡ　３′表現子突變株之部份序列。

圖９為ｐＧａＴＢ及ｐＧａＴＮ之圖示。

圖１０為ｐＵＳＡＴ圖示。

圖１１為可表現Ｇａｌ４－ＤＴＡ反應接合核糖酶之果蠅胚胎之外皮製劑。

圖１２代表〝原－核糖酶〞設計之原則。箭頭示出核糖酶解離位置，〝抗意識〞區以黑色標出，催化區以陰影區表示，且３′〝表現子〞序列示於右陰影處。於標的ｍＲＮＡ不存在下，反式接合核糖酶可暫時地鹼基配對，並與異質序列（包括其本身）反應。此外，在３′〝表現子〞接頭會斷開。構築鈍化的〝原核糖酶〞以含有額外的自身互補序列，其使核糖酶之催化中心錯誤地折疊，只有在欲求之標的ｍＲＮＡ與之鹼基配對後才會形成具活性之核糖酶，且因此取代干擾的二級結構。

圖１３示出ＣＡＴ－ＬａｃＺ反式接合核糖酶之序列及所預測之二級結構。核糖酶〝核心〞序列以陰影標出（依循Cech, Gene 73:259-271(1988)）。螺旋Ｐ８於未經修飾之核糖酶及１及２號原核糖酶中示出，其分別有１３個及１８個核苷酸與〝抗意識〞區之序列互補（突顯出來）。

圖１４示出：（１）圖示之活性ＣＡＴ－ＬａｃＺ核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (14)

糖酶，具有〝抗意識〞核糖酶區，及Ｐ８螺旋和３´〝表現子〞序列；（２）（ａ）鈍化的ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶２，在經修飾之螺旋Ｐ８及〝抗意識〞區之間的序列有鹼基配對情形；及（ｂ）活化之原－核糖酶，於與ＣＡＴ　ｍＲＮＡ鹼基配對後，置換螺旋Ｐ８－〝抗意識〞配對，及螺旋Ｐ８之再形成。

圖１５示出ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶轉錄子之安定性。含有ＣＡＴ－ＬａｃＺ核糖酶及原核糖酶序列之質體，以ＥｃｏＲＩ解離，並以Ｔ７或ＳＰ６　ＲＮＡ聚合酶及〔^{32}-Ｐ〕ＵＴＰ轉錄。經放射標的之轉錄子以５％聚丙烯醯胺凝膠電泳，於７Ｍ尿素與２５％甲醯胺中分級分離，再放射自顯之。核糖體轉錄子進行充份之水解作用，主要在〝３´表現子〞接頭。原核糖酶型式顯著地較不具反應性。

圖１６示出ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶之核糖核酸內切酶活性。含有ＣＡＴ－ＬａｃＺ核糖酶及原核糖酶序列之質體，以ＳｃａＩ解離，並以Ｔ７或ＳＰ６　ＲＮＡ聚合酶轉錄。轉錄子在３７℃、４５℃及５０℃下於４０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５，６ｍＭ　$MgCl_2$，２ｍＭ亞精胺，１０ｍＭ　ＮａＣｌ，２ｍＭ　ＧＴＰ加上放射標的之ＣＡＴ　ＲＮＡ，共置３０´，以Ｔ７　ＲＮＡ聚合酶自經ＰｕｖⅡ切割之質體處開始轉錄。產物以５％聚丙烯醯胺凝膠，於７Ｍ尿素及２５％甲醯胺中電泳，再放射自顯之。１７３ｎｔ之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (15)

CAT RNA，其RNA調介之解離可產生分為76nt及97nt之5′及3′片段。

圖17示出用於設計原－核糖酶之〝野生型〞及經修飾之螺旋P8，可能的鹼基配對示於圖中。互補於相當的原核糖酶〝抗意識〞部份之鹼基示以粗字體。互補鹼基之數目示於各螺旋下。螺旋以相當的原核糖酶轉錄子之安定性排列，係於活體外轉錄作用中偵測〝3′表現子〞水解作用之程度。

圖18示出GAL4－DTA原核糖酶之安定性。含有核糖酶及原核糖酶序列之質體，以XhoI線化，再以T7 RNA聚合酶轉錄。轉錄子在50℃下與40mM Tris－HCl pH7.5，6mM $MgCl_2$，2mM亞精胺，10mM NaCl，1mM GTP共置60′，再於5%聚丙烯醯胺凝膠中以7M尿素及25%甲醯胺電泳，再放射自顯之。在這些條件下，核糖酶轉錄子會充份水解，而原核糖酶1號較差，2號則穩定。

較佳具體實例之詳細說明

I．<u>定義</u>

於下文之說明中，充份利用重組體DNA（rDNA）技術中各種術語。為了對本說明書及申請專利範圍（包括此中術語所給予之範圍）有更清楚且實質的了解，提出以下之定義。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (16)

核糖酶。　一種型式之基因操作，第一多核苷酸之核酸序列與第二多種核苷酸同線或嵌入其中，其方式使得此多核苷酸間保有3′→5′磷酸二酯鍵結。而〝直接〞反式接合或〝受質－特異的〞反式接合意指需特異ＲＮＡ為反應接合反應受質之反式接合反應（即，接合倒置序列之特異ＲＮＡ）。直接的反式接合中，若核糖酶經設計係直接拮抗存在於相關ＲＮＡ組中之標的序列，則所對準將不足是一種ＲＮＡ。

標的ＲＮＡ。　係本發明核糖酶催化活性受質之ＲＮＡ分子。

表現匣。　一段遺傳序列，其提供本發明核糖酶表現所需之序列。

穩定。　一段序列〝穩定地〞嵌入基因體中，意指其嵌入方式造成於此基因體套數中繼承有此種序列。

可操作性鍵結。　〝可操作性鍵結〞表示序列與另一序列連接的方式使得可以改變序列之功能。如，將核糖酶編碼序列操作性鍵結至一啓動基因，則核糖酶編碼序列之表現位在啓動基因之影響或控制之下。二段核酸序列（如於編碼序列5′端之核糖酶編碼序列及啓動基因區序列）被稱

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (17)

為係操作性鍵結，係當誘導啓動基因之功能造成核糖酶編碼序列之轉錄作用，且若二序列間之鍵結本質不致於（1）造成移碼突變，（2）干擾表現調控序列指令核糖酶表現之能力。因此，若啓動基因可達成核酸序列之合成，則其可與核酸序列操作性鍵結。

Ⅱ．本發明核糖酶之遺傳工程

本發明的提出之反式接合核糖酶，原核糖酶及方法，第一次提出可指令反式接合至任何ＲＮＡ序列，且尤其是至成熟的（不含非表現子）ｍＲＮＡ之核糖酶。此中所述之反式接合核糖酶，因其與標的有擴大的互補性，和技藝中所述之由嗜熱四膜蟲衍生之核糖核酸內切酶活性大大不同。本發明核糖酶額外的互補性，可提供標的增加之親和力及特異性，且互補性並非催化活性中不可或缺之部份。此外，於變性劑不存在且高Ｍｇ$^{+2}$濃度下，解離可更有效且精確地發生。

此處用來設計反式接合核糖酶之準則是穩當的，係依據Ｉ群自身接合不表現子之明確特性為基礎，且用以提供設計任何直接的反式接合核糖酶之一般流程。因此，此處示出之準則並不限於嗜熱四膜蟲前－ｍＲＮＡＩ群不表現子，且可為任何精藝者在利用準則及技藝中之知識下，設計出具其他Ｉ群不表現子之本發明的核糖酶。天然的嗜熱四膜蟲核糖酶（不表現子序列）係位於以下嗜熱四膜蟲染色體外ｒＲＮＡ序列由第５３位至４６５位鹼基中：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (18)

TGACGCAATT CAACCAAGCG CGGGTAAACG GCGGGAGTAA CTATGACTCT
CTAAATAGCA ATATTTACCT TTGGAGGGAA AAGTTATCAG GCATGCACCT
CCTAGCTAGT CTTTAAACCA ATAGATTGCA TCGGTTTAAA AGGCAAGACC
GTCAAATTGC GGGAAAGGGG TCAACAGCCG TTCAGTACCA AGTCTCAGGG
GAAACTTTGA CATGGCCTTG CAAAGGGTAT GGTAATAAGC TGACGGACAT
GGTCCTAACC ACGCAGCCAA GTCCTAAGTC AACAGATCTT CTGTTGATAT
GGATGCAGTT CACAGACTAA ATGTCGGTCG GGGAAGATGT ATTCTTCTCA
TAAGATATAG TCGGACCTCT CCTTAATGGG AGGTAGCGGA TGAATGGATG
CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT ATGCGAAAGT ATATTGATTA
GTTTTGGAGT ACTCGTAAGG TAGCCAAATG CCTCGTCATC TAATTAGTGA
CGCGCATGAA TGGATTA [SEQ ID NO.1]

(Kan, N.C. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* *10*:2809-2822 (1982)).

如此中所述的，本發明直接之反式接合核糖核酸，利用此不表現子之催化核心來操作。不表現子及其催化核心可以技藝中已知之方法分離。不表現子之催化核心，即經截斷之不表現子與全長不表現子相異之處只在於其在ＳｃａＩ位置被截斷，因此移出不表現子最後５個核苷酸。經截斷的不表現子ＲＮＡ可以技藝中已知之技藝製備，或可以套組型式用買的，如來自US Biochemical，cleve-lard，OH之產物＃７２０００(RNAzyme™ Tet 1.0套組)。此US. Biochemical套組提供核糖酶及其使用之策略。可使用經轉錄之Ｔｅｔ．１　ｃＤＮＡ充作下述聚合酶鏈反應（ＰＣＲ）突變作用之受質，產生合成的反式接合酵素。

本發明核糖酶之受質特異性，即核糖酶〝對準〞充作

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線

五、發明說明 (19)

受質之特異ＲＮＡ之能力，係由於標的（受質）ＲＮＡ具特異性之互補序列融合至核糖酶之５´末端而提供的。

本發明核糖酶之直接的反式接合特異性，即重點之欲求外來序列與標的ＲＮＡ序列間反式接合之特異性，此點可由於核糖酶３´末端提供一個新的３´表現子而提供。設計之詳情進一步示於下文。

為改變Ｉ群不表現子之結構及催化特性，表現子序列取代此不表現子之鄰接序列，如此只保留了不表現子之催化核心－即核糖酶。所生成之經修飾的核糖酶可與受質ＲＮＡ呈反式地交互作用。當不表現子之截斷型（即〝催化核心〞，即在ＳｃａＩ處截斷留下不表現子最後５個核苷酸）與相當於天然核糖酶５´接合接頭之序列共置時，則位置可模擬接合中第一步驟，進行依賴鳥嘌呤核苷之解離。

基因操作本發明之核糖酶，需考慮以下４個準則：

首先，必須在標的ＲＮＡ內選擇一個接合位置。於最終的反式接合複合物中，標的ＲＮＡ只提供Ｐ１二體之５´部份。於欲求之接合位置５´緊鄰處只需一個單一保存之殘基－尿嘧啶。此是標的ＲＮＡ中唯一的序列要求。對標的ＲＮＡ並非嚴格的結構要求。可對準成熟的ｍＲＮＡ，且反式接合反應於細胞之細胞質中而非核中進行（和ｐｒｅ－ｍＲＮＡ不同）。此排除對細胞核中高核糖酶濃度之需求。

其次，既選定特殊的標的序列，改變的補償序列必須

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (20)

加至核糖酶之５´部份，以於標的及核糖酶ＲＮＡ間形成適當的螺旋Ｐ１。極希望在螺旋Ｐ１內欲求之５´接合位置上含有Ｕ：Ｇ鹼基對，且應定位在第４、第５（最佳）或第６位置(Doudna, J.A., et al., " RNA Structure, Not Sequence Determines The 5' Splice-Site Specificity of A Group I Intron," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7402-7406(1989)，在此列為參考文獻）。關於天然的嗜熱四膜蟲不表現子，Ｐ１伸展越過欲求的５´接合位置有３個額外的鹼基對，且於一個較佳的具體實例中，此保持在本發明之反式接合核糖酶中。為有泡率地反式接合，受質與經核糖核酸內切之不表現子ＲＮＡ必須鹼基配對，以生成具有不穩定的Ｕ：Ｇ鹼基對之螺旋Ｐ１。標的ＲＮＡ之解離發生在緊鄰Ｕ：Ｇ鹼基對３´（之後）之磷酸二酯鍵上。由遺傳分類比較及突變分析顯示，緊鄰５´接合位置固有之尿嘧啶殘基之序列，只要螺旋Ｐ１之鹼基配對保持著，則其本質對催化作用而言並不重要。

第三，必須選擇緊鄰接３´接合位置之表現子序列，且必要時調整核糖酶的５´段落，以形成穩定的Ｐ１０螺旋。雖然Ｐ１０螺旋不解散（必要時），但其存在可加強接合，且本發明核糖酶之較佳具體實例中係保有Ｐ１０螺旋(Suh, E.R. et al., " Base Pairing Increases 3' Splice Site Specificity in the Tetrahymena Self-Splicing rRNA Intron," Mol. Cell. Biol. 10:2960-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (21)

2965(1990))。螺旋Ｐ１及ｐ１０沿著嗜熱四膜蟲不表現子ＩＧＳ重疊，且在５´及３´接合位置後之第２及第３殘基與ＩＧＳ中的相同殘基互補（圖２）。雖然依循此有某些優點，但許多天然的Ｉ群不表現子並不受此約束，因此３´表現子序列之選擇主要由實驗考量來決定。此種考量影響選擇接合位置之大的伸縮性。例如，若欲在一定點上連接二個序列，則此點上之序列不可突變成為反式接合所改變。若重疊序列不會容納欲求之接合位置，則Ｐ１或Ｐ１０均可予以縮短。

３´接合位置選擇時之序列需求，似乎主賴於不表現子（核糖酶）本身之結構，包括螺旋Ｐ９．０，及描繪３´不表現子界線之毗連的３´鳥嘌呤核苷殘基。Ｐ９．０完整地納入不表現子序列中，且有助於界定鄰接的３´接合位置。於設計反式接合時，Ｐ９．０螺旋及不表現子內其餘的具功能性ＲＮＡ要件並未改變。Ｐ９．０螺旋之結構特性係已知的(Michel, F. et al., " The Guanosine Binding Site of the Tetrahymena Ribozyme, " Nature 342:391-395(1989))。然而，３´表現子內之鄰接序列對於螺旋Ｐ１０之形成及有效率的接合係必需的，可由突變分析示出。

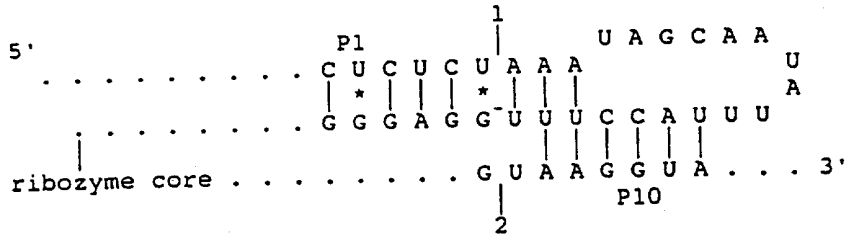
第四，將互補序列區置於反式接合核糖酶之５´末端，以增加其對標的ＲＮＡ之親和力及特異性。如此中所示，使用約４０個殘基之任意長度。也可使用其他長度，只要不損害欲求之作用即可。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明 (22)

如，由嗜熱四膜蟲自身接合不表現子開始（下圖示）：



（〝１〞及〝２〞於上圖中（及於本案的其他核糖酶圖示中）分別表示第１及第２個接合位置）。

（１）在所選定之標的ＲＮＡ內選擇鄰近尿嘧啶殘基的一個〝５〞位置。涉及於互補中之序列，不與涉及Ｐ１螺旋形成之序列緊鄰，但分隔約５個核苷酸，如涉及於Ｐ１０之形成；

（２）互補於所選定ＲＮＡ之序列，與自身接合之Ｉ群不表現子５´部份融合。核糖酶及標的ＲＮＡ間之鹼基配對可形成Ｐ１螺旋；

（３）所選擇之〝３´表現子〞序列融合至核糖酶之３´部份，保持固有的Ｐ１０螺旋；及

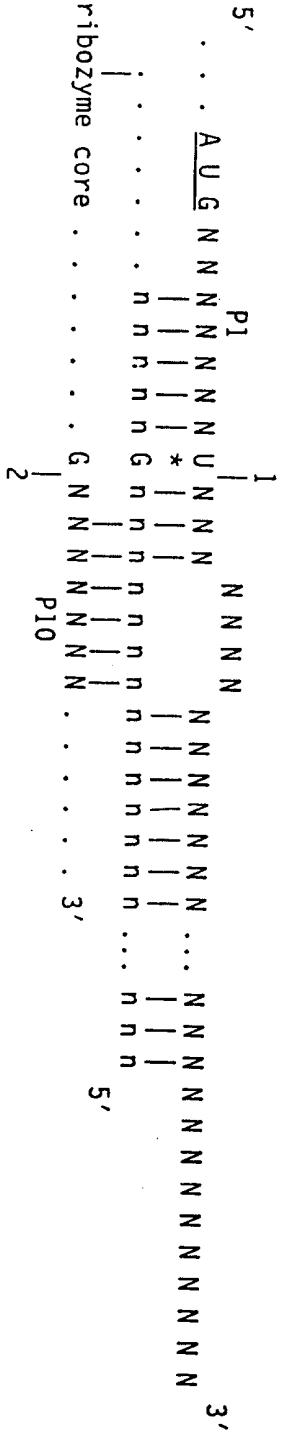
（４）必要時增加對標的ＲＮＡ之親和力，一部份伸展之互補序列融合至核糖酶５´部份，以形成３０－４０個鹼基對。

