



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107250148 B

(45) 授权公告日 2021.04.16

(21) 申请号 201580075275.4

(72) 发明人 D·E·赖安 D·J·德林杰

(22) 申请日 2015.12.03

J·R·桑普森 R·凯撒

(65) 同一申请的已公布的文献号

J·迈尔森

申请公布号 CN 107250148 A

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(43) 申请公布日 2017.10.13

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

62/087,211 2014.12.03 US

C07H 21/02 (2006.01)

62/146,189 2015.04.10 US

C12N 9/22 (2006.01)

62/256,095 2015.11.16 US

C12N 15/113 (2010.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/90 (2006.01)

2017.08.02

C12Q 1/6876 (2018.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2015/000143 2015.12.03

WO 2014/093712 A1, 2014.06.19

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2014/0273226 A1, 2014.09.18

W02016/089433 EN 2016.06.09

CN 104854241 A, 2015.08.19

(73) 专利权人 安捷伦科技有限公司

US 2014/0273232 A1, 2018.09.18

地址 美国加利福尼亚州

审查员 吴慧

权利要求书2页 说明书124页

序列表91页 附图20页

(54) 发明名称

具有化学修饰的指导RNA

(57) 摘要

本发明涉及修饰的指导RNA及其在成簇的规律间隔的短回文重复 (CRISPR) /CRISPR- 相关 (Cas) 系统中的用途。

1. 一种合成的指导RNA, 其包含:

(a) crRNA区段, 其包含 (i) 能够与多核苷酸中的靶序列杂交的指导序列, (ii) 茎序列; 和

(b) tracrRNA区段, 其包含与所述茎序列部分或完全互补的核苷酸序列,

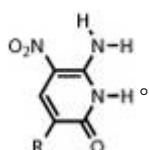
其中所述合成的指导RNA包含修饰, 且其中所述合成的指导RNA具有gRNA功能性,

其中, 所述修饰包括对修饰的核苷酸的糖和磷酸二酯键两者的修饰, 所述修饰的核苷酸位于所述指导RNA的5' 端或3' 端的5个核苷酸之内。

2. 权利要求1的合成的指导RNA, 其中所述修饰的核苷酸包含2' -0-甲基模块、2' -0-甲氧基乙基(MOE)模块、2' -脱氧模块、硫代磷酸酯核苷酸间连接、膦酰基乙酸酯(PACE)核苷酸间连接、或硫代膦酰基乙酸酯(硫代PACE)核苷酸间连接。

3. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其在所述指导RNA的5' 端包含少于26个连续的2' -0-甲基修饰。

4. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其进一步包含置换所述合成的指导RNA中的胞嘧啶的Z碱基, 其中所述Z碱基具有如下通式:



5. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其在对应于尿嘧啶的位置进一步包含至少一个2'-硫尿嘧啶, 所述尿嘧啶能参与与潜在脱靶序列的U-G摇摆配对。

6. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其中所述修饰的核苷酸选自下组: 具有3' -硫代磷酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -硫代膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸和具有3' -膦酰基乙酸酯基团的2' -脱氧核苷酸。

7. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其包含选自下组的三个连续的修饰的核苷酸: 具有3' -硫代磷酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -硫代膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸。

8. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其包含至少两个修饰。

9. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其包含多至50个修饰。

10. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其包含单RNA链或两条分离的RNA链, 以及在各条RNA链的5' 端、各条RNA链的3' 端、或各条RNA链的5' 端和3' 端二者处的一个或多个修饰。

11. 权利要求10的合成的指导RNA, 其在5' 端或3' 端包含或在5' 端和3' 端各包含7个或更少的连续的修饰核苷酸。

12. 权利要求11的合成的指导RNA, 其在5' 端、3' 端或茎-环的一个或多个处进一步包含一个或多个5-甲基尿苷核苷酸。

13. 权利要求1或2的合成的指导RNA, 其进一步包含荧光染料或标签。

14. 权利要求13的合成的指导RNA, 其中所述荧光染料或标签与所述合成的指导RNA的茎-环结合。

15. 一种用于基因组编辑以修饰DNA序列、或调控目的基因表达、或切割靶多核苷酸的方法, 其包括: 将所述DNA序列、目的基因、或靶多核苷酸与CRISPR-相关蛋白及权利要求1-

14中任一项的合成的指导RNA接触,并编辑、调控或切割所述DNA序列、目的基因、或靶多核苷酸。

16. 权利要求15的方法,其中所述方法在体外进行,且所述合成的指导RNA在整个指导序列包含15个或更多的2'-0-甲基修饰。

17. RNA分子的套组或文库,其包含两个或更多个权利要求1-14中任一项的合成的指导RNA。

18. 一种试剂盒,其包含权利要求1-14中任一项的合成的指导RNA。

19. RNA分子的阵列,其包含两个或更多个权利要求1-14中任一项的合成的指导RNA。

## 具有化学修饰的指导RNA

### 发明领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域。具体地，本发明涉及规律间隔的短回文重复的簇(CRISPR)技术。

[0002] 发明背景

[0003] 天然的原核CRISPR-Cas系统包含具有固定长度的介入可变序列的短重复阵列(即规律间隔的短回文重复的簇，或“CRISPR”)，和CRISPR-相关(“Cas”)蛋白。Cas蛋白的亚组将转录的CRISPR阵列的RNA加工成小指导RNA，其通常具有如下文所述的两个组分。至少存在三种不同的系统：I型、II型和III型。把RNA加工成成熟的crRNA的过程中涉及的酶在3种系统中是不同的。在天然原核系统中，指导RNA(“gRNA”)包含两个短非编码RNA种类，称为CRISPR RNA(“crRNA”)和反式作用RNA(“tracrRNA”)。在一个例示性的系统中，gRNA与Cas核酸酶形成复合体。gRNA:Cas核酸酶复合体结合靶多核苷酸序列，所述靶多核苷酸序列具有前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif)(“PAM”)和前间区序列(protospacer)，其是与部分gRNA互补的序列。gRNA:Cas核酸酶复合体对靶多核苷酸的识别与结合诱导对靶多核苷酸的切割。天然CRISPR-Cas系统作为原核生物中的免疫系统而发挥功能，而gRNA:Cas核酸酶复合体以类似真核生物中的RNAi的方式识别并沉默外源遗传元件，由此产生对外源遗传元件(如质粒和噬菌体)的抗性。

[0004] 已证明单一指导RNA(“sgRNA”)能替代天然存在的crRNA与tracrRNA之间形成的复合体。

[0005] 关于开发gRNA(包括sgRNA)的考虑包括特异性、稳定性和功能性。特异性是指具体的gRNA:Cas核酸酶复合体结合和/或切割目的靶序列的能力，而来自目的靶标的序列和/或位置中不同的多核苷酸很少发生或不发生结合和/或切割。因此，特异性是指将gRNA:Cas核酸酶复合体的脱靶效应最小化。稳定性是指gRNA抵抗酶(如核酸酶)的降解及细胞内或细胞外环境中存在的其他物质的降解的能力。因此，需要提供对核酸降解具有增加的抗性、针对靶多核苷酸的结合亲和力、和/或降低的脱靶效应但仍然具有gRNA功能性的gRNA(包括sgRNA)。关于开发gRNA的进一步考虑包括转染能力和免疫刺激特性。因此，需要提供在转染的细胞中具有有效和可滴定的转染入细胞的能力(尤其是进入真核细胞的核)，且具有最小的或不具有免疫刺激特性的gRNA(包括sgRNA)。对于gRNA的另一重要考虑是提供将其递送入并维持其在意向细胞、组织、体液或生物体内的有效手段，其维持时间足以允许目的gRNA发挥功能性。

[0006] 附图简述

[0007] 图1是示出例示性CRISPR-Cas系统的示意性模型的一组图。这里示出的例示性系统是具有Cas核酸酶的II型系统。在这个具体实例中，Cas核酸酶是Cas9核酸酶。Cas9核酸酶识别PAM序列(在此，PAM序列是NGG的3-nt序列，其中N是A, G, C或T，但已知存在其他PAM序列)。sgRNA包括指导序列，crRNA序列或区段，以及tracrRNA序列或区段。sgRNA的指导序列与PAM序列直接上游的DNA靶标杂交。在此所示的实例中，Cas9介导PAM序列上游的双链断裂(箭头)。

- [0008] 图2A是显示例示性的CRISPR-Cas9介导的切割测定的图。
- [0009] 图2B是显示用于生成图4中的数据的生物化学切割测定的组分及其浓度的表。
- [0010] 图2C是显示用于生物化学切割测定的酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9核酸酶的滴定的图。
- [0011] 图2D是显示用于生物化学切割测定的例示性sgRNA的滴定的图。在该实例中,命名为kanC1的sgRNA靶向于卡那霉素抗性基因中的互补序列。
- [0012] 图3显示了体外使用纯化组分的生物化学切割测定的例示性条件和程序。
- [0013] 图4是显示在切割测定中使用例示性修饰的指导RNA获得的数据的表。
- [0014] 图5A显示了本申请中公开的例示性指导RNA。
- [0015] 图5B显示了本申请中公开的例示性单一指导RNA (sgRNA)。
- [0016] 图6是显示具有至少两个化学修饰(例如第一修饰和第二修饰)的例示性指导RNA的表。每个数字代表所指示的修饰,每个“x”表示指导RNA中的修饰的组合。在一些实施方案中,第一和第二修饰存在于单个核苷酸上。在一些实施方案中,第一和第二修饰存在于分离的核苷酸上。
- [0017] 图7显示了具有至少三个化学修饰的指导RNA的例示性类型。图7的下部分列出了几种类型的修饰。图7的上部分中的表示出了双重修饰(“双mod”,两种类型的修饰的组合)能与单个修饰(“单mod”,一种类型的修饰)组合。“x”表示在指导RNA中存在相应的双mod和单mod。
- [0018] 图8A和8B显示了用于体外测试的荧光团修饰的CLTA1sgRNA。在图8A中,示出了CLTA1的sgRNA的RNA序列,其包括这样的位置,在所述位置中荧光染料或标记可附接至sgRNA。图8B显示了由Nishimasu等,Cell (2014) 156, 1-15报道的Cas9:sgRNA复合体的X射线晶体学确定的结构。
- [0019] 图9A显示了在某些位置(位置3,9和11)用2-硫尿苷修饰的CLTA1sgRNA,以改进针对CLTA1靶标的特异性。图9B显示,当脱靶位点涉及U-G摇摆配对时,用2-硫代U修饰的gRNA能增加gRNA的靶特异性。具体地,CLTA1\_2-硫代U+11具有低得多的脱靶序列CLTA1OFF3的切割,其具有在5'链中第11位处的T到C突变。
- [0020] 图10显示了指导RNA骨架二级结构,其表现出与Cas9的氨基酸的非共价结合相互作用,如Jiang等,Science (2015) 348:6242,1477-81中所报道的。
- [0021] 图11A和11B图示了实验结果,其显示使用本文公开的合成和化学修饰的sgRNA能实现人细胞系中具有高频插入和缺失 (indels) 和同源重组 (HR) 的基因破坏,如Hendel等, Nat.Biotechnol. (2015) 33:9, 985-9中所报道的。
- [0022] 图12A,12B,12C和12D图示了实验结果,其显示本文所述的化学修饰的sgRNA能用于在受刺激的原代人T细胞以及CD34+造血干细胞和祖细胞 (HSPC) 中实现高频率的基因破坏或靶向的基因组编辑,如Hendel等,Nat.Biotechnol. (2015) 33:9, 985-9中所报道的。
- [0023] 发明详述
- [0024] 本发明至少部分地基于一个意想不到的发现,即对gRNA的某些化学修饰是CRISPR-Cas系统所容许的。具体地,据信增加gRNA的稳定性,改变gRNA杂交相互作用的热稳定性,和/或降低Cas:gRNA复合的脱靶效应的一些化学修饰基本上不损害Cas:gRNA结合,切口和/或切割靶多核苷酸的功效。此外,一些化学修饰被认为提供了这样的gRNA,所述gRNA

具有有效且可滴定的对细胞的转染,尤其是转染入真核细胞的核中,和/或在转染的细胞中具有最小的或没有免疫刺激特性。据信一些化学修饰可提供这样的gRNA(包括sgRNA),所述gRNA能被有效地递送到和保持在意向细胞、组织、体液或生物体内足够的时间以允许所需的gRNA功能性。

[0025] I. 定义

[0026] 如本文所用,术语“指导RNA”通常是指能结合Cas蛋白并有助于将Cas蛋白靶向靶多核苷酸(例如DNA)内的特定位置的RNA分子(或一组RNA分子全部)。指导RNA可包含crRNA区段和tracrRNA区段。如本文所用,术语“crRNA”或“crRNA区段”是指RNA分子或其部分,其包括靶向多核苷酸的指导序列,茎序列和任选的5' -突出端序列。如本文所用,术语“tracrRNA”或“tracrRNA区段”是指这样的RNA分子或其部分,其包括蛋白结合区段(例如蛋白结合区段能够与CRISPR相关蛋白(例如Cas9)相互作用)。术语“指导RNA”涵盖单一指导RNA(sgRNA),其中crRNA区段和tracrRNA区段位于相同的RNA分子中。术语“指导RNA”还总地涵盖两个或更多RNA分子的组,其中crRNA区段和tracrRNA区段位于分离的RNA分子中。

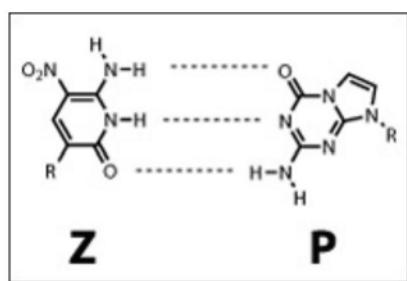
[0027] 术语“骨架”是指指导RNA分子的一部分,其包含在天然生物物种之间基本相同或高度保守的序列。骨架包括tracrRNA区段和crRNA区段除了在crRNA区段的5' 端处或附近的靶向多核苷酸的指导序列以外的部分,不包括包含在天然crRNA和tracrRNA中不保守的序列的任何非天然部分。

[0028] 术语“核酸”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”是指DNA分子、RNA分子或其类似物。如本文所用,术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”包括但不限于DNA分子,如cDNA、基因组DNA或合成DNA,和RNA分子,如指导RNA、信使RNA或合成RNA。此外,如本文所用,术语“核酸”和“多核苷酸”包括单链和双链形式。

[0029] 上下文中的术语寡核苷酸或多核苷酸的“修饰”包括但不限于(a)末端修饰,例如5' 端修饰或3' 端修饰,(b)核碱基(或“碱基”)修饰,包括替换或去除碱基,(c)糖修饰,包括2' 、3' 和/或4' 位置处的修饰,和(d)主链修饰,包括修饰或替换磷酸二酯键。术语“修饰的核苷酸”通常是指具有对碱基、糖和磷酸二酯键或主链部分的一个或多个的化学结构的修饰的核苷酸,包括核苷酸磷酸酯。

[0030] 术语“Z”和“P”是指由Steven Benner及其同事开发的核苷酸、核碱基或核碱基类似物,例如“Artificially expanded genetic information system:a new base pair with an alternative hydrogen bonding pattern”Yang,Z.,Hutter,D.,Sheng,P.,Sismour,A.M.和Benner,S.A.(2006)Nucleic Acids Res.,34,6095-101中所述的,其内容通过提述以其整体并入本文。

[0031]



[0032] 术语“xA”,“xG”,“xC”,“xT”或“x(A,G,C,T)”和“yA”,“yG”,“yC”,“yT”或“y(A,G,C,T)”是指核苷酸,核碱基或核碱基类似物,如Krueger等在“Synthesis and Properties of

Size-Expanded DNAs: Toward Designed, Functional Genetic Systems"; Andrew T.Krueger, Haige Lu, Alex H.F.Lee and Eric T.Kool (2007) *Acc.Chem.Res.*, 40, 141-50中描述的,其内容通过提述以其整体并入本文。

[0033] 术语“非结构核酸”或“UNA”是指如US7371580中所述的核苷酸,核碱基或核碱基类似物,其内容通过提述以其整体并入本文。非结构化核酸(或UNA)修饰也称为“假互补”核苷酸,核碱基或核碱基类似物(参见例如Lahoud等(1991) *Nucl.Acids Res.*, 36:10, 3409-19)。

[0034] 术语“PACE”和“硫代PACE”是指分别含有膦酰基乙酸酯或硫代膦酰基乙酸酯(phosphonoacetate)基团的核苷酸间磷酸二酯键类似物。这些修饰属于广泛类别的化合物,其包含膦酰基羧酸盐模块,膦酰基羧酸酯模块,硫代膦酰基羧酸盐模块和硫代膦酰基羧酸酯模块。这些连接可分别由通式P(CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR和(S)-P(CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR来描述,其中n是0至6的整数,并且R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>各自独立地选自H、烷基和取代的烷基。这些修饰中的一些由Yamada等描述于“Synthesis and Biochemical Evaluation of Phosphonoformate Oligodeoxyribonucleotides”Christina M.Yamada, Douglas J.Dellinger和Marvin H.Caruthers (2006) *J.Am.Chem.Soc.* 128:15, 5251-61中,其全部内容通过引用并入本文。

[0035] 如本文所用,“修饰”是指与未修饰的核糖核苷酸,即腺苷,鸟苷,胞苷和尿苷核糖核苷酸中发现的不同的化学模块或化学结构的部分。术语“修饰”可指修饰的类型。例如,“相同修饰”是指相同类型的修饰,且“修饰的核苷酸是相同的”是指修饰的核苷酸具有相同类型的修饰,而碱基(A,G,C,U等)可以是不同的。类似地,具有“两个修饰”的指导RNA是具有两个类型修饰的指导RNA,其可以是或可以不是相同的核苷酸,并且每个类型可出现在指导RNA中的多个核苷酸中。类似地,具有“三个修饰”的指导RNA是具有三个类型修饰的指导RNA,其可以或可以不在相同的核苷酸中,并且每个类型可出现在多个核苷酸中。

[0036] 如本文所用,术语“靶多核苷酸”或“靶标”是指含有靶核酸序列的多核苷酸。靶多核苷酸可以是单链或双链的,并且在一些实施方案中是双链DNA。在一些实施方案中,靶多核苷酸是单链RNA。本文所用的“靶核酸序列”或“靶序列”是指希望使用CRISPR系统结合、切口或切割的特异性序列或其互补序列。

[0037] 术语“杂交(hybridization)”或“杂交(hybridizing)”是指完全或部分互补的多核苷酸链在合适的杂交条件下在一起以形成双链结构或区域的过程,其中两个结构链通过氢键连接。如本文所用,术语“部分杂交”包括其中双链结构或区域含有一个或多个凸起或错配。虽然氢键通常在腺嘌呤和胸腺嘧啶或腺嘌呤和尿嘧啶(A和T或A和U)或胞嘧啶和鸟嘌呤(C和G)之间形成,可形成其他非经典碱基对(参见例如Adams等,“The Biochemistry of the Nucleic Acids,”第11版,1992)。预期修饰的核苷酸可形成允许或促进杂交的氢键。

[0038] 术语“切割(cleavage)”或“切割(cleaving)”是指在多核苷酸的核糖基磷酸二酯主链中破坏共价磷酸二酯键。术语“裂解”或“裂解”涵盖单链断裂和双链断裂。双链切割可由于两个不同的单链切割事件而发生。切割可导致平头或交错末端的产生。

[0039] 术语“CRISPR相关蛋白”或“Cas蛋白”是指野生型Cas蛋白,其片段或其突变体或变体。术语“Cas突变体”或“Cas变体”是指野生型Cas蛋白的蛋白或多肽衍生物,例如具有一个或多个点突变,插入,缺失,截短,融合蛋白或其组合的蛋白。在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”基本上保留了Cas蛋白的核酸酶活性。在一些实施方案中,“Cas突变体”或

“Cas变体”是突变的,从而使得一个或两个核酸酶域是失活的。在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”具有核酸酶活性。在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”缺少其野生型对应物的一些或全部核酸酶活性。

[0040] Cas蛋白的术语“核酸酶域”是指具有DNA切割的催化活性的蛋白内的多肽序列或域。核酸酶域可包含在单个多肽链中,或者切割活性可由两个(或更多个)多肽的结合而引起。单个核酸酶域可由给定多肽内的多于一个分离的氨基酸段(stretch)组成。这些域的实例包括RuvC样基序(SEQ ID N0:1中的氨基酸7-22、759-766和982-989)和HNH基序(氨基酸837-863)。参见Gasiunas等(2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109:39, E2579-E2586和W02013176772。

[0041] 具有“gRNA功能性”的合成的指导RNA是具有天然存在的指导RNA的一个或多个功能的合成的指导RNA,例如与Cas蛋白结合的功能,或由与Cas蛋白结合的指导RNA执行的功能。在一些实施方案中,功能性包括结合靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括将Cas蛋白或gRNA:Cas蛋白复合体靶向靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括切口靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括切割靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括与Cas蛋白的结合或结合。在一些实施方案中,功能性是具有Cas蛋白的CRISPR-Cas系统中的指导RNA的任何其他已知功能,包括具有工程化的Cas蛋白的人工CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,功能性是天然的指导RNA的任何其他功能。合成的指导RNA可具有比天然存在的指导RNA更大或更小程度的gRNA功能。在一些实施方案中,与相似的天然存在的指导RNA相比,合成的指导RNA可具有关于一种特性更大的功能性和对另一种特性更低的功能性。

[0042] “具有单链切口活性的Cas蛋白”是指与野生型Cas蛋白相比,具有降低的切割dsDNA的两条链之一的能力的Cas蛋白,包括Cas突变体或Cas变体。例如,在一些实施方案中,具有单链切口活性的Cas蛋白具有降低RuvC域(或HNH域)的功能的突变(例如氨基酸取代),结果降低了切割靶DNA的一条链的能力。此类变体的实例包括酿脓链球菌Cas9中的D10A、H839A/H840A、和/或N863A取代,并且还包括在其他物种的Cas9酶中的等同位点处的相同或相似的取代。

[0043] 如本文所用,术语序列的“部分”或“片段”是指小于完整序列的序列的任何部分(例如核苷酸亚序列或氨基酸亚序列)。多核苷酸的部分可为任何长度,例如长度至少5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、150、200、300或500个或更多个核苷酸。指导序列的一部分可为指导序列的约50%,40%,30%,20%,10%,例如指导序列的三分之一或更短,例如长度为7、6、5、4、3或2个核苷酸。

[0044] 在分子的语境中的术语“衍生自\来源于(derived from)”是指使用亲本分子或来自该亲本分子的信息分离或制备的分子。例如,Cas9单一突变体切口酶(nickase)和Cas9双突变体无效核酸酶衍生自野生型Cas9蛋白。

[0045] 在两个或更多个多核苷酸(或两个或更多个多肽)的语境下,术语“基本上相同”是指当使用序列比较算法或通过目测比较或比对最大对应时,具有至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,约90-95%,至少约95%,至少约98%,至少约99%或更多个核苷酸(或氨基酸)序列同一性的序列或亚序列。优选地,多核苷酸之间的“基本同一性”存在于覆盖多核苷酸的区域长度至少约50个核苷酸,长度至少约100个核苷酸,长度至少约200个核苷酸,长度至少约300个核苷酸,长度约500个核苷酸,或覆盖多核苷酸的全长。优选地,多

肽之间的“基本同一性”存在于覆盖多肽的区域长度至少约50个氨基酸残基,长度至少约100个氨基酸残基,或覆盖多肽的整个长度。

[0046] 如本文所公开的,提供了许多值的范围。应当理解,也具体涵盖到该范围的上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一。包含在规定范围内的每个较小范围或中间值也是具体涵盖的。术语“约”通常是指所示数字的加或减10%。例如,“约10%”可以表示9%至11%的范围,“20”可以意指从18-22。“约”的其他含义可从上下文中显而易见,例如四舍五入,因此,例如“约1”也可意指0.5至1.4。

