(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1867672 B
(45)授权公告日 2012.11.14

(21)申请号 200480030638.4

(22)申请日 2004.08.18

(30)优先权数据
294504/2003 2003.08.18 JP
427970/2003 2003.12.24 JP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.04.18

(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2004/011822 2004.08.18

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/017154 JA 2005.02.24

(73)专利权人 财团法人日本健康科学振兴财团
地址 日本东京都

(72)发明人 北条浩彦

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭文洁 邹雪梅

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
WO 2003046186 A,2003.06.05, 权利要求5-7,15,27.
李宁 钱新华.siRNA介导RNAi的研究进展.国外医学(分子生物学分册)25 2.2003,25(2),84-86页.

审查员 潘俊宇

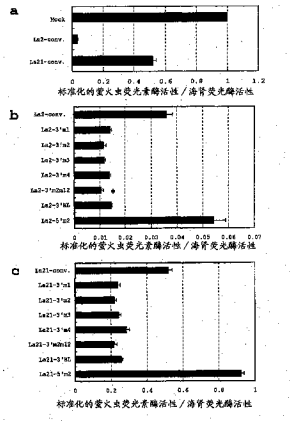
权利要求书 2 页 说明书 11 页
序列表 11 页 附图 3 页

(54)发明名称

改良的siRNA分子和应用该改良的siRNA分子的抑制基因表达的方法

(57)摘要

本发明涉及为调控siRNA对基因表达的抑制效果而对其进行改造所得的双链RNA分子。本发明的双链RNA分子是可通过RNAi抑制细胞内靶基因表达的双链RNA分子,自其双链RNA部分的正链3'末端或5'末端依次有一个以上核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。在本发明的双链RNA分子中,其双链部分的正义链中与反义链不互补的核苷酸的数目是能够使双链在上述细胞内杂交的数目。



CN 1867672 B

1. 一种可通过 RNAi 抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，其自双链部分的正义链 3’末端依次有一个以上的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸，其中所述 RNA 分子具有 29 个核苷酸或以下的链长，并且其双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸的数目是能够使双链在上述细胞内杂交的数目，其中，自双链部分的正义链 3’ 末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 1-4 个。

2. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，其中，自双链部分的正义链 3’ 末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 2 个。

3. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，其中，在双链部分的正义链 3’ 末端第 11-13 位的核苷酸中还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

4. 根据权利要求 3 所述双链 RNA 分子，其中，位于双链部分的正义链 3’末端第 12 位的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

5. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，其中，在双链部分的正义链上的下述位点的 5’或 3’侧 1-3 个核苷酸的位置还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸，所述位点对应于 RISC 对靶基因转录产物的切断位点。

6. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，其中，当正义链的双链部分由奇数个核苷酸构成时，在位于双链部分的正义链的中心的核苷酸的 5’侧第 1-3 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸；当正义链的双链部分由偶数个核苷酸构成时，在双链部分的正义链的中心 3’侧核苷酸的 5’侧第 1-3 个核苷酸位点中还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

7. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，其中，当正义链的双链部分由奇数个核苷酸构成时，在位于双链部分的正义链的中心的核苷酸的 5’侧第 2 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸；当正义链的双链部分由偶数个核苷酸构成时，在双链部分的正义链的中心 3’侧核苷酸的 5’侧第 2 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

8. 根据权利要求 1 所述双链 RNA 分子，该双链 RNA 分子在哺乳动物细胞内不诱导双链 RNA 依赖性蛋白激酶或 2’,5’- 寡聚腺苷酸合成酶。

9. 一种可通过 RNAi 抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，其自双链部分的正义链 5’末端依次有一个以上的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸，其中所述 RNA 分子具有 29 个核苷酸或以下的链长，并且其双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸的数目是能够使双链在上述细胞内杂交的数目，其中，自双链部分的正义链 5’ 末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 1-4 个。

10. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，自双链部分的正义链 5’末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 2 个。

11. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，自双链部分的正义链 3’末端依次有一个以上与反义链不互补的核苷酸。

12. 根据权利要求 11 所述双链 RNA 分子，其中，自双链部分的正义链 3’ 末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 1-4 个。

13. 根据权利要求 11 所述双链 RNA 分子，其中，自双链部分的正义链 3’ 末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 2 个。

14. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，在双链部分的正义链 3’末端第 11-13 位的核苷酸中还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

15. 根据权利要求 14 所述双链 RNA 分子，其中，位于双链部分的正义链 3’末端第 12 位的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

16. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，当正义链的双链部分由奇数个核苷酸构成时，在位于双链部分的正义链的中心的核苷酸的 5’侧第 1-3 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸；当正义链的双链部分由偶数个核苷酸构成时，在双链部分的正义链的中心 3’侧核苷酸的 5’侧第 1-3 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

17. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，当正义链的双链部分由奇数个核苷酸构成时，在位于双链部分的正义链的中心的核苷酸的 5’侧的第 2 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸；当正义链的双链部分由偶数个核苷酸构成时，在双链部分的正义链的中心 3’侧核苷酸的 5’侧第 2 个核苷酸位点还有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

18. 根据权利要求 9 所述双链 RNA 分子，其中，该双链 RNA 分子在哺乳动物细胞内不诱导双链 RNA 依赖性蛋白激酶或 2’,5’－寡聚腺苷酸合成酶。

19. 一种抑制细胞内靶基因表达的方法，其包含将权利要求 1-18 任一项所述双链 RNA 分子导入细胞的步骤。

20. 根据权利要求 19 所述方法，其中，细胞是哺乳动物细胞。

21. 一种载体，其同时含有编码权利要求 1-18 任一项所述双链 RNA 分子的正义链的 DNA 和编码所述 RNA 分子反义链的 DNA。

22. 一种抑制细胞内靶基因表达的方法，其包含将含有编码权利要求 1-18 任一项所述双链 RNA 分子的正义链的 DNA 的载体和含有编码该双链 RNA 分子的反义链的 DNA 的载体的组合，或权利要求 21 所述载体导入细胞的步骤。

23. 根据权利要求 22 所述方法，其中，细胞是哺乳动物细胞。

改良的 siRNA 分子和应用该改良的 siRNA 分子的抑制基因表达的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及 RNAi 现象引起的基因沉默，更具体而言，涉及经过改良的 siRNA 和使用其的基因表达抑制方法。

背景技术

[0002] RNAi(RNA 干扰）是由双链 RNA(dsRNA) 诱导的序列特异性基因转录后抑制机制。该现象已在苍蝇、昆虫、原生动物、脊椎动物、高等植物等多种物种观察到。有关 RNAi 在分子水平上的作用机制，根据对果蝇 (Drosophila) 和线虫 (Caenorhabditis elegans) 的多项研究表明，被称为 siRNA（短链干扰 RNA) 的 21-25 个核苷酸长的 RNA 片段是 RNAi 所必须的序列特异性中介体 (Hammond，S.M. 等人，Nature404，293-296，2000 ；Parrish，S. 等人，Mol.Cell.6，1077-1087，2000 ；Zamore，P.D. 等人，Cell 101，25-33，2000)，并且该 siRNA 是由长的双链 RNA 在 RNase III 样核酸酶 Dicer 的作用下生成 (Brenstein，E. 等人，Nature 409，363-366，2001 ；Elbashir，S.M. 等人，Genes Dev.15，188-200，2001)。