所生成的反式接合核糖酶，與其標的ＲＮＡ之排列可示於下。標的ＲＮＡ序列列於上。核糖酶序列排列於下，在下二列包圍一段連續的序列，其中可見５´及３´端之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (23)

核苷酸雜交，及核糖酶之P1及P10。


5'
A U G N N N N N N N N N U N N N N N N N N N

五、發明說明 (24)

依據本發明，可設計可基本上反式接合任何ＲＮＡ序列至任何ＲＮＡ標的之反式－接合核糖酶。標的中並不一定需含有不表現子序列，或核糖體是標的序列中的一個不表現子。如，此種設計之策略可包括（１）鑑定欲求之標的ＲＮＡ，（２）選殖及／或定序欲求之標的ＲＮＡ或其部份，（３）選擇欲求之編碼序列以反式接合至標的ＲＮＡ，（４）構築本發明的核糖酶，其可利用此處之準則雜交至標的上，及（５）證實本發明的核糖酶可利用標的充作受質，以為欲求之特異反式－接合反應，及（６）將核糖酶嵌入欲求之宿主細胞中。

標的ＲＮＡ之選擇會反映反式接合反應之欲求目的。若反應的目的是鈍化－特異的ＲＮＡ，則該選擇性被反式接合的位置係可破壞此ＲＮＡ所編碼的所有功能性肽區域，且此位置不會造成非欲求遺傳序列之繼續表現。若編碼此ＲＮＡ之基因存在不只一個對偶基因，則核糖酶較好是設計成其鈍化標的ＲＮＡ之位置係所有表現之對偶基因共有之位置。此外，可提供一個以上之核糖酶至細胞，每一個經設計可鈍化標的ＲＮＡ之特異對偶基因型式。

當只要鈍化標的ＲＮＡ時，而非新的欲求ＲＮＡ序列之表現，則由核糖酶提供之外來ＲＮＡ勿需一定是可為宿主細胞轉譯之序列，且可使用含有轉譯停止密碼子之序列充作經截斷之不表現子，如在ＳｃａＩ位置處截斷之不表現子核糖酶。

若反式接合反應之目的是對宿主細胞提供一個遺傳特

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (25)

徵，則標的ＲＮＡ之選擇可反映遺傳特徵欲求之表現型式。若希望遺傳特徵為宿主的繼續表現，則標的ＲＮＡ應也是可繼續表現的。若希望遺傳特徵只有在欲求之生長，激素或環境條件下選擇性表現，則標的ＲＮＡ應是可在此條件下選擇性表現者。

若此核糖酶之受質並不存在於宿主中（因核糖酶本身並不為宿主轉譯），若核糖酶本身之表現勿需選擇性受限於欲求之生長、激素、或環境條件。因此，由本發明核糖酶所貢獻之ＲＮＡ所編碼之序列，直到發生反式接合事件時才會被轉譯，且此事件可由宿主中核糖酶受質之表現所控制。

若欲求時，可操作核糖酶之表現，使其發生乃反映誘導調控標的表現之相同因子，或是可操作核糖酶之表現以提供額外的調控水平，如此限制反式接合事件因這些條件而發生，在此狀況下核糖酶及標的均為細胞選擇性地誘導，但是為不同因子所誘導，這些因子組合係非欲求的。此種調控作用令宿主細胞在這些條件下表現核糖酶標的，其中核糖酶本身未共同表現。

可與標的ＲＮＡ雜交之核糖酶區域序列，可由標的ＲＮＡ之序列來決定。標的ＲＮＡ序列之決定在編碼此ＲＮＡ之序列選殖之後，或在此標的所編碼之肽定序之後，且推衍出可編碼此一肽之ＲＮＡ序列。可使用技藝中已知之選殖技術，以選殖編碼標的ＲＮＡ之序列。

選擇欲求的序列以反式接合至標的ＲＮＡ（此中稱為

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (26)

〝反式接合序列〞）可反映出反式－接合之目的。若欲求之反式接合事件不會造成新遺傳序列之表現，則反式接合的序列勿需編碼一個可轉譯之蛋白質序列。若欲求之反式－接合事件確實會造成新遺傳序列之表現，且基本上是新的肽或蛋白質序列，則對反式接合之序列可進一步提供轉譯停止密碼子，及ＲＮＡ於宿主細胞中正確轉譯處理修飾所需的其他資訊。若希望反式接合的結果生成特異的蛋白質產物，則胺基酸讀譯架構需保持於所生成之融合之中。

本發明核糖酶特異性之鑑定及證實，可於欲求之標的存在下，測試假想的核糖酶催化欲求之反式接合反應之能力而成。若唯一存在之ＲＮＡ序列非此核糖酶應予以應和的（或較不與之應和），則反式接合反應不應發生。此特性可在標誌輔助下進行，如此正確（或不正確）的核糖酶活性可更容易地被追踪。於大部份例子中，足以在活體外測試核糖酶拮抗其欲求之標的，且而後以此轉形於宿主細胞，以研究其活體內作用。

當欲消除宿主ＤＮＡ時，此種消除作用應儘可能的完全。當希望提供宿主細胞一個新的遺傳序列時，本發明之反式接合反應勿需完全。此為本發明的一個優點，即，依據轉譯自此遺傳序列之肽生物活性，事實上反式接合事件可十分的無效率，只要發生充份的反式接合以提供充份的ｍＲＮＡ及因此所編碼之多肽至宿主中，以應欲求的目的。

本發明核糖酶於宿主細胞中之轉錄作用，發生在核糖

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明 (27)

酶基因引入宿主細胞之後。若宿主細胞中並不需核糖酶有穩定之滯留，則此核糖酶可化學地或酵素地合成，並以機械方法提供至宿主細胞，如微量注射、脂質體居中之轉感作用，電泳脈動、或磷酸鈣沈澱作用。此外，當希望編碼核糖酶之基因可穩定滯留時，此滯留可藉著將至少一個核糖酶ＤＮＡ套數穩定嵌入宿主染色體而完成，或將核糖酶之ＤＮＡ套數提供於質體上，其再為宿主細胞穩定的保留。

較好，本發明核糖酶以表現匣的一部份嵌入宿主染色體中，此種匣可提供可控制核糖酶於宿主細胞中轉錄作用之轉錄調控要件。此種要件可包括下列，但並不限於此：一個啓動基因要件，加強子或ＵＡＳ要件，及轉錄終結子訊號。聚腺苷化作用是不必要的，因核糖酶並未轉譯。然而，此種聚腺苷化作用訊號，可與編碼欲反式接合之要件之序列相連。

核糖酶之表現，其編碼序列已穩定地嵌入宿主染色體中，可由操作性鏈結至核糖酶編碼序列之啓動基因序列所控制。指令核糖酶表現之啓動基因可為宿主細胞中有作用的任何啓動基因，於原核宿主中欲求的是原核啓動基因，而真核細胞中則是真核啓動基因。啓動基因不連續之組成單位所構成，其可指令啓動基因於宿主細胞中之轉錄活化作用及／或遏制作用。此種組成單位可混合且於核糖酶啓動基因中配合，如此使核糖酶在宿主中有適當的表現。真核啓動基因可以是真核細胞中任何有作用之啓動基因，且

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (28)

尤其可為任何ＲＮＡ聚合酶Ⅰ、Ⅱ或Ⅲ特異性。若欲於各種真核宿主細胞中表現核糖酶，則可選擇可於大多數真核宿主細胞中均有功能之啓動基因，如ｒＲＮＡ或ｔＲＮＡ啓動基因，或用於各種已表現ｍＲＮＡ之啓動基因，如用於肌動蛋白基因或糖解基因之啓動基因。若核糖酶只希望於某些細胞或組織型式中表現，則應選擇只於該細胞或組織型式中具功能的細胞－特異性（或組織－特異性）啓動基因要件。

反式－接合反應不論於活體內或活體外進行，就化學上而言是相同的。然而，活體內由於輔因子已存在於宿主細胞中，標的及核糖酶之存在將足以造成反式－接合。

本發明的反式接合核糖酶及方法，可用於產生可用於標的細胞遺傳處理修飾及／或細胞死亡之基因活性。例如，本發明的反式接合反應，可用來將具毒性之蛋白質引入欲求細胞中。細胞之感受性可由標的細胞之選擇及指令核糖酶表現之調控要件予以決定。如，可操作可倒置編碼毒性蛋白質之ＲＮＡ序列之核糖酶，如此核糖酶之表現將依操作性鍵結之啓動基因特性而定。於一個極佳之具體實例中，白喉毒素肽Ａ由核糖酶部份所編碼，其可倒置至宿主中之欲求標的。核糖酶及白喉毒素肽Ａ鏈之調適表現，可造成宿主細胞之死亡。其他有用的毒素肽包括。蓖麻蛋白，外毒素Ａ，及疱疹胸苷激酶(Evans，G.A.，Genes & Dev. 3-259-263(1989))。此外，各種溶解酶具有瓦解細胞機制之強力。如，可使用真菌的核酸內切酶造成植物之雄

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (29)

性不育(Mariani, C. et al., Nature 347:737-741(1990))。由於標的ＲＮＡ有限的表現，可破壞特殊的組織。再者，若以病毒ＲＮＡ為標的，可操作新的病毒抗性型式或療法。

可利用本發明的核糖酶設計一個二相系，以控制組織特異的基因表現及／或用於異位的切除。例如，可使用可表現酵母轉錄作用活化子ＧＡＬ４之果蠅株，其係以組織及空間－特異型式利用Ｐ－要件加強子－截獲載體進行。任何轉錄作用活化劑均可取代ＧＡＬ４，且本發明並不限於ＧＡＬ４。編碼融合核糖酶之基因（其可反式接合ＤＴＡ序列）可置於ＧＡＬ４－ＵＡＳ啓動基因控制之下，且以遺傳上穩定方式嵌入果蠅中。此種核糖酶於缺乏ＧＡＬ４下不會於果蠅中表現。因此，以遺傳上攜有此核糖酶構體之果蠅宿主，與可以組織－特異方式表現ＧＡＬ４之果蠅宿主交配，則所生成之子代於誘導ＧＡＬ４表現時，所呈現的細胞死亡型式類似ＧＡＬ４表現型式。

此外，經由對準核糖酶以利用ＧＡＬ４ ｍＲＮＡ反式接合，則鈍化ＧＡＬ４表現及核糖酶表現之核糖酶活性可自體調控。

原－核糖酶

如上述地，反式接合的核糖酶包括三個融合的序列要件：一個５′〝抗意識〞區，其係與標的ＲＮＡ互補，及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (30)

催化區，依據自動接合的Ｉ群不表現子為基礎，及３´〝表現子〞序列。５´區可與所選定之標的ＲＮＡ鹼基配對，使其與Ｉ群不表現子之催化序列靠近。Ｉ群不表現子之結構提供一個適合催化標的ＲＮＡ與３´〝表現子〞序列精確接合之化學環境。然而，於適當的標的ＲＮＡ不存在下，核糖酶序列仍可催化３´〝表現子〞接頭之剪接（類似的水解作用可見於Ｉ群自身－接合之不表現子(Zaug et al., Science 231:470-475(1986))，且可經由核糖酶與異質ＲＮＡ序列（其可包括自身）間暫時的鹼基配對而催化不合理的接合事件。此種副反應及不合理的接合係不要的，且可能是有害的。例如，若反式接合是用於毒素活體內之調適遞送，則不合理的反式接合可能造成非預期的毒性活性表現。於３´〝表現子〞接頭的自動解離，可降低反式接合的效力。

為避免這些難題，已構築反式接合ＲＮＡ之〝原核糖酶〞型式，其中一個固定的螺旋，如Ｐ８螺旋，被打斷。構築原核糖酶以含有額外的自身互補序列，其造成核糖酶之催化中心被錯誤地折疊。於欲求之標的ＲＮＡ不存在時，原核糖酶是無活性的，只有當核糖酶與標的ＲＮＡ－其核糖酶內具干抗性之二級結構當然已被置換－鹼基配對後才可形成活性型。於無標的ＲＮＡ下，原核糖酶將為催化上惰性的，以減少於活體內及活體外不要的自身解離。自身接合，以及不合理的反式接合反應（圖１２）。

此處所述之原核糖酶在構型上是瓦解的，且因此是反

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (31)

式接合反應之鈍化型。因此，原核糖酶具極少的自身解離活性。其只有當與標的ＲＮＡ特異地交互作用時才會再活化，因此是受質活化之核糖酶，較不致催化反式接合成為非欲求之標的ＲＮＡ。反式－接合核糖酶可用於活體內遞送新的基因活性，且任何可減少不要之副作用或不合理接合者均是欲求且必要的。

雖然此處已以Ｐ８螺旋之瓦解為例說明反式接合之原核糖酶，也可使用其他催化活性所需之其他螺旋。

瓦解催化上重要結構之構型，使得只有與欲求之受質ＲＮＡ成鹼基配對者可形成活性之核糖酶，此相同的途徑可應用至其他核糖酶之設計。例如，可伸展核糖核酸內切酶〝鎚頭〞型之環狀序列(Haseloff et al., Nature 334:585-591(1988))，且使其與核糖酶〝抗意識〞臂之一互補，就類似上文中Ｐ８螺旋之變化一般。只有在與所選定之標的ＲＮＡ鹼基配對，置換瓦解之二級結構，及再形成催化作用所需之莖－環結構，才可呈現出核糖核酸內切酶活性，此可有效地增加核糖酶與標的之特異性。

此外，原核糖酶之活性未必依賴與受質本身之鹼基配對。反之，所選擇之第三ＲＮＡ或ｓｓＤＮＡ，或甚至蛋白質，對活性可能是需要的。額外的鹼基配對或ＲＮＡ－蛋白質交互作用，對於活性核糖酶複合物之形成將是需要的。此種額外組份之可應用任可決定核糖酶活性，且可用於改變核糖酶之選擇性。

本發明的核糖酶或原核糖酶可引入任何細胞中，原核

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明 (32)

或真核，尤其可至植物或哺乳動物宿主動物中，尤其是人類細胞，不論於培養中或活體內，可採用適合此宿主之技藝中已知之技術。本發明的核糖酶或原核糖酶，也可經操作以破壞病毒。於一個具體實例中，本發明的核糖酸或原核糖酶，以遺傳上穩定方式於病毒侵犯前提供至宿主細胞中。為適當病毒所感染，或潛在病毒於此宿主細胞中之表現（造成宿主細胞中核糖酸或原核糖酶標的ＲＮＡ之出現）可刺激核糖酶之催化活性，且破壞病毒ＲＮＡ標的及／或經由反式接合產生毒素，造成感染病毒之細胞死亡。於另一具體實例中，可操作核糖酸或原核糖酶，且可包裝至病毒本身之內。此種具體實例尤其可用於設計供檢查目的之病毒，其中所設計之核糖酸或原核糖酶可破壞特異病毒ＲＮＡ之功能，因此可於此ＲＮＡ不存在下研究病毒之功能。攜有核糖酸或原核糖酶之病毒，也可充作載體轉感具有欲求的核糖酶或原核糖酶活性之宿主細胞。

於農業上重要的植株中，可利用本發明之核糖酸或原核糖酶操作雄性或雌性不育。例如，煙草中之雄性不育可藉著本發明核糖酸或原核糖酶對準ＴＡ２９或ＴＡＢ ｍＲＮＡ（煙草花葉特異基因；Seurinck, J. et al., Nucl. Acids Res. 18:3403(1990)）而達成，其可反式接合ＤＴＡ３´表現子至這些標的上。

農作物型式可制用本發明核糖酸或原核糖酶，經由組織選擇性破壞或處理修飾而操作，如，可製成無籽的水果，即以可反式接合ＤＴＡ　３´表現子至標的的本發明核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (33)

糖酸或原核糖酶，對準貯存種子蛋白質之ｍＲＮＡ。

導入外來基因的植物可保護之使免受感染，係表現病毒特異之核糖酸或原核糖酶，以殺死被感染之細胞。此將是一種人工型式之〝過敏反映〞。如黃瓜花葉病毒之衣殼蛋白質ｍＲＮＡ，可以可反式接合ＤＴＡ　３´表現子至標的的本發明核糖酸或原核糖酶對準之。