[0047] II.CRISPR介导的序列特异性结合和/或切割

[0048] 图1中所示的是DNA的CRISPR-Cas9介导的序列特异性切割的图。指导RNA描述为sgRNA,其具有例示性的5'域内的20个核苷酸(20-nt)指导序列(其他指导序列可为例如约15至约30nt的长度)、内部定位地碱基配对的茎和3'域。指导序列与DNA靶标中的例示性20-nt靶序列互补。茎对应于crRNA中的重复序列,并与tracrRNA中的序列互补。指导RNA的3'域对应于结合Cas9核酸酶的tracrRNA的3'域。Cas9:指导RNA复合体结合并切割由Cas9识别的PAM序列直接上游的靶DNA序列或前间区序列。在图1中,例示了3-nt PAM序列;然而其他PAM序列,包括4-nt和5-nt PAM序列是已知的。在图1中例示的系统中,DNA中的靶序列的两条链都在箭头所示的位置处被Cas9切割。

[0049] III. 指导RNA

[0050] 在至少一个方面,本发明包括具有指导RNA功能性的化学修饰的指导RNA。包括除四种经典核糖核苷酸(即A,C,G和U)以外的任何核苷酸的指导RNA,无论是非天然的还是天然的(如假尿苷,肌苷或脱氧核苷酸),都是化学修饰的指导RNA。同样地,包含除天然磷酸二酯核苷酸间键之外的任何主链或核苷酸间连接的指导RNA具有化学修饰,因此是化学修饰的指导RNA。在一些实施方案中,保留的功能性包括结合Cas蛋白。在一些实施方案中,保留的功能性包括结合靶多核苷酸。在一些实施方案中,保留的功能性包括将Cas蛋白或gRNA:Cas蛋白复合体靶向多核苷酸。在一些实施方案中,保留的功能性包括由gRNA:Cas蛋白复合体切口靶多核苷酸。在一些实施方案中,保留的功能性包括由gRNA:Cas蛋白复合体切割靶多核苷酸。在一些实施方案中,保留的功能性是具有Cas蛋白的CRISPR-Cas系统(包括具有工程化的Cas蛋白的人工CRISPR-Cas系统)中的指导RNA的任何其他已知功能。在一些实施方案中,保留的功能性是天然指导RNA的任何其他功能。

[0051] A. 例示性修饰

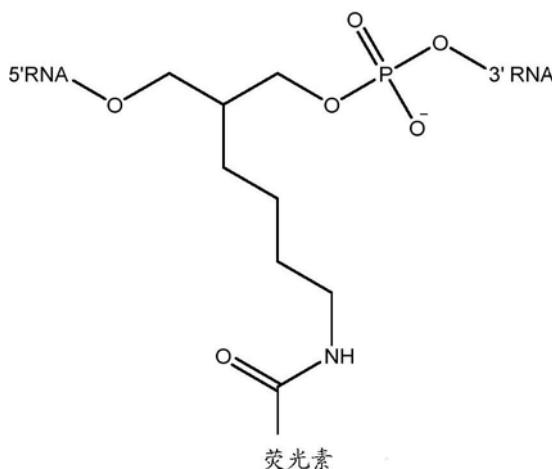
[0052] 在一些实施方案中,整合入指导RNA的核苷酸糖修饰选自下组:2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基如2'-0-甲基(2'-0Me)、2'-脱氧基(2'-H)、2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基如2'-甲氧乙基("2'-MOE")、2'-氟("2'-F")、2'-氨基("2'-NH<sub>2</sub>")、2'-阿拉伯糖("2'-arabino")核苷酸、2'-F-阿拉伯糖("2'-F-arabino")核苷酸、2'-锁核酸("LNA")核苷酸、2'-非锁核酸("ULNA")核苷酸、L型的糖("L-糖")、和4'-硫代核糖基核苷酸。在一些实施方案中,整合至指导RNA中的核苷酸间连接修饰选自下组:硫代磷酸酯"P(S)"(P(S))、膦酰基羧酸酯(P(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR)如膦酰基乙酸酯"PACE"(P(CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>))、硫代膦酰基羧酸酯((S)P(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR)如硫代膦酰基乙酸酯"硫代PACE"((S)P(CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>))、烷基膦酸酯(P(C<sub>1-3</sub>烷基)如甲基膦酸酯-P(CH<sub>3</sub>)、硼烷膦酸酯(P(BH<sub>3</sub>))、和二硫代磷酸酯(P(S)<sub>2</sub>)。

[0053] 在一些实施方案中,整合入指导RNA的核碱基("碱基")修饰选自下组:2-硫尿嘧啶

(“2-硫代U”),2-硫胞嘧啶(“2-硫代C”),4-硫尿嘧啶(“4-硫代U”),6-硫鸟嘌呤(“6-硫代G”),2-氨基腺嘌呤(“2-氨基A”),2-氨基嘌呤,假尿嘧啶,次黄嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-甲基胞嘧啶(“5-甲基C”),5-甲基尿嘧啶(“5-甲基U”),5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基尿嘧啶(“5-烯丙基U”),5-烯丙基胞嘧啶(“5-烯丙基C”),5-氨基烯丙基尿嘧啶(“5-氨基烯丙基U”),5-氨基烯丙基胞嘧啶(“5-氨基烯丙基C”),无碱基核苷酸,Z碱基,P碱基,非结构核酸(“UNA”),异鸟嘌呤(“isoG”),异胞嘧啶(“isoC”)[如““Enzymatic Incorporation of a New Base pair into DNA and RNA Extends the Genetic Alphabet.”Piccirilli, J.A.; Krauch, T.; Moroney, S.E.; Benner, S.A. (1990) Nature, 343, 33中所述],5-甲基-2-嘧啶[如Rappaport, H.P. (1993) Biochemistry, 32, 3047中所述],x(A,G,C,T)和y(A,G,C,T)。

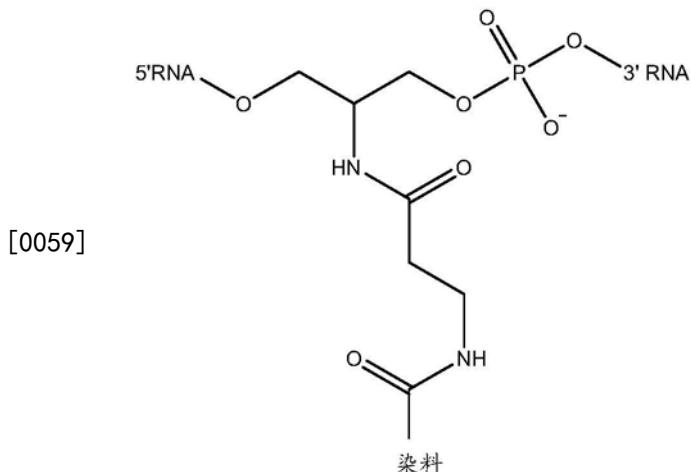
[0054] 在一些实施方案中,在核苷酸糖,核碱基,磷酸二酯键和/或核苷酸磷酸酯上引入一个或多个同位素修饰。此类修饰包括这样的核苷酸,所述核苷酸包含一个或多个<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C,<sup>14</sup>C,氘,<sup>3</sup>H,<sup>32</sup>P,<sup>125</sup>I,<sup>131</sup>I原子或用作示踪剂的其它原子或元素。

[0055] 在一些实施方案中,整合至指导RNA中的“末端”修饰选自下组:PEG(聚乙二醇),烃接头(包括:杂原子(O,S,N)取代的烃间隔基;卤素取代的烃间隔基;含(酮基-,羧基-,酰氨基-,亚硫酰基-,氨基甲酰基-,硫羰氨基甲酰基(thionocarbamoyl)的烃间隔基),精胺接头,染料,包括附接于接头的荧光染料(例如荧光素,罗丹明,花菁),例如6-荧光素-己基,猝灭剂(例如Dabcyl,BHQ)和其他标记(例如生物素,地高辛(digoxigenin),吖啶,链霉亲和素,亲和素(avidin),肽和/或蛋白质)。在一些实施方案中,“末端”修饰包括将指导RNA与包含寡核苷酸(包括脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸)肽,蛋白质,糖,寡糖,类固醇,脂质,叶酸,维生素和/或其他分子的另一分子的缀合(或连接)。在一些实施方案中,整合至指导RNA中的“末端”修饰经接头(例如2-(4-丁基酰氨基荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头(如下描绘))定位于指导RNA序列内部,其以磷酸二酯键并入并且能并入至指导RNA中的两个核苷酸之间的任何地方。



[0057] 2-(4-丁基酰氨基荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头

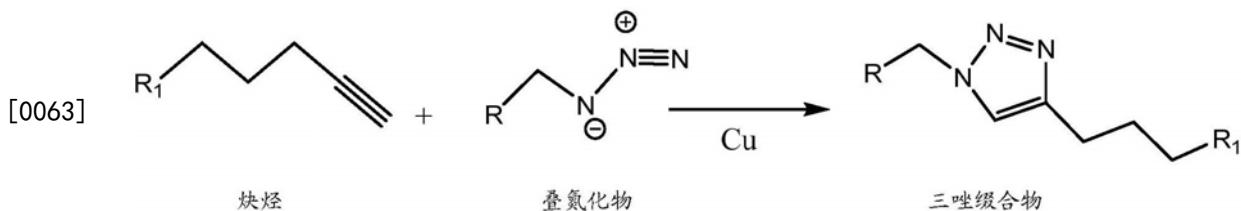
[0058] 其他接头包括例如以实例说明但不限于:



[0060] 2-(3-(染料-酰氨基)丙酰氨基)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头

[0061] 在一些实施方案中,末端修饰包括末端官能团如胺,硫醇(或巯基),羟基,羧基,羰基,亚硫酰基,硫代羰基,氨基甲酰基,硫氨基甲酰基,磷酰基,烯烃,炔基,卤素或官能团封端的接头,其中之一可随后与所需的模块缀合,例如荧光染料或非荧光标记或标签或任何其它分子,如寡核苷酸(包括脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸,包括适配体),氨基酸,肽,蛋白质,糖,寡糖,类固醇,脂质,叶酸,维生素。缀合采用本领域熟知的标准化学方法进行,包括但不限于通过N-羟基琥珀酰亚胺,异硫氰酸酯,DCC(或DCI)和/或“Bioconjugate Techniques”by Greg T.Hermanson, Publisher Elsevier Science,第三版(2013)中所述的任何其它标准方法,其内容通过提述以其整体并入本文。

[0062] 在一些实施方案中,标记或染料附接或缀合至gRNA中的修饰的核苷酸。荧光染料或其它模块例如非荧光标记或标签(例如生物素,亲和素,链霉亲和素或含有同位素标记如<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C,<sup>14</sup>C,氘,<sup>3</sup>H,<sup>32</sup>P,<sup>125</sup>I的部分和(包括脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸,包括适配体),氨基酸,肽,蛋白质,糖,寡糖,类固醇,脂质,叶酸,维生素或可使用所谓的“点击(click)”化学或所谓的“方酸(squareate)”缀合化学法来实现的其他分子。“点击”化学是指具有叠氮化物部分的炔烃模块的[3+2]环加成,得到两部分之间的三唑连接,如以下示意图所示:



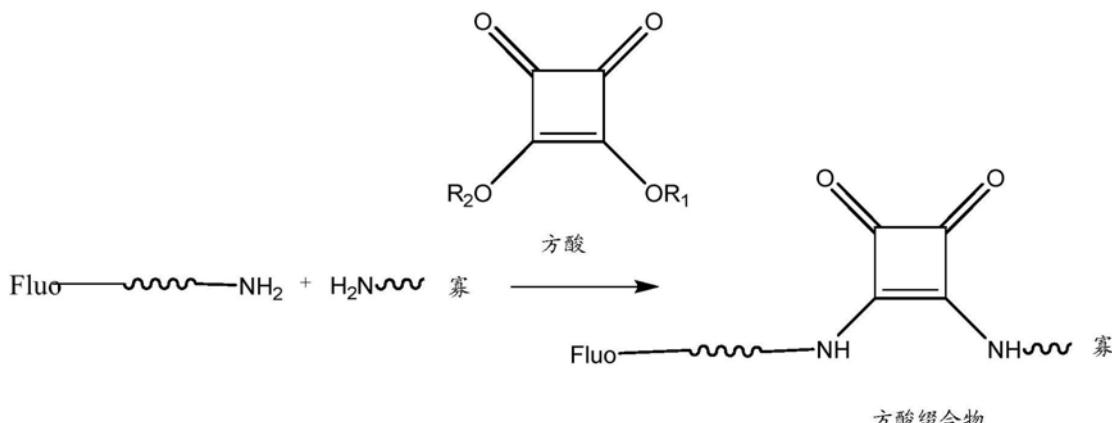
[0064] 如El-Sagheer, A.H和Brown, T. “Click chemistry with DNA”, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1388–1405和Mojibul, H.M和XiaoHua, P., DNA-associated click chemistry, *Sci. China Chem.*, 2014, 57: 2, 215–31中所述的实例, 其内容通过提述以其整体并入本文。

[0065] 在一些实施方案中,缀合可通过替代的环加成来实现,例如π-缀合的二烯模块与烯烃模块的Diels-Alder[4+2]环加成。

[0066] “方酸”缀合化学方法通过方酸衍生物连接两个各自具有胺的模块,以产生含有方酸标记模块的方酸缀合物(参见例如Tietze等(1991)Chem.Ber.,124,1215-21,其内容通过提述以其整体并入本文)。例如,含有接头胺的荧光素通过方酸接头与含有胺的寡核糖核昔

酸缀合,如下文方案中所述。方酸接头的一个实施例描述如下:

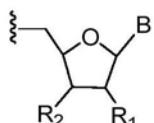
[0067]



[0068] 在一些实施方案中,整合入RNA中的化学修饰选自下组:2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基,2'-H,2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基,2'-F、2'-NH<sub>2</sub>,2'-阿拉伯糖,2'-F-阿拉伯糖,4'-硫代核糖基,2-硫代U,2-硫代C,4-硫代U,6-硫代G,2-氨基A,2-氨基嘌呤,假尿嘧啶,次黄嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-甲基C,5-甲基U,5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基U,5-烯丙基C,5-氨基烯丙基-尿嘧啶,5-氨基烯丙基-胞嘧啶,无碱基核苷酸(“abN”),Z,P,UNA,isoC,isoG,5-甲基-嘧啶,x(A,G,C,T)和y(A,G,C,T),硫代磷酸酯核苷酸间连接,膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,硫代膦酰基乙酸核苷酸连接,甲基膦酸酯核苷酸间连接,硼烷膦酸酯核苷酸间连接,二硫代磷酸酯核苷酸间连接,4'-硫代核糖基核苷酸,锁核酸(“LNA”)核苷酸,非锁核酸(“ULNA”)核苷酸,烷基间隔基,杂烷基(N,O,S)间隔基,5'-和/或3'-烷基封端的核苷酸,Unicap,自然界已知的5'端帽,xRNA碱基(类似于“xDNA”碱基),yRNA碱基(类似于“yDNA”碱基),PEG取代基,或与染料或非荧光标记(或标签)缀合的接头或如上所述的其它模块。例示性修饰的核苷酸还描述于表2中。

[0069] 表2.合成的指导序列中含有的例示性的修饰的核苷酸

[0070]



R<sub>1</sub> = OH或2'修饰  
R<sub>2</sub> = OH或核苷酸间连接  
B = 碱基

[0071]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
A1	OH	OH	尿苷
A2	OMe	OH	尿苷
A3	F	OH	尿苷
A4	Cl	OH	尿苷
A5	Br	OH	尿苷
A6	I	OH	尿苷
A7	NH <sub>2</sub>	OH	尿苷
A8	H	OH	尿苷
A9	OH	磷酸二酯	尿苷
A10	OMe	磷酸二酯	尿苷
A11	F	磷酸二酯	尿苷
A12	Cl	磷酸二酯	尿苷
A13	Br	磷酸二酯	尿苷
A14	I	磷酸二酯	尿苷
A15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	尿苷
A16	H	磷酸二酯	尿苷
A17	OH	膦酰基乙酸酯	尿苷
A18	OMe	膦酰基乙酸酯	尿苷
A19	F	膦酰基乙酸酯	尿苷
A20	Cl	膦酰基乙酸酯	尿苷
A21	Br	膦酰基乙酸酯	尿苷
A22	I	膦酰基乙酸酯	尿苷
A23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	尿苷
A24	H	膦酰基乙酸酯	尿苷
A25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷

[0072]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
A26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A27	F	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A30	I	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A32	H	硫代膦酰基乙酸酯	尿苷
A33	OH	硫代磷酸酯	尿苷
A34	OMe	硫代磷酸酯	尿苷
A35	F	硫代磷酸酯	尿苷
A36	Cl	硫代磷酸酯	尿苷
A37	Br	硫代磷酸酯	尿苷
A38	I	硫代磷酸酯	尿苷
A39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	尿苷
A40	H	硫代磷酸酯	尿苷
A41	OH	二硫代磷酸酯	尿苷
A42	OMe	二硫代磷酸酯	尿苷
A43	F	二硫代磷酸酯	尿苷
A44	Cl	二硫代磷酸酯	尿苷
A45	Br	二硫代磷酸酯	尿苷
A46	I	二硫代磷酸酯	尿苷
A47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	尿苷
A48	H	二硫代磷酸酯	尿苷
A49	OH	甲基磷酸酯	尿苷
A50	OMe	甲基磷酸酯	尿苷
A51	F	甲基磷酸酯	尿苷
A52	Cl	甲基磷酸酯	尿苷
A53	Br	甲基磷酸酯	尿苷
A54	I	甲基磷酸酯	尿苷
A55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	尿苷
A56	H	甲基磷酸酯	尿苷
A57	OH	硼烷膦酸酯	尿苷
A58	OMe	硼烷膦酸酯	尿苷
A59	F	硼烷膦酸酯	尿苷
A60	Cl	硼烷膦酸酯	尿苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
A61	Br	硼烷膦酸酯	尿苷
A62	I	硼烷膦酸酯	尿苷
A63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	尿苷
A64	H	硼烷膦酸酯	尿苷
B1	OH	OH	腺苷
B2	OMe	OH	腺苷
B3	F	OH	腺苷
B4	Cl	OH	腺苷
B5	Br	OH	腺苷
B6	I	OH	腺苷
B7	NH <sub>2</sub>	OH	腺苷
B8	H	OH	腺苷
B9	OH	磷酸二酯	腺苷
B10	OMe	磷酸二酯	腺苷
B11	F	磷酸二酯	腺苷
B12	Cl	磷酸二酯	腺苷
B13	Br	磷酸二酯	腺苷
B14	I	磷酸二酯	腺苷
B15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	腺苷
B16	H	磷酸二酯	腺苷
B17	OH	膦酰基乙酸酯	腺苷
B18	OMe	膦酰基乙酸酯	腺苷
B19	F	膦酰基乙酸酯	腺苷
B20	Cl	膦酰基乙酸酯	腺苷
B21	Br	膦酰基乙酸酯	腺苷
B22	I	膦酰基乙酸酯	腺苷
B23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	腺苷
B24	H	膦酰基乙酸酯	腺苷
B25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B27	F	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B30	I	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷

[0073]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
B32	H	硫代膦酰基乙酸酯	腺苷
B33	OH	硫代磷酸酯	腺苷
B34	OMe	硫代磷酸酯	腺苷
B35	F	硫代磷酸酯	腺苷
B36	Cl	硫代磷酸酯	腺苷
B37	Br	硫代磷酸酯	腺苷
B38	I	硫代磷酸酯	腺苷
B39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	腺苷
B40	H	硫代磷酸酯	腺苷
B41	OH	二硫代磷酸酯	腺苷
B42	OMe	二硫代磷酸酯	腺苷
B43	F	二硫代磷酸酯	腺苷
B44	Cl	二硫代磷酸酯	腺苷
B45	Br	二硫代磷酸酯	腺苷
B46	I	二硫代磷酸酯	腺苷
B47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	腺苷
B48	H	二硫代磷酸酯	腺苷
B49	OH	甲基磷酸酯	腺苷
B50	OMe	甲基磷酸酯	腺苷
B51	F	甲基磷酸酯	腺苷
B52	Cl	甲基磷酸酯	腺苷
B53	Br	甲基磷酸酯	腺苷
B54	I	甲基磷酸酯	腺苷
B55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	腺苷
B56	H	甲基磷酸酯	腺苷
B57	OH	硼烷膦酸酯	腺苷
B58	OMe	硼烷膦酸酯	腺苷
B59	F	硼烷膦酸酯	腺苷
B60	Cl	硼烷膦酸酯	腺苷
B61	Br	硼烷膦酸酯	腺苷
B62	I	硼烷膦酸酯	腺苷
B63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	腺苷
B64	H	硼烷膦酸酯	腺苷
C1	OH	OH	胞苷
C2	OMe	OH	胞苷

[0074]

[0075]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
C3	F	OH	胞苷
C4	Cl	OH	胞苷
C5	Br	OH	胞苷
C6	I	OH	胞苷
C7	NH <sub>2</sub>	OH	胞苷
C8	H	OH	胞苷
C9	OH	磷酸二酯	胞苷
C10	OMe	磷酸二酯	胞苷
C11	F	磷酸二酯	胞苷
C12	Cl	磷酸二酯	胞苷
C13	Br	磷酸二酯	胞苷
C14	I	磷酸二酯	胞苷
C15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	胞苷
C16	H	磷酸二酯	胞苷
C17	OH	膦酰基乙酸酯	胞苷
C18	OMe	膦酰基乙酸酯	胞苷
C19	F	膦酰基乙酸酯	胞苷
C20	Cl	膦酰基乙酸酯	胞苷
C21	Br	膦酰基乙酸酯	胞苷
C22	I	膦酰基乙酸酯	胞苷
C23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	胞苷
C24	H	膦酰基乙酸酯	胞苷
C25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C27	F	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C30	I	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C32	H	硫代膦酰基乙酸酯	胞苷
C33	OH	硫代磷酸酯	胞苷
C34	OMe	硫代磷酸酯	胞苷
C35	F	硫代磷酸酯	胞苷
C36	Cl	硫代磷酸酯	胞苷
C37	Br	硫代磷酸酯	胞苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
C38	I	硫代磷酸酯	胞苷
C39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	胞苷
C40	H	硫代磷酸酯	胞苷
C41	OH	二硫代磷酸酯	胞苷
C42	OMe	二硫代磷酸酯	胞苷
C43	F	二硫代磷酸酯	胞苷
C44	Cl	二硫代磷酸酯	胞苷
C45	Br	二硫代磷酸酯	胞苷
C46	I	二硫代磷酸酯	胞苷
C47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	胞苷
C48	H	二硫代磷酸酯	胞苷
C49	OH	甲基磷酸酯	胞苷
C50	OMe	甲基磷酸酯	胞苷
C51	F	甲基磷酸酯	胞苷
C52	Cl	甲基磷酸酯	胞苷
C53	Br	甲基磷酸酯	胞苷
C54	I	甲基磷酸酯	胞苷
C55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	胞苷
C56	H	甲基磷酸酯	胞苷
C57	OH	硼烷膦酸酯	胞苷
C58	OMe	硼烷膦酸酯	胞苷
C59	F	硼烷膦酸酯	胞苷
C60	Cl	硼烷膦酸酯	胞苷
C61	Br	硼烷膦酸酯	胞苷
C62	I	硼烷膦酸酯	胞苷
C63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	胞苷
C64	H	硼烷膦酸酯	胞苷
D1	OH	OH	鸟苷
D2	OMe	OH	鸟苷
D3	F	OH	鸟苷
D4	Cl	OH	鸟苷
D5	Br	OH	鸟苷
D6	I	OH	鸟苷
D7	NH <sub>2</sub>	OH	鸟苷
D8	H	OH	鸟苷