[0003] 起初认为，对于哺乳动物而言，RNAi 现象仅存在于卵母细胞和着床前的胚。哺乳动物细胞一般具有作为序列非特异性 RNase 的 Rnase L 介导的快速且非特异性 RNA 分解途径、干扰素诱导的双链 RNA 依赖性蛋白激酶 (PKR) 介导的快速翻译阻断途径，这些都是由 30 个核苷酸以上的双链 RNA 激活。因而，在除未分化细胞和 PKR 缺失的分化细胞以外的哺乳动物细胞中，常常存在序列特异性 RNAi 活性因上述对 30 个核苷酸以上的双链 RNA 的应答而被掩盖的现象。最近，据报道，合成的具有 21 个核苷酸的 siRNA 的二聚体可在哺乳动物细胞培养基中特异性阻断内源性基因的表达 (Elbashir，S.M. 等人，Nature 411，494-498，2001)。

[0004] RNAi 介导的基因表达抑制的原理一般认为如下。首先，当 siRNA 被导入细胞时，其和多蛋白复合体结合，形成 RISC(RNA 诱导型沉默复合体）。接着，该 RISC 结合于靶基因的 mRNA，再在其核酸酶的作用下，切断 mRNA 中与 siRNA 结合的部分。由此，靶基因的蛋白质表达被阻断。

[0005] 最近，利用将合成的 siRNA 导入细胞产生的 RNAi 现象的方法，作为基因表达的抑制方法，被广泛关注和应用。siRNA 的构成和基因表达抑制效果之间的关系也作为研究的对象。

[0006] 例如，Hohjoh H. 在报告 (Hohjoh H.，FEBS Letters 521，195-199，2002) 中，针对对应于萤火虫荧光素酶 (Photinus luciferase) 基因的各种双链寡核苷酸，研究了它们对该基因在哺乳动物细胞中的表达抑制效果。据该报告所记载 ：正义链和反义链 3’末端的 2 个核糖核苷酸突出端，反义链的结构很重要，并且，基因表达的抑制效果会因对象基因的靶序列的不同而有所差异。

[0007] Hamada M. 等人的报告 (Hamada M. 等人，Antisense Nucleic AcidDrug Dev.12，301-309，2002) 中，采用在正义链和 / 或反义链各自 3’末端以外的部分中一个以上不连续

位点引入了与靶序列错配的核苷酸的siRNA，研究其对靶基因的表达抑制效果。据该报告记载，基因表达抑制效果因反义链中存在的与靶序列的错配而降低，然而另一方面，正义链中的错配对基因表达抑制效果没有影响。

发明内容

[0008] 本发明人发现，针对 siRNA，通过在其正义链的双链部分的 3’末端的几个核苷酸位点，导入与反义链的错配，该 siRNA 对基因表达抑制效果得到增强。进而，本发明人发现，siRNA 中通过在其正义链的双链部分的 5’末端的几个核苷酸位点，导入与反义链的错配，该 siRNA 的基因表达抑制效果被降低。本发明是基于这些发现而完成的。

[0009] 因而，本发明的目的在于，提供为调控 siRNA 对基因表达的抑制效果而对其改良所得的双链 RNA 分子，以及使用该改良后的 siRNA 的基因表达抑制方法。

[0010] 根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子是能够通过 RNAi 作用抑制细胞内靶基因的表达的双链 RNA 分子，其双链部分中正义链的 3’末端依次有 1 个以上的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸，且其双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸的数目是能够使双链在上述细胞内杂交的数目。

[0011] 进而，根据本发明的第二个方面的双链 RNA 分子是能够通过 RNAi 作用抑制细胞内靶基因的表达的双链 RNA 分子，其该双链部分的正义链的 5’末端依次有 1 个以上的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸，且该双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸的数目是能够使双链在上述细胞内杂交的数目。

[0012] 进而，本发明的基因表达抑制方法是包含将本发明的双链 RNA 分子导入细胞的步骤的抑制细胞内靶基因的表达的方法。

[0013] 在利用 RNAi 现象抑制靶基因表达的方法中，基于本发明，可实现对靶基因表达抑制效率的调控。

附图说明

[0014] 图 1 表示的是各种 siRNA 对 HeLa 细胞中的萤火虫荧光素酶基因的表达的抑制效果的双荧光素酶基因检测结果的示意图。

[0015] 图 2 是各种 siRNA 基因对 HeLa 细胞内的内源性基因的表达抑制效果的示意图。

[0016] 图 3 是在正义链 3’末端含有错配的 siRNA 分子 (La21-3’m2) 和不含错配的 siRNA 分子 (La21-conv.) 对两种质粒的报告基因的表达水平的影响的棒状示意图。

具体实施方式

[0017] 本说明书中，“双链 RNA”指的是两条单 RNA 分子全部或部分杂交所得的 RNA 分子。构成各单链 RNA 的核苷酸数目可以不同。此外，构成双链 RNA 的一条或者两条核苷酸链也可包含单链部分（突出端）。

[0018] 本说明书中，“双链部分”指的是，在双链 RNA 中，两条链中核苷酸配对的部分，即，除双链 RNA 的单链部分以外的部分。

[0019] 本说明书中，“正义链”指的是，具有和基因编码链相同的序列的核苷酸链，“反义链”指的是，具有与基因编码链互补的序列的核苷酸链。

[0020] 本说明书中，“互补”指的是，两个核苷酸在杂交条件下能够配对，例如，腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T) 或尿嘧啶 (U) 之间的关系，以及胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 之间的关系。

[0021] 能够通过 RNAi 抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，本领域的技术人员可基于有关 RNAi 的现有知识很容易地设计。一般来说，首先，在靶基因中选择其基因特异性区域，将在细胞内能够和该区域特异性杂交的核糖核苷酸链作为上述双链 RNA 分子的反义链。此处，“特异性区域”指的是，在能够实施靶基因的表达抑制的细胞内，具有其它核酸分子所不具有的序列的区域。此外，“能够特异性杂交”指的是，该反义链在能够实施靶基因的表达抑制的细胞内，和除靶基因及其转录产物以外的核酸分子不能杂交。上述反义链含有与上述特异性区域相对应的序列，但并不需要具有上述特异性区域的完全互补序列，只要是能够和该特异性区域特异性杂交，即使含有非互补核苷酸也可以。然而，上述反义链优选具有完全互补序列。双链 RNA 分子的正义链含有与反义链完全互补的序列。

[0022] 从靶基因中选出的上述特异区域，优选仅选自靶基因的外显子。此外，上述特异性区域一般优选选自除 5’末端和 3’末端非翻译区 (UTR) 和翻译起始密码子周围以外的部分，例如，在包含外显子和内含子两者的序列中，优选距离翻译起始密码子 3’侧 50 个核苷酸以上的区域，更优选距翻译起始密码子 3’侧 75 个核苷酸以上的区域，尤其优选距离 100 个核苷酸以上的区域。上述特异性区域的长度没有特殊限制，但优选是 15 个核苷酸以上，更优选是 17 个核苷酸以上，进而优选是 19 个核苷酸以上，尤其优选是 19-23 个核苷酸，更加优选是 19-21 个核苷酸。