藉著引入反式接合之核糖酸或原核糖酶，可製成抵抗特異病原體之微生物族群。如，生自乾酪之細菌，藉著本發明核糖酸或原核糖酶所提供之３´表現子，其中所編碼之細菌性毒素基因或溶解酵素對準噬菌體ＲＮＡ，可使細菌抵抗噬菌體之感染，如，其可在噬菌體感染後造成早的溶解，而干抗噬菌體之複製作用。

可構築病毒病原體，以經由反式接合遞送毒性。以此方式可對準特異細胞型式以供切除，如用於癌症或病毒療法。例如，ＨＩＶ　ｍＲＮＡ可為本發明之核糖酸或原核糖酶所對準，其中攜有ＤＴＡ　３´表現子，可採病毒或脂質體遞送方式。

以下的實例用以說明目的，不欲限制本發明範圍。

實例

實例１

ＣＡＴ－ＬａｃＺ反式接合核糖酶之構築及鑑定

Ⅰ．本發明核糖酶之ＰＣＲ擴大作用及選殖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝・・・訂・・・線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (34)

依循上述之準則，設計一種反式接合之融合核糖酶，其可接合部份的大腸桿菌β－半乳糖苷酶（ＬａｃＺ）ｍＲＮＡ之胺基末端編碼序列，至氯霉素乙醯基轉移酶（ＣＡＴ）ｍＲＮＡ之位置（圖３）。合成鄰接嗜熱四膜蟲核糖酶核心及３´表現子之新序列，呈寡核苷酸型式。再以相繼的聚合酶鏈反應組合完整的核糖酶序列，利用合成的承接子寡核苷酸為引子，加上β－半乳糖苷酶ＤＮＡ模板（雖有其他方法可應用，但以本法為合宜）。

為構築可接合β－半乳糖苷酶（ＬａｃＺ）β－肽編碼序列之氯霉素乙醯轉移酶（ＬＡＴ）５´編碼序列位置上之核糖酶，於是合成三段寡核苷酸。

寡核苷酸１

5'-GGCCA AGCTT CTTTA CGATG CCATT GGGAT ATATC AACGG TGGTA TAAAC CCGTG GTTTT TAAAA GTTAT CAGGC ATGCA CC-3' [SEQ ID NO. 2]

寡核苷酸２

5'-GATTA GTTTT GGAGT ACTCG TACGG ATTCA CGGCC GTCGT TTTAC AA-3' [SEQ ID NO. 3]

寡核苷酸３

5′-GGCCG AATTC TTACA ATTTC CATTC AGGCT GCGCA ACTGT TGG-3′ [SEQ ID NO. 4]

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (35)

寡核苷酸２及３（各２００微微莫耳）與０．１微克的經ＰｖｕⅡ切割的ｐＧＥＭ４　ＤＮＡ混合（其中含有ＬａｃＺ　α－肽序列），並接受ＰＣＲ擴大作用，反應的１００微升體積中含有：

５０ｍＭ　ＫＣｌ，
１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．３，
１．５ｍＭ　$MgCl_2$，
０．４ｍＭ　ｄＮＴＰｓ，
０．１％明膠，及
５　Ｕ　ＴａｑＩ　ＤＮＡ聚合酶，

並培育３０個循環，１分鐘@９４℃，２分鐘@５０℃，２分鐘@７２℃。

質體ｐＧＥＭ４可購自Promega Corporation, Madison WI, USA。

經擴大的２１０ｂｐ產物，利用低成膠溫度之瓊脂糖行電泳而純化，再充作第二輪ＰＣＲ擴大作用中之引子。

於第二輪ＰＣＲ擴大作用後，混合２．０微克的２１０ｂｐ經擴大產物，２００微微莫耳寡核苷酸１，及０．１微克４５０ｂｐ片段（含嗜熱四膜蟲ＩＶＳ），再利用上示之條件行ＰＣＲ擴大作用。生成的６６０ｂｐ產物以ＥｃｏＲＩ及Ｈｉｎｄ　Ⅲ水解，再選殖至質體載體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (36)

pGEM4中。CAT－LacZ α－肽核糖酶DNA序列之完整序列，以SEQ ID No5示出且於圖3B中。

含有所選殖序列之選殖載體，再轉移至細菌宿主XL1／Blue(Strategene, La Jolla, California)中，並於其中增殖，利用技藝中已知之技術進行(Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Guide,2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Publishers。然而，可使用任何可穩定維持載體之細菌宿主，如JM 109。

可自宿主細胞中萃取質體，以利用技藝中一般已知之技術進一步分析(Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Guide,2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Publishers)。

Ⅱ．所選殖之核糖酶及標的RNAs之活體外轉錄作用

利用標準步驟，所選殖之序列可自細菌宿主中純化，且質體利用不會切斷核糖酶序列之核酸內切限制酶（如：EcoRI）線化，再利用T7 RNA聚合酶轉錄，其中在100微升反應體積中含有：

5微克線化之質體DNA，

40mM Tris－HCl pH7.5，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (37)

6mM $MgCl_2$，

2mM 亞精胺，

10mM NaCl，

10mM DTT，

1mM NTPs（含有20微居里〔$\alpha-^{32}P$〕UTP，若欲有經標記之RNA轉錄子時，

100U RNasin，及

50 U T7 RNA聚合酶，

且反應在37℃下共置2小時。

RNA轉錄以5%聚丙烯醯胺凝膠電泳純化再使用（7BE，7M尿素凝膠）。含有活性嗜熱四膜蟲IVS序列之RNA，可於轉錄作用中於3´不表現子－表現子接頭進行某些自動的切割，以電泳脈動純化法除去片段，以澄明化接續反式接合分析。

Ⅲ．<u>活體外反式接合反應之條件</u>

於以下條件共置標的及／或反式－接合核糖酶：

0.1－0.5微克RNA組份（含量依實驗型式而定，通常核糖酶較標的多5倍）

30mM Tris-HCl pH7.5，

100mM NaCl，

2mM GTP，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (38)

５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$，

於５微升體積中，４２℃下歷６０分鐘。

反應以９５微升０．１ｍＭ　Ｎａ$_2$ＥＤＴＡ，２００ｍＭ　ＮａＣｌ稀釋，再以乙醇沈澱。ＲＮＡ再於５％聚丙烯醯胺凝膠中分析，其中含有ＴＢＥ緩衝液。７Ｍ尿素及２５％甲醯胺，再放射自顯。

ＩＶ．核酸內切活性之分析

核糖酶與標的鹼基配對後，於反式接合中的第一步驟是在欲求之５´接合位置上由鳥嘌呤核苷所調升之標的ＲＮＡ解離步驟。回冷及反式接合可於如：３０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１００ｍＭ　ＮａＣｌ，５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$，２ｍＭ　ＧＴＰ一類之緩衝中，以４２℃進行。因３´接合位置對此反應而言是可無的，因此經截斷之反式接合核糖酶，可如高度特異之核糖核酸內切酶般作用。為測試此活性，上述ＣＡＴ－ＬａｃＺα－肽反式接合核糖酶之經弄短的活體外轉錄子（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．５及圖３）可與ＣＡＴ　ｍＲＮＡ序列共置。ＣＡＴ－ＬａｃＺ核糖酶匣是在ＨｉｎｄⅢ－ＥｃｏＲＩ片段。ＳｃａＩ解離位置明示出在３´接合位置上游５個鹼基之處之位置。核糖酶之特異性，可在欲求之單一位置上解離標的ＲＮＡ，產生預期大小之片段。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)　81. 2. 20,000

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝　訂　線

五、發明說明 (39)

V．反式－接合反應

為證實ＣＡＴ－ＬａｃＺ　α－肽核糖酶催化５′接合位置處３′表現子序列之連接，將各型式與經放射標的之ＣＡＴ　ＲＮＡ共置。自ＤＮＡ模板中合成核糖酶轉錄子，其已在數個位置之一上被３′截斷，範圍由核糖酶末端通過表現子序列。與經標記之ＣＡＴ共置，可形成欲求之接合產物，其中依據３′表現子序列之程度而在長度上有異。

此外，某部份的ＣＡＴ－ＬａｃＺ　α－肽核糖酶於活體外轉錄作用時，可在３′接合位置進行自動地解離，類似完整的嗜熱四膜蟲不表現子。這些已解離之型式（終結在鄰接３′接合位置之鳥嘌呤核苷殘基上）也與ＣＡＴ　ＲＮＡ共置。於此例中，核糖酶本身與ＣＡＴ　ＲＮＡ３′部份連接，產生長約５５０個核苷酸之產物。此反應類似完整不表現子之自身－環化作用，且相同的連接產物可見於其他的反式接合反應之中。

ＩＶ．反式接合之正確性

ＣＡＴ－ＬａｃＺ　α－肽反式接合反應中之產物被逆轉錄，並以互補於預定之接合位置二側序列之二段寡核苷酸行聚合酶反應而擴大之。經擴大之序列再選殖及定序。自接合產物之預期序列中，示出個別的重組子並無變化。如完整不表現子之研究中所見的，接合似乎是高度正確

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (40)

的。

因此，上述研究顯示依據本發明準則所設計之反式接合核糖酶，可於活體外正確且有效地反式接合。

實例2

設計可提供植物抗病毒性之反式接合核糖酶

黃瓜花葉病毒（ＣＭＶ）是具有許多已知菌株之流行性病毒。示出９個序列株，範圍在ＲＮＡ３及亞基因體ｍＲＮＡ４中所編碼的衣殼蛋白質順反子之起克區（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯＳ．７－２５；圖４（Ａ）及５）。選出二個位置，係在序列中具保留性且於衣殼蛋白質ＡＵＧ起始密碼子的下游。構築核糖酶之寡核苷酸示於圖４Ｂ，且於下文中討論，且此酶係可反式接合ＤＴＡ之ｉｌｅ－突變型至ＣＭＶ衣殼蛋白質ｍＲＮＡ中。

圖４Ｃ及Ｄ中所示之反式接合核糖酶，對準圖４Ｂ所示之ＣＭＶ病毒序列，不僅可造成ＣＭＶ　ＲＮＡ分子之解離，且可於感染細胞中表現白喉毒素Ａ鏈。圖４之反式接合匣可轉移至任何感受ＣＭＶ之植株，利用技藝中已知之技術，且導入外來基因之子代接受ＣＭＶ感染之挑戰。核糖酶經如此設計後，則病毒感染對於經由ＲＮＡ反式接合而啓動毒素之產製上而言是必要的，因為核糖酶本身並不會轉譯。感染的細胞會局部死亡（由於毒素表現所致），如此限制病毒在植株內之複製及散布，而得到人工的過敏反映。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

85. 8. 12 修正
年 月 日 補充
A7
B7

五、發明說明（ 41）

實例 3

Ｇａｌ４－白喉毒素Ａ鏈反式接合核糖酶之構築及鑑定

依據本發明及實例１所述之方法，已設計一種Ｇａｌ４－白喉毒素Ａ鏈反式接合的融合核糖酶。（圖６）。此核糖酶之序列以ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．６示出。ＧＡＬ４－ＤＴＡ核糖酶匣是一種ＳａｌＩ－ＸｈｏＩ片段。ＳｃａＩ位置位在３´接合位置上游５個鹼基處。此核糖酶可將白喉毒素Ａ鏈之編碼序列接合，至ＧＡＬ４ｍＲＮＡ　５´區中的位置上。此反式接合活性，活體外（如上）及活體內（如下），均具活性。ＧＡＬ４－ＤＴＡ核糖酶成功設計之主要準則，以及任何可將編碼毒性產物之序列反式接合之反式接合核糖酶，不僅在於有效且精確之反式接合催化作用，同時毒性產物（例如ＤＴＡ）之表現沒有反式接合就不會發生。

依據上述之設計，構築核糖酶之催化部份，且在ＧＡＬ４及ＤＴＡ之５´編碼區內分別選擇５´及３´接合位置。相當於ＤＴＡ基因之３´表現子序列，已於眞核細胞中表現，除了除去第一個ＡＵＧ密碼子及許多近端的胺基酸。ＤＴＡ原先的白喉棒桿菌型於其５´區也有異，以一個ＣＵＧ密碼子啓動轉譯作用。原先的ＤＴＡ序列也含有一個不存在的訊號肽前導序列。

這些核糖酶分子可在３´接合位置進行自動的切割。由於ＤＴＡ極具毒性，因此任何釋出之３´表現子序列不

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85. 8. 12
85. 8. 14 修正
A7 年 月 日
B7 補充

五、發明說明（ 42）

會造成毒性轉譯作用產物此點是十分重要的。3′表現子在第13位置上含有一個在架構上之甲硫胺酸，其可想像地生成經截斷但具毒性之多肽。爲減少此一可能性，野生型序列（R_z-DTA_{met}）自此位置上改變，即於二個不同的核糖酶構體中，甲硫胺酸變化成異白胺酸（R_z-DTA_{ile}）或白胺酸（R_z-DTA_{leu}）（圖6）。

實例4

本發明核糖酶之活體內活性

I．前言

研究以此中所示之準則所設計之核糖酶活體內活性，及此核糖酶遞送新基因活性至宿主細胞之能力，利用所述之Gal4－白喉毒素A鏈反式接合核糖酶（實例3及圖6）遞送高度毒性之白喉毒素A鏈產物至宿主細胞中而明示。於此系統中，選中果蠅爲宿主細胞，且在果蠅宿主中可以組織特異方式控制本發明核糖酶之表現。

白喉毒素是由對噬菌體具溶原性之白喉棒桿菌所分泌者。此毒素係爲單一多肽產物，可進行蛋白水解，成A及B鏈。A鏈（DTA）具有强力之ADP核糖基酶活性，其對眞核細胞轉譯加長作用因子EF－2具特異性。此酵素即使極少量存在也可造成轉譯作用之停止，且最後是各種眞核細胞之死亡。B鏈可藉著與甘露糖殘基結合而粘附

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 43）

毒素至細胞表面受體上，因此可胞內遞送，是採細胞攝粒作用且以胞腺融合方式進入胞質中。

於缺乏B鏈下，A鏈當於胞外存在時較不具毒性。此特性及其劇毒，已被提議可用於異位切除實驗。如，編碼DNA之序列已於導入對來基因的老鼠中表現，利用視蛋白啓動基因來驅動於發展眼睛中之表現。結果老鼠眼殘而盲(Breitman, M.L., Science 238:1563-1565(1987))。於另一研究中，進行老鼠胰臟之切除(Palmiter, R.D. et al., Cell 50:435-443(1987))且Wert, S.E. et al., Am. Rev. Respir. Dis. 141(no.4,part 2):A695(1990)描述利用嵌合基因來切除肺泡細胞，基因中含啓動基因及人類界面活性劑蛋白質C基因之5´鄰接序列（表現於II型肺胞細胞）及DTA基因。

然而，以此途徑，無法保持或增殖轉形之有機體，其可能有更嚴重，或致命的表現型。此外，迄今尚無以完整DTA序列轉形於某一種類（如果蠅）之報告。於此轉形過程中DTA基因之有缺失的表現可造成即刻的死亡。

II. 果蠅系統

於果蠅中對準基因表現之一般方法已發展出來了。首先，系統可使個別株有快速的生殖作用，其中異位基因表現可集中於不同的組織或細胞型式中：利用加强子偵測技術(O'Kane, C.J. and Gehring, W.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA:9123-9127(1987); Bellen et al., Gene-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (44)

s and Development 3:1288-1300(1989);Bier et al., Genes and Development 3:1273-1287(1989))以於各種型式之胚胎、幼蟲及成蟲中表現轉錄活化子蛋白質。其次，方法可使活化子與其標的基因分隔在不同株中，以確保個別的親代株可存活：於一株中存在有活化子蛋白質，但標的基因未被活化，於第二株中標的基因則沈默。當二種株交配，只有在交配之子代中標的基因才被活化，使顯性表現型（包括致病力）被合宜地研究。

為了只異位表現重點基因，需要在蠅中無內源性標的之轉錄活化子。來自酵母，Ｇａｌ４之活化子可活化蠅中之轉錄作用，但只自攜有Ｇａｌ４結合位置之啓動基因中作用(Fischer et al., Nature 332:853-865(1988))。為對準基因表現，Ｇａｌ４以二種方式限制於特定細胞：不論是由具特性之蠅啓動基因所驅動之Ｇａｌ４轉錄作用，或是無加強子之Ｇａｌ４基因任意地整合至果蠅基因體中，均在不同的基因體加強子排列控制之下。為分析Ｇａｌ４之轉活化作用，則表現Ｇａｌ４之蠅與攜有ｌａｃＺ基因者交配，後者之轉錄作用由Ｇａｌ４結合位置驅動(Fischer et al., Nature 332:853-865(1988))。β－半乳糖苷酶只於先表現Ｇａｌ４之細胞中表現。ｌａｃＺ之組織－及細胞－特異之轉活化作用已明示，其中Ｇａｌ４表現且已確立各種型式。

以此系統目的有以下可能性：１）將Ｇａｌ４結合位置置於任何編碼序列之上游；２）只於其中Ｇａｌ４已表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (45)

現之細胞中活化基因，及3）觀察此異常表現對發展之作用。於異位表現是致命的例子中，此方法可使二個親代株（一個表現Ｇａｌ４，另一個則攜有沈默基因，其在啓動基因中有Ｇａｌ４結合位置）穩定地增殖。之後再於交配之子代中研究表現型。