[0076]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
D9	OH	磷酸二酯	鸟苷
D10	OMe	磷酸二酯	鸟苷
D11	F	磷酸二酯	鸟苷
D12	Cl	磷酸二酯	鸟苷
D13	Br	磷酸二酯	鸟苷
D14	I	磷酸二酯	鸟苷
D15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	鸟苷
D16	H	磷酸二酯	鸟苷
D17	OH	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D18	OMe	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D19	F	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D20	Cl	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D21	Br	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D22	I	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D24	H	膦酰基乙酸酯	鸟苷
D25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D27	F	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D30	I	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D32	H	硫代膦酰基乙酸酯	鸟苷
D33	OH	硫代磷酸酯	鸟苷
D34	OMe	硫代磷酸酯	鸟苷
D35	F	硫代磷酸酯	鸟苷
D36	Cl	硫代磷酸酯	鸟苷
D37	Br	硫代磷酸酯	鸟苷
D38	I	硫代磷酸酯	鸟苷
D39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	鸟苷
D40	H	硫代磷酸酯	鸟苷
D41	OH	二硫代磷酸酯	鸟苷
D42	OMe	二硫代磷酸酯	鸟苷
D43	F	二硫代磷酸酯	鸟苷

[0077]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
D44	Cl	二硫代磷酸酯	鸟苷
D45	Br	二硫代磷酸酯	鸟苷
D46	I	二硫代磷酸酯	鸟苷
D47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	鸟苷
D48	H	二硫代磷酸酯	鸟苷
D49	OH	甲基磷酸酯	鸟苷
D50	OMe	甲基磷酸酯	鸟苷
D51	F	甲基磷酸酯	鸟苷
D52	Cl	甲基磷酸酯	鸟苷
D53	Br	甲基磷酸酯	鸟苷
D54	I	甲基磷酸酯	鸟苷
D55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	鸟苷
D56	H	甲基磷酸酯	鸟苷
D57	OH	硼烷膦酸酯	鸟苷
D58	OMe	硼烷膦酸酯	鸟苷
D59	F	硼烷膦酸酯	鸟苷
D60	Cl	硼烷膦酸酯	鸟苷
D61	Br	硼烷膦酸酯	鸟苷
D62	I	硼烷膦酸酯	鸟苷
D63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	鸟苷
D64	H	硼烷膦酸酯	鸟苷
E1	OH	OH	2-硫尿苷
E2	OMe	OH	2-硫尿苷
E3	F	OH	2-硫尿苷
E4	Cl	OH	2-硫尿苷
E5	Br	OH	2-硫尿苷
E6	I	OH	2-硫尿苷
E7	NH <sub>2</sub>	OH	2-硫尿苷
E8	H	OH	2-硫尿苷
E9	OH	磷酸二酯	2-硫尿苷
E10	OMe	磷酸二酯	2-硫尿苷
E11	F	磷酸二酯	2-硫尿苷
E12	Cl	磷酸二酯	2-硫尿苷
E13	Br	磷酸二酯	2-硫尿苷
E14	I	磷酸二酯	2-硫尿苷

[0078]

[0079]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
E15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	2-硫尿苷
E16	H	磷酸二酯	2-硫尿苷
E17	OH	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E18	OMe	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E19	F	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E20	Cl	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E21	Br	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E22	I	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E24	H	膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E27	F	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E30	I	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E32	H	硫代膦酰基乙酸酯	2-硫尿苷
E33	OH	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E34	OMe	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E35	F	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E36	Cl	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E37	Br	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E38	I	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E40	H	硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E41	OH	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E42	OMe	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E43	F	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E44	Cl	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E45	Br	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E46	I	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E48	H	二硫代磷酸酯	2-硫尿苷
E49	OH	甲基磷酸酯	2-硫尿苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
E50	OMe	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E51	F	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E52	Cl	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E53	Br	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E54	I	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E56	H	甲基磷酸酯	2-硫尿苷
E57	OH	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E58	OMe	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E59	F	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E60	Cl	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E61	Br	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E62	I	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
E64	H	硼烷膦酸酯	2-硫尿苷
F1	OH	OH	4-硫尿苷
F2	OMe	OH	4-硫尿苷
F3	F	OH	4-硫尿苷
F4	Cl	OH	4-硫尿苷
F5	Br	OH	4-硫尿苷
F6	I	OH	4-硫尿苷
F7	NH <sub>2</sub>	OH	4-硫尿苷
F8	H	OH	4-硫尿苷
F9	OH	磷酸二酯	4-硫尿苷
F10	OMe	磷酸二酯	4-硫尿苷
F11	F	磷酸二酯	4-硫尿苷
F12	Cl	磷酸二酯	4-硫尿苷
F13	Br	磷酸二酯	4-硫尿苷
F14	I	磷酸二酯	4-硫尿苷
F15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	4-硫尿苷
F16	H	磷酸二酯	4-硫尿苷
F17	OH	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F18	OMe	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F19	F	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F20	Cl	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷

[0080]

[0081]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
F21	Br	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F22	I	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F24	H	膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F27	F	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F30	I	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F32	H	硫代膦酰基乙酸酯	4-硫尿苷
F33	OH	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F34	OMe	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F35	F	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F36	Cl	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F37	Br	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F38	I	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F40	H	硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F41	OH	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F42	OMe	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F43	F	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F44	Cl	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F45	Br	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F46	I	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F48	H	二硫代磷酸酯	4-硫尿苷
F49	OH	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F50	OMe	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F51	F	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F52	Cl	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F53	Br	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F54	I	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	4-硫尿苷

[0082]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
F56	H	甲基磷酸酯	4-硫尿苷
F57	OH	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F58	OMe	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F59	F	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F60	Cl	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F61	Br	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F62	I	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
F64	H	硼烷膦酸酯	4-硫尿苷
G1	OH	OH	2-氨基腺苷
G2	OMe	OH	2-氨基腺苷
G3	F	OH	2-氨基腺苷
G4	Cl	OH	2-氨基腺苷
G5	Br	OH	2-氨基腺苷
G6	I	OH	2-氨基腺苷
G7	NH <sub>2</sub>	OH	2-氨基腺苷
G8	H	OH	2-氨基腺苷
G9	OH	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G10	OMe	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G11	F	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G12	Cl	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G13	Br	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G14	I	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G16	H	磷酸二酯	2-氨基腺苷
G17	OH	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G18	OMe	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G19	F	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G20	Cl	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G21	Br	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G22	I	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G24	H	膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷

[0083]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
G27	F	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G30	I	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G32	H	硫代膦酰基乙酸酯	2-氨基腺苷
G33	OH	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G34	OMe	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G35	F	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G36	Cl	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G37	Br	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G38	I	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G40	H	硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G41	OH	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G42	OMe	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G43	F	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G44	Cl	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G45	Br	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G46	I	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G48	H	二硫代磷酸酯	2-氨基腺苷
G49	OH	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G50	OMe	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G51	F	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G52	Cl	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G53	Br	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G54	I	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G56	H	甲基磷酸酯	2-氨基腺苷
G57	OH	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G58	OMe	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G59	F	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G60	Cl	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G61	Br	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷

[0084]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
G62	I	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
G64	H	硼烷膦酸酯	2-氨基腺苷
H1	OH	OH	7-脱氮鸟苷
H2	OMe	OH	7-脱氮鸟苷
H3	F	OH	7-脱氮鸟苷
H4	Cl	OH	7-脱氮鸟苷
H5	Br	OH	7-脱氮鸟苷
H6	I	OH	7-脱氮鸟苷
H7	NH <sub>2</sub>	OH	7-脱氮鸟苷
H8	H	OH	7-脱氮鸟苷
H9	OH	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H10	OMe	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H11	F	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H12	Cl	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H13	Br	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H14	I	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H16	H	磷酸二酯	7-脱氮鸟苷
H17	OH	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H18	OMe	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H19	F	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H20	Cl	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H21	Br	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H22	I	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H24	H	膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H27	F	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H30	I	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷
H32	H	硫代膦酰基乙酸酯	7-脱氮鸟苷

[0085]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
H33	OH	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H34	OMe	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H35	F	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H36	Cl	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H37	Br	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H38	I	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H40	H	硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H41	OH	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H42	OMe	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H43	F	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H44	Cl	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H45	Br	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H46	I	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H48	H	二硫代磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H49	OH	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H50	OMe	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H51	F	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H52	Cl	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H53	Br	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H54	I	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H56	H	甲基磷酸酯	7-脱氮鸟苷
H57	OH	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H58	OMe	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H59	F	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H60	Cl	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H61	Br	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H62	I	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
H64	H	硼烷膦酸酯	7-脱氮鸟苷
I1	OH	OH	肌苷
I2	OMe	OH	肌苷
I3	F	OH	肌苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
I4	Cl	OH	肌苷
I5	Br	OH	肌苷
I6	I	OH	肌苷
I7	NH <sub>2</sub>	OH	肌苷
I8	H	OH	肌苷
I9	OH	磷酸二酯	肌苷
I10	OMe	磷酸二酯	肌苷
I11	F	磷酸二酯	肌苷
I12	Cl	磷酸二酯	肌苷
I13	Br	磷酸二酯	肌苷
I14	I	磷酸二酯	肌苷
I15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	肌苷
I16	H	磷酸二酯	肌苷
I17	OH	膦酰基乙酸酯	肌苷
I18	OMe	膦酰基乙酸酯	肌苷
I19	F	膦酰基乙酸酯	肌苷
I20	Cl	膦酰基乙酸酯	肌苷
I21	Br	膦酰基乙酸酯	肌苷
I22	I	膦酰基乙酸酯	肌苷
I23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	肌苷
I24	H	膦酰基乙酸酯	肌苷
I25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I27	F	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I30	I	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I32	H	硫代膦酰基乙酸酯	肌苷
I33	OH	硫代磷酸酯	肌苷
I34	OMe	硫代磷酸酯	肌苷
I35	F	硫代磷酸酯	肌苷
I36	Cl	硫代磷酸酯	肌苷
I37	Br	硫代磷酸酯	肌苷
I38	I	硫代磷酸酯	肌苷

[0086]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
I39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	肌苷
I40	H	硫代磷酸酯	肌苷
I41	OH	二硫代磷酸酯	肌苷
I42	OMe	二硫代磷酸酯	肌苷
I43	F	二硫代磷酸酯	肌苷
I44	Cl	二硫代磷酸酯	肌苷
I45	Br	二硫代磷酸酯	肌苷
I46	I	二硫代磷酸酯	肌苷
I47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	肌苷
I48	H	二硫代磷酸酯	肌苷
I49	OH	甲基磷酸酯	肌苷
I50	OMe	甲基磷酸酯	肌苷
I51	F	甲基磷酸酯	肌苷
I52	Cl	甲基磷酸酯	肌苷
I53	Br	甲基磷酸酯	肌苷
I54	I	甲基磷酸酯	肌苷
I55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	肌苷
I56	H	甲基磷酸酯	肌苷
I57	OH	硼烷膦酸酯	肌苷
I58	OMe	硼烷膦酸酯	肌苷
I59	F	硼烷膦酸酯	肌苷
I60	Cl	硼烷膦酸酯	肌苷
I61	Br	硼烷膦酸酯	肌苷
I62	I	硼烷膦酸酯	肌苷
I63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	肌苷
I64	H	硼烷膦酸酯	肌苷
J1	OH	OH	5-甲基胞苷
J2	OMe	OH	5-甲基胞苷
J3	F	OH	5-甲基胞苷
J4	Cl	OH	5-甲基胞苷
J5	Br	OH	5-甲基胞苷
J6	I	OH	5-甲基胞苷
J7	NH <sub>2</sub>	OH	5-甲基胞苷
J8	H	OH	5-甲基胞苷
J9	OH	磷酸二酯	5-甲基胞苷

[0087]

[0088]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
J10	OMe	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J11	F	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J12	Cl	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J13	Br	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J14	I	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J16	H	磷酸二酯	5-甲基胞苷
J17	OH	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J18	OMe	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J19	F	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J20	Cl	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J21	Br	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J22	I	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J24	H	膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J27	F	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J30	I	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J32	H	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基胞苷
J33	OH	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J34	OMe	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J35	F	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J36	Cl	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J37	Br	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J38	I	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J40	H	硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J41	OH	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J42	OMe	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J43	F	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J44	Cl	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷

[0089]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
J45	Br	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J46	I	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J48	H	二硫代磷酸酯	5-甲基胞苷
J49	OH	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J50	OMe	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J51	F	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J52	Cl	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J53	Br	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J54	I	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J56	H	甲基磷酸酯	5-甲基胞苷
J57	OH	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J58	OMe	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J59	F	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J60	Cl	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J61	Br	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J62	I	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
J64	H	硼烷膦酸酯	5-甲基胞苷
K1	OH	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K2	OMe	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K3	F	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K4	Cl	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K5	Br	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K6	I	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K7	NH <sub>2</sub>	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K8	H	OH	5-氨基烯丙基尿苷
K9	OH	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K10	OMe	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K11	F	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K12	Cl	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K13	Br	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K14	I	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷

[0090]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
K16	H	磷酸二酯	5-氨基烯丙基尿苷
K17	OH	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K18	OMe	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K19	F	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K20	Cl	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K21	Br	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K22	I	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K24	H	膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K27	F	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K30	I	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K32	H	硫代膦酰基乙酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K33	OH	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K34	OMe	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K35	F	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K36	Cl	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K37	Br	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K38	I	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K40	H	硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K41	OH	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K42	OMe	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K43	F	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K44	Cl	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K45	Br	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K46	I	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K48	H	二硫代磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K49	OH	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K50	OMe	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
K51	F	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K52	Cl	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K53	Br	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K54	I	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K56	H	甲基磷酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K57	OH	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K58	OMe	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K59	F	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K60	Cl	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K61	Br	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K62	I	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
K64	H	硼烷膦酸酯	5-氨基烯丙基尿苷
L1	OH	OH	5-甲基尿苷
L2	OMe	OH	5-甲基尿苷
L3	F	OH	5-甲基尿苷
L4	Cl	OH	5-甲基尿苷
L5	Br	OH	5-甲基尿苷
L6	I	OH	5-甲基尿苷
L7	NH <sub>2</sub>	OH	5-甲基尿苷
L8	H	OH	5-甲基尿苷
L9	OH	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L10	OMe	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L11	F	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L12	Cl	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L13	Br	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L14	I	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L15	NH <sub>2</sub>	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L16	H	磷酸二酯	5-甲基尿苷
L17	OH	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L18	OMe	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L19	F	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L20	Cl	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L21	Br	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷

[0091]

[0092]

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
L22	I	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L23	NH <sub>2</sub>	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L24	H	膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L25	OH	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L26	OMe	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L27	F	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L28	Cl	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L29	Br	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L30	I	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L31	NH <sub>2</sub>	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L32	H	硫代膦酰基乙酸酯	5-甲基尿苷
L33	OH	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L34	OMe	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L35	F	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L36	Cl	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L37	Br	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L38	I	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L39	NH <sub>2</sub>	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L40	H	硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L41	OH	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L42	OMe	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L43	F	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L44	Cl	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L45	Br	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L46	I	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L47	NH <sub>2</sub>	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L48	H	二硫代磷酸酯	5-甲基尿苷
L49	OH	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L50	OMe	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L51	F	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L52	Cl	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L53	Br	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L54	I	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L55	NH <sub>2</sub>	甲基磷酸酯	5-甲基尿苷
L56	H	甲基膦酸酯	5-甲基尿苷

#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	B
[0093]	L57	OH	硼烷膦酸酯
	L58	OMe	硼烷膦酸酯
	L59	F	硼烷膦酸酯
	L60	Cl	硼烷膦酸酯
	L61	Br	硼烷膦酸酯
	L62	I	硼烷膦酸酯
	L63	NH <sub>2</sub>	硼烷膦酸酯
	L64	H	硼烷膦酸酯
			5-甲基尿苷

[0094] 如本文所述,一些非天然碱基对(例如isoG和isoC,Z碱基和P碱基;参见Zhang等(2015)J.Am.Chem.Soc.)可能有利于影响指导RNA二级结构的热稳定性。这些修饰可用于防止指导RNA骨架与指导RNA序列的其他域的错误折叠。

[0095] 最近的指导RNA:Cas9蛋白结构信息(图10,如Jiang等,2015,Science报道的),以及体内/体外功能突变研究(参见例如Briner等,2014,Mol.Cell,56,333-9)表明指导RNA骨架主要在结构上是保守的。这加强了指导RNA的保守域的正确折叠对于与Cas9发挥功能的重要性。图10显示了指导RNA骨架二级结构,显示与Cas9的氨基酸的相互作用。大多数指导RNA含氮碱基不涉及与Cas9蛋白的结合相互作用。

[0096] sgRNA骨架的侧翼序列增加错误折叠的可能性,从而增加误差。20nt指导靶序列,骨架区的5',是用户指定针对各靶标的,从而错配的可能性是可变的或靶标特异性的。此外,许多新兴的CRISPR-Cas应用附加了骨架的功能序列3',例如CRISPR显示(Schechner等,Nat.Methods 2015)和CRISPR-i/-a(Chen等,Cell 2013),其是核糖开关或适配体,其也需要正确和独立地折叠才能正常工作。为了确保给定sgRNA的每个功能域(即靶向指导,骨架,适配体)以模块化、独立的方式折叠,结构上保守的骨架碱基对可被非天然的正交碱基对(例如isoG和isoC;Z碱基和P碱基)取代,并且在一些实施方案中,仅被非天然正交碱基对取代。这确保了sgRNA骨架序列将不会在二级结构中稳定地与靶标配对的指导序列的元件或并入指导RNA中的其他非天然域(如任何适配体序列或指导RNA上的任何非天然的5'或3'凸出)相互作用。或者,上述非天然正交碱基对可被并入可能存在的任何非天然凸出或适配体中,从而防止涉及骨架序列错折叠的二级结构。

[0097] B. 具有至少一个修饰的指导RNA

[0098] 在一个方面,本技术提供具有至少一个修饰的指导RNA,构成修饰的gRNA。

[0099] 在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的核苷酸。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所有核苷酸都是修饰的。在一些实施方案中,所有修饰都是相同的。在一些实施方案中,所有修饰的核苷酸具有相同类型的修饰。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含不同修饰的核苷酸的组合。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含两个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含三个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核

昔酸是连续排列的。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含至少一个连续的修饰的核昔酸段。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的核昔酸的连续段。各个修饰的核昔酸可独立地包含一个或多个类型的修饰。在一些实施方案中,在修饰的gRNA的序列中,修饰的核昔酸都不是连续的,或者一部分连续但非全部连续。

[0100] 在一些实施方案中,修饰在指导RNA的5'部分内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的5'部分的前5个(5)核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的5'部分的前3个(3)核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的3'部分的最后5个(5)核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的3'部分的最后3个(3)核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的内部区域(即5'端至3'端之间)内。

[0101] 在一些实施方案中,修饰整合于指导RNA的5'部分或3'部分中,尤其是在5'部分的前5或10个核昔酸内或在3'部分的最后5或10个核昔酸内,以例如保护RNA不被核酸酶降解或出于其他目的。在一些其他实施方案中,修饰在指导RNA的5'部分和3'部分二者中,尤其是在5'部分的前5或10个核昔酸内或在3'部分的最后5或10个核昔酸内,以例如保护RNA不被核酸酶降解或出于其他目的。在一些实施方案中,指导RNA的5'部分和3'部分二者均存在中超过一个类型的修饰。在一些实施方案中,修饰定位在指导RNA的5'端处、3'端处及内部序列中。在一些实施方案中,指导RNA在指导RNA的5'部分和3'部分中包含40个或更少、或20个或更少、或15个或更少、或10个或更少、或5个或更少、或3或更少个脱氧核糖核昔酸残基。

[0102] 在一些实施方案中,修饰在指导RNA的crRNA区段内。在一些实施方案中,修饰在crRNA的指导序列内。在一些实施方案中,修饰在crRNA区段的前五(5)个核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在crRNA区段的前三(3)个核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在crRNA区段上的5'-凸出内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的tracrRNA区段内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后五(5)个核昔酸内。在一些实施方案中,修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后三(3)个核昔酸内。在一些实施方案中,当指导RNA是单一指导RNA时,修饰位于指导RNA的环内。在一些实施方案中,一个或多个修饰在环L区内。在一些实施方案中,修饰包括染料,非荧光标记或标签,其缀合至整合于如上所述的两个核昔酸之间的接头,例如通过缀合至2-(3-(染料/标记/标签)酰胺基)丙酰胺基)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头或缀合至环或L区中的核昔酸的修饰碱基。

[0103] 在一些实施方案中,修饰包括末端修饰如5'端修饰或3'端修饰。末端修饰的实例包括但不限于磷酸化(作为天然磷酸酯或多磷酸酯或作为修饰的磷酸酯基团,例如烷基膦酸酯,膦酰基羧酸酯,膦酰基乙酸酯,硼烷膦酸酯,硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯等),生物素化,缀合或缀合的分子,接头,染料,标记,标签,官能团(例如但不限于5'-氨基,5'-硫代,5'-酰氨基,5'-羧基等),反式连接,或烃模块,其可包含醚,聚乙二醇(PEG),酯,羟基,芳基,卤素,磷酸二酯,双环,杂环或其它有机官能团。在一些实施方案中,末端修饰包括二甲氧基三苯甲基。

[0104] 在一些实施方案中,修饰包括修饰的碱基。如本文所用,“未修饰的”碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T),胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。修饰的碱

基的实例包括但不限于合成的和天然的碱基,例如2-硫代U,2-硫代C,4-硫代U,6-硫代G,2-氨基A,2-氨基P,假尿嘧啶,次黄嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-甲基C,5-甲基U,5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基U,5-烯丙基C,5-氨基烯丙基-尿嘧啶和5-氨基烯丙基-胞嘧啶。在一些实施方案中,修饰包括无碱基核苷酸。在一些实施方案中,修饰包括非标准嘌呤或嘧啶结构,例如Z或P,isoC或isoG,UNA,5-甲基吡喃,x(A,G,C,T)或y(A,G,C,T)。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的碱基。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的碱基。在一些实施方案中,gRNA中所有碱基都是修饰的。

[0105] 在一些实施方案中,修饰包括修饰的糖。修饰的糖的实例包括但不限于具有2'位置处修饰或4'位置处修饰的糖。例如,在一些实施方案中,糖包括2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基,例如2'-0-甲基(2'-0Me)。在一些实施方案中,糖包括2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基,例如2'-甲氧基乙氧基(2'-0-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>),也称为2'-0-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE。在一些实施方案中,糖包含2'-卤素,如2'-F,2'-Br,2'-Cl或2'-I。在一些实施方案中,糖包含2'-NH<sub>2</sub>。在一些实施方案中,糖包含2'-H(例如脱氧核糖核苷酸)。在一些实施方案中,糖包含2'-阿拉伯糖或2'-F-阿拉伯糖。在一些实施方案中,糖包含2'-LNA或2'-ULNA。在一些实施方案中,糖包含4'-硫代核糖基。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的糖。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的糖。在一些实施方案中,gRNA中的所有糖都是修饰的。

[0106] 在一些实施方案中,修饰包括修饰的主链(即天然磷酸二酯以外的核苷酸间连接)。修饰的核苷酸间键连接的实例包括但不限于硫代磷酸酯核苷酸间连接,手性硫代磷酸酯核苷酸间连接,二硫代磷酸酯核苷酸间连接,硼烷膦酸酯核苷酸间连接,C<sub>1-4</sub>烷基膦酸酯核苷酸间连接,例如甲基膦酸酯核苷酸间连接,硼烷膦酸酯核苷酸间连接,膦酰基羧酸酯核苷酸间连接,如膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,膦酰基羧酸酯核苷酸间连接如膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,硫代膦酰基羧酸核苷酸间连接,如硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,硫代膦酰基羧酸酯核苷酸间连接如硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接。还包括各种盐,混合盐和游离酸形式。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的核苷酸间连接。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的核苷酸间连接。在一些实施方案中,gRNA中的所有核苷酸间连接都是修饰的。