[0023] 上述双链 RNA 分子的反义链，可以在与正义链的核苷酸互补配对而成的双链部分的 3’ 末端侧含有单链部分（突出端）。该单链部分的核苷酸序列，可以是靶基因的关联序列，也可以是与靶基因不相关的序列，其长度也没有特殊限制，优选 2 个核苷酸长度的序列，更优选是 2 个尿残基 (UU)。正义链也可以具有类似突出端。

[0024] 根据本发明第一个方面的双链 RNA 分子是在上述那样的双链 RNA 分子中，其自双链部分中的正义链 3’末端依次有 1 个以上核苷酸是与反义链不互补的核苷酸的双链 RNA 分子。即，根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子的正义链在自其双链部分的 3’末端依次有 1 个以上与反义链错配的核苷酸。由此，靶基因的表达抑制效果得到增强。但是，由于该正义链和反义链须在细胞内保持双链状态，因而错配的核苷酸数目取决于为保持双链状态所必需的与反义链互补的核苷酸数目。因而，在根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子中，其双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸数是可在细胞内进行双链杂交的数目。

[0025] 双链核糖核苷酸链在细胞内杂交与否，本领域技术人员能够很容易研究。例如，可以将目的细胞内的杂交条件在体外 (in vitro) 再现，在其中添加两条核糖核苷酸链，观察它们是否杂交。

[0026] 根据本发明的优选实施方式，在根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子中，自双链部分的正义链的 3’末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目为 1-4 个，更优选为 2 个。

[0027] 为更好地抑制细胞内靶基因的表达，除上述正义链的 3’ 末端的错配外，在位于其 3’ 末端的第 11-13 个核苷酸位点再引入一个核苷酸错配是有好处的。因而，基于本发明的优选实施方式，根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子优选在位于双链部分的正义链 3’ 末端第 11-13 位，更加优选第 12 位有一个核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。

[0028] 经应用下述 DNA 分子的实验数据证实，在双链部分的正义链的 3’末端第 11-13 位

有一个错配核苷酸的双链 RNA 分子在增强基因表达抑制效果方面是有利的，上述实验使用的双链 RNA 分子是在 19-20 个核苷酸长度的正义链的 3’末端的 2 个核苷酸位点以及其 3’末端起的第 12 位核苷酸引入错配的 RNA 分子。于是，该错配位点邻近 RISC 对靶基因转录产物的切断位点。因而，在根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子中，除正义链的双链部分 3’末端的错配外，也可以在正义链上其它特定位点的 5’侧或 3’侧第 1-3 个核苷酸位点处导入其它的错配，上述特定位点指的是对应于 RISC 对靶基因转录产物的切断位点的位点。RISC 对靶基因转录产物的切断位点，依据双链 RNA 分子中所含的靶基因特异性区域的序列，本领域技术人员能够很容易地确定，其典型地位于前述特异性区域的中心部分。

[0029] 根据本发明的优选实施方式，在根据本发明的第一个方面的双链 RNA 分子中，除正义链的双链部分 3’末端的错配外引入的其它错配，当正义链的双链部分由奇数个核苷酸构成时，在位于中心的核苷酸 5’侧第 1-3 个核苷酸的位置，优选第 2 个核苷酸处引入；当正义链的双链部分由偶数个核苷酸构成时，其在中心 3’侧核苷酸的 5’侧的第 1-3 个核苷酸，优选第 2 个核苷酸处引入。

[0030] 根据本发明第二个方面的双链 RNA 分子是通过 RNAi 作用能够抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，自其双链部分的正义链的 5’末端依次有一个以上的核苷酸是与反义链不互补的核苷酸。即，根据本发明第二个方面的双链 RNA 分子的正义链，自其双链部分的 5’末端依次有一个以上与反义链的错配。由此，靶基因表达的抑制效果被降低。然而，由于需保持该正义链和反义链在细胞内的双链状态，因而错配的核苷酸数取决于保持双链状态所必需的与反义链互补的核苷酸数。因此，在根据本发明的第二个方面的双链 RNA 分子中，其双链部分的正义链中与反义链互补的核苷酸数是可在细胞内进行双链杂交反应的数目。

[0031] 根据本发明的优选实施方式，在根据本发明的第二个方面的双链 RNA 分子中，自双链部分的正义链的 5’末端依次与反义链不互补的核苷酸的数目优选为 1-4 个，更优选为 2 个。

[0032] 根据本发明的第二个方面的双链 RNA 分子，也可含有根据第一个方面的双链 RNA 分子的正义链上的一部分或全部错配。由此，可对靶基因的表达抑制效果进行更为精细的调控。

[0033] 已经知道，当在哺乳动物细胞内导入长的双链 RNA 分子时，双链 RNA 依赖性蛋白酶、2’,5’－寡聚腺苷酸合成酶被诱导，进而和细胞死亡相关。因而，根据本发明的双链 RNA 分子，优选为在哺乳动物细胞内不诱导双链 RNA 依赖性蛋白酶和 2’,5’－寡聚腺苷酸合成酶的双链 RNA 分子。满足该条件的双链 RNA 分子的链长，对本领域技术人员而言，是很容易知道的。已知上述细胞死亡一般是由 30 个核苷酸以上的双链 RNA 分子引起的，因而，由本发明的双链 RNA 分子优选具有 29 个或以下，更优选 25 个或以下核苷酸链长的 RNA 分子。此处使用的“链长”指的是不仅包括双链 RNA 分子的双链部分，还包括单链部分在内的核苷酸长。

[0034] 本发明的双链 RNA 分子，是能够依据 RNAi 作用调控基因表达的抑制效果的分子，这可由本说明书记载的实验数据得到验证。根据这些实验数据证实，siRNA 中，当在正义链 3’末端引入错配时，RNAi 的基因表达抑制效果得到增强，反过来当在 5’末端引入错配时，其效果被减弱。因此，这样的基因表达抑制效果的调控是通过调控 siRNA 整合入 RNA 诱导型沉默复合体 (RISC) 时的方向性来实现的。即，当引入到 siRNA 的任意末端的错配将该端

部的杂交解除时，siRNA 就从该端部开始整合到 RISC 中，此时，构成 siRNA 的两条链中，从 5’末端整合的链就作为 RNAi 的中介体（真正的反义链）发挥作用。因而，在针对作为表达抑制对象的靶基因设计的 siRNA 中，通过对该 siRNA 进行改造使得从其反义链 5’末端整合入 RISC，能够增强靶基因的表达抑制效果，另一方面，通过对该 siRNA 进行改造使得从其正义链 5’末端整合入 RISC，能够降低靶基因的表达抑制效果。

[0035] 因而，根据本发明，提供通过 RNAi 作用能够抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，所述 RNA 分子经改造使其从反义链 5’末端侧整合到 RNA 诱导型沉默复合体中。这种改造的具体例子与上述针对根据本发明的第一个方面的 RNA 分子所述一致。通过这种改造，靶基因的表达抑制效果得到增强。