Ⅲ．載體

於這些研究中充作起始物質之載體包括：

１）ｐＧＡＴＢ及ｐＧＡＴＮ（圖９）：這些載體用於選殖位於無啓動基因Ｇａｌ４基因上游之啓動基因及加強子。

構築載體，其中在Ｇａｌ４編碼區上游嵌入單一的ＮｏＩＩ或ＢａｍＨＩ位置。一旦啓動基因與Ｇａｌ４編碼序列相連，基因可自ｐＨＳＲＥＭ載體骨架中切出(Knipple and Marsella-Herrick, Nucl. Acids Res. 16: 7748(1988)並移至Ｐ－要件載體。已將Ｒｈ$_2$啓動基因(Mismer et al., Genetics 120:173-180(1988))選殖至載體中，且產生的蠅其Ｇａｌ４只於眼點中表現。

２）ｐＧａｗＢ：此是用於偵測加強子之Ｇａｌ４載體。

無加強子之Ｇａｌ４基因已繼代選殖至載體ｐｌｗＢ中(Wilson et al., Genes and Development 3:1301-1313(1989)以產生ｐＧａｗＢ。ｐｌｗＢ先以ＨｉｎｄⅢ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (46)

水解以除去ｌａｃＺ基因，及Ｐ－轉因子酶基因之Ｎ－末端。此更換以Ｐ－轉因子酶基因ＴＡＴＡ盒後完整的Ｇａｌ４編碼區。

３）ｐＵＡＳＴ（圖１０）：此質體用於選殖ＧａｌＵＳＡ下游之編碼序列。

於Ｐ－要件載體中構築一個載體，其中基因可繼代選殖至Ｇａｌ４　ＵＡＳ後（上游活化作用序列）－ｐＣａＳｐｅＲ３(C. Thummel, Univ. of Utah Medical Center, Salt Lake City, Utah,個人論點）。嵌入５個Ｇａｌ４結合位置，繼以ｈｓｐ７０　ＴＡＴＡ盒及轉錄作用起點，聚連接子，ＳＶ４０不表現子及聚腺化位置。可嵌入基因或ｃＤＮＡ中之單一位置包括：ＥｃｏＲＩ，ＢｇｌⅡ，ＮｏｔＩ，ＸｈｏＩ，ＫｐｎＩ及ＸｂａＩ。

Ⅳ．果蠅株

於這些研究中用來鑑定果蠅株之遺傳技術，係技藝中熟知的（〝Genetic Variations of Drosophila melanogaster,〞D. Lindsley and E.H. Grell, eds)。

利用攜有△２－３之〝跳越啓始〞（jumpstarter）株因化Ｐ－要件轉因子，其係一種在第三條染色體上有缺失之Ｐ－要件，此染色體可表現高的原構性活性轉因子酶水平(Robertson et al., Genetics 118:451-470(1988))。三種母株，目前用來產製及定位嵌入株，貯置在果蠅種

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (47)

系中心，Indiana University Department of Biology, Jordan Hall A 503, Bloomington, Indiana 47405:

1：y w；+／+；Sb P〔ry⁺, Δ2－3〕／TM6, Ubx

2： w；+／+；TM3, Sb／CxD

（貯置號：3665）

3： w；CyO／Sco；+／+

（貯置號：3666）

其中三個染色體之遺傳特性以半支點分出。因此，如於第1株中，第1個染色體（X染色體）是黃及白同種接合子的（〝y w〞），第2個染色體是野生型（〝+／+〞），第3個染色體攜有短髮基因（〝Sb〞），及P要件轉因子薔薇色基因（〝ry⁺〞）及Δ2－3，而第2及第3染色體攜有平衡逆位（〝／TM6, Ubx〞）。

V. 產生Gal4表現型式之策略

A. 用於分離轉形細胞之流程

將衍自母株之胚胎中注入構體；

♀♀ y w/y w ; Δ2-3,Sb/TM6,Ubx X ♂♂ y w/Y ; Δ2-3,Sb/TM6,Ubx

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (48)

F0；已發展之單株

♀ y w/y w ; Δ2-3,Sb/TM6,Ubx X ♂ y w/Y; +/+

或

♂ y w/Y ; Δ2-3,Sb/TM6,Ubx X ♀ y w/y w; +/+

F1；選擇〔W±〕及〔Sb±〕子代及已發展之母株

♀ y w/y w ; +/TM6,Ubx X ♂ y w/Y; +/+

或

♂ y w/Y ; +/TM6,Ubx X ♀ y w/y w; +/+

B. 用來跳越無加強子Gal4嵌入子之流程

1. 自X－染色體跳過

♀♀ FM3/FM7,w; +/+ X、 ♂♂ y w/Y; Δ2-3,Sb/TM6,Ubx

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w^+] X ♂♂ FM7/Y ; Δ2-3,Sb/+

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w^+]; Δ2-3,Sb/+ X ♂♂ y w/Y; +/+

♀ FM7,w/ y w ; Δ2-3,Sb/+ X ♂ y w/Y; +/+

選擇〔W*〕及〔B〕子代並發展母株

2. 自△2－3－染色體跳過

♀♀ y w/y w X ♂♂ y w/Y ; P[Gal4,w^+], Δ2-3,Sb/+

選擇〔W*〕及〔Sb*〕子代並發展母株

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線

五、發明說明 (49)

C．染色體分隔

欲分析嵌入之分隔，使用二母株：w；＋／＋；TM3，Sb／CxD及w；CyO／Sco；＋／＋。

方法

為產生可以細胞一或組織特異方式表現Gal4的大量株，已構築加強子偵測載體，其攜有各種不同型式的Gal4基因。二種基因，不論編碼全身蛋白質或經截斷的蛋白質，已被選殖至薔薇色（ry⁺）及白色（w⁺）P－要件載體中（plArB及plwB之經修飾型式；Wilson et al., Genes and Development 3:1301-1313(1989))。利用ry⁺或w⁺來篩選，且引入△2－3基因而固化這些載體(Robertson et al., Genetics 118:461-470(1988))。為具象化Gal4之表現型式，Gal4嵌入株與在Gal4 UAS控制下攜有lacZ基因之株交配(Fischer et al., Nature 332:853-865(1988))。得自這些交配之胚胎、幼蟲及成蟲進行β－半乳糖苷酶之篩選，可利用以X－gal為受質之酵素分析，或以相對於β－半乳糖苷酶之單株抗體染色。由USA－lacZ構體編碼之β－半乳糖苷酶，定位在細胞質。

已篩選約500個Gal4－嵌入株，且其中許多可於特異組織中活化基因之用，如表皮紋、中胚層、中樞神經系統及周邊神經系統。有許多株可於唾腺及其他組織中

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (50)

表現β－半乳糖苷酶。有可能於構築無加強子之Ｇａｌ４轉因子時，意外地產生位置依賴性之唾腺加強子。

ＶＩ．樣品篩選

株數目	未染色	唾腺	其他組織	%
9	+	-	-	5.8
45	-	+	-	28.8
81	-	+	+	51.9
21	-	-	+	13.5
156				100.0

欲以特異型式活化基因（Ｘ基因），選出Ｇａｌ４嵌入株與攜有Ｘ基因且選殖於ＧＡＬ　ＵＡＳ後之株交配即成。

ＶＩＩ．無核糖酶之ＧＡＬ４／ＵＡＳ系統要點

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝・・・訂・・・線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (51)

Ｇａｌ４／ＵＡＳ系統是可控制基因活化之二部式系統。方法是多變化的，可為組織特異的，且除了如此中所述之ＵＡＳ－ＤＴＡ構體，似乎不呈現基本表現水平。其可用來異位表現具特性之基因，表現對有機體具致命性之經修飾基因，及自其他種類中表現基因以研究其在果蠅發展上之影響。由於此方法可以產生具優勢且獲致功能的突變作用，因此可進行存活或致命性表現型加強子或抑制子之異位測試及篩選。Ｇａｌ４系統也可令毒性產物表現，以研究細胞及組織－特異性切除之影響。

ＶⅢ．表現Ｇａｌ４的果蠅與分子量ＤＴＡ核糖酶之用法

攜有編碼ＤＴＡ蛋白質序列之融合核糖酶，其表現係在ＧＡＬ４　ＵＡＳ（上游活化子序列）控制之下，於ｐＵＡＳＴ中（圖１０）。如上文所陳述的，利用上述的經修飾的Ｐ－要件加強子－捕獲載體，可構築許多穩定的果蠅株，其於發展中之蠅中以特異的空間及時間方式，各自表現酵母轉錄活化子ＧＡＬ４。位於Ｇａｌ４上游活化子序列（ＵＡＳ）控制下的任何基因，均可各自地轉形及維持，之後遺傳交配至可表現Ｇａｌ４之株而誘生特殊的果蠅組織（圖７）。然而，無法在本身無進一步處理修飾下利用Ｇａｌ４系統表現ＤＴＡ，係由於難以經由ＤＴＡ之有缺失表現產生ＵＡＳ－ＤＴＡ轉形細胞。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)
81. 2. 20,000

五、發明說明 (52)

頃發現，使用此二要件系統充作調適表現ＤＴＡ之方法，可經由反式接合核糖酶（圖６）克服這些問題。於這些表現ＧＡＬ４之細胞中，ＧＡＬ４蛋白質提供核糖酶轉錄作用所需之活性，且ＧＡＬ４ ｍＲＮＡ提供ＤＴＡ產製所需之反式接合標的。

果蠅胚胎可利用技藝中已知之技術注射核糖酶，而該序列置於ＵＡＳ啓動基因之控制下。胚胎以Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{met}$構築體注射後無法存活，而自注有Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{ile}$及Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{leu}$之胚胎中可得到正常的經轉形蠅。此結果暗示，中段的ＡＵＧ密碼子確實如啓始密碼子般作用，而於注射後用於轉譯毒性產物。密碼子鄰近ＤＴＡ序列中推想之ＮＡＤ＋結合位置，以及鄰近遠端相關之外毒素Ａ中固有之序列，此係來自線膿桿菌的另一ＥＦ－２特異ＡＤＰ－核糖基酶。

含有Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{ile}$及Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{leu}$序列，且在ＧＡＬ４ ＵＡＳ控制下之導入外來基因之蠅，與以特殊表現型式產製ＧＡＬ４之蠅交配。如，於一個具特性株－１Ｊ３株中，已將ＧＡＬ４基因於髮基因（hairy gene)近處嵌入，且反映出其表現型式。髮基因產物於胚胎形成過程中，產生於偶數腹部片段之表皮紋上。當由ＵＡＳ驅動之ＬａｃＺ基因引入１Ｊ３中，其中ＧＡＬ４以相同方式呈髮基因產物型式表現，可在偶數紋內發現β－半乳糖苷酶之出現。當含有Ｒ$_z$－ＤＴＡ$_{leu}$基因之蠅與此表現ＧＡＬ４之株交配，則可生成正常的子代。然而，當含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (53)

R_z－DTA$_{ile}$之蠅與表現GAL4株交配，於胚胎形成中子代之發展會被遏止。於胚胎眼點上可見暗色斑紋，與醫層細胞之死亡符合。當檢視眼點製劑時，偶數之齒狀帶瓦解或喪失，尤其是第4、6及8紋（圖11）。當含有R_z－DTA$_{ile}$之蠅與不同的GAL4表現基因交配時，可觀察到其他特異型式之細胞死亡。

實例5

原－核糖酶之設計

為了設計原核糖酶，於是變化先前所述之CAT－LacZ反式接合核糖酶（圖12）。遺傳分類比較及突變分析（其總覽，見Cech, Am. Rev. Biochem. 59:543-568(1990))已顯示，I群自身一接合不表現子之核心區是具高度保留性的，且對活性而言十分重要（圖13）。為了構築反應接合之原核糖酶，瓦解緊鄰此區之螺旋，P8。於第一個實驗中，將新序列13或18個核苷酸引入5´股及P8螺旋環中，以分別產生原核糖酶1及2。額外的核苷酸與核糖酶5´〝抗－意識〞部份互補，而調整鄰接的序列以保有（1）於P8鹼基上之確實序列，及（2）P8內可能的鹼基配對程度（圖13）。在嵌入螺旋P8之序列及原核糖酶5´〝抗－意識〞區間自身－互補之程度如此，以致此新的螺旋預期可形成初生之轉錄子，而後才是螺旋P8。此不同螺旋之形成，預期也

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (54)

會在核糖酶之催化核心內瓦解相鄰的二級及可能的三級交互作用。因此，原核糖酶之折疊錯誤將使其在催化作上鈍化（圖１４）。然而，原核糖酶與欲求標的ＲＮＡ之鹼基配對，可取代Ｐ８－〝抗意識〞之鹼基配對，接收〝抗意識〞序列，且令Ｐ８螺旋及一個活性之催化區域再被形成。Ｐ８－〝抗意識〞螺旋之置換，可造成鹼基配對總和增加，使催化區有正確之折疊，因此在活力上而言是較為有利的。

ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶

利用上述之ＰＣＲ－突變作用，構築相當於二個ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶之選殖序列，且以活體外轉錄作用產生ＲＮＡ。可觀察到ＣＡＴ－ＬａｃＺ反式接合的核糖酶，於轉錄作用中會在３´接合接頭進行切割，此乃不表現子催化之水解作用結果。類似的水解作用可見於未經修飾之嗜熱四膜蟲不表現子之活體外轉錄子上。相反的，不同的ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶之轉錄子，在相同條件下具較少解離證據者，可較為穩定（圖１５）。此顯示原核糖酶是無活性的，若催化序列被錯誤的折疊其將是可預期的。測試原核糖酶截斷型，對於拮抗ＣＡＴ　ＲＮＡ之特異核糖核酸內切酶活性。自於ＳｃａＩ位置被截斷之模板中轉錄ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶ＲＮＡ，以除去３´接合接頭及ＬａｃＺ序列。於除去３´接合位置後，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (55)

核糖酶及原核糖酶ＲＮＡ均是穩定的。經截斷之原核糖酶與ＣＡＴ　ＲＮＡ共置，可使標的ＲＮＡ被特異地解離成預期大小之片段（圖１６）。在３７℃、４５℃及５０℃下不具特異之解離活性。

也可構築ＧＡＬ４－ＤＴＡ反式接合核糖酶之原核糖酶型式（圖１７）。２０個核苷酸區域（互補於〝抗意識〞區）嵌入５′及螺旋Ｐ８之環中。二個原核糖酶差異處在於鹼基配對之程度（可能指經修飾之螺旋Ｐ８中），且ＧＡＬ４－ＤＴＡ原核糖酶，具有較長之莖，且於環中有較少（３個）易接近之鹼基。ＧＡＬ４－ＤＴＡ原核糖酶２之螺旋Ｐ８，與ＣＡＴ－ＬａｃＺ原核糖酶２更為類似，其較大的環中（１４個鹼基）含有與〝抗－意識〞區互補之序列。ＧＡＬ４－ＤＴＡ原核糖酶之轉錄子較未經修飾之核糖酶者更為穩定。特別地，原核糖酶２於可造成核糖酶型式基本上完全自身解離之條件中共置（３０′@５０℃，１０ｍＭ　$MgCl_2$，２ｍＭ　ＧＴＰ，見圖１８）後大部份仍是完整的。

既已完全說明本發明，精藝者應可了解，只要不影響本發明之精義或範圍，或其任何具體實例，可在大且相當之條件，變數等之內進行其範疇。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝・・・訂・・・線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

393511

85. 8. 12 修正補充
年 月 日

四、中文發明摘要（發明之名稱：使用反式接合核糖酶以切除一部份細胞之方法）

本發明描述一種新設計的核糖酶，其在I群不表現子催化核心基礎下，可自體催化反式接合。利用此設計可構築核糖酶，其可以高度精確方式有效地接合一個新的3′表現子序列至任何選定之標的RNA序列上。也描述細胞切除的方法，此中利用本發明新穎的反式接合核糖酶，以對準且經調控方式將一毒性產物送至宿主細胞活體內。也描述鈍化的原核糖酶型式。

英文發明摘要（發明之名稱：Cell ablation using trans-splicing ribozymes）

ABSTRACT

The design of new ribozymes capable of self-catalyzed *trans*-splicing which are based upon the catalytic core of a Group I intron are described. Using this design, it is possible to construct ribozymes capable of efficiently splicing a new 3′ exon sequence into any chosen target RNA sequence in a highly precise manner. A method of cell ablation is also described that provides a toxic product to a host cell *in vivo* in a targetted, regulated manner utilizing novel *trans*-splicing ribozymes of the invention. Inactive pro-ribozyme forms are also described.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

393511

85. 8. 12 修正補充
年 月 日

四、中文發明摘要（發明之名稱：使用反式接合核糖酶以切除一部份細胞之方法）

本發明描述一種新設計的核糖酶，其在I群不表現子催化核心基礎下，可自體催化反式接合。利用此設計可構築核糖酶，其可以高度精確方式有效地接合一個新的3′表現子序列至任何選定之標的RNA序列上。也描述細胞切除的方法，此中利用本發明新穎的反式接合核糖酶，以對準且經調控方式將一毒性產物送至宿主細胞活體內。也描述鈍化的原核糖酶型式。