[0107] 在一些实施方案中,修饰是2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基,2'-H,2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基,2'-F,2'-NH<sub>2</sub>,2'-阿拉伯糖,2'-F-阿拉伯糖,2'-LNA,2'-ULNA,4'-硫代核糖基,2-硫代U,2-硫代C,4-硫代U,6-硫代G,2-氨基A,2-氨基P,假尿嘧啶,次黄嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-MeC,5-MeU,5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基

尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基U,5-烯丙基C,5-氨基烯丙基-尿嘧啶,5-氨基烯丙基-胞嘧啶,无碱基核苷酸,Z,P,UNA,isoC,isoG,5-甲基-嘧啶,x(A,G,C,T),y(A,G,C,T),3'-硫代磷酸酯基团,3'-膦酰基乙酸酯基团,3'-膦酰基乙酸酯基团,3'-硫代膦酰基乙酸酯基团,3'-硫代膦酰基乙酸酯基团,3'-甲基膦酸酯基团,3'-硼烷膦酸酯基团,3'-二硫代磷酸酯基或其组合。

[0108] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-0-甲基-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-0-甲基-3'-硫代膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含Z碱基。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-卤-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-卤-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-氟-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-氟-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含2'-氟-3'-硫代膦酰基乙酸酯。

[0109] 在一些实施方案中,指导RNA包含式(I)所示的寡核苷酸:

[0110] W-Y或Y-W (I)

[0111] 其中W代表包含至少一个修饰的寡核苷酸的核苷酸或核苷酸段,而Y代表寡核苷酸未修饰的部分。

[0112] 在一些实施方案中,W在指导RNA的5'部分内。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸中。在一些实施方案中,W在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸中。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸中。在一些实施方案中,W在指导RNA的内部区域(即5'端和3'端之间)内。

[0113] 在一些实施方案中,W包含如上所述的末端修饰,例如5'端修饰或3'端修饰。在一些实施方案中,末端修饰包括二甲氧基三苯甲基。

[0114] 在一些实施方案中,W包含如上所述的修饰碱基。在一些实施方案中,W包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰碱基。在其他实施方案中,W包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰碱基。在一些实施方案中,gRNA中的所有碱基都是修饰的。

[0115] 在一些实施方案中,W包含上所述的修饰的糖。在一些实施方案中,W包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的糖。在其他实施方案中,W包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的糖。在一些实施方案中,gRNA中的所有的糖都是修饰的。

[0116] 在一些实施方案中,W包含上所述的修饰的主链(即磷酸二酯以外的核苷酸间连接)。在一些实施方案中,W包含多于1个,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个修饰的核苷酸间连接。在其他实施方案中,W包含至少55、60、

65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的核苷酸间连接。在一些实施方案中, gRNA中的所有的核苷酸间连接都是修饰的。

[0117] 在一些实施方案中,W包含2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基,2'-H,2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基,2'-F,2'-NH<sub>2</sub>,2'-阿拉伯糖,2'-F-阿拉伯糖,2'-LNA,2'-ULNA,4'-硫代核糖基,2-硫代U,2-硫代C,4-硫代U,6-硫代G,2-氨基A,2-氨基P,假尿嘧啶,次黄嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-MeC,5-MeU,5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基U,5-烯丙基C,5-氨基烯丙基-尿嘧啶,5-氨基烯丙基-胞嘧啶,无碱基核苷酸,Z,P,UNA,isoC,isoG,5-甲基-嘧啶,x(A,G,C,T),y(A,G,C,T),硫代磷酸酯核苷酸间连接,膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,硫代膦酰乙酸酯核苷酸间连接,甲基膦酸酯核苷酸间连接,硼烷膦酸酯核苷酸间连接接,二硫代磷酸酯核苷酸间连接,或其组合。

[0118] 在一些实施方案中,W包含相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,W包含相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-膦酰基乙酸酯基团。一些实施方案中,W包含相同核苷酸上的2'-F和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,W包含相同核苷酸上的2'-F和3'-膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,W包含相同核苷酸上的2'-F和3'-硫代膦酰基乙酸酯基团。

[0119] 在一些实施方案中,W包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,每个修饰的核苷酸都包含相同的修饰。在一些实施方案中,W包含多种修饰的核苷酸的组合。在一些实施方案中,W包含两个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,W包含三个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,由于一个或多个未修饰的核苷酸可能会介于中间(intercede),所述修饰的核苷酸在序列中不连续排列或者至少不完全连续排列。在一些实施方案中,修饰的核苷酸连续排列。在一些实施方案中,W包含至少一个修饰核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W包含至少三(3)个修饰核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W包含至少四(4)个修饰核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W包含至少五(5)个修饰核苷酸的连续段。

[0120] 在一些实施方案中,指导RNA包含式(II)所示的寡核苷酸:

[0121] M<sub>m</sub>N<sub>n</sub> (II)

[0122] 其中各个N独立地表示未修饰的核糖核苷酸;

[0123] 其中各个M表示修饰的核苷酸,并且独立地选自下组:2'-0-甲基核糖核苷酸,3'-P(S)核糖核苷酸,3'-PACE核糖核苷酸,3'-硫代PACE核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-P(S)-核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸,Z核苷酸和2'-脱氧核苷酸;

[0124] 其中各个M处于指导RNA的序列的任何位置;

[0125] 其中任何给定的M与任何其它M相同或不同,并且任何给定的N与任何其它N相同或不同;和

[0126] 其中m和n各自独立地选自0至219的整数,条件是50< m+n≤220,且m不为0。

[0127] 在一些实施方案中,m+n<150。

[0128] 在一些实施方案中,每个M由一个或多个独立地选自下组的模块修饰:2'-F,2-硫尿嘧啶,4-硫尿嘧啶,2-氨基腺嘌呤,次黄嘌呤,5-甲基胞嘧啶,5-甲基尿嘧啶,5-烯丙基氨基尿嘧啶,方酸连接,三唑连接和2-(4-丁基酰胺荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)连接。在一些实施方案中,M包含通过接头连接的染料。

[0129] 在一些实施方案中,每个M独立地选自下组:2'-0-甲基核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸和2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中,每个M独立地选自下组:2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸和2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸。

[0130] 在一些实施方案中,当m>1,任何给定的M与任何其他M相同或不同。在一些实施方案中,当m>1,每个M具有相同的修饰。

[0131] 在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,m选自1至10的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,m选自1至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,并且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,m选自2至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,并且n选自1至148的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。

[0132] 在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸,m选自1至10的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,并且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸,m选自1至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,并且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸,m选自2至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,并且n选自1至148的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。

[0133] 在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基核糖核苷酸,m选自1至40的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基核糖核苷酸,m选自1至25的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基核糖核苷酸,m选自1至20的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。在一些实施方案中,m是10。在一些实施方案中,m是15。在一些实施方案中,m为20。在一些实施方案中,m是30。在一些实施方案中,m是40。

[0134] 在一些实施方案中,每个M是2'-脱氧核苷酸,m选自1至30的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是2'-脱氧核苷酸,m选自1至20的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是5。在一些实施方案中,m是10。在一些实施方案中,m是15。在一些实施方案中,m是20。在一些实施方案中,m是30。

[0135] 在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核苷酸,m选自1至10的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案

中,每个M是2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核苷酸,m选自1至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。

[0136] 在一些实施方案中,每个M是Z核苷酸,m选自1至10的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,每个M是Z核苷酸,m选自1至5的整数,每个N独立地选自A、U、C和G,且n选自1至149的整数,条件是 $50 < m+n \leq 150$ 。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。

[0137] 在一些实施方案中,修饰是改变稳定性的修饰。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰提高指导RNA的核酸酶抗性,从而增强指导RNA的稳定性。在一些实施方案中,改变稳定性的修饰是增强稳定性的修饰。例如,在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2'-0-甲基或2'-0-C<sub>1-4</sub>烷基核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2'-卤素核苷酸,如2'-F,2'-Br,2'-Cl或2'-I。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2' MOE或2'-0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2'-NH<sub>2</sub>核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2'-H(或2'-脱氧)核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括2'-阿拉伯糖或2-F-阿拉伯糖。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括4'-硫代核糖基糖模块。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括3'-膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括含有3'-硫代膦酰基乙酸酯基团的核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括含有3'-甲基膦酸酯基团的核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括含有3'-硼烷磷酸酯基团的核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包含含有3'-二硫代磷酸酯基团的核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括锁核酸("LNA")核苷酸。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括非锁核酸("ULNA")核苷酸。

[0138] 在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-硫代膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-氟和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-氟和3'-膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,增强稳定性的修饰包括相同核苷酸上的2'-氟和3'-硫代膦酰基乙酸酯基团。

[0139] 在一些实施方案中,修饰是改变特异性的修饰。在一些实施方案中,可通过增强中靶结合和/或切割,或减少脱靶结合和/或切割或二者的组合来实现特异性增强。在一些其它实施方案中,可例如通过减少中靶结合和/或切割,或增加脱靶结合和/或切割或二者的组合来实现特异性降低。

[0140] 在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括2'-0-甲基。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括2'-卤素,例如2'-氟。

[0141] 在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括2-硫尿嘧啶碱基(2-硫代U)。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括2-硫代C。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括4-硫代U。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括6-硫代G。在一些实施方案中,改变特异

性的修饰包括2-氨基A。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括2-氨基嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括假尿嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括次黄嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括7-脱氮鸟嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括7-脱氮腺嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-甲基C。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-甲基U。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-羟甲基胞嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5,6-脱氢尿嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-丙炔基胞嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-乙炔基胞嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-乙炔尿嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-烯丙基U。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-烯丙基C。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-氨基烯丙基U。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-氨基烯丙基C。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括无碱基核苷酸。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括Z碱基。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括P碱基。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括isoC。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括isoG。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括5-甲基-嘧啶。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括x(A,G,C,T)。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括y(A,G,C,T)。

[0142] 在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括硫代磷酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括膦酰基乙酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括硫代膦酰基乙酸核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括甲基膦酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括硼烷磷酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包含二硫代磷酸核苷酸间连接。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括ULNA。在一些实施方案中,改变特异性的修饰包括LNA。

[0143] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰通过例如改变指导RNA的解链温度( $T_m$ )来改变RNA碱基配对。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰降低指导RNA的 $T_m$ 。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修改提高指导RNA的 $T_m$ 。

[0144] 在一些实施方案中,改变特异性的修饰降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是2'-脱氧基,因为本领域众所周知的是,DNA/DNA碱基对具有比其相应的RNA/DNA双链体更低的 $T_m$ 。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是2-硫尿嘧啶,其轻微降低G-U摇摆配对的 $T_m$ 。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是硫代磷酸酯核苷酸间连接或二硫代磷酸酯核苷酸间连接,其每个修饰使 $T_m$ 降低~0.5°C。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是硼烷膦酸酯核苷酸间连接,其每个修饰使 $T_m$ 降低~0.5~0.8°C。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,其每个修饰将 $T_m$ 降低~1.3°C。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是非锁核酸(“ULNA”),其每个修饰将 $T_m$ 降低~5~8°C。在一些实施方案中,降低碱基配对相互作用的 $T_m$ 的修饰是2'-0-甲基-3'-甲基膦酸酯。

[0145] 在一些实施方案中,改变特异性的修饰提高碱基配对相互作用的Tm。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是2'-0-甲基,其每个修饰将Tm提高~0.5-0.7°C。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是2'-F,其每个修饰使Tm提高~1°C。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是2-硫尿嘧啶,其提高A-U配对的Tm(并且如上所述,略微降低G-U摇摆配对的Tm)。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是4-硫尿嘧啶,其提高G-U摇摆对的Tm并轻微提高A-U对的Tm。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是2-氨基-腺嘌呤,其每个修饰将其与U配对的碱基的Tm提高~1°C。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是5-甲基-尿嘧啶(5-甲基U)(参见例如Wang&Kool(1995) *Biochemistry*, 34, 4125-32)。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是5-甲基-胞嘧啶(5-甲基C)。在一些实施方案中,提高碱基配对相互作用的Tm的修饰是锁核酸("LNA"),其每个修饰将Tm提高2-10°C。

[0146] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰改变指导RNA的转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰提高指导RNA的转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰降低指导的转染效率。在一些实施方案中,修饰中和磷酸盐上的阴离子电荷,允许被动扩散进入细胞。在一些实施方案中,中和电荷的修饰包括膦酰基乙酸酯烷基酯核苷酸间连接,如膦酰基乙酸甲酯核苷酸间连接。

[0147] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰改变指导RNA的免疫刺激作用。最初发现非甲基化的细菌DNA及其合成类似物是TLR9的配体(参见Hemmi等(2000) *Nature*, 408, 740-5)。可在二核苷酸基序中减轻TLR9的刺激,例如通过修饰C和G残基。使用5-甲基胞嘧啶,2-氨基胞嘧啶,2-硫代胞嘧啶,5-甲基异胞嘧啶,P-核碱基(6-( $\beta$ -D-2'-脱氧呋喃核糖基)-3,4-二氢-8H-嘧啶并[4,5-c][1,2]噁嗪-7-酮)和2'-0-甲基胞嘧啶均导致TLR9刺激的损失或减少。在一些实施方案中,使用6-硫鸟嘌呤,2,6-二氨基嘌呤,2-氨基嘌呤,黄嘌呤,肌苷,7-脱氮黄嘌呤,异鸟嘌呤,8-氨基鸟嘌呤,水粉蕈素(nebularine),8-溴鸟嘌呤,K-核碱基(2-氨基-N-甲氧基腺苷)和/或2'-0-甲基鸟嘌呤可导致TLR9刺激的损失或减少。在一些实施方案中,使用磷酸二酯修饰可降低或消除TLR9应答。通常,合成并入的硫代磷酸酯可以有限的程度降低TLR9响应,这被认为是由合成RNA中每个硫代磷酸酯的两个立体异构体的存在而导致的。然而,已显示缺乏CpG基序的硫代磷酸酯修饰的DNA刺激TLR9至相当小的程度。磷上的负电荷是通过TLR9识别的重要元素,因此使用烷基膦酸酯去除负电荷可导致TLR9刺激的损失或减少。在5'和3'末端序列中的脱氧核苷之间使用膦酰基乙酸酯(PACE)核苷酸间连接可显著增加TLR9响应;然而,在5'和3'末端序列中的脱氧核苷之间使用硫代膦酰基乙酸酯(硫代PACE)核苷酸间连接可以导致TLR9刺激的损失或减少。在一些实施方案中,使用有利于C3'-endo构象的糖修饰(如2'-0-甲基修饰)可在5'和3'末端掺入以降低TLR9响应。TLR7和TLR8可由含有7-脱氮鸟嘌呤和单链RNA的分子刺激(参见例如Heil等(2004) *Science*, 303, 1526-9)。TLR3涉及病毒来源的双链RNA的细胞免疫反应。在一些实施方案中,例如可通过使用2'-0-甲基修饰,含硫的修饰的磷酸二酯键或降低核苷酸负电荷的修饰(如甲基膦酸酯和/或膦酰基乙酸酯核苷酸间连接)来减轻TLR响应。

[0148] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰增强指导RNA的稳定性和特异性。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰增强指导RNA的稳定性和转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰增强指导RNA的特异性和转染效率。在一

些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,修饰增强指导RNA的整体功效。

[0149] C. 具有修饰组合的指导RNA

[0150] 一方面,本技术提供具有两个或更多个修饰的组合的指导RNA。

[0151] 在一些实施方案中,两个修饰是相同的核苷酸(例如一个核苷酸包含2'-0-甲基和3'-硫代磷酸基乙酸酯模块)。在其它实施方案中,两个修饰在两个不同的核苷酸上(例如一个核苷酸具有2-硫代U碱基,另一个核苷酸具有2'-0-甲基基团)。

[0152] 在一些实施方案中,指导RNA的每个修饰是相同的。在一些实施方案中,指导RNA中的至少一个修饰与指导RNA中的至少一个其他修饰不同。在一些实施方案中,指导RNA中的单个核苷酸具有两个或更多个修饰。

[0153] 在一些实施方案中,指导RNA包含不同类型修饰的组合,且组合中至少有一个类型存在于指导RNA的多个位置。在一些实施方案中,组合中的至少一种类型在指导RNA中出现1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次。

[0154] 在一些实施方案中,组合中的至少一种类型的修饰出现在两个或更多个修饰的核苷酸中。在一些实施方案中,组合中的至少一种类型的修饰出现在三个或更多个修饰的核苷酸中。在一些实施方案中,由于一个或多个未修饰的核苷酸可能介于其间,所述修饰的核苷酸在序列中是不连续排列的或者至少不完全连续排列的。在一些实施方案中,修饰的核苷酸连续排列。在一些实施方案中,指导RNA包含相同类型的连续的修饰的核苷酸段。在一些实施方案中,所述段具有至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40个修饰的核苷酸。

[0155] 在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的5'部分内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中的至少一种类型的修饰在指导RNA的内部区域(即5'端和3'端之间)内。

[0156] 在一些实施方案中,组合中的至少一种类型的修饰整合入指导RNA的5'或3'部分,特别是在5'部分的前5个或10个核苷酸内,或在3'部分的最后5个或10个核苷酸内,以例如保护RNA免受核酸酶降解或用于其它目的。在一些实施方案中,组合中的至少一种类型的修饰在5'部分内且组合中的至少一种类型的修饰在指导RNA的3'部分内,尤其是在5'部分的前5个或10个核苷酸内和在3'部分的最后5个或10个核苷酸内,以例如保护RNA不被核酸酶降解或用于其他目的。在一些实施方案中,指导RNA在指导RNA的5'部分中包含20个或更少,或15个或更少,或15个或更少,或10个或更少,或5个或更少,或3个或更少的脱氧核糖核苷酸残基。

[0157] 在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的crRNA区段内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在crRNA的指导序列中。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在crRNA区段的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在crRNA区段的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的tracrRNA区段内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的

修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,组合中至少一种类型的修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后三(3)个核苷酸内。

[0158] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分内,组合中的第二种修饰类型在指导RNA的内部区域内(即5'端和3'端之间)。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸内。

[0159] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型的修饰类型在指导RNA的内部区域内(即5'端和3'端之间),组合中的第二种类型的修饰类型在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,第二种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第二种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸内。

[0160] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型的修饰类型在指导RNA的5'部分内,组合中的第二种类型的修饰在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,第二种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第二种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸内。

[0161] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分内,组合中的第二种类型的修饰在内部区域内(即在5'端和3'端之间),并且组合中的第三种类型的修饰在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,第三种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第三种类型的修饰在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸内。

[0162] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型的修饰在指导RNA的crRNA区段内,组合中的第二种类型的修饰在tracr区段内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA的指导序列内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,第二种类型的修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第二种修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后三(3)个核苷酸内。

[0163] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型和第二种类型的修饰在指导RNA的crRNA区段内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在指导序列的crRNA内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前三(3)个核苷酸内。

[0164] 在一些实施方案中,组合中的第一种类型和第二种类型的修饰在指导RNA的crRNA区段内,组合中的第三种类型的修饰类型在tracr区段内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA的指导序列内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第一种类型的修饰在crRNA区段的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,第三种类型的修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,第三种类型的修饰在指导RNA的tracrRNA区段的最后三(3)个核苷酸内。

[0165] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括如上所述的末端修饰(如5'端修饰或3'端修饰)。在一些实施方案中,末端修饰包括二甲氧基三苯甲基。

[0166] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括修饰的碱基。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40个修饰的碱基。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的碱基。在一些实施方案中,gRNA中所有的碱基都是修饰的。

[0167] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括修饰的糖。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40个修饰的糖。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的糖。在一些实施方案中,gRNA中所有的糖都是修饰的。

[0168] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括修饰的主链(即天然磷酸二酯以外的核苷酸间连接)。在一些实施方案中,修饰的gRNA包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40个修饰的核苷酸间连接。在其他实施方案中,修饰的gRNA包含至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130或140个修饰的核苷酸间连接。在一些实施方案中,gRNA中所有的核苷酸间连接都是修饰的。

[0169] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-0-甲基,2'-氟,2'-氨基,2'-脱氧基,2'-阿拉伯糖,2-F-阿拉伯糖,2-硫尿嘧啶,2-氨基腺嘌呤,5-甲基胞嘧啶,5-氨基烯丙基尿嘧啶,Z碱基,3'-硫代磷酸酯,3'-膦酰基乙酸酯,3'-膦酰基乙酸酯,3'-硫代膦酰基乙酸酯,3'-硫代膦酰基乙酸酯,3'-甲基膦酸酯,3'-硼烷膦酸酯,3'-二硫代磷酸酯或其组合。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-0-甲基,2'-脱氧基,Z碱基,硫代磷酸酯核苷酸间连接,膦酰基乙酸酯核苷酸连接,硫代膦酰基乙酸核苷酸连接,或其组合。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-F,2-硫代U,4-硫代U,2-氨基A,5-甲基C,5-甲基U,5-氨基烯丙基U或其组合。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰是“末端”修饰,例如末端磷酸酯,PEG,末端胺,末端接头如烃接头,取代的烃接头,方酸接头,三唑接头,内部接头如2-(4-丁基氨基荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头,与染料缀合的接头,与非荧光标记缀合的接头,与标签缀合的接头或与固体支持物(例如珠粒或微阵列)缀合的接头。在一些实施方案中,组合中的至少两个修饰包含2'-0-甲基核苷酸和硫代磷酸酯核苷酸间连接,2'-0-甲基核苷酸和膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,或2'-0-甲基核苷酸和硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,组合中的至少两个修饰包含2'-0-甲基核苷酸和膦酰基羧酸酯核苷酸间连接,2'-0-甲基核苷酸和膦酰基羧酸酯核苷酸间连接,2'-0-甲基核苷酸和硫代膦酰基羧酸酯核苷酸间连接,或其组合。在其它实施方案中,组合中的修饰还包括2-硫尿嘧啶,2-硫代胞嘧啶,4-硫尿嘧啶,6-硫鸟嘌呤,2-氨基腺嘌呤,2-氨基嘌呤,假尿嘧啶,肌苷,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,5-甲基胞嘧啶,5-甲基尿嘧啶,5-羟甲基胞嘧啶,5-羟甲基尿嘧啶,5,6-脱氢尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-乙炔基胞嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,5-烯丙基尿嘧啶,5-烯丙基胞嘧啶,5-氨基烯丙基-

尿嘧啶,5-氨基烯丙基-胞嘧啶或无碱基核苷酸。

[0170] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-0-甲基-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-0-甲基-3'-硫代膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括2'-卤-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包括2'-卤-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-卤-3'-硫代膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-氟-3'-硫代磷酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-氟-3'-膦酰基乙酸酯。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰包含2'-氟-3'-硫代膦酰基乙酸酯。至少两个或三个修饰的可能组合分别示于图6和图7中,并通过提述并入本文。

[0171] 在一些实施方案中,指导RNA包含如式(III)或式(IV)所示的寡核苷酸:

[0172] W-Y-Q(III);或

[0173] Y-W-X-Q(IV)

[0174] 其中Q和W各自独立地表示包含至少一个修饰的寡核苷酸的核苷酸或核苷酸段,且Y和X各自独立地表示寡核苷酸的未修饰部分。

[0175] 在一些实施方案中,W在指导RNA的5'部分内。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的5'部分的前五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,W至少部分在指导RNA的5'部分的前三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,W在指导RNA的内部区域(即5'端和3'端之间)内。