[0036] 进而，根据本发明，提供通过 RNAi 作用能够抑制细胞内靶基因表达的双链 RNA 分子，所述 RNA 分子经改造使其从正义链 5’末端侧整合到 RNA 诱导型沉默复合体中。这种改造的具体例子与上述针对根据本发明的第二个方面的 RNA 分子所述一致。通过这种改造，靶基因的表达抑制效果被减弱。

[0037] 根据本发明的双链 RNA 分子，可在细胞内抑制靶基因的表达。因而，根据本发明，提供包含将本发明的双链 RNA 分子导入细胞内的步骤的抑制细胞内靶基因表达的方法。

[0038] 细胞只要是可通过 siRNA 诱导的 RNAi 现象的细胞就可以，例如可以举出来自于昆虫、线虫、植物、哺乳动物等的细胞，优选哺乳动物细胞。作为植物来源的细胞，例如可以举出，西红柿、烟草、拟南芥 (Arabidopsis thaliana)、稻等植物来源的细胞。作为动物来源的细胞，例如可举出，HeLa 细胞、NIH/3T3 细胞、COS-7 细胞、293 细胞等。

[0039] 将本发明的双链 RNA 分子导入细胞的方法，只要是能将双链 RNA 分子导入细胞中的方法就可以，没有特殊限制。在根据本发明的方法中，尤其优选的将双链 RNA 分子向细胞内导入的方法是，使用脂质体，优选阳离子脂质体的转染法，可使用 Lipofectamine2000 转染试剂 (Invitrogen 公司生产）、Oligofectamin 转染试剂 (Invitrogen 公司生产）、jetSI 转染试剂 (Polyplus-transfection 公司生产）、TransMessenger(Qiagen 公司生产）等市售转染试剂，容易地进行。

[0040] 或者，在利用本发明的双链 RNA 分子抑制靶基因表达时，也可通过将在细胞中表达本发明的双链 RNA 分子的载体导入目的细胞中来实施。在该方法中，可以使用分别表达本发明的双链 RNA 分子的正义链和反义链的 2 种载体，也可使用同时含有编码本发明的双链 RNA 分子的正义链和反义链的 DNA 的载体。因而，根据本发明的其它实施方式，提供抑制细胞内靶基因表达的方法，该方法包括将含有下述 DNA 的载体导入细胞的步骤，所述载体是含有编码本发明的双链 RNA 分子的正义链的 DNA 的载体和含有编码本发明双链 RNA 分子的反义链的 DNA 的载体的混合物，或者是同时含有编码本发明的双链 RNA 分子的正义链和反义链的 DNA 的载体。

[0041] 上述载体只要能够在细胞内表达本发明的双链 RNA 分子的一条链或两条链就可以。因而，上述载体中编码双链 RNA 分子的链的 DNA 是以该 DNA 能够在细胞内进行转录的形式存在。这种载体，本领域的技术人员很容易就能构建，例如，根据需要，可将启动子、终止子等要素以能够发挥作用的形式进行连接。作为启动子，只要是能够在目的细胞内发挥作用即可，例如可使用组成型启动子、诱导型启动子等。此外，也可使用和控制靶基因表达的启动子一样的启动子。由此，在靶基因的转录产物生成的同时，可产生用于分解该转录产

物的本发明的 RNA 分子。本领域技术人员根据本领域已知方法，就能够很好地将构建的载体导入目的细胞中。

[0042] 尤其优选使用一种能够表达本发明的双链 RNA 分子的两条链的载体。这种载体可以是分别表达双链 RNA 分子的两条链的载体，也可以是表达两条链通过连接序列连接的发夹型双链 RNA 的载体。将本发明的双链 RNA 分子以发夹型双链 RNA 的形式表达的载体，对于本领域技术人员而言，是能够适当构建的，例如可依据文献记载 (Bass，B.L.，Cell 101，235-238，2000 ；Tavernarakis，N. 等人，Nat.Genet.24，180-183，2000 ；Malagon，F. 等人，Mol.Gen.Genet.259，639-644，1998 ；Parrish，S. 等人，Mol.Cell 6，1077-1087，2000)。

[0043] 本发明的双链 RNA 分子，以及利用所述双链 RNA 分子的基因表达抑制方法，可将各种基因作为靶标，例如，可将在细胞内的功能有待解析的基因作为靶标。此外，通过将癌基因、病毒基因等作为表达抑制的靶基因，可阐明这些基因的功能，进而，通过抑制这些基因在生物活体内存活细胞中的表达，也有可能治疗疾病或紊乱。

[0044] 实施例

[0045] 例 1 ：各种 siRNA 在 HeLa 细胞中对萤火虫荧光素酶基因表达的抑制作用

[0046] 设计针对萤火虫荧光素酶基因的常规的 siRNA，和在正义链多个位点引入了与反义链的错配的 siRNA，考察它们对萤火虫荧光素酶基因的表达抑制效果。

[0047] 设计的各种 siRNA 的核苷酸序列示于下表 1。表 1 中，以各 siRNA 的正义链在上，反义链在下进行排列，互补核苷酸在双链间用星号“ * ”表示。此外，就各 siRNA 的名称而言，“La2”和“La21”表示萤火虫荧光素酶基因中的靶序列，根据该基因导入细胞时使用的表达载体 pGL3-control(Promega 公司生产) 的编号体系，“La2”是以第 282-300 个核苷酸为靶标的序列，“La21”是以第 340-358 个核苷酸为靶标的序列。此外，“conv.”表示基于常规设计标准设计的 siRNA，因而，它不含错配。“3’ BL”表示其 siRNA 的正义链的 3’ 末端不含突出部分 (突出端)。

[0048] 表 1 ：针对萤火虫荧光素酶基因设计的 siRNA

[0049]

名称	序列	序列号
	5GGAAGACGCCAAAAACAUAUU3′	1
La2-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU 5′	2
	5GGAAGACGCCAAAAACAUU 3′	3
La2-3′ m1	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU 5′	2
	5GGAAGACGCCAAAAACAAU 3′	4
La2-3′ m2	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU 5′	2
	s GGAAGACGCCAAAAACUAU3′	5
La2-3′ m3	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU 5′	2
	5GGAAGACGCCAAAAAUUAU3′	6
La2-3′ m4	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU 5′	2
	5UUAAGACGCCAAAAACAUAUU3′	7
La2-5′ m2	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUOUUGUAU 5′	2
	5GGAAGACUCCAAAAACAAU3′	8
La2-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUUUUGUAU5′	2
	5GGAAGACGCCAAAAACAUA3′	28
La2-3′ BL	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUCCUUCUGCGGUUDUUGUAU5′	2
	5ACCGCUGGAGAGCAACUGCUU 3′	9
La21-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG 5′	10
	5ACCGCUGGAGAGCAACUGU3′	1
La21-3′ m1	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG5′	10
	s ACCGCUGGAGAGCAACUUU3′	12
La21-3′ m2	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG 5′	10
	s ACCGCUGGAGAGCAACAUU 3′	13
La21-3′ m3	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG 5′	10
	5ACCGCUGGAGAGCAAUAUU 3′	14
La21-3′ m4	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG 5′	10
	5UACGCUGGAGA6CAACUGCUU 3′	29
La21-5′ m2	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG 5′	10
	5ACCGCUGUAGAGCAACUUU3′	15
La21-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊ ＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG s′	10
	5ACCGCUGGAGAGCAACUGC 3′	30
La21-3′ BL	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3UUUGGCGACCUCUCGUUGACG5′	10