英文發明摘要（發明之名稱：Cell ablation using trans-splicing ribozymes）

ABSTRACT

The design of new ribozymes capable of self-catalyzed *trans*-splicing which are based upon the catalytic core of a Group I intron are described. Using this design, it is possible to construct ribozymes capable of efficiently splicing a new 3′ exon sequence into any chosen target RNA sequence in a highly precise manner. A method of cell ablation is also described that provides a toxic product to a host cell *in vivo* in a targetted, regulated manner utilizing novel *trans*-splicing ribozymes of the invention. Inactive pro-ribozyme forms are also described.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

年 月 日 修正 補充
89.3.07

附件一a:

公告本

第81102785號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國89年3月修正

1．一種編碼反式接合I群（Group I）核糖酶之多核苷酸，該核糖酶之序列爲一融合RNA，此融合RNA之序列由如下組成：

（1）一個第一RNA序列，其能夠將該核糖酶對準標的RNA並與之雜交，該第一RNA序列係對該標的RNA互補之序列，且該第一RNA序列能與標的RNA充分互補而使得標的RNA與該核糖酶之間形成P1螺旋；

（2）一個第二RNA序列，其藉由該核糖酶之反式接合活性結果而可同線地嵌入標的RNA，其係編碼一肽之序列，該肽對宿主細胞有毒性，且其係第13個胺基酸之甲硫胺酸被異亮胺酸或亮胺酸取代之突變白喉毒素A（Diphtheria taxin A, DTA），該嵌入作用發生在緊臨該標的RNA之尿嘧啶殘基之後的位置，該位置係由該第一RNA序列決定；及

（3）一個第三RNA序列，其包括衍生嗜熱四膜蟲（Tetrahymena themophila）I群不表現子之催化核心，該第三RNA序列其5´端連接至該第一RNA序列且其3´端連接至該第二RNA序列；

其中該多核苷酸之表現作用係被操作性連接至轉錄活

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

年 月 日 修正 補充
89.3.07

附件一a:

公告本

第81102785號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國89年3月修正

1．一種編碼反式接合I群（Group I）核糖酶之多核苷酸，該核糖酶之序列爲一融合RNA，此融合RNA之序列由如下組成：

（1）一個第一RNA序列，其能夠將該核糖酶對準標的RNA並與之雜交，該第一RNA序列係對該標的RNA互補之序列，且該第一RNA序列能與標的RNA充分互補而使得標的RNA與該核糖酶之間形成P1螺旋；

（2）一個第二RNA序列，其藉由該核糖酶之反式接合活性結果而可同線地嵌入標的RNA，其係編碼一肽之序列，該肽對宿主細胞有毒性，且其係第13個胺基酸之甲硫胺酸被異亮胺酸或亮胺酸取代之突變白喉毒素A（Diphtheria taxin A, DTA），該嵌入作用發生在緊臨該標的RNA之尿嘧啶殘基之後的位置，該位置係由該第一RNA序列決定；及

（3）一個第三RNA序列，其包括衍生嗜熱四膜蟲（Tetrahymena themophila）I群不表現子之催化核心，該第三RNA序列其5´端連接至該第一RNA序列且其3´端連接至該第二RNA序列；

其中該多核苷酸之表現作用係被操作性連接至轉錄活

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

化子蛋白質，ＧＡＬ４，之表現作用，且其中該第一ＲＮＡ序列爲雜交至編碼該ＧＡＬ４之ＲＮＡ的序列。

２．根據申請專利範圍第１項之多核苷酸，其中該多核苷酸是ＲＮＡ。

３．根據申請專利範圍第１項之多核苷酸，其中該多核苷酸是ＤＮＡ。

４．根據申請專利範圍第１項之多核苷酸，其中該核糖酶是原　核糖酶。

５．根據申請專利範圍第１項之多核苷酸，其中該核糖酶是原核糖酶，且該多核苷酸是ＲＮＡ。

６．根據申請專利範圍第１項之多核苷酸，其中該核糖酶是原核糖酶，且該多核苷酸是ＤＮＡ。

７．一種製備轉形體之方法，包括將如申請專利範圍第１或２項之多核苷酸之編碼序列嵌入一表現載體或轉移載體，該載體已被操作性連接至能夠於昆蟲細胞內作用之啓動子，並以該載體轉形昆蟲細胞。

８．根據申請專利範圍第７項之方法，其中該昆蟲是果蠅。

９．根據申請專利範圍第７項之方法，其包括將如申請專利範圍第５或６項之多核苷酸的編碼序列嵌入表現載體或轉移載體。

１０．一種活體外反式接合之方法，此方法包括如下步驟：

（１）於反式接合反應混合物中，提供由如申請專利

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

範圍第１項之多核苷酸所編碼之反式接合核糖酶；及

（２）在該核糖酶具有反式接合活性之條件下，提供標的ＲＮＡ至此反應混合物中，該標的ＲＮＡ包括互補於該核糖酶之第一ＲＮＡ序列之ＧＡＬ４編碼序列，其中該核糖酶之第二ＲＮＡ序列共線地被轉移至該標的ＲＮＡ。

１１．根據申請專利範圍第１０項之方法，其中該核糖酶是原核糖酶。

１２．一種活體外反式接合之方法，該方法包括以下步驟：

（１）提供如申請專利範圍第１項之多核苷酸至昆蟲細胞中；

（２）於該昆蟲細胞中表現由該多核苷酸所編碼之反式接合核糖酶；

（３）於昆蟲細胞中表現該核糖酶之受質，其中該受質是標的ＲＮＡ，該標的ＲＮＡ係包括互補於該核糖酶之第一ＲＮＡ序列的ＧＡＬ４編碼序列；及

（４）於該昆蟲細胞中催化該核糖酶之第二ＲＮＡ序列與此受質之反式接合。

１３．根據申請專利範圍第１２項之方法，其中該核糖酶是原核糖酶。

１４．一種活體外鈍化標的ＲＮＡ活性之方法，該方法包括：

（１）提供根據申請專利範圍第１項之多核苷酸所編碼之反式接合核糖酶至反式接合反應混合物中，該核糖酶

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

對標的ＲＮＡ具催化活性，該催化活性造成該標的ＲＮＡ作用之鈍化；

（２）提供該標的ＲＮＡ至該混合物中，其中該標的ＲＮＡ包含互補於該核糖酶之第一ＲＮＡ序列的ＧＡＬ４編碼序列；及

（３）提供條件以令該核糖酶表現該催化活性。

１５．根據申請專利範圍第１４項之方法，其中該核糖酶是原核糖酶。

１６．一種提供欲求之遺傳序列至昆蟲細胞中之活體外方法，該方法包括：

（１）提供根據申請專利範圍第１項之多核苷酸至該昆蟲細胞，該核糖酶具有對標的ＲＮＡ之催化活性；

（２）於該昆蟲細胞中提供該標的ＲＮＡ，其中該標的ＲＮＡ含有互補於該核糖酶之第一ＲＮＡ序列的ＧＡＬ４編碼序列；

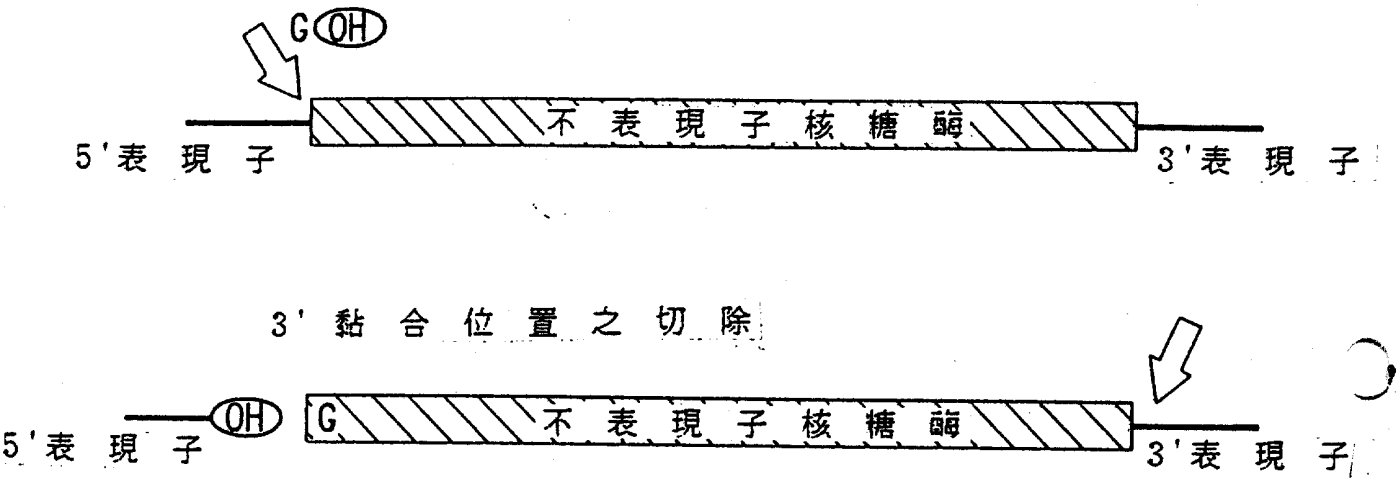
（３）提供條件以令該核糖酶可共線地將該核糖酶之第二ＲＮＡ序列轉移至該標的ＲＮＡ之中，藉此提供該所欲之遺傳序列至該昆蟲細胞。

１７．根據申請專利範圍第１６項之方法，其中該核糖酶是原核糖酶。

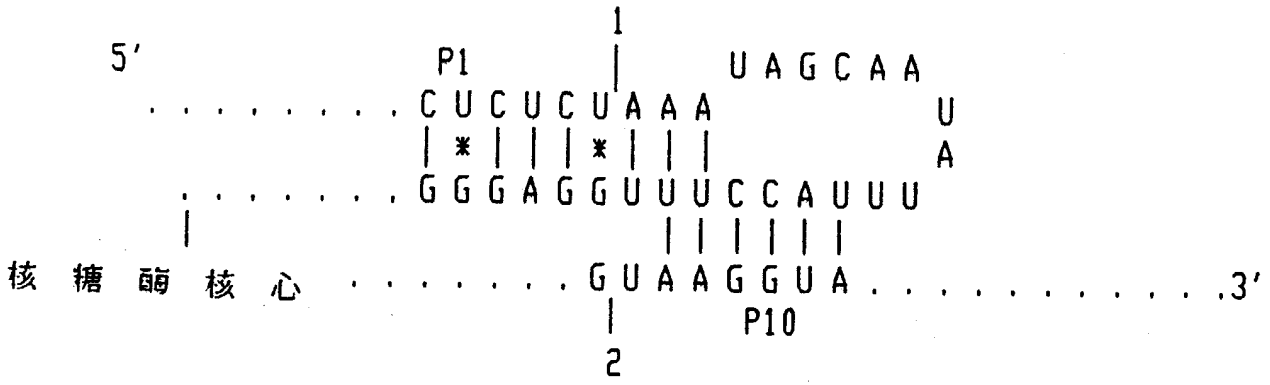
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

附件四：８１１０２７８５中文圖式修正本

85. 8. 12 修正補充
年 月 日

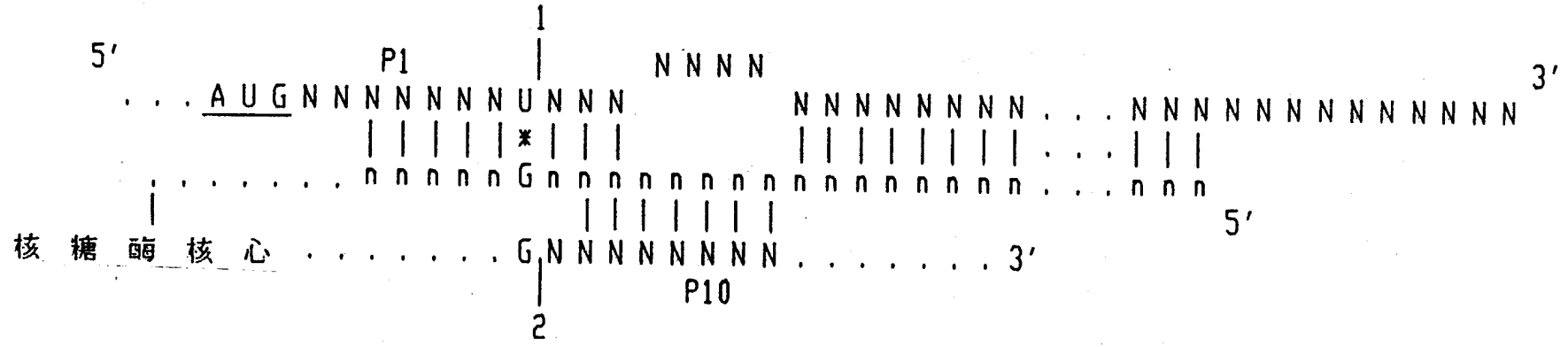


第1圖

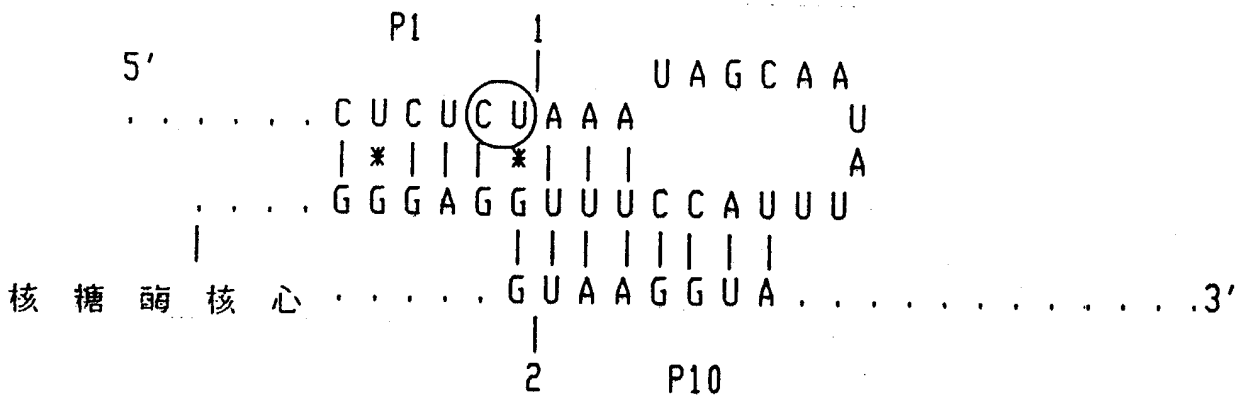


第2A圖

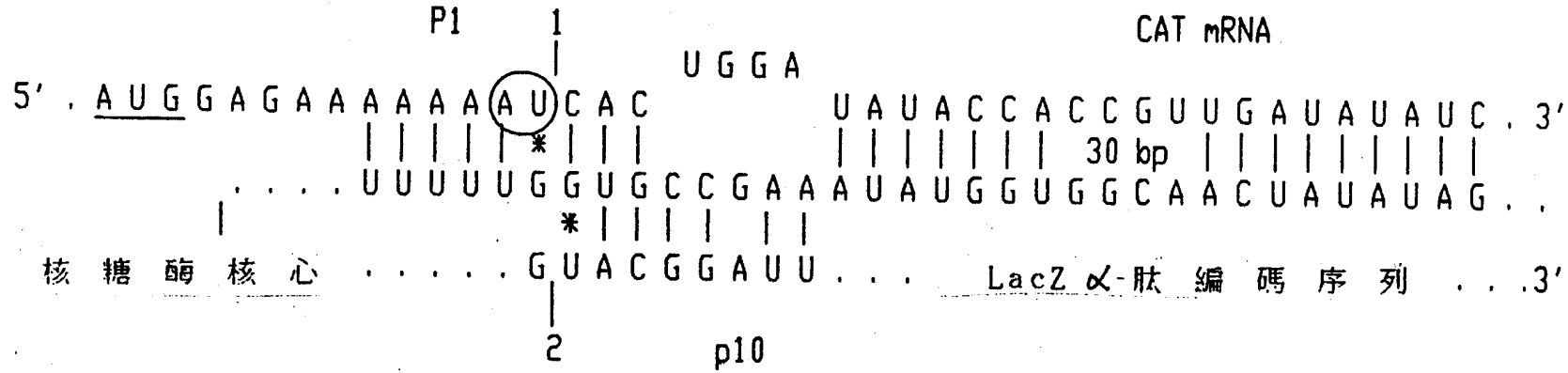
標的mRNA及反式黏合之核糖酶



第2B圖



CAT-LacZ 反 式 黏 合 之 核 糖 酶



met glu lys lys ile thr asp ser leu ala val val leu gln arg arg asp.....

5′ . AUG GAG AAA AAA AUU ACG GAU UCA CUG GCC GUC GUU UUA CAA CGU CGU GAC.....