[0176] 在一些实施方案中,Q在指导RNA的3'部分内。在一些实施方案中,Q至少部分在指导RNA的3'部分的最后五(5)个核苷酸内。在一些实施方案中,Q至少部分在指导RNA的3'部分的最后三(3)个核苷酸内。在一些实施方案中,Q在指导RNA的内部区域(即5'端和3'端之间)内。

[0177] 在一些实施方案中,W包含如上所述的末端修饰,如5'端或3端修饰。在一些实施方案中,末端修饰包括二甲氧基三苯甲基。

[0178] 在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含如上所述的修饰的碱基。在一些实施方案中,W或Q中至少一个包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个修饰的碱基。在一些实施方案中,W或Q中至少一个包含多余一个修饰的碱基,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个修饰的碱基。

[0179] 在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含如上所述的修饰的糖。在一些实施方案中,W或Q中至少一个包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个修饰的糖。在一些实施方案中,W或Q中至少一个包含多于一个修饰的糖,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个修饰的糖。

[0180] 在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含如上所述的修饰的主链(即磷酸二酯以外的核苷酸间连接)。在一些实施方案中,W或Q中至少一个包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个修饰的核苷酸间连接。在一些实施方

案中,W或Q中至少一个包含多于一个,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个修饰的糖。

[0181] 在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含2'-0-甲基核苷酸,2'-F核苷酸,2'-氨基核苷酸,2'-脱氧核苷酸,2-硫尿苷核苷酸,2-氨基腺苷核苷酸,6-硫鸟苷核苷酸,5-甲基胞苷核苷酸,5-氨基烯丙基尿苷核苷酸,Z核苷酸,3'-硫代磷酸酯核苷酸间连接,3'-硫代磷酸酯核苷酸间连接,3'-膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,3'-膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,3'-硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,3'-硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,3'-甲基膦酸酯核苷酸间连接,3'-硼烷膦酸酯核苷酸间连接,3'-二硫代磷酸酯核苷酸间连接或其组合。

[0182] 在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-膦酰基乙酸酯基团连接。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-0-甲基和3'-硫代膦酰基乙酸酯基团。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-F和3'-硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-F和3'-膦酰基乙酸酯基团连接。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含相同核苷酸上的2'-F和3'-硫代膦酰基乙酸酯基团。

[0183] 在一些实施方案中,W或Q中至少有一个包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,W或Q中的至少一个中的每个修饰的核苷酸都包含相同的一个或多个修饰。在一些实施方案中,W包含与Q中的修饰的核苷酸不同的修饰核苷酸。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含两个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含三个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,由于一个或多个未修饰的核苷酸可能介于其间,所述修饰的核苷酸在序列上是不连续或者至少不完全连续排列的。在一些实施方案中,修饰的核苷酸连续排列。在一些实施方案中,W或Q的至少一个包含至少一个修饰核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W或Q中的至少一个包含至少三(3)个修饰的核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W或Q中的至少一个包含至少四(4)个修饰的核苷酸的连续段。在一些实施方案中,W或Q中的至少一个包含至少五(5)个修饰的核苷酸的连续段。

[0184] 在一些实施方案中,指导RNA包含如式(V)或式(VI)所示的核苷酸序列:

[0185]  $M_m N_n M'_{m'} N'_{n'} \dots$  (式V);或

[0186]  $M_m N_n M'_{m'} N'_{n'} M''_{m''} \dots$  (式VI)

[0187] 其中每个M独立地表示修饰的核糖核苷酸;

[0188] 其中每个N独立地表示未修饰的核糖核苷酸;

[0189] 其中每个M'独立地表示修饰的核糖核苷酸;

[0190] 其中每个N'独立地表示未修饰的核糖核苷酸;

[0191] 其中每个M''独立地表示修饰的核糖核苷酸;

[0192] 其中m为0至40的整数,n为0至130的整数,m'为0至10的整数,n'为0至130的整数,m''为0至10的整数,条件是 $m+m'+m'' \geq 1$ 且 $50 \leq m+n+m'+n'+m'' \leq 150$ 。

[0193] 在一些实施方案中,每个M独立地选自下组:2'-0-甲基核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸和2'-脱氧核苷酸。在一些实施方案中,每个M独立地选自下组:2'-0-甲基核糖核苷酸,2'-

0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M独立地选自下组: 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 当m>1, 任何给定的M与任何其他M是相同或不同的。在一些实施方案中, 当m>1, 每个M包含相同的一个或多个修饰。

[0194] 在一些实施方案中, 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸和2' -脱氧核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 当m'>1, 任何给定的M'与任何其他M'是相同或不同的。在一些实施方案中, 当m'>1, 每个M'包含相同的一个或多个修饰。

[0195] 在一些实施方案中, 每个M"独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸和2' -脱氧核苷酸。在一些实施方案中, 每个M"独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M"独立地选自下组: 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸和2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 当m">1, 任何给定的M"与任何其他M"是相同或不同的。在一些实施方案中, 当m">1, 每个M"包含相同的一个或多个修饰。

[0196] 在一些实施方案中, 每个M是2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸; m选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; n选自10至130的整数; 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸, 2' -脱氧核苷酸和Z核苷酸; m'选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; 并且n'选自0至130的整数。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是Z核苷酸。

[0197] 在一些实施方案中, 每个M是2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸; m选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; n选自10至130的整数; 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸, 2' -脱氧核苷酸和Z核苷酸; m'选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; 并且n'选自0至130的整数。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸。在一些实施方案中, 每个M'是Z核苷酸。

[0198] 在一些实施方案中, 每个M是2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸; m选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; n选自10至130的整数; 每个M'独立地选自下组: 2' -0-甲基核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -P (S) 核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -PACE核糖核苷酸, 2' -0-甲基-3' -硫代PACE核糖核苷酸, 2' -脱氧核苷酸和Z核苷酸; m'选自1至10的整数; 每个N独立地选自A、U、C和G; 并且n'选自0至130的整数。在一些实施方案中, 每个M'是2' -0-甲基-3' -PACE核糖核

昔酸。在一些实施方案中,每个M'是2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M'是2'-0-甲基核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M'是2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M'是Z核昔酸。

[0199] 在一些实施方案中,每个M独立地选自下组:2'-0-甲基核糖核昔酸,2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核昔酸,2'-0-甲基-3'-PACE核糖核昔酸,2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核昔酸,2'-脱氧核昔酸和Z核昔酸;m选自0至10的整数;每个N独立地选自A、U、C和G;n选自10至15的整数;每个M'是2'-0-甲基核糖核昔酸;m'选自1至5的整数;每个N独立地选自A、U、C和G;并且n'选自0至130的整数。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-PACE核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基核糖核昔酸。在一些实施方案中,每个M是2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核昔酸。在一些实施方案中,m为0;n选自10至15的整数,m'选自1至5的整数;并且n'选自0至130的整数。

[0200] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰是改变稳定性的修饰。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰增加指导RNA的核酸酶抗性,因此增强指导RNA的稳定性。

[0201] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰是如上所述的增强稳定性的修饰。

[0202] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰是如上所述的改变特异性的修饰。

[0203] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰改变RNA碱基配对。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰降低如上所述的碱基配对相互作用的T<sub>m</sub>。在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰提高如上所述的碱基配对相互作用的T<sub>m</sub>。

[0204] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰改变指导RNA的转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰提高指导RNA的转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰降低指导RNA的转染效率。在一些实施方案中,组合中至少一种增加转染的修饰包括膦酰基乙酸酯烷基酯核昔酸间连接,例如膦酰基乙酸酯甲酯核昔酸间连接。

[0205] 在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰增强指导RNA的稳定性和特异性。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰增强指导RNA的稳定性和转染效率。在一些实施方案中,相对于无修饰的指导RNA,组合中的至少一个修饰增强指导RNA的特异性和转染效率。

[0206] 在一些实施方案中,组合中的至少一个修饰改变指导RNA的二级结构。该修饰改变指导RNA中任何RNA/RNA内部双链体的碱基配对。这些修饰中的一些增加RNA/RNA结构的碱基配对,或者增加RNA/RNA双链体的T<sub>m</sub>,而其它修饰降低RNA/RNA双链体或多个双链体的碱基配对(或T<sub>m</sub>)。这些修饰包括碱基修饰的核昔酸,特别是UNA核昔酸,如2-硫尿昔和2-氨基腺昔对,Z/P核昔酸对,isoC/isoG对,6-硫代G//5-甲基嘧啶对,和如前所述的在糖或核昔酸间连接上具有修饰的核昔酸。

[0207] 在一些实施方案中,组合包括至少一种修饰或一组修饰,其通过增加特异性(即减少脱靶效应)的至少一种修饰或一组修饰来增加核酸酶抗性(即稳定性)。在一些实施方案中,组合包括至少一种修饰或一组修饰,其通过提高指导RNA中一些碱基配对的T<sub>m</sub>的至少一种修饰或一组修饰来增加核酸抗性(即稳定性)。在一些实施方案中,组合包括至少一种修

饰或一组修饰,其通过降低指导RNA的一些碱基配对的T<sub>m</sub>的至少一种修饰或一组修饰来增加核酸抗性(即稳定性)。在一些实施方案中,组合包括增加核酸酶抗性(即稳定性)的至少一种修饰或一组修饰,增加指导RNA中的一些碱基配对的T<sub>m</sub>的至少一种修饰或一组修饰,以及降低指导RNA中其他地方的一些碱基配对的T<sub>m</sub>的至少一种修饰或一组修饰。在一些实施方案中,组合包括增加核酸酶抗性(即稳定性)的至少一种修饰或一组修饰以及增加指导RNA与Cas蛋白结合的至少一种修饰或一组修饰。在一些实施方案中,组合包括增加核酸酶抗性(即稳定性)的至少一种修饰或一组修饰以及减少指导RNA与Cas蛋白结合的至少一种修饰或一组修饰。在一些实施方案中,指导RNA包括不同类型的修饰的组合。

[0208] D. 指导RNA结构

[0209] 在一些实施方案中,指导RNA能够与CRISPR相关蛋白形成复合体。在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白由CRISPR-Cas II型系统提供或衍生自CRISPR-Cas II型系统,该系统具有RNA引导的多核苷酸结合和/或核酸酶活性。在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白是Cas9,Cas9突变体或Cas9变体。在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白是来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白是来自嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白是来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,合成的指导RNA或合成的指导RNA:CRISPR相关蛋白复合体维持天然指导RNA或不具有修饰的核苷酸的复合体的功能性。在一些实施方案中,功能性包括结合靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括切口靶多核苷酸。在一些实施方案中,功能性包括切割靶多核苷酸。在一些实施方案中,靶多核苷酸在体外核酸内。在一些实施方案中,靶多核苷酸在体内或体外的细胞的基因组内(例如在培养的细胞或从生物体分离的细胞中)。在一些实施方案中,靶多核苷酸是DNA中的前间区序列。

[0210] 在一些实施方案中,crRNA区段包含25至80个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA区段包含能够与靶序列杂交的指导序列。在一些实施方案中,指导序列与靶序列或其一部分互补。在一些实施方案中,指导序列包含15至30个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA区段包含茎序列。在一些实施方案中,茎序列包含10至50个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA区段包含5'凸出序列。在一些实施方案中,5'凸出序列包含1至10个核苷酸,或者1至5个核苷酸,或者1、2或3个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA包含(i)能够与靶序列杂交的指导序列和(ii)茎序列。在一些实施方案中,crRNA包含(i)5'-凸出序列,(ii)能够与靶序列杂交的指导序列,和(iii)茎序列。在其中所述crRNA区段包含茎序列的某些实施方案中,tracrRNA区段包含与所述crRNA区段的茎序列部分或完全互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,tracrRNA区段还包含至少一个的双链结构。

[0211] 在一些实施方案中,指导RNA是单一指导RNA。在一些实施方案中,指导RNA是单一指导RNA,其中crRNA区段和tracrRNA区段通过环L相连。在一些实施方案中,环L包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个核苷酸。在一些实施方案中,环L包含GNRA的核苷酸序列,其中N表示A,C,G或U,R表示A或G。在一些实施方案中,环L包含GAAA的核苷酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含多于一个环。

[0212] 指导RNA包含5'部分(即5'那一半)和3'部分(即3'那一半)。在一些实施方案中,crRNA区段是tracrRNA区段的5'(即上游)。在一些实施方案中,tracrRNA区段相对于crRNA

区段为5'。

[0213] 在一些实施方案中,指导RNA包含至少两个单独的RNA链,例如crRNA链和分开的tracrRNA链。参见例如图5A。在一些实施方案中,每条链是包含一个或多个修饰的合成链。在一些实施方案中,所述链的至少一个是包含一个或多个修饰的合成链。在一些实施方案中,所述链共同作用来指导Cas蛋白(如Cas9)对靶多核苷酸的结合、切口或切割。在一些实施方案中,crRNA序列和tracrRNA序列位于分开的链上,并通过两个互补序列相互杂交形成茎或双链体。

[0214] 在一些实施方案中,指导RNA是包含crRNA序列和tracrRNA序列的单一指导RNA。参见例如图5B。在一些实施方案中,crRNA序列和tracrRNA序列通过环序列或“环”连接。在一些实施方案中,单一指导RNA包含5'部分和3'部分,其中crRNA序列在tracrRNA序列的上游。

[0215] 在一些实施方案中,两个RNA片段的总长度可为约50-220(例如约55-200、60-190、60-180、60-170、60-160、60-150、60-140、60-130和60-120)个核苷酸,例如长度为约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、或220个核苷酸。类似地,单一指导RNA(例如图5B)长度可为约50-220(例如约55-200、60-190、60-180、60-170、60-160、60-150、60-140、60-130和60-120)个核苷酸,例如长度为约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、或220个核苷酸。

[0216] 如图5A和5B所示,合成的指导RNA包含(i) crRNA序列,其包含(a)能够与核酸中的靶序列杂交的指导序列(例如G<sub>1</sub>-G<sub>n</sub>区段,其中每个G表示指导序列中的核苷酸),(b)能够部分或完全与第二茎序列杂交的第一茎序列(例如X<sub>1</sub>-X<sub>n</sub>区段,其中每个X表示第一茎序列中的核苷酸),和任选地(c)5'凸出序列(例如O<sub>1</sub>-O<sub>n</sub>区段,其中每个O表示凸出序列中的核苷酸),和(ii)包含第二茎序列的tracrRNA序列(例如Y<sub>1</sub>-Y<sub>n</sub>区段,其中每个Y表示第二茎序列中的核苷酸)。tracrRNA序列还包含T<sub>1</sub>-T<sub>n</sub>区段,其中每个T表示tracrRNA序列中的核苷酸。图5A中显示的合成的指导RNA包括一个或多个修饰。同样,图5B中所示的合成的指导RNA包括一个或多个修饰。在一些实施方案中,修饰位于沿crRNA, tracrRNA或包含crRNA区段、tracrRNA区段和任选的环的单一指导RNA的长度上的任何点。在一些实施方案中,在图5A和5B中所示的合成的指导RNA中由O,G,X,Y或T表示的任何核苷酸可为修饰的核苷酸。图5B中所示的指导RNA表示这样的单一指导RNA(sgRNA),其中crRNA区段和tracrRNA区段通过具有序列GNRA的环连接,其中N表示A,C,G或U,且R表示A或G。

[0217] 在一些实施方案中,指导RNA的crRNA区段长度为25-70(例如30-60,35-50或40-45)个核苷酸。在一些实施方案中,指导序列长度为12-30(例如16-25,17-20或15-18)个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的5'部分不与靶序列杂交或仅部分杂交。例如,crRNA区段上可有一个5'凸出。

[0218] 在一些实施方案中,单一指导RNA包含核心部分(central portion),其包括crRNA区段的茎序列, tracrRNA区段的茎序列,以及任选的将crRNA区段共价连接至tracrRNA区段的环。在一些实施方案中,单一指导RNA的核心区段长度为8-60(例如10-55,10-50或20-40)个核苷酸。

[0219] 在一些实施方案中,指导RNA的tracrRNA区段长度为10-130(例如10-125,10-100,10-75,10-50或10-25)个核苷酸。在一些实施方案中,除了中心区段中的任何发夹或双链结构之外, tracrRNA区段还包括一个或多个发夹或双链结构。

[0220] 在一些实施方案中,与参考tracrRNA,如天然存在的成熟tracrRNA相比, tracrRNA是截短的。已显示出一系列长度在分离型(图5A)和嵌合sgRNA型(图5B)二者中都起作用。例如,在一些实施方案中, tracrRNA可从其3'端截短至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35或40个核苷酸。在一些实施方案中, tracrRNA分子可从其5'端截短至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个核苷酸且从其3'端截短至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35或40个核苷酸。参见例如Jinek等(2012) *Science*, 337, 816-21; Mali等(2013) *Science*, 339:6121, 823-6; Cong等(2013) *Science*, 339:6121, 819-23; 和Hwang等(2013) *Nat.Biotechnol.* 31:3, 227-9; Jinek等(2013) *eLife*, 2, e00471。在一些实施方案中, tracrRNA是未截短的。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的修饰在crRNA区段或tracrRNA区段或二者中。在一些实施方案中,本发明的修饰在crRNA区段的指导序列中。在一些实施方案中,本发明的修饰在crRNA区段的茎序列中。在一些实施方案中,本发明的修饰在crRNA区段的5' -凸出序列中。在一些实施方案中,本发明的修饰在tracrRNA区段的茎序列中。在一些实施方案中,本发明的修饰在指导RNA的环序列中。在一些实施方案中,本发明的修饰在指导RNA的5'部分中。在一些实施方案中,本发明的修饰在指导RNA的3'部分中。在一些实施方案中,本发明的修饰在指导RNA的5'部分和指导RNA的3'部分中。

#### [0222] E. 指导RNA的合成

[0223] 在一些实施方案中,通过使用合成有机化学领域的化学合成生产包括单一指导RNA (sgRNA; 参见图1和5B) 的指导RNA。包含除四种主要核糖核苷酸(即A,C,G和U)以外的任何核苷酸(无论是非天然的还是天然的,如假尿苷,肌苷或脱氧核苷酸)的指导RNA在与RNA中四种主要核苷酸中的任何一个化学/结构上不同的核苷酸处具有化学修饰或取代。

[0224] 本文所述的合成的指导RNA可化学合成。例如,合成的指导RNA可使用TC化学通过Dellinger等(2011) *J.Am.Chem.Soc.*, 133, 11540, 133, 11540, 美国专利8,202,983, 以及美国专利申请2010/0076183A1, 其内容通过提述以其整体并入本文。“TC化学”是指通过硫簇氨基甲酸酯保护基团使用2' -羟基模块上保护的RNA单体核苷酸前体的组合物和方法,以合成未修饰的RNA或包含一个或多个修饰的核苷酸的修饰的RNA。使用TC- RNA化学法化学合成相对长的RNA(长达200多个或更长)的能力使得能够产生具有能够超过由四种主要核糖核苷酸(A,C,G和U)所实现的特殊特征的指导RNA。本文描述的一些合成的指导RNA也可使用本领域已知的方法包括体外转录和基于细胞的表达来制备。例如,可将2' -氟NTP并入通过基于细胞的表达产生的合成的指导RNA。

[0225] 指导RNA的合成也可通过RNA序列的化学或酶促合成来实现,其随后通过酶连接在一起,或通过化学连接来进行化学连接,包括但不限于溴化氰化学法,如R.Kumar等(2007) *J.Am.Chem.Soc.*, 129, 6859-64发表的“点击”化学,或如K.Hill在标题为“Compositions and methods for conjugating oligonucleotides”的W02013176844中所述的方酸缀合化学。

[0226] 如下文进一步描述的,本文公开的指导RNA(包括那些包含修饰的核苷酸和/或修饰的核苷酸间连接的指导RNA)可用于在体外或体内执行各种CRISPR介导的功能(包括但不限于编辑基因,调节基因表达,切割靶序列,和结合靶序列),例如在无细胞测定中,在完整

细胞中或在整个生物体中。对于体外或体内应用, RNA可用本领域已知的任何方式递送到细胞或整个生物体中。

[0227] 文库及阵列

[0228] 一方面,本发明提供多个指导RNA的组或文库。在一些实施方案中,所述文库包含两种或更多种本文公开的指导RNA。文库可含有约10至约10<sup>7</sup>个个体成员,例如约10至约10<sup>2</sup>,约10<sup>2</sup>至约10<sup>3</sup>,约10<sup>3</sup>至约10<sup>5</sup>,约10<sup>5</sup>至约10<sup>7</sup>个成员。至少在指导序列中,文库的个体成员与文库的其他成员不同,即gRNA的DNA靶向区段。另一方面,在一些实施方案中,文库的每个个体成员可含有与文库所有其他成员相同或基本相同的tracrRNA区段的核苷酸序列。以这种方式,文库可包含靶向一个或多个多核苷酸中的不同多核苷酸或不同序列的成员。

[0229] 在一些实施方案中,文库至少包含10<sup>2</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少有10<sup>3</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少包含10<sup>4</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少包含10<sup>5</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少包含10<sup>6</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少包含10<sup>7</sup>个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库至少针对10个不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>2</sup>种不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>3</sup>种不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>4</sup>种不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>5</sup>种不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>6</sup>种不同的多核苷酸。在一些实施方案中,文库靶向至少10<sup>7</sup>种不同的多核苷酸。

[0230] 在一些实施方案中,文库包含指导RNA的集合,所述指导RNA具有相同的序列并且在逐渐移动跨越文库成员序列的窗口中具有相同的修饰。在一些实施方案中,窗口总共覆盖RNA的全长。

[0231] 在一些实施方案中,文库允许进行高通量、多靶标基因组操作和分析。在一些实施方案中,仅有指导RNA的DNA靶向区段是变化的,而Cas蛋白结合区段是相同的。在一些实施方案中,文库的第一部分包含具有识别、结合和指导特定Cas蛋白的Cas结合区段的指导RNA,而文库的第二部分包含识别、结合和指导不同的Cas蛋白(例如来自不同物种的Cas蛋白)的不同的Cas结合区段,由此允许文库与两种或更多种正交的Cas蛋白共同起作用。在一些实施方案中,第一正交Cas蛋白的诱导表达利用与第一正交Cas蛋白相互作用的文库部分。在一些实施方案中,第一和第二正交Cas蛋白的诱导表达分别利用与第一和第二正交Cas蛋白相互作用的文库部分。在一些实施方案中,第一和第二正交Cas蛋白的诱导表达在不同时间发生。因此,可通过专门操作或修饰文库中指定的多个靶标来进行大规模的基因编辑或基因调控。

[0232] 在一些实施方案中,文库是“阵列排列”的文库,即可寻址的排列中不同特征或特征库的集合。例如,阵列的特征可被选择性切割并转移到微量滴定板,使得板中的每个孔含有已知特征或已知的特征库。在一些其它实施方案中,文库以48列或96列微量滴定板格式或384列板合成。

[0233] 在一些实施方案中,本发明的指导RNA的合成可在固体支持物上进行,所述固体支持物具有化学实体可结合的表面。在一些实施方案中,正在合成的指导RNA直接或间接附接至相同的固体支持物上并且可形成阵列的一部分。“阵列”是已知单体序列的单独分子的集合,每个分子以空间定义和物理寻址的方式排列,使得每个序列的定位是已知的。在本文中

可互换使用的“阵列”或“微阵列”包括具有特定化学模块或多个模块(如配体,例如与该区域相关联的生物聚合物,如多核苷酸或寡核苷酸序列(核酸),多肽(例如蛋白质),糖类,脂质等)的可寻址区的任何一维、二维或基本二维(以及三维)排列。当阵列具有不同模块的多个区域(例如不同的多核苷酸序列)时,阵列是“可寻址的”,使得在阵列上特定预定位置(即“地址”)处的区(即阵列的“特征”)检测特定的靶标或一类靶标(虽然特征可能附带地检测到该特征的非目标)。阵列特征通常是(但不一定要)通过间隔空间分隔的。可包含在阵列上的特征的数量主要由基底的表面积、特征的尺寸和特征之间的间隔决定。阵列可具有多达每cm<sup>2</sup>数十万或更多的特征,例如2500至200,000特征/cm<sup>2</sup>的密度。这些特征可以或可以不共价地键合至基底。