[0050] 合成上述各寡核糖核苷酸对，分别添加到退火缓冲液（30mMHEPES，pH7.0，100mM醋酸钾，和10mM醋酸镁）中，终浓度为20μM，90℃、3分钟热变性后，37℃退火一天一夜。由此，得到各siRNA。

[0051] HeLa 细胞，在补充有 10％胎牛血清 (Life Technologies 公司生产)、100U/ml 青霉素 (Life Technologies 公司生产) 和 100μg/ml 链霉素 (LifeTechnologies 公司生产) 的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基 (Sigma 公司生产) 中，于 37℃、5％ CO_2 环境中增殖。

[0052] 转染前一天，以胰蛋白酶处理增殖后的 HeLa 细胞，再用不含抗生素的新鲜培养基稀释，接种于 24 孔培养板 (0.5ml 培养基中约有 0.5×105 个细胞 / 孔)。接着，以 0.5ml OPT-MEMI(Life Technologies 公司生产) 替换培养基，并在各孔中添加 0.25μg 表达萤火虫荧光素酶的 pGL3-control 质粒 (Promega 公司生产)、表达海肾萤光素酶 (Renillaluciferase) 的对照用 phRL-TK 质粒 (Promega 公司生产)0.05μg、以及 0.24μg 各 siRNA。采用 Lipofectamine2000 转染试剂 (Invitrogen 公司生产) 进行 2 种报告质粒和各 siRNA 的共转染。

[0053] 然后，将细胞于 37℃孵育 4 小时，再添加不含抗生素的新鲜培养基 0.5ml，再于 37℃孵育。转染 24 小时后配制细胞裂解物，以 Dual-Luciferase 报告分析系统 (Promega 公司生产) 进行荧光酶表达分析。

[0054] 图 1 表示双荧光酶测试结果。图 1 显示了使用各 siRNA 时，靶 (萤火虫) 荧光酶活性与对照 (海肾) 荧光酶活性的比。该双荧光酶活性比，以使用不引起基因表达抑制的双链 RNA(Mock)(Qiagen 公司生产) 的对照样品时得到的比值为 1.0，进行标准化。各数据是至少 4 次独立实验的平均值，各数据所带的误差棒表示标准差。

[0055] 根据图 1a 表明，La2-conv. 表现出非常强的基因表达抑制作用，约为 98％；而 La21-conv. 表现出的基因表达抑制作用为中等程度，约为 50％。该 La2-conv. 和 La21-conv. 之间的基因表达抑制效果的差异被认为是因萤火虫荧光素酶基因中的靶序列上的差异所致。

[0056] 图 1b 表示的是使用各种 siRNA，以萤火虫荧光素酶基因中的 La2 为靶标时的基因表达抑制效果。将 La2-conv. 和 La2-3' m1、La2-3' m2、La2-3' m3 以及 La2-3' m4 比较后表明，通过在 siRNA 的正义链 3' 末端引入 1-4 个核苷酸错配，其对靶基因的表达抑制效果达到 2-3 倍。其中，在正义链 3' 末端有 2 个核苷酸错配的 siRNA 表现出很强的基因表达抑制，而除正义链 3' 末端的 2 个核苷酸错配外，还在正义链 3' 末端第 12 位核苷酸位点有错配的 siRNA(La2-3' m2m12) 表现出更为强的基因表达抑制效果。与此相反，在正义链 5' 末端具有 2 个核苷酸错配的 siRNA(La2-5' m2) 表现出比常规 siRNA(La2-conv.) 还要弱的基因表达抑制效果，这表明，在 siRNA 正义链 5' 末端引入错配会降低该 siRNA 对基因表达的抑制效果。

[0057] 图 1c 表示的是使用各种 siRNA，以萤火虫荧光素酶基因中的 La21 为靶标时的基因表达抑制效果。将 La21-conv. 和 La21-3' m1、La21-3' m2、La21-3' m3 以及 La21-3' m4 比较后表明，通过在 siRNA 的正义链 3' 末端引入 1-4 个核苷酸错配，其对靶基因的表达抑制效果达到 2-3 倍。其中，在正义链 3' 末端有 2 个核苷酸错配的 siRNA 表现出很强的基因表达抑制效果。除正义链 3' 末端的 2 个核苷酸错配外，还在正义链 3' 末端第 12 位核苷酸位点有错配的 siRNA(La21-3' m2m12) 表现出更强的基因表达抑制效果。与此相反，在正义链 5' 末端具有 2 个核苷酸错配的 siRNA(La21-5' m2) 表现出比常规 siRNA(La21-conv.) 还要弱的基因表达抑制效果，这表明，在 siRNA 正义链 5' 末端引入错配会降低该 siRNA 对基因表达的抑制效果。这些结果和上述使用以 La2 为靶标的各种 siRNA 的情况一致，因而表明，

通过在 siRNA 的正义链的 3’末端引入错配，和进而在 3’末端第 12 位核苷酸引入错配所产生的基因表达抑制增强的效果并非依赖于基因中的靶序列位置、靶序列的核苷酸序列、针对该靶序列设计的不含错配的常规 siRNA 所产生的基因表达抑制效率等。

[0058] 例 2：各种 siRNA 对 HeLa 细胞中的 LaminA/C 基因和 Dnmt1 基因的表达抑制作用

[0059] 分别针对 HeLa 细胞内表达的内源性 LaminA/C 基因和 Dnmt1 基因，设计对应于这些基因的常规的 siRNA，和在正义链的各处引入了与反义链的错配的 siRNA，考察这些 siRNA 对上述基因的表达抑制效果。

[0060] 设计的各种 siRNA 的核苷酸序列示于表 2。表 2 中，以各 siRNA 的正义链在上，反义链在下进行排列，互补核苷酸在双链间用星号“*”表示。此外，就各 siRNA 的名称而言，“Lam”和“Dn1”分别表示靶基因，即，LaminA/C 基因和 Dnmt1 基因。根据以各基因的 mRNA 序列中翻译起始密码子的“A”为 1 的编号体系，“Lam”表示以 LaminA/C 基因的 mRNA 中的第 829-851 个核苷酸为靶标的基因，“Dn1(#1)”表示 Dnmt1 基因的 mRNA 中的第 70-89 个核苷酸为靶标的基因，“Dn1(#2)”表示 Dnmt1 基因的 mRNA 中的第 185-203 个核苷酸为靶标的基因。进而，“Nat.Lam”表示以 LaminA/C 基因为靶标的 siRNA，其靶序列在文献中有记载(Elbrashir,S.M. 等人,Nature 411:494-498,2001)。此外，“conv.”表示基于常规设计基准设计的 siRNA，因而，它不含错配。

[0061] 表 2：针对 LaminA/C 基因和 Dnmt1 基因设计的 siRNA。

[0062]