第3A圖

```
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
  1 GGGAGACCGG AAGCTTCTTT ACGATGCCAT TGGGATATAT CAACGGTGGT ATAAAGCCGT 60
 61 GGTTTTTAAA AGTTATCAGG CATGCACCTG GTAGCTAGTC TTTAAACCAA TAGATTGCAT 120
121 CGGTTTAAAA GGCAAGACCG TCAAATTGCG GGAAAGGGGT CAACAGCCGT TCAGTACCAA 180
181 GTCTCAGGGG AAACTTTGAG ATGGCCTTGC AAAGGGTATG GTAATAAGCT GACGGACATG 240
241 GTCCTAACCA CGCAGCCAAG TCCTAAGTCA ACAGATCTTC TGTTGATATG GATGCAGTTC 300
301 ACAGACTAAA TGTCGGTCGG GGAAGATGTA TTCTTCTCAT AAGATATAGT CGGACCTCTC 360
361 CTTAATGGGA GCTAGCGGAT GAAGTGATGC AACACTGGAG CCGCTGGGAA CTAATTTGTA 420
421 TGCGAAAGTA TATTGATTAG TTTTGGAGTA CTCGTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC 480
481 AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC 540
541 CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC 600
601 GCAGCCTGAA TGGAAATTGT AAG                                         623
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
```

FIG 3B 圖

CMV 分 離 者

```
                                                  1         2
                                                  |         |
WD     UUUGCGUCU.......UAGUGUGCCU AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU
Q      UUUGCGUCUCAG.......UGUGCCU AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU
Fny    UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
M      UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAU AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
I      UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
O      UUUACGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
Y      UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
D      UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
C      UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU
   5'                                                                      3'
```

FIG 第4A圖

```
                                                  1       2
5'                                                |       |                 3'
  AATTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC ATG GAC AAA T.CT GAA T.CA ACC AGT GCT GCA
      |||||||||||||||||||||||||| ||| ||| ||| | || ||| | || ||| ||| ||
      AACACAGCATCTTAACTCAGCTCAG TAC CTG TTT A.GA CTT A.GT TGG TCA GC
EcoRI                                                                 5' PstI
```

FIG 第4B圖

核 糖 酶 1

```
                                        1
                                        |
5'AAUUUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUCAUGGACAAAU.CUGAAUCAACCAGUGCUGCA 3'
                                  |||||* ||||    ||||||||| (41 bp)
                          ..........UGUUUG GACUACUAUGGUUACGA ... 5'
                          |               *|||||||****
                核 糖 酶 核 心 .......G.UUGAUGAUAGGUACCUCGATGATGTTGTTGAT... 3'
```

```
met asp lys phe asp asp arg tyr leu asp asp val ser...
AUG GAC AAA UUU GAU GAU AGG UAC CUC GAU GAU GUU UCU...3'
```

核 糖 酶 2

```
                                       2
                                       |
5'AAUUUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUCAUGGACAAAUCUGAAU.CAACCAGUGCUGCA 3'
                                 |||||* |||     ||| (46 bp)
                          ..........GACUUG GUUCCUACCGA ... 5'
                          |              *||||*|||
                核 糖 酶 核 心 .......G.UAAGGGUGGGGUACCUCGATGATGTTGTTGAT... 3'
```

```
met asp lys ser glu leu arg val gly tyr leu asp asp...
AUG GAC AAA UCU GAA UUA AGG GUG GGG UAC CUC GAU GAU...3'
```

FIG第4C 圖

RNA 4 之 5′ 端

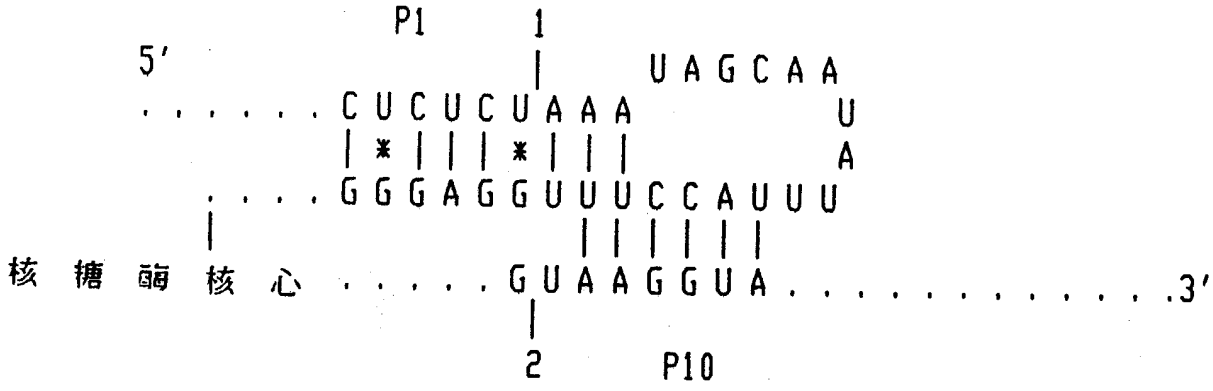
```
WD   GTTTAGTTGTTCACC.....TGAGT.CG.TGTGTTTTGTA..TTTTGCGTCT.....TAGTGTGCCT
Q    GTTTAGTTGTTCACC.....TGAGT...C.GTGTTTTCTTTGTTTTGCGTCTCAG.....TGTGCCT
Fny  GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTTTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
M    GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
I                          AGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
O    GTT..ATTGTCTACTGATTGTATAAAGAGTGTGTGTGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTACGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
Y    GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
D                            GAGTGTGTATGTGCTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC
C    GTT..ATTGTCTACTGACTATATAGAGAGTGTGTGTG..CTGTGTTTTCTC..TTTTGTGTCGTAGAATTGAGTCGAGTC

5′
```

```
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT 3′
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAT AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGC AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT TTG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CAT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC
```

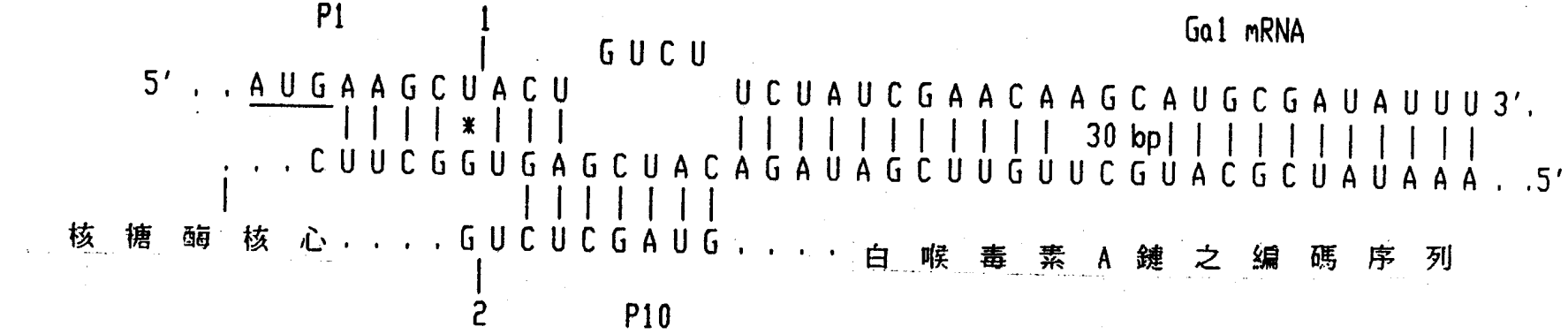
3′

TAC CTG TTT AGA CTT AGA TGG TCC CGA CCA GCA TTG GCA GCT GCA GCA GGC GCA GCA ... CCA AGG GCG AGG CGG GGG AGG

第 5 圖



Gal4-Dt-A 反 式 黏 合 之 核 糖 酶



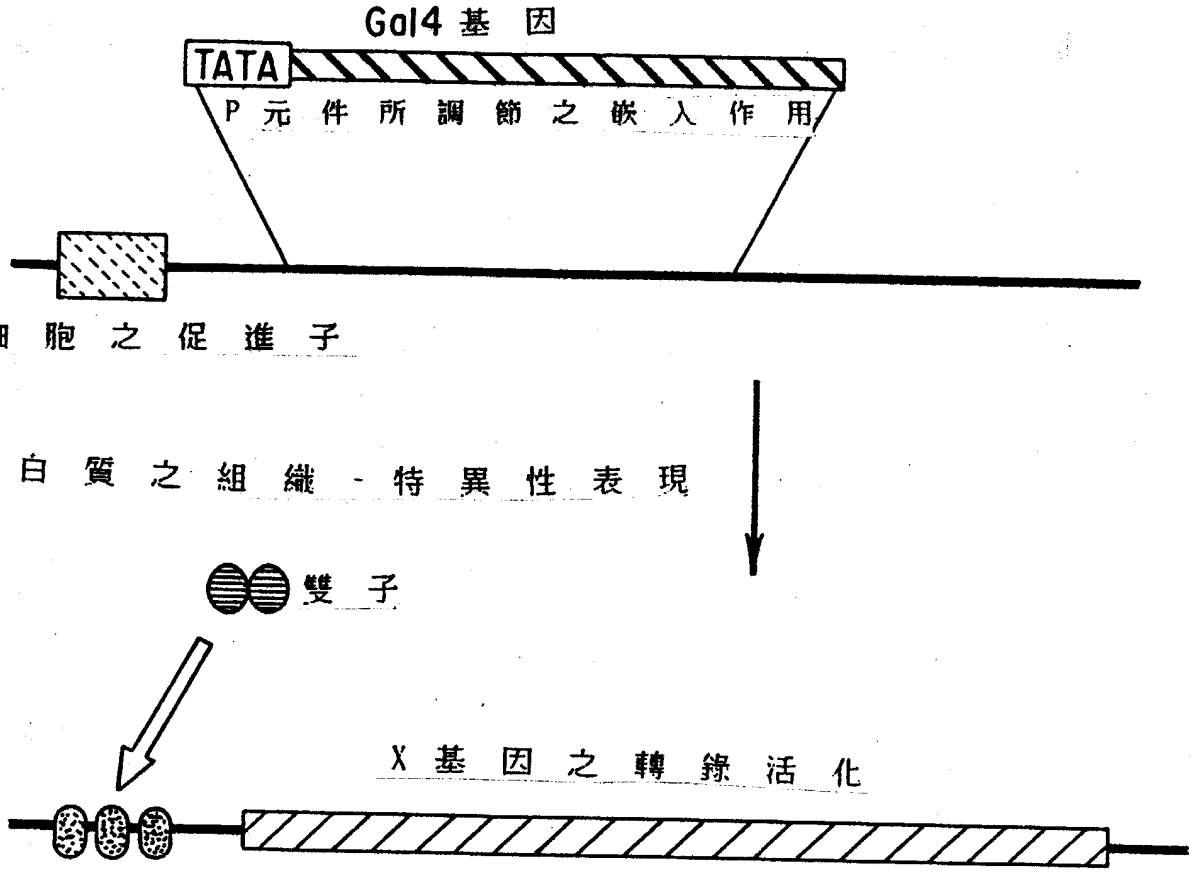
第 6A 圖

met lys leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser .....

5′. . AUG AAG CUU CUC GAU GAU GUU GUU GAU UCU UCU AAA UCU UUU GTG AUG GAA AAC UUU UCU .....3′

```
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
   1 GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60
  61 AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120
 121 AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180
 181 GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240
 241 CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300
 301 AATGTCGGTC GGGGAAGATG TATTCTTCTC ATAAGATATA GTCGGACCTC TCCTTAATGG 360
 361 GAGCTAGCGG ATGAAGTGAT GCAACACTGG AGCCGCTGGG AACTAATTTG TATGCGAAAG 420
 421 TATATTGATT AGTTTTGGAG TACTCGTCTC GATGATGTTG TTGATTCTTC TAAATCTTTT 480
 481 GTGATTGAAA ACTTTTCTTC GTACCACGGG ACTAAACCTG GTTATGTAGA TTCCATTCAA 540
 541 AAAGGTATAC AAAAGCCAAA ATCTGGTACA CAAGGAAATT ATGACGATGA TTGGAAAGGG 600
 601 TTTTATAGTA CCGACAATAA ATACGACGCT GCGGGATACT CTGTAGATAA TGAAAACCCG 660
 661 CTCTCTGGAA AAGCTGGAGG CGTGGTCAAA GTGACGTATC CAGGACTGAC GAAGGTTCTC 720
 721 GCACTAAAAG TGGATAATGC CGAAACTATT AAGAAAGAGT TAGGTTTAAG TCTCACTGAA 780
 781 CCGTTGATGG AGCAAGTCGG AACGGAAGAG TTTATCAAAA GGTTCGGTGA TGGTGCTTCG 840
 841 CGTGTAGTGC TCAGCCTTCC CTTCGCTGAG GGGAGTTCTA GCGTTGAATA TATTAATAAC 900
 901 TGGGAACAGG CGAAAGCGTT AAGCGTAGAA CTTGAGATTA ATTTTGAAAC CCGTGGAAAA 960
 961 CGTGGCCAAG ATGCGATGTA TGAGTATATG GCTCAAGCCT GTGCAGGAAA TCGTGTCAGG 1020
1021 CGATCTTTGT GACTCGAG                                              1038
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
```

FIG 第6B 圖



用於表現Gal4蛋白質之P-元件所調節之"促進子捕獲作用"

第.7 圖

反 式 黏 合 Gal4-DTA mRNA 的 轉 譯

5′ ↓

ATG AAG CTT CTC GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT AAA TCT TTT GTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 3

met lya leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys

3′ "表 現 子" 之 轉 譯

Rz-DTA$_{met}$ 5′ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3′

met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys

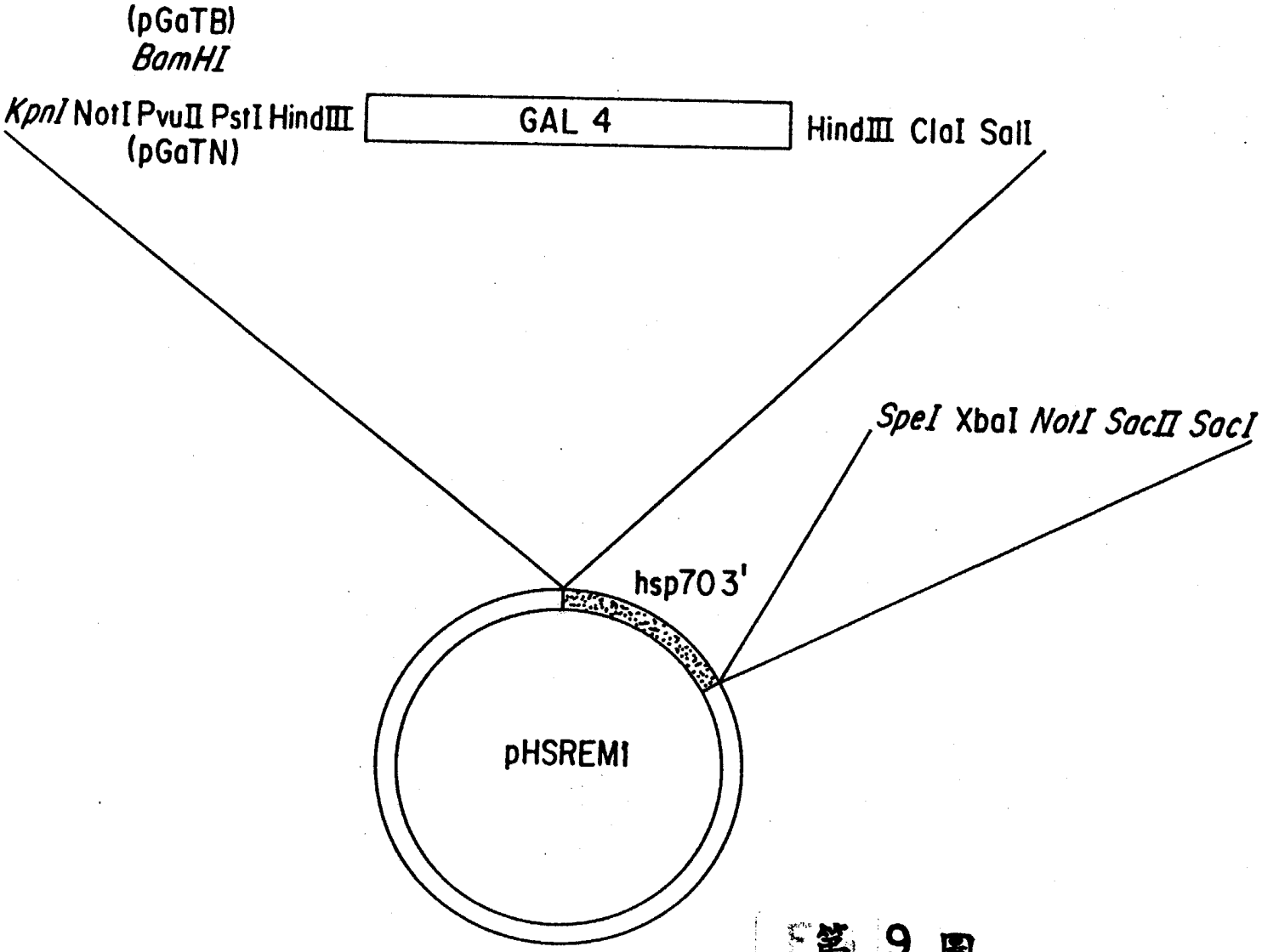
Rz-DTA$_{ile}$ 5′ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATT GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3′