[0234] 合适的固体支持物可具有各种形式和组合物,并且衍生自天然存在的材料,已被合成修饰的天然存在的材料或合成材料。合适的支持材料的实例包括但不限于二氧化硅、硅和氧化硅、聚四氟乙烯、玻璃、多糖如琼脂糖(例如来自Pharmacia的Sephadose®)和右旋糖酐(例如Sephadex®和Sephacryl®,也来自Pharmacia)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇、甲基丙烯酸羟乙酯和甲基丙烯酸甲酯的共聚物等。在一些实施方案中,固体支持物是多个珠粒。

[0235] 要在基底表面上合成的指导RNA的初始单体可以结合至接头,接头又结合至表面亲水基团,例如二氧化硅基底上存在的表面羟基模块。在一些实施方案中,使用通用接头。在一些其它实施方案中,初始单体直接与例如表面羟基模块反应。或者,可以首先根据本发明合成指导RNA,并在合成分后通过本领域已知的任何方法附接至固体基底。因此,本发明可以用于制备指导RNA的阵列,其中寡核苷酸在阵列上合成,或在合成分后附接至阵列基底。随后,指导RNA或库或多个指导RNA库可任选地和选择性地从阵列基底切割并用作文库或多个文库。

#### [0236] IV.Cas蛋白

[0237] 如上所述,功能性CRISPR-Cas系统还需要提供所需活性(例如靶结合或靶切口/切割)的蛋白组分(例如Cas蛋白,其可为Cas核酸酶)。在一些实施方案中,所需的活性是靶结合。在一些实施方案中,所需的活性是靶切口或靶切割。在一些实施方案中,所需的活性还包括如本文公开的与Cas蛋白共价融合的多肽提供的功能。在一些实施方案中,所需的活性还包括如本文公开的与核酸酶缺陷型Cas蛋白共价融合的多肽提供的功能。这种所需活性的实例包括如下所述的转录调节活性(激活或抑制),表观遗传修饰活性或靶标可视化/鉴定活性。Cas蛋白可作为纯化或非纯化的(i)Cas蛋白或(ii)编码用于表达Cas蛋白的mRNA或(iii)编码用于表达所述蛋白的线性或环状DNA,而引入体外或体内系统。提供Cas蛋白的这三种方法中的任一种在本领域中是公知的,并且在本文中提及Cas蛋白或Cas蛋白的用途时可以互换地表示。在一些实施方案中,Cas蛋白从mRNA或DNA组成型表达。在一些实施方案中,Cas蛋白从mRNA或DNA的表达是可诱导或诱导型的。

[0238] 在一些实施方案中,Cas蛋白是化学合成的(参见例如Creighton,“Proteins: Structures and Molecular Principles”,W.H.Freeman&Co.,NY,1983),或通过本文所述的重组DNA技术产生。对于其他的指导,技术人员可查询Frederick M.Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology,”John Wiley&Sons,2003;和Sambrook等,“Molecular

Cloning, A Laboratory Manual,"Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)。

[0239] 在一些实施方案中,Cas蛋白以纯化或分离的形式提供。在一些实施方案中,Cas蛋白以约80%,约90%,约95%或约99%的纯度提供。在一些实施方案中,Cas蛋白作为组合物的一部分提供。在一些实施方案中,Cas蛋白以适于用作或包含于RNA指导核酸酶反应的组合物的水性组合物提供。本领域技术人员清楚地知道可包括在此类核酸酶反应组合物中的各种物质。

[0240] 在一些实施方案中,提供了一种Cas蛋白作为重组多肽。在一些实例中,制备重组多肽作为融合蛋白。例如在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸连接至编码融合配偶体(例如谷胱甘肽-s-转移酶(GST),6x-His表位标签或M13基因3蛋白)的另一核酸。合适的宿主细胞可用于表达融合蛋白。在一些实施方案中,通过本领域已知的方法分离融合蛋白。在一些实施方案中,可以通过例如酶促消化来进一步处理融合蛋白,以除去融合配偶体并获得Cas蛋白。或者,Cas蛋白:指导RNA复合体可使用本领域已知的宿主细胞系统或体外翻译-转录系统以重组技术制备。此类系统和技术的细节可以见于例如W02014144761,W02014144592,W02013176772,US20140273226和US20140273233中,其内容通过提述以其整体并入本文。

#### [0241] 野生型Cas蛋白

[0242] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含衍生自具有RNA指导的多核苷酸结合和/或核酸酶活性的CRISPR-Cas I型,II型或III型系统的蛋白质。合适的Cas蛋白的非限制性实例包括Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(或CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(或CasA)、Cse2(或CasB)、Cse3(或CasE)、Cse4(或CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966。参见例如W02014144761,W02014144592,W02013176772,US20140273226和US20140273233,其内容通过提述以其整体并入本文。

[0243] 在一些实施方案中,Cas蛋白衍生自II型CRISPR-Cas系统。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自细菌Cas9蛋白,包括W02014144761中鉴定的那些。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自链球菌属菌种(*Streptococcus* sp.)或葡萄球菌属菌种(*Staphylococcus* sp.)Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自嗜热链球菌Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自酿脓链球菌Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自金黄色葡萄球菌Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是或衍生自嗜热链球菌Cas9蛋白。

[0244] 在一些实施方案中,野生型Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,野生型Cas9蛋白是来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的Cas9蛋白(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述蛋白或多肽可包含SEQ ID NO:1的片段,或由SEQ ID NO:1的片段组成或基本上由其组成。

[0245] 通常,Cas蛋白包括与指导RNA相互作用的至少一个RNA结合域。在一些实施方案中,修饰Cas蛋白以增加核酸结合亲和力和/或特异性、改变酶活性和/或改变蛋白质的其他特性。例如可修饰、突变、缺失或失活Cas蛋白的核酸酶(即DNA酶, RNA酶)域。或者,可截短Cas蛋白以除去对于蛋白功能非必需的域。在一些实施方案中,Cas蛋白是截短或修饰的以

优化效应物域的活性。在一些实施方案中,Cas蛋白包括核定位序列(NLS),其将带NLS标签的Cas蛋白引入活细胞的核中。在一些实施方案中,Cas蛋白包括两个或更多个修饰。

[0246] 突变体Cas蛋白

[0247] 在一些实施方案中,Cas蛋白可为野生型Cas蛋白(例如Cas9)的突变体或其片段。在其它实施方案中,Cas蛋白可衍生自突变体Cas蛋白。例如,可修饰Cas9蛋白的氨基酸序列以改变蛋白的一种或多种特性(例如核酸酶活性、结合亲和力、对蛋白酶的稳定性等)。或者,可从蛋白中消除不参与RNA指导的切割的Cas9蛋白的域,使得修饰的Cas9蛋白小于野生型Cas9蛋白。例如,减小Cas9编码序列的大小可使其适合转染本不能容纳野生型序列的载体,如AAV载体及其他。在一些实施方案中,本发明的系统利用来自酿脓链球菌的Cas9蛋白,如在细菌中编码的或经密码子优化用于在真核细胞中表达。下面显示的是野生型酿脓链球菌Cas9蛋白序列(SEQ ID No.1,可获取自www.uniprot.org/uniprot/Q99ZW2)的氨基酸序列。

[0248] MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRTGWRGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLSKDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVEDHVHQFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDLSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTLAIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGENELALPSKYVNFLYASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD

[0249] Cas9蛋白通常具有至少两个核酸酶(例如DNA酶)域。例如,Cas9蛋白可具有RuvC样核酸酶域和HNH样核酸酶域。RuvC和HNH域一起运作,在靶位点切断双链,使靶多核苷酸发生双链断裂。(Jinek等,Science,337:816-821)。在一些实施方案中,修饰突变体Cas9蛋白以仅含有一个功能性核酸酶域(RuvC样或HNH样核酸酶域)。例如,在一些实施方案中,修饰突变体Cas9蛋白,使得所述核酸酶域之一被缺失或突变,使得其不再起作用(即核酸酶活性不存在)。在其中一个核酸酶域是无活性的一些实施方案中,突变体能够将切口引入双链多核苷酸(这种蛋白称为“切口酶”),但不能切割双链多核苷酸。例如,RuvC样域中的天冬氨酸至丙氨酸(D10A)转化将Cas9衍生的蛋白转化成切口酶。同样地,在HNH域中的组氨酸至丙氨酸(H840A)的转化将Cas9衍生的蛋白转化成切口酶。同样地,在HNH域中的天冬酰胺至丙氨酸(N863A)的转化将Cas9衍生的蛋白转化成切口酶。

[0250] 在一些实施方案中, RuvC样核酸酶域和HNH样核酸酶域是修饰的或消除的,使得突变体Cas9蛋白不能切口或切割靶多核苷酸。在一些实施方案中, Cas9衍生蛋白的所有核酸酶域是修饰的或消除的,使得Cas9衍生蛋白缺乏所有的核酸酶活性。在一些实施方案中,相对于野生型对应物缺乏部分或全部核酸酶活性的Cas9蛋白却在更大或更小程度上维持靶标识别活性。

[0251] 在任何上述实施方案中,任何或全部核酸酶域可使用公知的方法(如定点诱变, PCR介导的诱变和总基因合成,以及本领域已知的其它方法)通过一个或多个缺失突变、插入突变和/或取代突变来失活。

[0252] 在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”与SEQ ID N0:1至少为50% (例如50%至100%的任何数字,包括例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%和99%)相同。在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”与RNA分子(例如sgRNA)结合。在一些实施方案中,“Cas突变体”或“Cas变体”通过RNA分子靶向特定的多核苷酸序列。

#### [0253] 融合蛋白

[0254] 在一些实施方案中,Cas蛋白融合至与Cas蛋白异源的另一蛋白或多肽以产生融合蛋白。在一些实施方案中,异源序列包括一个或多个效应物域,例如切割域、转录激活域,转录阻遏子域或表观遗传修饰域。效应物域的其他实例包括核定位信号、细胞穿透或转位域或标记域。在一些实施方案中,效应物域位于融合蛋白的N末端、C末端或内部位置。在一些实施方案中,融合蛋白的Cas蛋白是或衍生自Cas9蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白的Cas蛋白是衍生自其中所有核酸酶域已被灭活或缺失的修饰的或突变的Cas蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白的Cas蛋白是或衍生自缺乏核酸酶活性的修饰的或突变的Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白的RuvC和/或HNH域是修饰或突变的,使得它们不再具有核酸酶活性。

#### [0255] 切割域

[0256] 在一些实施方案中,融合蛋白的效应物域是切割域。如本文所用,“切割域”是指切割DNA的域。切割域可从任何核酸内切酶或核酸外切酶获得。可衍生出切割域的核酸内切酶的非限制性实例包括限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶(homing endonuclease)。参见例如New England Biolabs Catalog或Belfort等(1997) Nucleic Acids Res. 25, 3379-88。切割DNA的其他酶是已知的(例如51核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母H0核酸内切酶)。还参见Linn等(编)“Nucleases,”Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993。这些酶中的一种或多种(或其功能性片段)可用作切割域的来源。

[0257] 在一些实施方案中,切割域可衍生自II-S型核酸内切酶。II-S型核酸内切酶在通常距离核酸内切酶的DNA识别位点几个碱基对的位点处特异性切割DNA,因此具有可分离的识别和切割域。这些酶通常是瞬时缔合形成二聚体以在交错位置切割DNA的每条链的单体。合适的II-S型核酸内切酶的非限制性实例包括BfiI、BpmI、BsaI、BsgI、BsmBI、BsmI、BspMI、FokI、MboI和SapI。在一些实施方案中,融合蛋白的切割域是FokI切割域或其片段或衍生物。参见Miller等(2007) Nat. Biotechnol. 25, 778-85; Szczepk等(2007) Nat. Biotechnol. 25, 786-93; Doyon等(2011) Nat. Methods, 8, 74-81。

#### [0258] 转录激活域

[0259] 在一些实施方案中,融合蛋白的效应物域是转录激活域。通常,转录激活域与转录控制元件和/或转录调节蛋白(即转录因子, RNA聚合酶等)相互作用以增加和/或激活基因

的转录。在一些实施方案中,转录激活域是单纯疱疹病毒VP16激活域,VP64(其是VP16的四聚体衍生物),NF $\kappa$ B p65激活域,p53激活域1和2,CREB(cAMP响应元件结合蛋白)激活域,E2A激活域或NFAT(激活的T细胞的核因子)激活域。在一些实施方案中,转录激活域是Gal4、Gcn4、MLL、Rtg3、Gln3、0af1、Pip2、Pdr1、Pdr3、Pho4或Leu3。转录激活域可为野生型,或者其可为原始转录激活域的修饰或截短的版本。

[0260] 转录阻遏子域

[0261] 在一些实施方案中,融合蛋白的效应物域是转录阻遏子域。通常,转录阻遏子域与转录控制元件和/或转录调节蛋白(即转录因子, RNA聚合酶等)相互作用以降低和/或阻止基因的转录。在一些实施方案中,转录阻遏子域是可诱导的cAMP早期阻遏因子(ICER)域,Kruppel相关盒A(KRAB-A)阻遏子域,YY1富含甘氨酸的阻遏子域,Sp1样阻遏子,E(spI)阻遏子,I $\kappa$ B阻遏子或MeCP2。

[0262] 表观遗传学修饰域

[0263] 在一些实施方案中,融合蛋白的效应物域是表观遗传修饰域。通常,表观遗传修饰域通过修饰组蛋白结构和/或染色体结构来改变基因表达。在一些实施方案中,表观遗传修饰域是组蛋白乙酰转移酶域,组蛋白脱乙酰酶域,组蛋白甲基转移酶域,组蛋白脱甲基酶域,DNA甲基转移酶域或脱甲基酶域。

[0264] 其他域

[0265] 在一些实施方案中,融合蛋白还包含至少一个其他域。合适的其他域的非限制性实例包括核定位信号(NLS)、细胞穿透或转位域和标记域。NLS通常包含一段碱性氨基酸。参见例如Lange等(2007)J.Biol.Chem.,282,5101-5。例如,在一些实施方案中,NLS是单一的序列,例如PKKKRKV(SEQ ID NO:2)或PKKKRRV(SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,NLS是二分的序列。在一些实施方案中,NLS是KRPAATKKAGQAKKK(SEQ ID NO:4)。

[0266] 在一些实施方案中,融合蛋白包含至少一个细胞穿透域。在一些实施方案中,细胞穿透域是衍生自HIV-1TAT蛋白的细胞穿透肽序列。例如,TAT细胞穿透序列可为GRKKRRQRRRPPQPKKKRKV(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,细胞穿透域是TLM(PLSSIFSRIGDPPKKKRKV;SEQ ID NO:6),其是来源于人乙型肝炎病毒的细胞穿透肽序列。在一些实施方案中,细胞穿透域是MPG(GALFLGWLGAAGSTMAGPKKKRKV;SEQ ID NO:7或GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,细胞穿透域是Pep-1(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:9),VP22,其是来自单纯疱疹病毒的细胞穿透肽或聚精氨酸肽序列。

[0267] 在一些实施方案中,融合蛋白包含至少一个标记域。标记域的非限制性实例包括荧光蛋白、纯化标签和表位标签。在一些实施方案中,标记域是荧光蛋白。合适的荧光蛋白的非限制性实例包括绿色荧光蛋白(例如GFP,GFP-2,tagGFP,turboGFP,EGFP,祖母绿(Emerald),Azami Green,单体Azami Green,CopGFP,AceGFP,ZsGreen1),黄色荧光蛋白(例如YFP,EYFP,Citrine,Venus,YPet,PhiYFP,ZsYellow1),蓝色荧光蛋白(例如EBFP,EBFP2,Azurite,mKalama1,GFPuv,Sapphire,T-sapphire),青色荧光蛋白(例如ECFP,Cerulean,CyPet,AmCyan1,Midoriishi-Cyan),红色荧光蛋白(mKate,mKate2,mPlum,DsRed单体,mCherry,mRFP1,DsRed-Express,DsRed2,DsRed-单体,HcRed-串联,HcRed1,AsRed2,eqFP611,mRaspberry,mStrawberry,Jred),橙色荧光蛋白(mOrange,mKO,Kusabira-Orange,单体

Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) 和任何其它合适的荧光蛋白。在一些实施方案中, 标记域是纯化标签和/或表位标签。例示性的标签包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) , 壳多糖结合蛋白 (CBP) , 麦芽糖结合蛋白, 硫氧还蛋白 (TRX) , 聚 (NANP) , 串联亲和纯化 (TAP) 标签, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 生物素羧基载体蛋白 (BCCP) , 和钙调蛋白。

[0268] V. 用途和方法

[0269] 一方面, 本发明提供用Cas蛋白切割靶多核苷酸的方法。该方法包括使靶多核苷酸与如下接触: (i) 本文所述的指导RNA或一组指导RNA分子, 和 (ii) Cas蛋白。在一些实施方案中, 该方法导致靶多核苷酸中的双链断裂。在一些实施方案中, Cas蛋白是具有单链切口活性的Cas蛋白。在一些实施方案中, 该方法导致靶多核苷酸中的单链断裂。在一些实施方案中, 将包含具有单链切口活性的指导RNA和Cas蛋白的复合体用于靶向序列的单链DNA切割, 即切口。

[0270] 一方面, 本发明提供了用Cas蛋白切割两种或更多种靶多核苷酸的方法。该方法包括使靶多核苷酸与如下接触: (i) 本文所述的一组指导RNA分子, 和 (ii) Cas蛋白。在一些实施方案中, 该方法导致靶多核苷酸中的双链断裂。在一些实施方案中, Cas蛋白是具有单链切口活性的Cas蛋白。在一些实施方案中, 该方法导致靶多核苷酸中的单链断裂。在一些实施方案中, 将包含具有单链切口活性的指导RNA和Cas蛋白质的复合体用于靶向序列的单链DNA切割, 即切口。

[0271] 一方面, 本发明提供了将靶多核苷酸与Cas蛋白结合的方法。该方法包括使靶多核苷酸与如下接触: (i) 本文所述的指导RNA或一组指导RNA分子和 (ii) Cas蛋白, 以导致靶多核苷酸与Cas蛋白的结合。在一些实施方案中, Cas蛋白是Cas变体。在一些实施方案中, Cas变体相对于对应的野生型Cas蛋白缺乏部分或全部核酸酶活性。

[0272] 一方面, 本发明提供了将两种或更多种靶多核苷酸与Cas蛋白结合的方法。该方法包括使靶多核苷酸与如下接触: (i) 本文所述的一组RNA分子和 (ii) Cas蛋白, 以导致靶多核苷酸与Cas蛋白的结合。在一些实施方案中, Cas蛋白是Cas变体。在一些实施方案中, Cas变体相对于对应的野生型Cas蛋白缺乏部分或全部核酸酶活性。

[0273] 一方面, 本发明提供了将Cas蛋白靶向靶多核苷酸的方法。该方法包括使Cas蛋白与本文所述的指导RNA或一组指导RNA分子接触。在一些实施方案中, 该方法导致指导RNA: Cas蛋白复合体的形成。在一些实施方案中, Cas蛋白是野生型Cas9蛋白。在一些实施方案中, Cas蛋白是Cas9蛋白的突变体或变体。在一些实施方案中, Cas蛋白是具有单链切口活性的Cas蛋白。在一些实施方案中, Cas蛋白是缺乏核酸酶活性的Cas蛋白 (例如Cas蛋白的核酸酶缺陷型突变体)。在一些实施方案中, Cas蛋白是融合蛋白 (例如包含 (i) Cas蛋白和 (ii) 异源多肽的融合蛋白) 的一部分。

[0274] 一方面, 本发明提供了将Cas蛋白靶向两种或更多种靶多核苷酸的方法。该方法包括使Cas蛋白与本文所述的一组指导RNA分子接触。在一些实施方案中, 该方法导致指导RNA: Cas蛋白复合体的形成。在一些实施方案中, Cas蛋白是野生型Cas9蛋白。在一些实施方案中, Cas蛋白是Cas9蛋白的突变体或变体。在一些实施方案中, Cas蛋白是具有单链切口活性的Cas蛋白。在一些实施方案中, Cas蛋白是缺乏核酸酶活性的Cas蛋白 (例如Cas蛋白的核酸酶缺陷型突变体)。在一些实施方案中, Cas蛋白是融合蛋白 (例如包含 (i) Cas蛋白或 (ii)

异源多肽的融合蛋白)的一部分。

[0275] 在一些实施方案中,通过转染将指导RNA引入细胞。用于RNA转染的技术是本领域已知的,包括电穿孔和脂质体转染。RNA转染的有效技术主要取决于细胞类型。参见例如Lu jambio等(西班牙国家癌症中心)Cancer Res.2007年2月,其描述了转染HTC-116结肠癌细胞,以及使用用于转染可商业获得的、修饰的miRNA或前体miRNA的Oligofectamine (Invitrogen)。还参见Cho等(Seoul National Univ.)Nat.Biotechnol.,2013年3月,其描述了K562细胞的转染,并使用用于转染转录的sgRNA(约60个核苷酸长)的4D Nucleofection<sup>TM</sup>(Lonza)电穿孔。用于转染RNA的技术也是本领域已知的。例如,治疗性RNA已被递送入用Invasin蛋白包覆的非病原性大肠杆菌(E.coli)中(以促进摄取入表达β-1整联蛋白的细胞),并且大肠杆菌被编码以表达裂解溶血素(lysteriolysin)O成孔蛋白以允许shRNA从大肠杆菌转入细胞质。还参见Cho等(Seoul National Univ.)Nat.Biotechnol.2013年3月。

[0276] 在一些实施方案中,将指导RNA引入或递送到细胞中。可用于递送指导RNA的技术包括利用通过可生物降解的聚合物、脂质体或纳米颗粒进行包封的那些。此类聚合物,脂质体和纳米颗粒可静脉内递送。在一些实施方案中,对于体内递送,可将指导RNA注射到组织部位内或全身给药。体内递送也可通过β-葡聚糖递送系统来实现,如美国专利No.5,032,401和5,607,677以及美国公开No.2005/0281781中所述的那些,其内容通过提述以其整体并入本文。在一些实施方案中,指导RNA或含有指导RNA的递送介质被靶向特定的组织或身体区室。例如,在一些实施方案中,为了将外源RNA靶向其他组织,合成的载体用细胞特异性配体或适配体进行装饰,用于受体摄取,例如包裹在涂覆有PEG的环糊精纳米颗粒中的RNA,并用人转铁蛋白功能化以通过在肿瘤细胞中高度表达的转铁蛋白受体进行摄取。其它方法描述于下文或是本领域已知的。

[0277] 本发明已经在人细胞中进行了测试,如Hendel等,Nat.Biotechnol.(2015)33:9,985-9(其以其整体并入本申请)。在引用的工作中,将修饰的指导RNA引入K562细胞,人原代T细胞和CD34+造血干细胞和祖细胞(HSPC)中。与未修饰的指导RNA相比,修饰的指导RNA显著增强人细胞(包括人原代T细胞和CD34+HSPC)中的基因组编辑效率。

[0278] 图11A和11B示出了实验结果,其显示使用本文公开的合成和化学修饰的sgRNA可通过高频率的插入缺失或通过切割刺激的同源重组来实现人细胞系中的基因破坏。通过PCR扩增子的深度测序(图12A)或通过由Cas9与合成sgRNA组合诱导的K562细胞中的三个基因座IL2RG、HBB和CCR5的HR的基因添加(图12B)来测量诱变型NHEJ的基因破坏。合成的sgRNA以每1百万个细胞1μg(浅色阴影)或20μg(深色阴影)递送。从质粒(2μg)表达Cas9,并对于HR实验,包括5μg的编码GFP的供体质粒。作为阳性对照,使用2μg的编码sgRNA和Cas9蛋白的sgRNA质粒(灰色条)。条表示平均值+s.e.m.,n=3。