名称	序列	序列号
	5 UGCUGAGAGGAACAGCAACCU 3′	16
Lam-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3 AGACGACUCUCCUUGUCGUUG 5′	17
	5 UGCUGAGUGGAACAGCAUU3′	18
Lam-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3 AGACGACUCUCCUUGUCGUUG 5′	17
	5 CUGGACUUCCAGAAGAACAUU 3′	19
Nat.Lam-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3 UUGACCUGAAGGUCUUCUUGU 5′	20
	5 CUGGACUACCAGAAGAAUU3′	21
Nat.Lam-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3 UUGACCUGAAGGUCUUCUUGU 5′	20
	5 GUCCGCAGGCGGCUCAAAGAUU3′	22
Dn1(#1)-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	3′ UUCAGGCGUCCGCCGAGUUUCU 5′	23
	5 GUCCGCAGUCGGCUCAAAUU	24
Dn1(#1)-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	UUCAGGCGUCCGCCGAGUUUCU5′	23
	5 GUGACUUGGAAACCAAAUUUU	25
Dn1(#2)-conv.	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	UUCACUGAACCUUUGGUUUAA 5′	26
	5 GUGACUUUGAAACCAAAAA	27
Dn1(#2)-3′ m2m12	＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊	
	UUCACUGAACCUUUGGUUUAA 5′	26

[0063] 合成上述各寡核糖核苷酸对，分别添加到退火缓冲液（30mMHEPES，pH7.0，100mM醋酸钾，和10mM醋酸镁）中，终浓度为20μM，90℃、3分钟热变性后，37℃退火一天一夜。由此，得到各siRNA。

[0064] HeLa细胞，在补充有10％胎牛血清（Life Technologies公司生产）、100U/ml青霉素（Life Technologies公司生产）和100μg/ml链霉素（LifeTechnologies公司生产）的Dulbecco’s改良Eagle’s培养基（Sigma公司生产）中，于37℃、5％ CO_2 环境中增殖。

[0065] 以各种siRNA(100nM)转染HeLa细胞时，使用的是jetSI转染试剂(Polyplus-transfection公司生产)。

[0066] 转染48小时后分离出总RNA，用逆转录酶合成cDNA。以该cDNA为模板，通过实时PCR，测定靶基因的表达水平。采用SYBR green PCR试剂盒（Molecular Probe公司生产）对这一系列表达水平进行测定。

[0067] 图2表示的是各种siRNA对HeLa细胞中的内源性基因的表达抑制效果。图2显示了使用各siRNA时，靶基因（LaminA/C基因或Dnmt1基因）的表达水平与对照基因（G3PDH基因）的表达水平的比。该表达水平的比，以使用不引起基因表达抑制的双链RNA(Mock)(Qiagen公司生产）的对照样品时得到的比值为1.0，进行标准化。各数据是至少4次独立实验的平均值，各数据所带的误差棒表示标准差。

[0068] 根据图 2a 和图 2b 表明，正义链 3’末端具有 2 个错配，进而在正义链 3’末端第 12 位核苷酸具有错配的 siRNA，表现出比常规 siRNA 更强的基因表达抑制效果。

[0069] 例 3 :构成 siRNA 的正义链 3’ 末端的错配对 RISC 形成的影响

[0070] 将 siRNA 导入细胞内时，其正义链和反义链的任意一方整合入 RISC。据认为如此形成的 RISC 会切断与整合于其中的链所杂交的 mRNA。因而认为，靶基因的表达抑制效果，因 siRNA 的正义链还是反义链易于整合到 RISC 中而不同。

[0071] 本例中，通过在 siRNA 分子的正义链 3’末端引入错配，考察整合到 RISC 内的链的选择性是否发生变化为目的，进行了以下实验。

[0072] 首先，在海肾荧光酶基因的 3’ 非翻译区分别插入萤火虫荧光酶基因的靶序列“La21”的正义链和反义链的对应序列，制备两种报告质粒。对照质粒采用表达 β - 半乳糖酶基因的质粒。siRNA 分子 (2 聚体) 使用上述表 1 所示 La21-conv.(正义链 3’ 末端没有错配) 和 La-3’ m2(正义链 3’ 末端含有两个错配)。

[0073] HeLa 细胞，在补充有 10％胎牛血清 (Life Technologies 公司生产)、100U/ml 青霉素 (Life Technologies 公司生产) 和 100μg/ml 链霉素 (LifeTechnologies 公司生产) 的 Dulbecco’s 改良 Eagle’s 培养基 (Sigma 公司生产) 中，于 37℃、5％ CO_2 环境中，生长增殖。

[0074] 将任何一种上述报告质粒、任何一种上述 siRNA 分子和对照质粒共转染 HeLa 细胞。24 小时后，测定荧光酶活性和 β - 半乳糖酶活性，将荧光酶活性测定值除以 β - 半乳糖酶活性测定值后的值，作为标准化后的报告基因的表达水平进行评估。

[0075] 图 3 是表示在正义链 3’ 末端含有错配的 siRNA 分子 (La21-3’ m2) 或不含错配的 siRNA 分子 (La21-conv.) 作用下，2 种质粒的报告基因的表达水平的棒图。图 3 中，“反义 siRNA”的图表示的是靶序列的正义链重组到 3’ 非翻译区的报告质粒的表达水平，因而，该表达水平受到以各 siRNA 分子的反义链为中介体的 RNAi 的抑制。另一方面，“正义 siRNA”的图表示的是靶序列的反义链重组到 3’ 非翻译区的报告质粒的表达水平，因而，该表达水平受到以各 siRNA 分子的正义链为中介体的 RNAi 的抑制。

[0076] 根据图 3 可知，在使用正义链 3’ 末端不含错配的常规类型的 siRNA 分子 (La21-conv.) 时，其正义链和反义链以几乎相同程度的比例作为 RNAi 的中介体发挥作用。另一方面可知，在使用正义链 3’ 末端含有错配的 siRNA 分子 (La21-3’ m2) 时，以其正义链作为中介体的 RNAi 活性几乎不被诱导，而以反义链为中介体的 RNAi 活性显著增强。该结果表明，通过在 siRNA 分子正义链 3’末端引入错配，其反义链将优先作为 RNAi 中介体整合到 RISC 内。这提示，通过正义链 3’ 末端的错配，siRNA 分子将从其反义链 5’ 末端侧整合到 RISC 内，其结果是，该反义链作为 RNAi 中介体发挥作用。

[0001]

序列表

<110> Japan Health Sciences Foundation

<120> 改良的 siRNA 分子和应用该 siRNA 分子的抑制基因表达的方法

<130> 149555

<150> JP 2003-294504
<151> 2003-08-18

<150> JP 2003-427970
<151> 2003-12-24

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 1
ggaagacgcc aaaaacauau u 21

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 2
uauguuuuug gcgucuuccu u 21

<210> 3
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 3
ggaagacgcc aaaaacauu 19

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 4
ggaagacgcc aaaaacaau 19

<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 5
ggaagacgcc aaaaacuau 19

<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 6
ggaagacgcc aaaaauuau 19

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 7
uuaagacgcc aaaaacauau u 21