ile

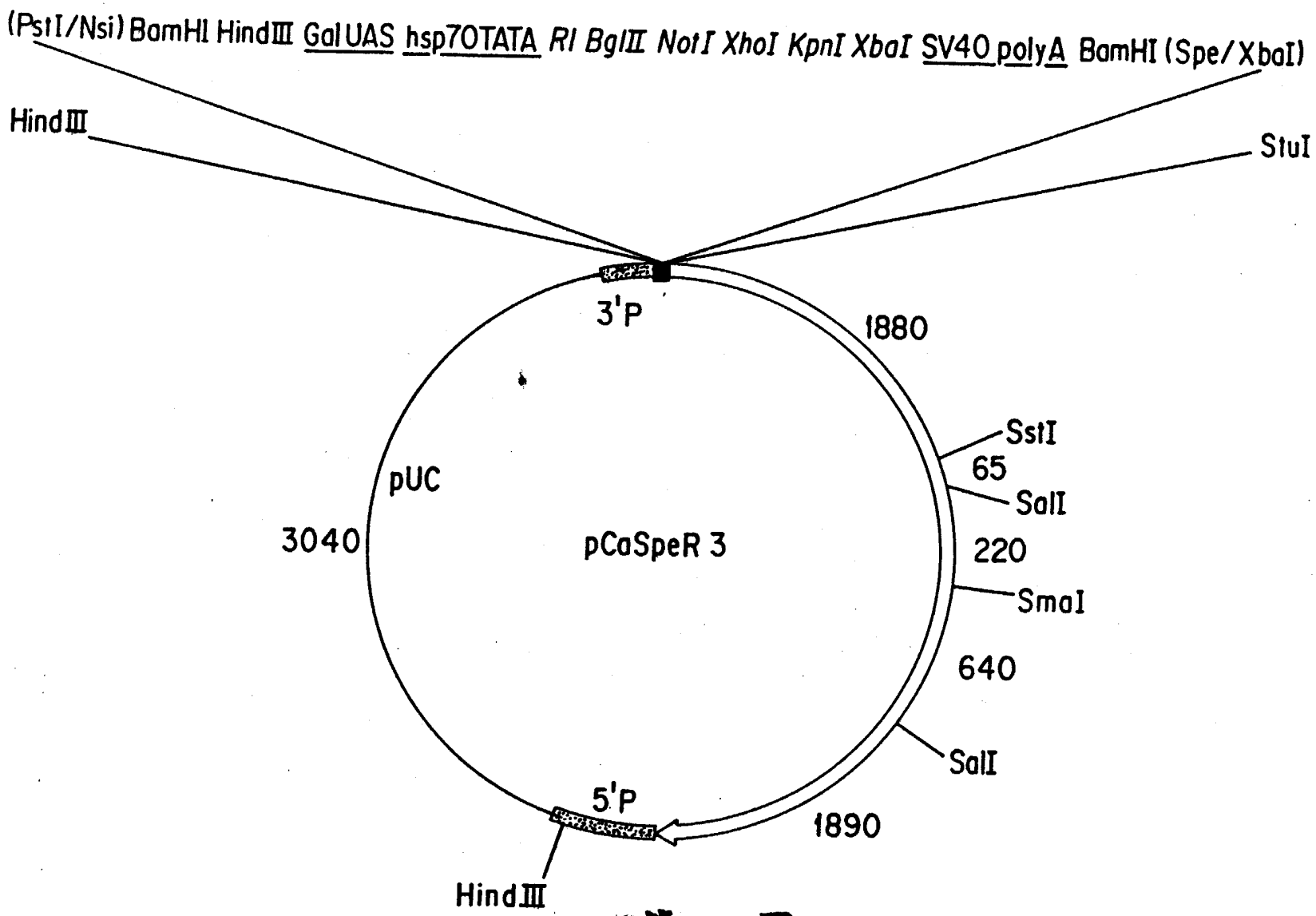
Rz-DTA$_{leu}$ 5′ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG TTG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA ... ... 3′

leu

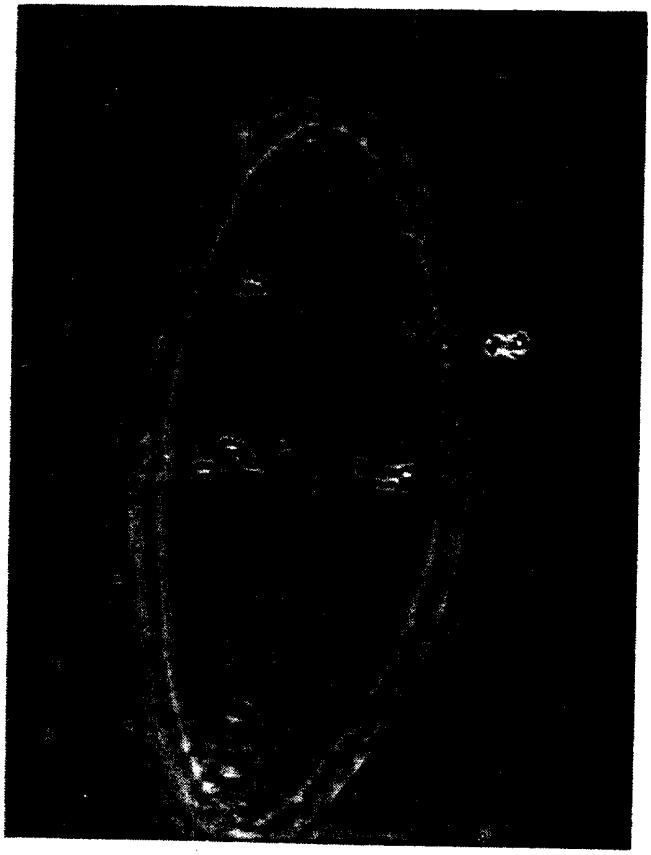
第 8 圖


(pGaTB)
BamHI
KpnI NotI PvuII PstI HindIII
(pGaTN)
GAL 4
HindIII ClaI SalI
SpeI XbaI NotI SacII SacI
hsp70 3'
pHSREM1

第 9 圖

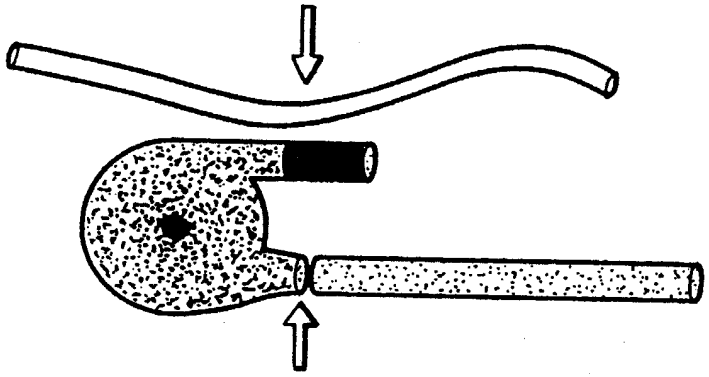

(PstI/Nsi) BamHI HindIII GalUAS hsp70TATA RI BglII NotI XhoI KpnI XbaI SV40 polyA BamHI (Spe/XbaI)
HindIII
StuI
3'P
1880
SstI
65
SalI
220
SmaI
640
SalI
1890
5'P
HindIII
pUC
3040
pCaSpeR 3