[0279] 图12A、12B、12C和12D示出了实验结果,其显示本文所述的化学修饰的sgRNA可用于实现刺激的原代人T细胞和CD34+造血干细胞和祖细胞(HSPC)中的基因破坏或靶向基因组编辑的高频率。

[0280] 图12A示出了用10μg合成的CCR5sgRNA和15μg Cas9mRNA或1μg Cas9编码质粒核转染的原代人T细胞的结果。纳入了编码sgRNA和Cas9蛋白的1μg sgRNA质粒用于比较。这些条代表三个不同供体的平均插入缺失频率+s.e.m.,n=6,如通过跨越sgRNA靶位点的PCR扩增

子的TIDE(通过分解的插入缺失追踪)分析并使用模拟物处理的样品作为对照参考来测量的。用未修饰或M修饰的sgRNA和编码sgRNA和Cas9二者的质粒的核转染递送Cas9mRNA并没有产生高于背景的等位基因修饰频率。用Cas9的DNA表达质粒共转染MSP修饰的sgRNA,产生9.3%的插入缺失频率。具有MS-或MSP-修饰的sgRNA的Cas9mRNA分别产生48.7%和47.9%的插入缺失频率。

[0281] 图12B示出了刺激的T细胞的结果。细胞如上所述接受核转染,但是用15 $\mu$ g Cas9蛋白(其与2.5摩尔过量的所示合成的CCR5sgRNAs复合)进行的。插入缺失频率通过TIDE分析加以测量。条表示三个不同供体的平均插入缺失频率+s.e.m.,n=6。对于化学修饰的sgRNA,当与Cas9蛋白复合递送时,观察到MS修饰的sgRNA相对于未修饰的sgRNA的插入缺失频率的2.4倍的改进(30.7%对12.8%)。这些结果表明,当与Cas9蛋白复合递送时,化学修饰的sgRNA可用于被刺激的T细胞的基因组编辑。

[0282] 图12C示出了人外周血CD34+HSPC的结果。用10 $\mu$ g的靶向IL2RG或HBB的指定合成sgRNA和15 $\mu$ g Cas9mRNA或1 $\mu$ g Cas9质粒对50万个动员的(mobilized)细胞进行核转染。纳入1 $\mu$ g编码sgRNA和Cas9蛋白二者的sgRNA质粒用于比较。条表示平均插入缺失频率+s.e.m.,n=3,如通过T7核酸内切酶切割测定所测得的。当用Cas9mRNA共转染时,使用未修饰的或M修饰的sgRNA在任一位点处均未检测到插入缺失。然而,IL2RG MS-和MSP-修饰的sgRNA分别显示17.5%和17.7%的插入缺失频率,而HBB MS-和MSP-修饰的sgRNA则分别为23.4%和22.0%。

[0283] 图12D示出了受刺激的T细胞或感受态的人外周血CD34+HSPC的结果。将100万个细胞用15 $\mu$ g Cas9mRNA和10 $\mu$ g指定的合成的CCR5sgRNA进行核转染。近期研究显示,同时使用两种sgRNA能改进人原代T细胞和CD34+HSPC中的基因破坏。参见例如Mandal等(2014)Cell Stem Cell,15,643-52。MS-和MSP-修饰的CCR5sgRNA用Mandal研究中报道的序列(称为“D”和“Q”)进行化学合成,其切掉了205个碱基对。当组合使用时,每种sgRNA的量为5 $\mu$ g。通过如上所述的TIDE分析测量具有单个sgRNA的样品的插入缺失频率,并通过对克隆的PCR产物的测序来测量具有两个sgRNA的样品的等位基因破坏频率。条表示平均插入缺失频率+s.e.m.,n=3。在T细胞中,单独的‘D’sgRNA分别对于MS-和MSP-修饰的sgRNA分别产生56.0%和56.3%的插入缺失,而‘Q’sgRNA则分别为62.6%和69.6%。当组合使用时,等位基因修饰的频率增加,因为我们观察到MS-和MSP-修饰的sgRNA的插入缺失分别为73.9%和93.1%,其中大多数修饰事件是两个sgRNA靶位点之间的缺失。在CD34+HSPC中,观察结果是相似的,但总体频率较低。对于‘D’sgRNA,MS-和MSP-修饰的sgRNA的等位基因修饰频率分别为9.8%和11.2%,而‘Q’sgRNA则分别为17.8%和19.2%。当组合使用时,MS-和MSP-修饰的sgRNA的频率分别增加到37.8%和43.0%。这显示使用两种化学修饰的sgRNA是促进原代人T细胞和CD34+HSPC中基因破坏的有效方法。

[0284] 其他用途的实例包括如下所述的基因组编辑和基因表达调控。

[0285] 基因组编辑

[0286] 在一个方面,本发明提供用于在体内或体外修饰DNA序列的基因组编辑方法(“体外”包括但不限于无细胞系统,细胞裂解物,细胞的分离组分,和活体外的细胞)。DNA序列可包含染色体序列,附加体序列,质粒,线粒体DNA序列或功能性基因间序列,例如增强子序列或用于非编码RNA的DNA序列。该方法包括使DNA序列与如下接触:(i)本文所述的指导RNA或一

组指导RNA分子,和(ii)Cas蛋白。在一些实施方案中,DNA序列在细胞外接触。在一些实施方案中,DNA序列位于细胞内的基因组中,并在体外或体内接触。在一些实施方案中,细胞在生物体或组织内。在一些实施方案中,细胞是人细胞,非人哺乳动物细胞,干细胞,非哺乳动物脊椎动物细胞,无脊椎动物细胞,植物细胞,单细胞生物体或胚胎。在一些实施方案中,指导RNA有助于将Cas蛋白靶向DNA序列中的靶位点。在一些实施方案中,Cas蛋白在靶位点处切割DNA序列的至少一条链。在一些实施方案中,Cas蛋白在靶位点处切割DNA序列的两条链。

[0287] 在一些实施方案中,该方法还包括将Cas蛋白引入细胞或另一系统。在一些实施方案中,将Cas蛋白引入纯化或非纯化的蛋白。在一些实施方案中,通过编码Cas蛋白的mRNA引入Cas蛋白。在一些实施方案中,通过编码Cas蛋白的线性或环状DNA引入Cas蛋白。在一些实施方案中,细胞或系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的核酸。

[0288] 在一些实施方案中,可通过易错的非同源末端连接(“NHEJ”)修复过程修复双链断裂。在一些实施方案中,双链断裂可通过同源性定向修复(HDR)过程进行修复,使得供体多核苷酸中的供体序列可整合至靶向的DNA序列中或与靶向的DNA序列交换。

[0289] 在一些实施方案中,该方法还包括将至少一种供体多核苷酸引入细胞或系统。在一些实施方案中,供体多核苷酸包含与DNA序列中靶位点任一侧的序列具有基本序列同一性的至少一个同源序列。在一些实施方案中,供体多核苷酸包含可通过同源性定向修复(例如同源重组)整合至DNA序列中或与DNA序列交换的供体序列。

[0290] 在一些实施方案中,供体多核苷酸包括上游同源序列和下游同源序列,其各自与分别定位于DNA序列中靶位点的上游和下游的序列具有基本序列同一性。这些序列相似性允许例如供体多核苷酸和靶向的DNA序列之间的同源重组,使得供体序列可整合入靶向的DNA序列(或与其交换)。

[0291] 在一些实施方案中,DNA序列中的靶位点跨越或与突变相邻,例如可能导致病症或与病症相关的点突变、转位或倒置。在一些实施方案中,该方法包括通过向细胞或系统引入至少一种供体多核苷酸来校正突变,所述供体多核苷酸包含(i)突变的野生型对应物和(ii)至少一个同源序列,其与DNA序列中靶向位点的一侧上的序列具有基本的序列同一性。在一些实施方案中,供体多核苷酸包含同源序列,其与DNA序列中靶向位点的两侧上的序列具有基本的序列同一性。

[0292] 在一些实施方案中,供体多核苷酸包含外源序列,其可通过同源性定向修复过程(例如同源重组)整合至靶向的DNA序列中或与靶向的DNA序列交换。在一些实施方案中,外源序列包含蛋白编码基因,其可操作性连接至外源启动子控制序列。因此,在一些实施方案中,在外源序列整合时,细胞能表达由整合的基因编码的蛋白。在一些实施方案中,将外源序列整合至靶向的DNA序列中,使其在受体细胞或系统中的表达受外源启动子控制序列调控。将外源基因整合入靶向的DNA序列称为“敲入”。在其它实施方案中,外源序列可为转录控制序列,另一种表达控制序列,RNA编码序列等。

[0293] 在一些实施方案中,供体多核苷酸包含与靶位点处或附近的DNA序列的一部分基本相同但包含至少一个核苷酸变化的序列。例如,在一些实施方案中,供体序列包含在靶位点处或附近的DNA序列的修饰或突变版本,使得在整合至靶向位点中或与靶向位点交换时,靶向位点处的所得序列包含至少一个核苷酸变化。在一些实施方案中,至少一个核苷酸变化是一个或多个核苷酸的插入,一个或多个核苷酸的缺失,一个或多个核苷酸的取代,或其

组合。作为修饰序列的整合的结果,细胞可从靶向的DNA序列产生修饰的基因产物。

[0294] 在一些实施方案中,这些方法适用于多重复合应用。在一些实施方案中,该方法包括将指导RNA文库引入细胞或系统。在一些实施方案中,文库包括至少100个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库包括至少1,000个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库包括至少10,000个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库包括至少100,000个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库包括至少1,000,000个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库靶向至少10个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少10个不同的序列。在一些实施方案中,该文库靶向至少100个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少100个不同的序列。在一些实施方案中,文库靶向至少1,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少1,000个不同的序列。在一些实施方案中,文库靶向至少10,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少10,000个不同的序列。在一些实施方案中,文库靶向至少100,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少100,000个不同的序列。在一些实施方案中,文库靶向至少1,000,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少1,000,000个不同的序列。

[0295] 人和哺乳动物细胞中的基因编辑

[0296] 本发明的实施方案可用于在哺乳动物细胞中的基因组编辑以修饰靶多核苷酸(例如DNA序列)方法。

[0297] 在一些实施方案中,DNA序列是染色体序列。在一些实施方案中,DNA序列是蛋白编码序列。在一些实施方案中,DNA序列是功能性的基因间序列,如增强子序列或非编码序列。在一些实施方案中,DNA是人基因的一部分。在一些此类实施方案中,人基因是网格蛋白轻链(CLTA1)基因,人白细胞介素2受体 $\gamma$ (IL2RG)基因,人细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CLTA4)基因,人原钙粘附蛋白 $\alpha$ 4(PCDHA4)基因,人锯齿形同源异型盒1(EN1)基因,人血红蛋白 $\beta$ (HBB)基因,其可携带引起镰状细胞性贫血和地中海贫血的突变,或人趋化因子(C-C基序)受体5(CCR5)基因,其编码HIV的共同受体。

[0298] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞是人细胞。在一些此类实施方案中,人细胞是原代人细胞。在另外的实施方案中,原代人细胞是人原代T细胞。人原代T细胞可为受刺激或未刺激的。在一些实施方案中,人细胞是干/祖细胞,如CD34+造血干细胞和祖细胞(HSPC)。在一些实施方案中,人细胞来自培养的细胞系,例如可商购获得。例示的细胞系包括K562细胞,人骨髓性白血病系。

[0299] 在一些实施方案中,细胞在活体内。在一些其他实施方案中,细胞在活体外。

[0300] 该方法包括使DNA序列与如下接触:(i)本文所述的指导RNA或一组指导RNA分子,和(ii)Cas蛋白。

[0301] 在一些实施方案中,该方法还包括将指导RNA引入或递送至细胞中。在一些此类实施方案中,通过转染将指导RNA引入细胞。用于RNA转染的技术是本领域已知的,包括电穿孔和脂质转染。在其它实施方案中,通过核转染将指导RNA引入细胞(并且更具体而言为细胞核)中。用于核转染的技术是本领域已知的,并且可利用核转染装置,例如Lonza Nucleofector 2b或Lonza4D-Nucleofector及相关试剂。

[0302] 在一些实施方案中,该方法还包括将Cas蛋白引入或递送至细胞中。在一些此类实施方案中,将Cas蛋白作为纯化的或非纯化的蛋白质而引入。在其它实施方案中,通过编码

Cas蛋白的mRNA引入Cas蛋白。在一些这样的实施方案中,通过转染将编码Cas蛋白的mRNA引入细胞。在其它实施方案中,通过核转染将编码Cas蛋白的mRNA引入细胞(并且更具体而言为细胞核)中。

[0303] 在一些实施方案中,该方法采用基于核糖核蛋白(RNP)的递送方式,使Cas蛋白以与指导RNA的复合体形式引入细胞中。例如,Cas9蛋白可与指导RNA复合于Cas9:gRNA复合体中,这允许共同递送gRNA和Cas蛋白。例如,可将Cas:gRNA复合体核转染入细胞中。

[0304] 在一些实施方案中,该方法采用全RNA递送平台。例如,在一些此类实施方案中,将指导RNA和编码Cas蛋白的mRNA同时或基本上同时(例如通过共转染或共核转染)引入细胞。在一些实施方案中,与Cas mRNA和未修饰的gRNA的共同递送相比,Cas mRNA和修饰的gRNA的共同递送导致更高的编辑频率。具体地,与未修饰的gRNA相比,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者的2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)或2'-0-甲基-3'-硫代PACE(MSP)的gRNA提供更高的编辑频率。

[0305] 在一些实施方案中,将指导RNA和编码Cas蛋白的mRNA序贯地引入细胞;也就是说,指导RNA和编码Cas蛋白的mRNA在不同时间引入细胞。每个试剂的引入之间的时间可在几分钟(或更少)至几小时或几天的范围内。例如,在一些此类实施方案中,首先递送gRNA,然后在4、8、12或24小时后递送Cas mRNA。在其它此类实施方案中,首先递送Cas mRNA,然后在4、8、12或24小时后递送gRNA。在一些具体实施方案中,首先递送修饰的gRNA,随后递送Cas mRNA,导致与递送未修饰的gRNA的随后递送Cas mRNA相比更高的编辑频率。

[0306] 在一些实施方案中,将gRNA与编码Cas蛋白的DNA质粒一起引入细胞。在一些此类实施方案中,通过核转染将gRNA和编码Cas蛋白的DNA质粒引入细胞。在一些具体实施方案中,基于RNP的递送平台或全RNA递送平台在原代细胞中提供比基于DNA质粒的递送系统更低的细胞毒性。

[0307] 在一些实施方案中,该方法显著增强人细胞(包括人原代T细胞和CD34+HSPC)中的基因组编辑效率。

[0308] 在一些实施方案中,相对于未修饰的gRNA,修饰的gRNA增加插入缺失(indel)的频率,这可指示诱变的NHEJ和基因破坏。具体地,相对于未修饰的gRNA,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者处的2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)或2'-0-甲基-3'-硫代PACE(MSP)的修饰的gRNA增加了插入缺失的频率。

[0309] 在一些实施方案中,与未修饰的gRNA和Cas mRNA的共同递送相比,将修饰的gRNA和Cas mRNA共同递送至人原代T细胞中增加了插入缺失的频率。具体地,相对于未修饰的gRNA,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者处的2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)或2'-0-甲基-3'-硫代PACE(MSP)的修饰的gRNA增加了人类原代T细胞中插入缺失的频率。

[0310] 在一些实施方案中,修饰的gRNA相对于未修饰的gRNA改进gRNA的稳定性。作为一个实例,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者处的2'-0-甲基(M)的gRNA适度地改进针对核酸酶的稳定性,并且相对于未修饰的gRNA还改进碱基配对热稳定性。作为另一个实例,相对于未修饰的gRNA,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者处的2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)或2'-0-甲基-3'-硫代PACE(MSP)的gRNA显著提高了针对核酸酶的稳定性。预期gRNA末端修饰增强针对外切核酸酶的细胞内稳定性,这使得当Cas mRNA和gRNA共同递送或序贯递送到人细胞中时,能够增加基因组编辑的功效。

[0311] 在一些实施方案中,修饰的gRNA刺激基因打靶,其又通过例如同源重组或NHEJ进行基因编辑。具体地,具有整合于3个末端核苷酸的5'和3'端二者处的2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯(MS)或2'-0-甲基-3'-硫代PACE(MSP)的gRNA,刺激比未修饰的gRNA更高水平的同源重组。

[0312] 在一些实施方案中,修饰的gRNA保留高度特异性。在一些实施方案中,与未修饰的gRNA相比,修饰的gRNA的中靶对脱靶的插入缺失频率之比是改进的。在一些实施方案中,与基于DNA质粒的递送系统相比,在具有Cas蛋白的RNP复合体中递送的修饰的gRNA提供了显著更佳的中靶:脱靶比率。

[0313] 基因表达调控

[0314] 在一些实施方案中,本文所述的指导RNA用于调节目的基因的转录或表达。例如,在一些实施方案中,使用包含Cas蛋白(例如核酸酶缺陷型Cas9)和转录激活因子多肽的融合蛋白来增加基因的转录。类似地,在一些实施方案中,使用包含Cas蛋白(例如核酸酶缺陷型Cas9)和阻遏因子多肽的融合蛋白通过干扰基因的转录来敲低基因表达。

[0315] 在至少一个方面,本发明提供在体内或体外调控目的基因表达的方法。该方法包括将细胞或另一系统引入(i)本文所述的合成的指导RNA,和(ii)融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白包含Cas蛋白和效应物域,如转录激活域,转录阻遏子域或表观遗传修饰域。在一些实施方案中,融合蛋白包含突变的Cas蛋白,例如作为无效核酸酶的Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白含有一个或多个突变,如D10A、H840A和/或N863A。

[0316] 在一些实施方案中,将融合蛋白作为纯化或非纯化的蛋白引入细胞或系统。在一些实施方案中,通过编码融合蛋白的mRNA将融合蛋白引入细胞或系统。在一些实施方案中,通过编码融合蛋白的线性或环状DNA将融合蛋白引入细胞或系统。

[0317] 在一些实施方案中,指导RNA有助于将融合蛋白导向包含染色体序列,附加体序列,质粒,线粒体DNA序列或功能性基因间序列的特异性靶多核苷酸,例如增强子或非编码RNA的DNA序列。在一些实施方案中,效应物域调控靶多核苷酸序列的表达。可以设计用于调节基因表达的指导RNA以靶向任何所需的内源基因或编码功能性RNA的序列。可以在内源基因的转录起始位点附近选择基因组靶序列,或者在内源基因的翻译起始位点附近选择基因组靶序列。在一些实施方案中,靶序列位于传统上称为基因的“启动子近端”区的DNA区中。在一些实施方案中,靶序列位于转录起始位点上游大约1000个碱基对至转录起始位点下游约1000个碱基对的区中。在一些实施方案中,靶序列远离用于基因转录的起始位点(例如在另一个染色体上)。

[0318] 在一些实施方案中,这些方法适用于多重复合应用。在一些实施方案中,该方法包括将指导RNA文库引入细胞或系统。在一些实施方案中,文库包含至少100个,至少1,000个,至少10,000个,至少100,000个,或至少1,000,000个唯一的指导序列。在一些实施方案中,文库靶向至少10个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少10个不同的序列。在一些实施方案中,文库针对至少100个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内至少100个不同的序列。在一些实施方案中,文库针对至少1,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少1,000个不同的序列。在一些实施方案中,文库靶向至少10,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少10,000个不同序列。在一些实施方案中,文库靶向至少100,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少100,000个不同的序列。在一些实施方案中,文库针对至少1,000,000个不同的多核苷酸或一个或多个多核苷酸内的至少1,000,000个不同的序列。

[0319] 试剂盒

[0320] 一方面,本发明提供含有用于执行上述方法的试剂的试剂盒,包括产生gRNA:Cas蛋白复合体和/或支持其对于结合、切口或切割靶多核苷酸的活性。在一些实施方案中,本文公开的方法中的一种或多种反应组分,例如一种或多种指导RNA和Cas蛋白可以试剂盒的形式提供使用。在一些实施方案中,试剂盒包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的核酸,以及本文所述的一种或多种指导RNA或指导RNA的集合或文库。在一些实施方案中,试剂盒包括一个或多个其他反应组分。在一些实施方案中,在一个或多个容器中提供适量的一种或多种反应组分或保持在基底上。

[0321] 试剂盒的其它组分的实例包括但不限于一种或多种不同的聚合酶,一种或多种宿主细胞,用于将外来核酸引入宿主细胞的一种或多种试剂,用于检测指导RNA和/或Cas mRNA或蛋白的表达或用于验证靶核酸的状态的一种或多种试剂(例如探针或PCR引物),以及用于反应的缓冲液、转染试剂或培养基(以1倍或更多浓缩形式)。在一些实施方案中,试剂盒包括一个或多个以下组分:生化和物理支持物;终止、修饰和/或消化试剂;渗透剂(osmolyte);和用于反应、转染和/或检测的装置。

[0322] 所使用的反应组分可以各种形式提供。例如,组分(例如酶, RNA, 探针和/或引物)可悬浮在水溶液中或与珠粒结合或作为冷冻干燥的或冻干的粉末或沉淀物。在后一种情况下,组分在重建时形成组分的完全混合物用于测定。本发明的试剂盒可以任何合适的温度提供。例如,为了将含有蛋白质组分或其复合体的试剂盒储存在液体中,优选将它们提供并保持在低于0°C,优选为约-20°C,可能在含有甘油或其它合适的防冻剂的抗冻溶液中。

[0323] 试剂盒或系统可以含有足以用于至少一个测定的量的、任何组合的本文所述组分。在一些应用中,一个或多个反应组分可以预先测量的单次使用量在单独的、通常为一次性的管或相当的容器中提供。通过这样的布置,可通过将靶核酸或含有靶核酸的样品或细胞直接添加到各个管中来进行RNA指导的核酸酶反应。试剂盒中提供的组分的量可为任何适当的量,并可取决于产品所针对的市场。其中供应组分的容器可为能够保持供应形式的任何常规容器,例如微量离心管、微量滴定板,安瓿,瓶、或整体测试装置,例如流体装置,筒,横向流或其他类似装置。

[0324] 试剂盒还可包括用于容纳容器或容器组合的包装材料。用于此类试剂盒和系统的典型包装材料包括将反应组分或检测探针保持在各种配置(例如在小瓶,微量滴定板孔,微阵列等)中的固体基质(例如玻璃,塑料,纸,箔,微粒等)。试剂盒还可包括以有形形式记录的用于使用组分的说明。

## 实施例

[0325] 实施例1

[0326] 为了评估化学合成的指导RNA靶向和切割DNA靶序列的能力,开发了体外切割测定。简而言之,如图3所示,通过制备型PCR扩增质粒携带的人序列(这里是来自人网格蛋白轻链CLTA基因的序列)制备~4-kb的PAM可寻址DNA靶标。以20μL的反应体积,在50nM sgRNA、39nM重组纯化的Cas9蛋白(酿酒酵母;Agilent)和10mM MgCl<sub>2</sub>(pH 7.6)的存在下,将50f摩尔的线性化DNA靶标在37°C温育30分钟。完成后,加入0.5μL的RNase I (Agilent),并在37°C继续温育5分钟,然后在70°C温育15分钟。随后加入0.5μL蛋白酶K (Mol.Bio.grade,

NEB),并在37°C温育15分钟。将等分试样加载到DNA 7500LabChip中,并在Bioanalyzer 2200上进行分析。检查(workup)步骤用于从与靶DNA的结合释放Cas9,分析其用于切割。