<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 8
ggaagacucc aaaaacaau 19

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 9
accgcuggag agcaacugcu u 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 10
gcaguugcuc uccagcgguu u 21

<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 11
accgcuggag agcaacugu 19

<210> 12
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 12
accgcuggag agcaacuuu 19

<210> 13
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 13
accgcuggag agcaacauu 19

<210> 14
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 14
accgcuggag agcaauauu 19

<210> 15
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 15
accgcuguag agcaacuuu 19

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 16
ugcugagagg aacagcaacc u 21

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 17
guugcuguuc cucucagcag a 21

<210> 18
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 18
ugcugagugg aacagcauu 19

<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 19
cuggacuucc agaagaacau u 21

<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 20
uguucuucug gaaguccagu u 21

<210> 21
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 21
cuggacuacc agaagaauu 19

<210> 22
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 22
guccgcaggc ggcucaaaga uu 22

<210> 23
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 23
ucuuugagcc gccugcggac uu 22

<210> 24
<211> 20
<212> RNA
<213> **人工序列**

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 24
guccgcaguc ggcucaaauu 20

<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> **人工序列**

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 25
gugacuugga aaccaaauuu u 21

<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> **人工序列**

[0010]

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 26
aauuugguuu ccaagucacu u 21

<210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 27
gugacuuuga aaccaaaaa 19

<210> 28
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 28
ggaagacgcc aaaaacaua 19

<210> 29
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 29

uacgcuggag agcaacugcu u 21

<210> 30

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：单链 siRNA

<400> 30

accgcuggag agcaacugc 19

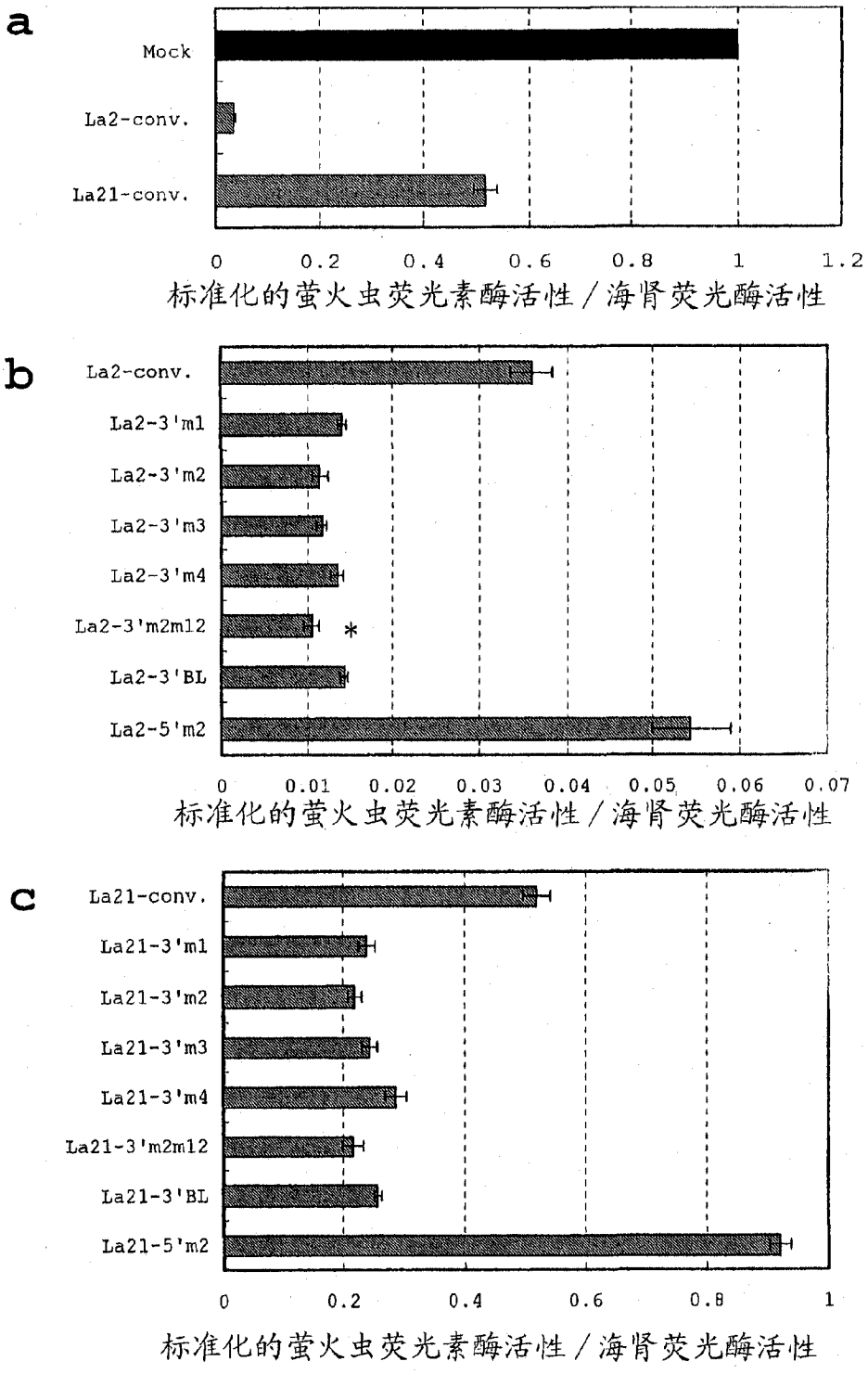

a
Mock
La2-conv.
La21-conv.
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
标准化的萤火虫荧光素酶活性／海肾荧光酶活性
b
La2-conv.
La2-3'm1
La2-3'm2
La2-3'm3
La2-3'm4
La2-3'm2m12
La2-3'BL
La2-5'm2
*
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
标准化的萤火虫荧光素酶活性／海肾荧光酶活性
c
La21-conv.
La21-3'm1
La21-3'm2
La21-3'm3
La21-3'm4
La21-3'm2m12
La21-3'BL
La21-5'm2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
标准化的萤火虫荧光素酶活性／海肾荧光酶活性