第 10 圖

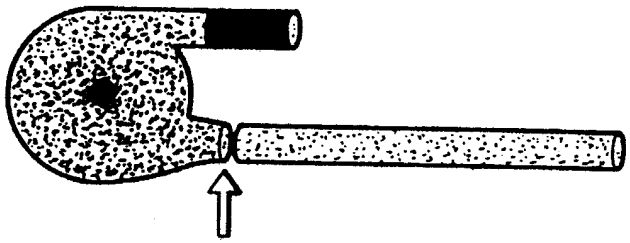


組織內之非黑色處

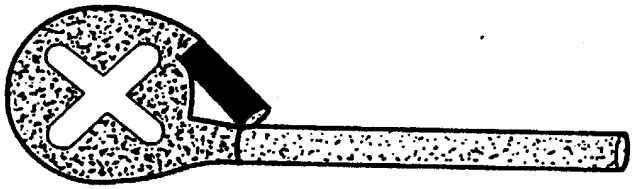
第11圖



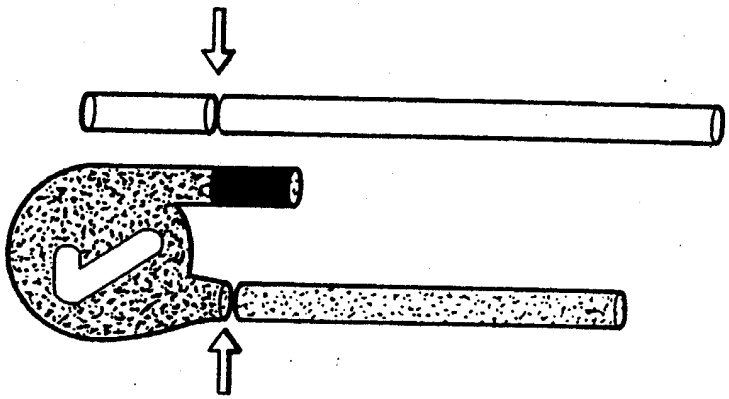
第12A圖



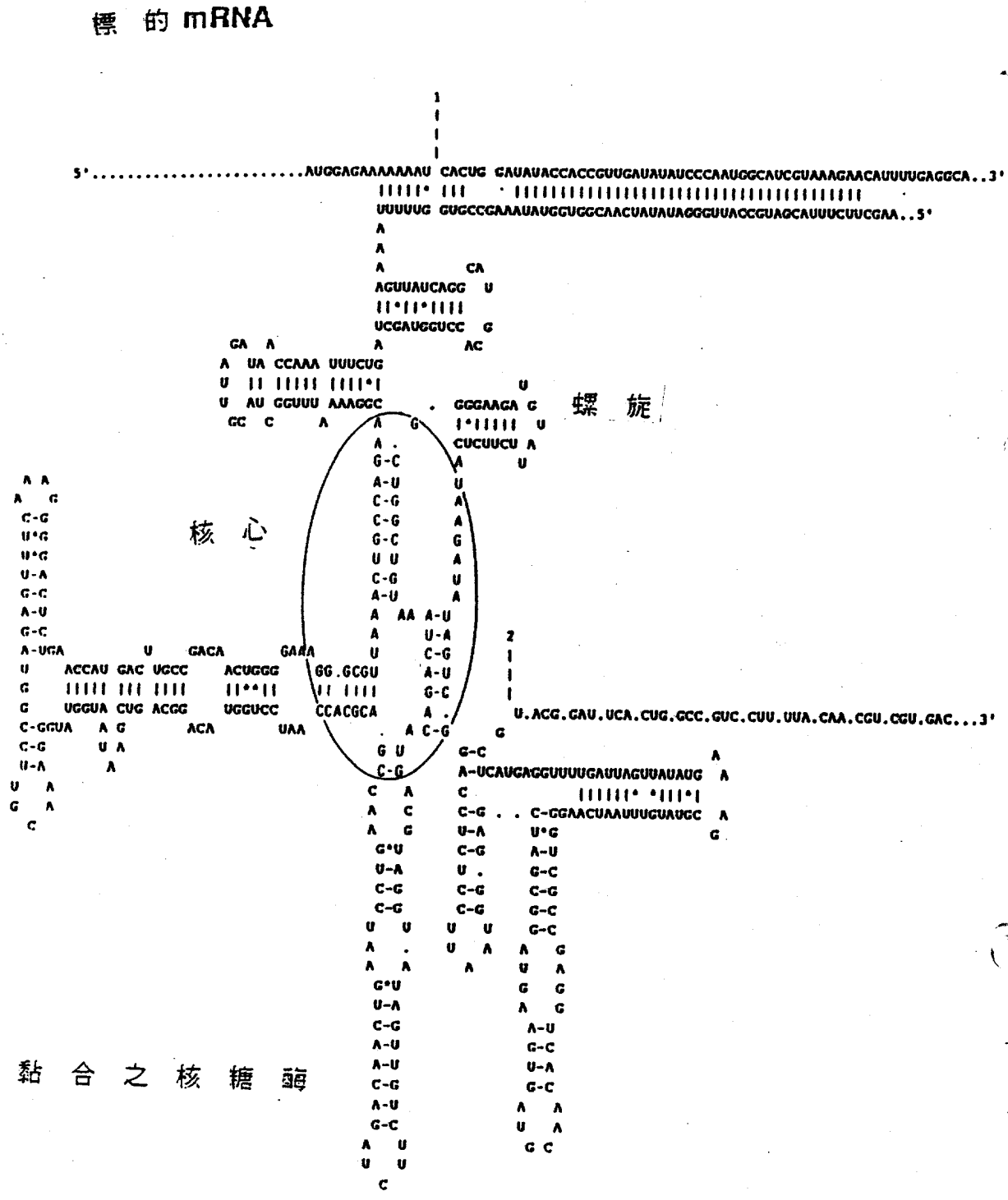
第12B圖



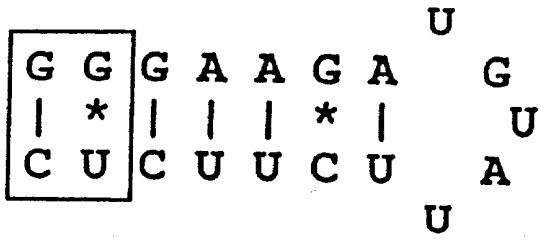
第12C圖



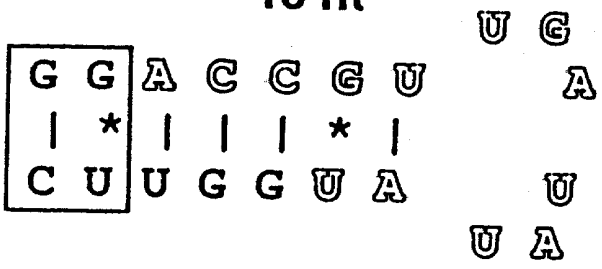
第12D圖



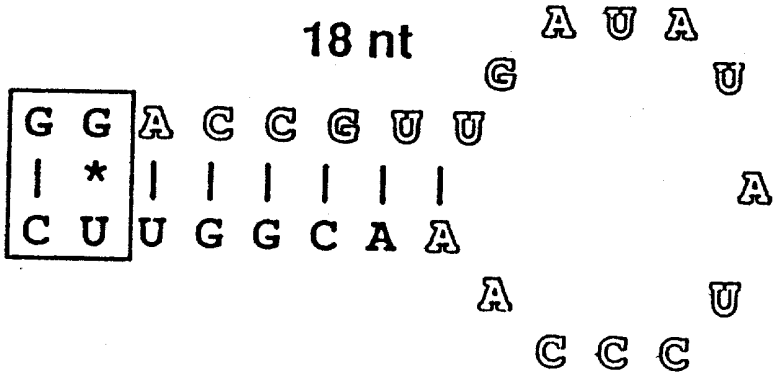
第13A圖



13 nt

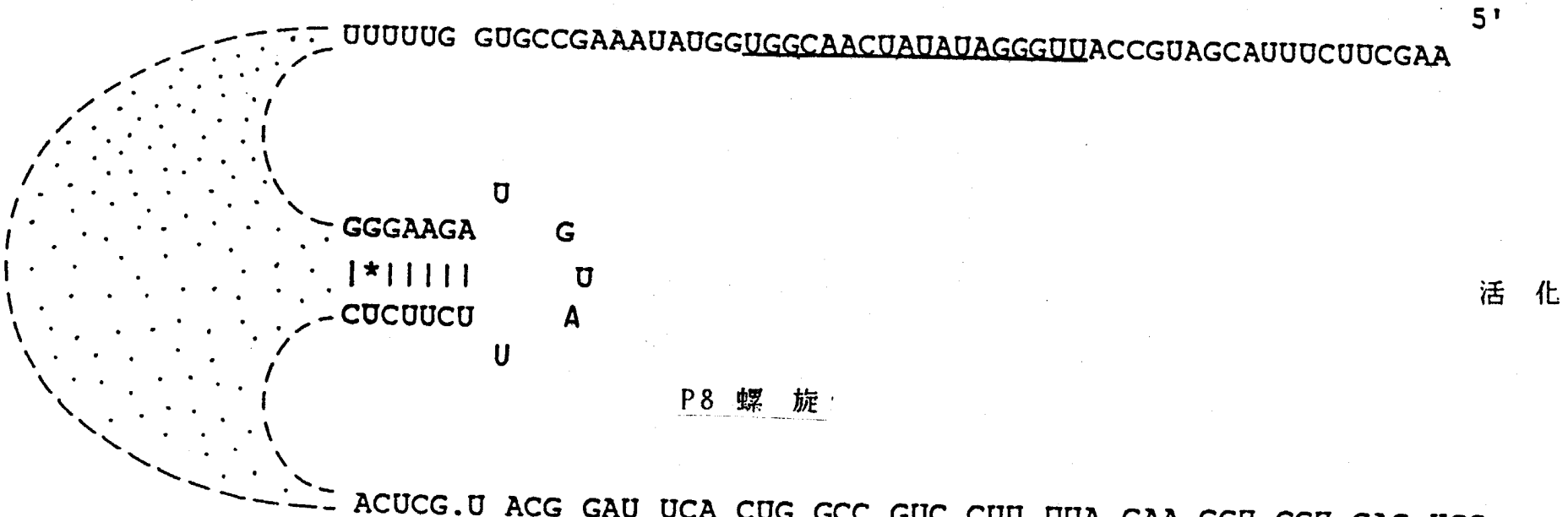


18 nt

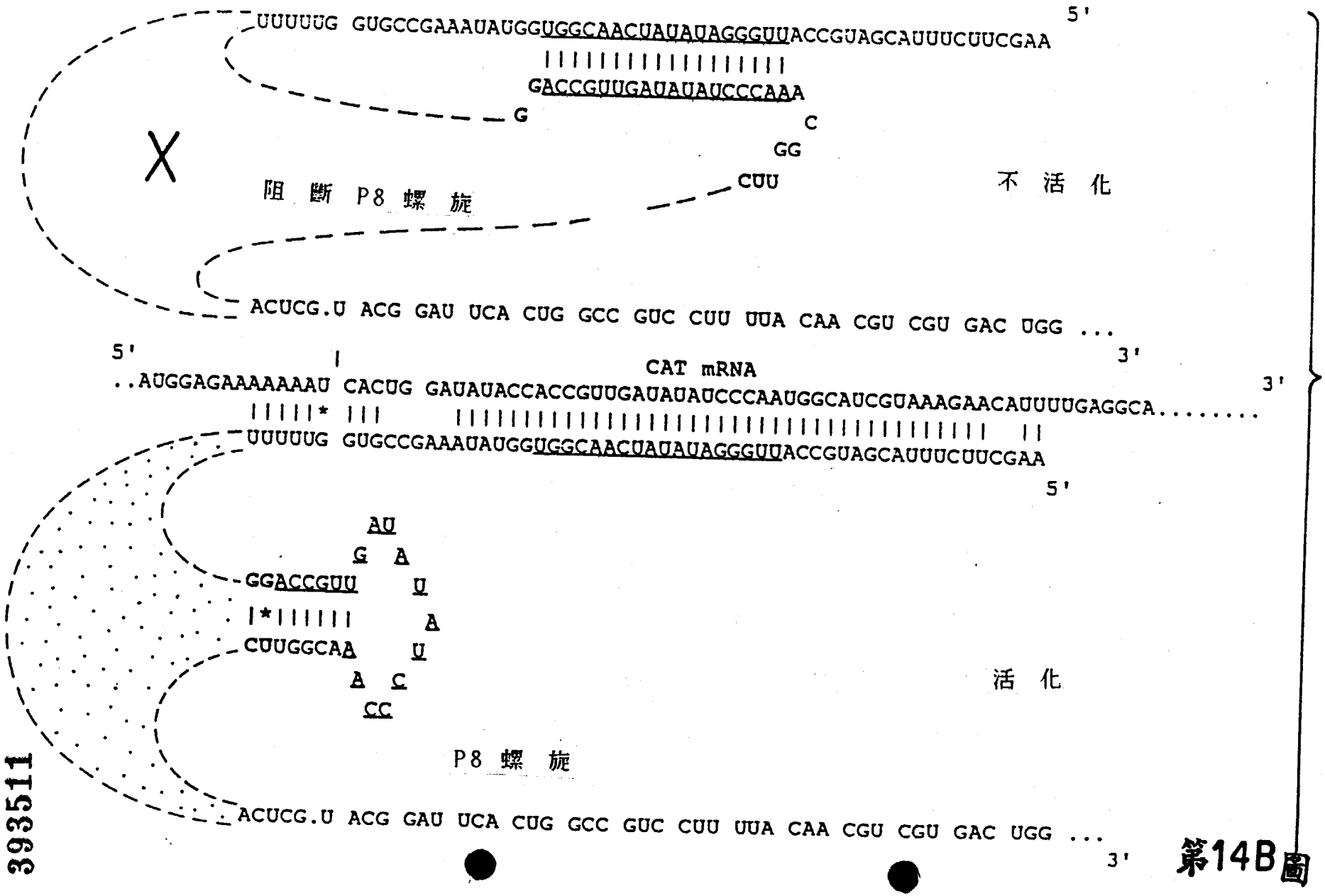


N＝互補於"反-有意義"

第13B圖

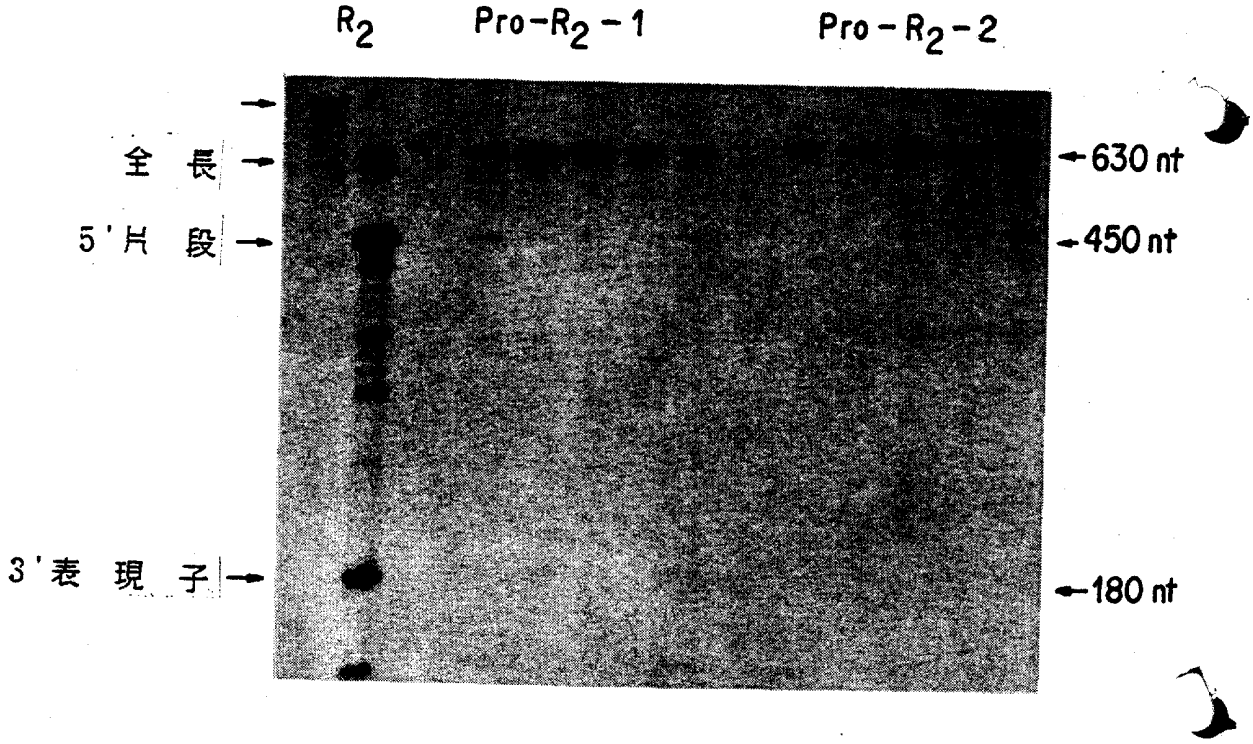

UUUUUG GUGCCGAAAUAUGGUGGCAACUAUAUAGGGUUACCGUAGCAUUUCUUCGAA
5'
U
GGGAAGA G
|*|||||| U
CUCUUCU A
U
活 化
P8 螺 旋
ACUCG.U ACG GAU UCA CUG GCC GUC CUU UUA CAA CGU CGU GAC UGG ...
3'

FIG第14A圖



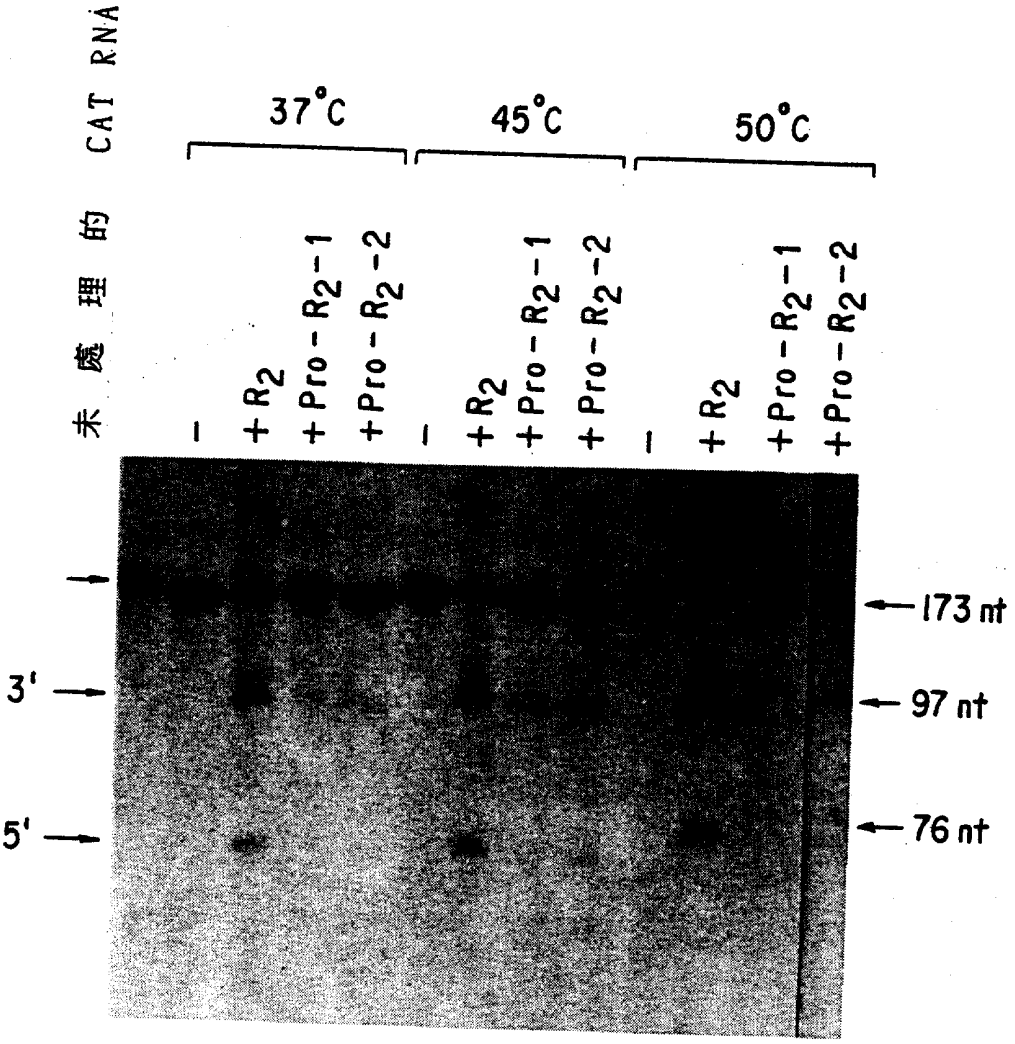
393511

第14B圖

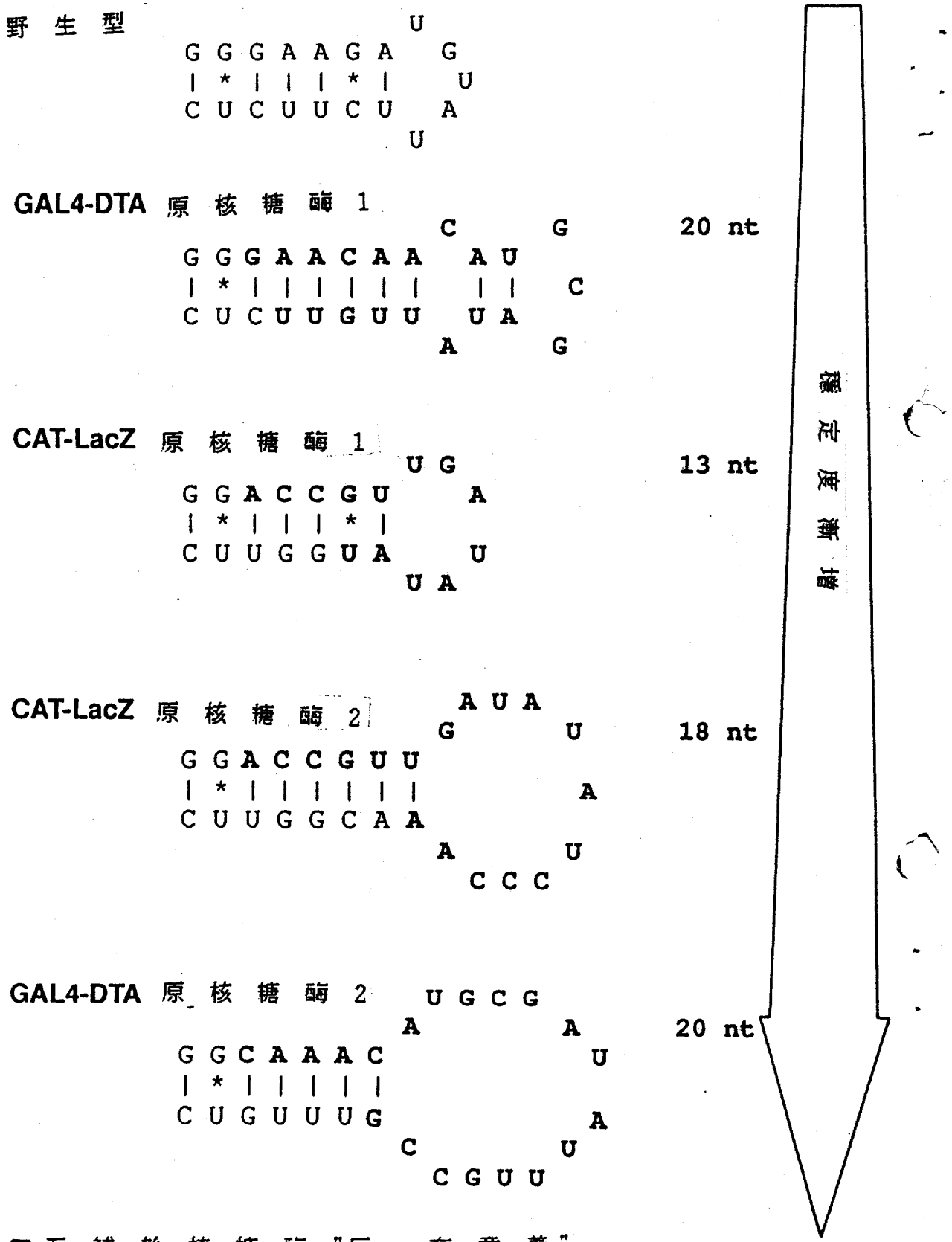


第15 圖

393511

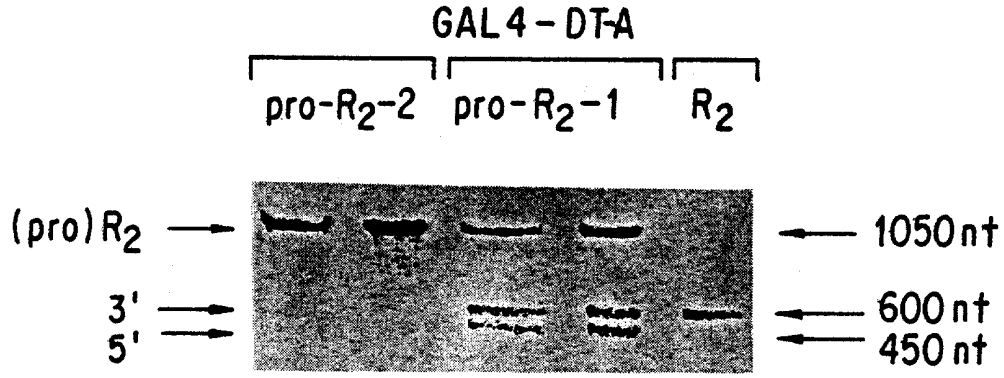

未處理的 CAT RNA
37°C
45°C
50°C
–
+R2
+Pro-R2-1
+Pro-R2-2
–
+R2
+Pro-R2-1
+Pro-R2-2
–
+R2
+Pro-R2-1
+Pro-R2-2
3'
5'
173 nt
97 nt
76 nt

第16圖



N = 互補於核糖酶"反-有意義"

第17圖



第18 圖