图 1

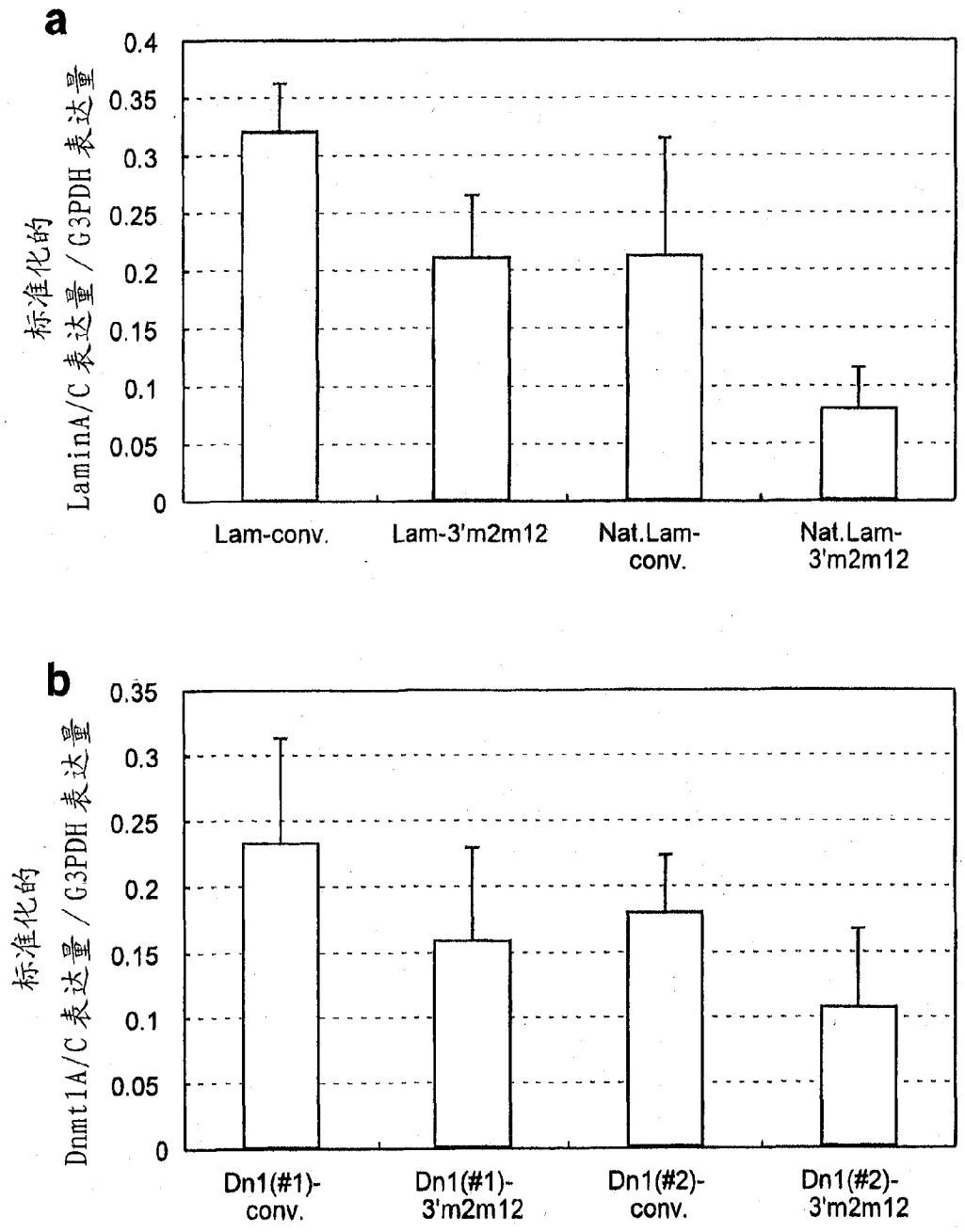

a
标准化的
LaminA/C 表达量 / G3PDH 表达量
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Lam-conv.
Lam-3'm2m12
Nat.Lam-conv.
Nat.Lam-3'm2m12
b
标准化的
Dnmt1A/C 表达量 / G3PDH 表达量
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Dn1(#1)-conv.
Dn1(#1)-3'm2m12
Dn1(#2)-conv.
Dn1(#2)-3'm2m12

图 2

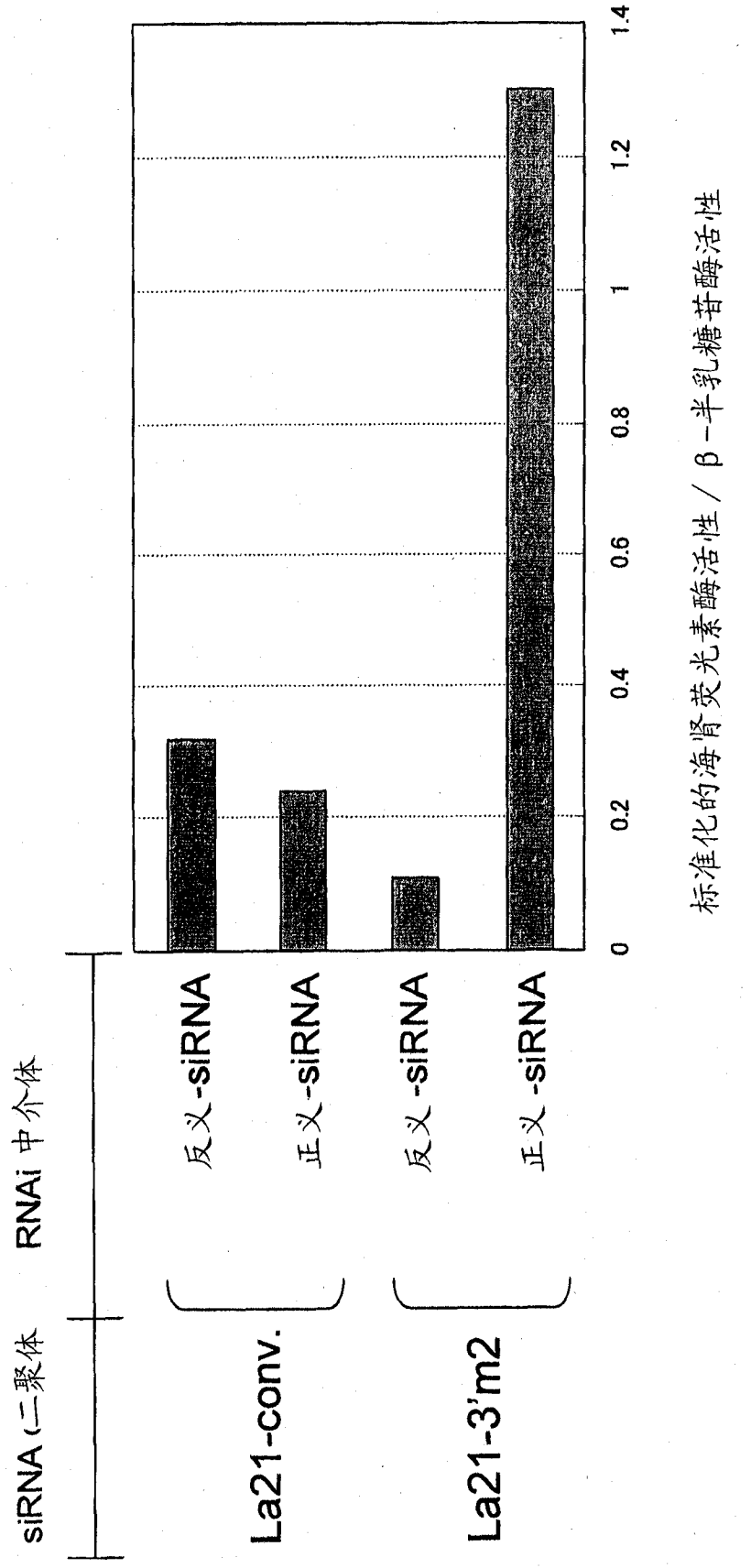

siRNA (二聚体
RNAi 中介体
La21-conv.
La21-3'm2
反义-siRNA
正义-siRNA
反义-siRNA
正义-siRNA
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
标准化的海肾荧光素酶活性 / β-半乳糖苷酶活性

图 3