[0327] 化学合成了如图4所示的一系列指导性RNA。简言之,合成单个RNA链,并进行HPLC纯化。所有寡核苷酸均通过HPLC分析和全长链纯度通过质谱分析基于化学纯度批准进行质量控制。将这些指导RNA中的每一个设计为靶向人CLTA基因。

[0328] 结果示于图4。如图4的表1所示,除化学合成的指导RNA的一个之外,所有化学合成的指导RNA以显著的切割速率靶向和切割CLTA编码的DNA靶序列。所述一个例外是“CLTA\_37\_脱氧”指导RNA,其在其5'端具有37个脱氧核糖核苷酸的连续序列。

[0329] 如本文所公开的,在指导RNA的序列中的特定位置处测试了各种化学修饰。令人惊讶的是,指导RNA(亦称指导RNA中的间隔序列)的指导序列中的测试位置容许测试的大多数修饰,包括指导RNA中单个核苷酸内的多个修饰的组合,即使是当靶结合序列中的修饰实体化(instantiated)时。

[0330] 结果表明,在特定位置含有修饰的指导RNA是被活性Cas蛋白和gRNA:Cas蛋白复合体容许的,因为修饰不能防止靶多核苷酸的靶特异性切割。在图4的表1中列出的所有指导RNA序列中,5'端的前20个核苷酸与靶DNA中的靶序列互补。经测试并发现特定位置可容许的修饰包括2'-0-甲基核糖核苷酸(=2' OMe),2'-脱氧核糖核苷酸,外消旋硫代磷酸酯核苷酸间连接(=P(S)),3'-膦酰基乙酸酯(=PACE),3'-硫代膦酰基乙酸酯(=硫代PACE),Z核苷酸及其组合。

[0331] 预期本文公开和测试的化学修饰,特别是在测试位置(如图4的表1中所列)处的化学修饰会在多种指导RNA中的等同位置处是容许的。在一些实施方案中,本文公开和测试的化学修饰在指导RNA中的任何位置处都是容许的。

[0332] 如本文所公开的,将化学修饰的核苷酸整合入指导RNA中以图改善一些特性。这些特性包括改进的指导RNA的核酸酶抗性,降低的gRNA:Cas蛋白复合体的脱靶效应(也称为改进的特异性),切割、切口或结合靶多核苷酸时改进的gRNA:Cas蛋白复合体的功效,改进的转染效率,和/或改进的细胞器定位如核定位。

[0333] 虽然已知使用修饰的RNA(例如在某些应用中阻止核酸分解降解),但众所周知,不能简单地在RNA序列中的任何或所有位置整合入修饰,并期望其起作用,特别是当RNA序列需要与蛋白或酶复合以发挥某些功能时。因此,这些指导RNA是否能容许各种核苷酸位置处的化学修饰同时在CRISPR-Cas系统中执行充分或改进的功能,是不可预测的。实际上,指导RNA能容忍实体化和测试的程度的具体修饰,特别是在测试的几个位置处,这是预料不到的。

#### [0334] 实施例2

[0335] 为了评估化学合成的指导RNA靶向和切割DNA靶序列的能力,使用与实施例1中所述类似的体外切割测定。靶DNA构建体用于人DNA靶标(来自人网格蛋白轻链(CLTA1)基因,人白细胞介素2受体 $\gamma$ (IL2RG)基因,人细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CLTA4)基因,人原癌黏附蛋白 $\alpha$ 4(PCDHA4)基因,和人锯齿形同源异型盒1(EN1)基因),连同与靶DNA有一个或多个核苷酸不同的脱靶DNA构建体。

[0336] 表3示出了指导RNA构建体及其序列,以及用于评估那些指导RNA构建体靶向和切割的能力的DNA构建体。在表3中列出的所有指导RNA序列中,5'端的前20个核苷酸与靶DNA中的靶序列互补。中靶构建体包含20个核苷酸靶序列。脱靶构建体包含与靶DNA相同的20个

核苷酸的大多数,其有1、2或3个核苷酸差异。因此,指导RNA基本上但不完全与脱靶构建体的序列互补。脱靶构建体基于已知出现在人基因组中的基因序列。

表3

[0337]

条目 #	指导RNA构建体	靶DNA构建体	RNA序列 (5' → 3')	RNA 长度
未修饰的双重-指导RNA (dgRNA)				
2-件双指导骨架				
1	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
2	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
3	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	ACUUGUAAAAGGUCCGUUAAGGCUAUGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26) AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
4	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	ACUUGUAAAAGGUCCGUUAAGGCUAUGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26) AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
5	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 靶标	ACUUGUAAAAGGUCCGUUAAGGCUAUGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26) AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
6	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 靶标	ACUUGUAAAAGGUCCGUUAAGGCUAUGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26) AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86
7	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 靶标	ACUUGUAAAAGGUCCGUUAAGGCUAUGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26) AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGGCUAUGCUGUUUGAAUUGGUCCC AAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCCGUUAUCA	56 + 86

[0338]

8	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCC AAAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUAGGUCCGUUAUCA ACUIGUAAAAGUGGCCACGGACGUCCGGU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
9	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 靶标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCC AAAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUAGGUCCGUUAUCA ACUIGUAAAAGUGGCCACGGACGUCCGGU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
10	IL2RG_crRNA + tracrRNA	IL2RGmng ON- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCC AAAAAC (SEQ ID NO: 25) GGAAACCAUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUAGGUCCGUUAUCA ACUIGUAAAAGUGGCCACGGACGUCCGGU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
荧光团偶联的dgRNA				
11	CLTA1 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCC AAAAAC (SEQ ID NO: 29) GGAAACCAUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUAGGUCCGUUAUCA ACUIG(氨基端丙基 U+C,5)AAAAGUGGCCACCGAGUCGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 30)	56 + 86
2' O 甲基修饰的dgRNA				
12	IL2RG_crRNA_5',3'-3x (2'OMe) + tracrRNA_5',3'- 3x(2'OMe)	IL2RGmng ON- 靶标	UGGUAAUGAUGGCCUUCAACAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUCCC AAAAAC (SEQ ID NO: 31) GGAAACCAUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUAGGUCCGUUAUCA ACUIG(氨基端丙基 U+C,5)AAAAGUGGCCACCGAGUCGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 32)	56 + 86
2' O 甲基,3'硫代磷酸酯修饰的dgRNA				
13	IL2RG_crRNA_5',3'-3x (2'OMe,3'P(S) + tracrRNA_5',3'-3x(2' O Me,3'P(S))	IL2RGmng ON- 靶标	U <sub>8</sub> GG <sub>8</sub> S <sub>8</sub> G <sub>8</sub> *G <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> UAUGAUGGCCUUCAACAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CCAASASASC (SEQ ID NO: 33) G <sub>8</sub> G <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> ACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCCUAGUCCGUUUU <sub>8</sub> U (SEQ ID NO: 34)	56 + 86
2' O 甲基,3'硫代酸酯基PACE修饰的dgRNA				
14	IL2RG_crRNA_5',3'-3x (2'OMe,3'硫代PACE) + tracrRNA_5',3'-3x(2' O Me,3'硫代PACE)	IL2RGmng ON- 靶标	U <sub>8</sub> S <sub>8</sub> G <sub>8</sub> *G <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> UAUGAUGGCCUUCAACAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU UCCCA <sub>8</sub> A <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> A <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> *SC (SEQ ID NO: 35) G <sub>8</sub> *G <sub>8</sub> *S <sub>8</sub> ACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCCUAGUCCGUU AUCAACUUGUAAAAGUGGCCACCGAGUCGGUGCUUU <sub>8</sub> U (SEQ ID NO: 36)	56 + 86
15	IL2RG_crRNA_5',3'-1x	IL2RGmng ON-	U <sub>8</sub> GG <sub>8</sub> UAUGAUGGCCUUCAACAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGU CC	56 + 86

[0339]

	(2'OMe, 3'硫代PACE) + tracrRNA_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	靶标	CAAAA* <sup>SC</sup> G*GAACC AUUCAAAACAGCAUGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC AACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGUUCUUU <sup>U</sup> *U (SEQ ID NO: 38)	SEQ ID NO: 37)
<b>2'-硫代U修饰的dgRNA</b>				
16	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
17	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
18	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
19	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
20	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
21	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF2- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
22	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
23	CLTA1_2硫代U+3 crRNA + tracrRNA	CLTA1 OFF3- 靶标	AG(2sU)CCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 39) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUC ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86

[0340]

24	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI ON1-靶 标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
25	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI ON1-靶 标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
26	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF1- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
27	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF1- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
28	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF2- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
29	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF2- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
30	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF3- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
31	CLTAI_2硫代U+9 crRNA + tracrRNA	CLTAI OFF3- 靶标	AGUCCUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 40) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
32	CLTAI_2硫代U+11 crRNA + tracrRNA	CLTAI ON1-靶 标	AGUCCUCAUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGCUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
33	CLTAI_2硫代U+11 crRNA + tracrRNA	CLTAI ON1-靶 标	AGUCCUCAUCA(2sU)CUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUGAAUGGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41)+	56 + 86

[0341]

34	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
35	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	CLTA1 OFF1- 靶标	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
36	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	CLTA1 OFF2- 靶标	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
37	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	"	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
38	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	CLTA1 OFF3- 靶标	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
39	CLTA1_2硫代U+11 erRNA + tracerRNA	"	GGACCACAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	AGUCCUCAUC(2s)CCCCUAAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUUUGAAU GGUC CCAAAAC (SEQ ID NO: 41) GGAAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAGGUCAUGCGGUUAUCA ACUUGUAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUUUUU (SEQ ID NO: 26)	56 + 86
<b>单一指导骨架</b>					
<b>未修饰的单一指导RNA (sgRNA)</b>					
40	CLTA1 sgRNA (批次 #1)	CLTA1 ON1- 靶 标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUCAUGCGGUUAUCACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)		113
41	CLTA1 sgRNA (批次 #1)	CLTA1 ON1- 靶 标	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUCAUGCGGUUAUCACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)		113
42	CLTA1 sgRNA (批次	CLTA1 ON1- 靶	AGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA		113

[0342]

		#2)	标	AGUUUUAAAUAGGUUAUGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	
43	CLTA1 sgRNA	(批次 #2)	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
44	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
45	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
46	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
47	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
48	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
49	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
50	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 <sup>mg</sup> OFF1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
51	CLTA1 sgRNA	(批次 #3)	CLTA1 <sup>mg</sup> OFF3- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
52	CLTA1 sgRNA (粗制品)		CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUUAAAUAGGUUAGGUUAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 42)	113
53	CLTA1_Bos sgRNA		CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUU AGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUU (SEQ ID NO: 43)	100
54	CLTA1_Bos sgRNA		CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUU AGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUUAGGUU (SEQ ID NO: 43)	100

[0343]

55	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC GUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAAAU AGGUCAUGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCCGCUUU (SEQ ID NO: 43)	100
56	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg OFF1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC GUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAAAU AGGUCAUGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCCGCUUU (SEQ ID NO: 43)	100
57	CLTA1_Bos sgRNA	CLTA1mg OFF3-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCAAGC GUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAAAU AGGUCAUGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCCGCUUU (SEQ ID NO: 43)	100
58	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-靶 标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
59	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-靶 标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
60	CLTA4 sgRNA	CLTA4 ON-靶 标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
61	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg ON- 靶标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
62	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg ON- 靶标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
63	CLTA4 sgRNA	CLTA4mg OFF5-靶标	GCAGAUGUAGUGUTUCCACAGGUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 44)	113
64	CLTA1_截短的_18聚体	CLTA1mg ON1-靶标	UCCUCAUCUCCCUCAAGGUUAAGGUAAACAGCAUAGCAAG UUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 45)	111
65	CLTA1_截短的_18聚体	CLTA1mg ON1-靶标	UCCUCAUCUCCCUCAAGGUUAAGGUAAACAGCAUAGCAAG UUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 45)	111
66	CLTA1_截短的_18聚体	CLTA1mg OFF1-靶标	UCCUCAUCUCCCUCAAGGUUAAGGUAAACAGCAUAGCAAG UUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 45)	111
67	CLTA1_截短的_18聚体	CLTA1mg	UCCUCAUCUCCCUCAAGGUUAAGGUAAACAGCAUAGCAAG UUUUAAAUAAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU GUCGCUUUUUU (SEQ ID NO: 45)	111

[0344]

		OFF3-靶标	GUUUUUUUU (SEQ ID NO: 45)
68	CLTA1_截短的_17聚体	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	CCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGCAAGU UUAAGAUAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGGGUG CUUUUUUUU (SEQ ID NO: 46)
69	CLTA1_截短的_17聚体	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	CCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGCAAGU UUAAGAUAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGGGUG CUUUUUUUU (SEQ ID NO: 46)
70	CLTA1_截短的_17聚体	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	CCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGCAAGU UUAAGAUAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGGGUG CUUUUUUUU (SEQ ID NO: 46)
71	CLTA1_截短的_17聚体	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	CCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGCAAGU UUAAGAUAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUGGGUG CUUUUUUUU (SEQ ID NO: 46)
72	CLTA1_1xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	GAGUCCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 47)
73	CLTA1_1xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	GAGUCCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 47)
74	CLTA1_1xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	GAGUCCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 47)
75	CLTA1_1xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	GAGUCCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 47)
76	CLTA1_2xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	GGAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAG CAAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 48)
77	CLTA1_2xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	GGAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAG CAAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 48)
78	CLTA1_2xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	GGAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAG CAAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 48)
79	CLTA1_2xExtraG	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	GGAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUUACAGCAUAG CAAGUUUAAAAGGUAGCUAGCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGGUUUUUUUU (SEQ ID NO: 48)

[0345]

80	CLTA1_63U,64U	CLTA1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAUUCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GGCUUUUUU (SEQ ID NO: 49)	113
81	CLTA1_63A,64A	CLTA1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAUUCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GGCUUUUUU (SEQ ID NO: 50)	113
82	CLTA1_63A,64A,70U,7 1U	CLTA1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAUUCUAGUUGGUUAUCUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GGCUUUUUU (SEQ ID NO: 51)	113
83	CLTA1_cis-block(1-5)_P polyU_sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	GGACUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAUAGGCUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC GGGGCUUUU (SEQ ID NO: 52)	111
84	CLTA1_cis-block(1-5)_P polyU_sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	GGACUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAUAGGCUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC GGGGCUUUU (SEQ ID NO: 52)	111
85	CLTA1_cis-block(1-5)_P polyU_sgRNA	CLTA1mg OFF1-靶标	GGACUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAUAGGCUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC GGGGCUUUU (SEQ ID NO: 52)	111
86	CLTA1_cis-block(1-5)_P polyU_sgRNA	CLTA1mg OFF3-靶标	GGACUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAUAGGCUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC GGGGCUUUU (SEQ ID NO: 52)	111
87	CLTA1_cis-block(1-10) _polyU_sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	GAUGAGGACUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAA AUAGCAAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCAC GAGUCGGGGCUUUU (SEQ ID NO: 53)	116
88	CLTA1_cis-block(1-10) _polyU_sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	GAUGAGGACUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAA AUAGCAAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCAC GAGUCGGGGCUUUU (SEQ ID NO: 53)	116
89	CLTA1_cis-block(1-10) _polyU_sgRNA	CLTA1mg OFF1-靶标	GAUGAGGACUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAA AUAGCAAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCAC GAGUCGGGGCUUUU (SEQ ID NO: 53)	116
90	CLTA1_cis-block(1-10) _polyU_sgRNA	CLTA1mg OFF3-靶标	GAUGAGGACUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAA AUAGCAAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCAC GAGUCGGGGCUUUU (SEQ ID NO: 53)	116
91	CLTA1_cis-block(16-20) _polyU_sgRNA	CLTA1mg ON1-靶标	GCUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC GGGGCUUUU (SEQ ID NO: 54)	111
92	CLTA1_cis-block(16-20)	CLTA1mg	GCUUUUUUUAGGUCCUCAUCUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAAGAAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUAGUCGU/AUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUC	111

[0346]

	<b>polyU_sgRNA</b>	<b>ON1-靶标</b>	<b>GGUGCUUUU (SEQ ID NO: 54)</b>
93	<b>CLTA1_cis-block(16-20) -polyU_sgRNA</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> OFF1-靶标</b>	<b>GGUUGUUUUAGGUCCUACUCCCUAAGCGUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAUAAGGUCCUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU (SEQ ID NO: 54)</b>
94	<b>CLTA1_cis-block(16-20) -polyU_sgRNA</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> OFF3-靶标</b>	<b>GGUUGUUUUAGGUCCUACUCCCUAAGCGUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAUAAGGUCCUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU (SEQ ID NO: 54)</b>
<b>DMT修饰的sgRNA</b>			
95	<b>CLTA1_DMT-ON sgRNA</b>	<b>CLTA1 ON1-靶 标</b>	<b>(dmT)AGUCCUCAUCUCCUCAAGGUUAGAGCUAUGCUGUAACGCAUA GCAAGUUI/AAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 55)</b>
96	<b>CLTA1_DMT-ON/OFF sgRNA</b>	<b>CLTA1 ON1-靶 标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGUAACGCAUA AGUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUU (SEQ ID NO: 56)</b>
<b>荧光团修饰的sgRNA</b>			
97	<b>CLTA1_IntFl_sg环</b>	<b>CLTA1 ON1-靶 标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGGUUAGAGCUAUGCUGG(Fl)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 57)</b>
98	<b>CLTA1_IntFl_sg环</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> ON1-靶标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGGGUUUAAGAGCUAUGCUGG(Fl)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 57)</b>
99	<b>CLTA1_IntFl_sg环</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> ON1-靶标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGGGUUUAAGAGCUAUGCUGG(Fl)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 57)</b>
100	<b>CLTA1_IntFl_sg环</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> OFF1-靶标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGGGUUUAAGAGCUAUGCUGG(Fl)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 57)</b>
101	<b>CLTA1_IntFl_sg环</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> OFF3-靶标</b>	<b>AGUCCUCUCAUCUCCUCAAGGGUUUAAGAGCUAUGCUGG(Fl)AACAGCAUAGC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 57)</b>
102	<b>CLTA1_IntFl_sg环 -5',3'-3x(2'OMe)</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> ON1-靶标</b>	<b>AGUUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 58)</b>
103	<b>CLTA1_IntFl_sg环 -5',3'-3x(2'OMe)</b>	<b>CLTA1<sup>Img</sup> ON1-靶标</b>	<b>AGUUUAAAUAAGGUAGGUUACUACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 58)</b>

[0347]

[0348]

116	CLTA4_3xF1-环 s_3x(2'OMe, 3'硫代 PACE)	CLTA4mg ON- 靶标	U(F1)U*SU (SEQ ID NO: 61)
			<u>G*scAGAUAGUAGUUUCCACAGUUaAGAGCUAG(F1)AAUAGCAAGUuAAA UAAGGCUAGUCCGUUAACUUG(F1)AAAAGUGGCACCGAG(F1)CGGUGCUU</u> 100 U*SU (SEQ ID NO: 62)
117	CLTA4_3xF1-环 s_3x(2'OMe, 3'硫代 PACE)	CLTA4mg OFF5-靶标	U(F1)U*SU (SEQ ID NO: 61)
<b>3'硫代磷酸酯修饰的sgRNA</b>			
118	CLTA1_5'-2xP(S) sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AsGSUCCUCAUCUCCCUAAGCGGUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 63)
119	CLTA1_5'-3xP(S) sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AsGSUCCUCAUCUCCCUAAGCGGUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGC AAGUUUAAAAGGUAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 64)
120	CLTA1_5'-4xP(S) sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AsGSUCCUCAUCUCCCUAAGCGGUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAG CAAGUUUAAAAGGUAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 65)
121	CLTA1_3'-4xP(S) sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUAAGCGGUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 66)
<b>2' O甲基修饰的sgRNA</b>			
122	CLTA1_2'OMe+20 sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUAAG <u>CC</u> GUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 67)
123	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1 ON1- 靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUAAG <u>CC</u> GUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 68)
124	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCUAAG <u>CC</u> GUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 68)
125	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg ON1- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCUAAG <u>CC</u> GUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 68)
126	CLTA1_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1mg OFF1- 靶标	AGUCCUCAUCUCCCUAAG <u>CC</u> GUUAAAGAGCUAUGUGCUAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUCG 113

[0349]

			GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 68)
127	CLTAI_2'OMe+19 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 68)
128	CLTAI_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 69)
129	CLTAI_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 69)
130	CLTAI_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 69)
131	CLTAI_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 69)
132	CLTAI_2'OMe+18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 69)
133	CLTAI_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 70)
134	CLTAI_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 70)
135	CLTAI_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 70)
136	CLTAI_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 70)
137	CLTAI_2'OMe+17 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 70)
138	CLTAI_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGGCCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUAAUCUAGAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 71)

[0350]

139	CLTAI_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 71)	113
140	CLTAI_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 1mg ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 71)	113
141	CLTAI_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 1mg OFF1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 71)	113
142	CLTAI_2'OMe+17,18 sgRNA	CLTA1 1mg OFF3-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 71)	113
143	CLTAI_5',3'-3x(2'OMe ) sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 72)	113
144	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe ) sgRNA	CLTA4 4mg ON-靶标	<u>GC</u> AGAUGUAGUGUUUCACAGGUUAAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 73)	113
145	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe ) sgRNA	CLTA4 4mg OFF5-靶标	<u>GC</u> AGAUGUAGUGUUUCACAGGUUAAAGAGCUAUGCUUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 73)	113
146	CLTAI_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113
147	CLTAI_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 1mg ON1-靶标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113
148	CLTAI_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 1mg ON1-靶标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113
149	CLTAI_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 1mg OFF1-靶标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113
150	CLTAI_5'-20x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 1mg OFF3-靶标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113
151	CLTAI_5'-26x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	<u>AG</u> UCCUCAUCUCCCUC <del>AA</del> AGCUAUGGUAAACAGCAUAGC AGUUUAAAUAAGGCUAGGUUAAAGAGCUAUCUAGA GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 74)	113

[0351]

	sgRNA	标	GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 75)
152	CLTA1_5'-37x(2'OMe) sgRNA	CLTA1 ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGUUUAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC</u> <u>AAGUUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUAAACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 76)
153	CLTA1_41x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUAAACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 77)
154	CLTA1_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 78)
155	CLTA1_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCAACCGAGU <sub>CG</sub>
156	CLTA1_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 79)
157	CLTA1_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 79)
158	CLTA1_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 79)
159	CLTA1_47x(2'OMeG/A )_QB3	CLTA1 ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 80)
160	CLTA1_47x(2'OMeG/A )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCAACCGAGU <sub>CG</sub>
161	CLTA1_47x(2'OMeG/A )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 80)
162	CLTA1_47x(2'OMeG/A )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCAACCGAGU <sub>CG</sub>
163	CLTA1_47x(2'OMeG/A )_QB3	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-# <sub>2</sub> 标	<u>AGUCCUCUACUCUCCCUAAGGGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC</u> <u>AGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAGUGG</u> GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 80)

[0352]

164	CLTA1_43x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA1 ON1- <u>靶</u> 标	<u>AGUCCUCAUCCCCUCAAGC</u> <u>GUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUA</u> <u>AAAUA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
165	CLTA1_43x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA1mg ON1- <u>靶</u> 标	<u>AGUCCUCAUCCCCUCAAGC</u> <u>GUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUA</u> <u>AAAUA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
166	CLTA1_43x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA1mg ON1- <u>靶</u> 标	<u>AGUCCUCAUCCCCUCAAGC</u> <u>GUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUA</u> <u>AAAUA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
167	CLTA1_43x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA1mg OFF1- <u>靶</u> 标	<u>AGUCCUCAUCCCCUCAAGC</u> <u>GUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUA</u> <u>AAAUA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
168	CLTA1_43x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA1mg OFF3- <u>靶</u> 标	<u>AGUCCUCAUCCCCUCAAGC</u> <u>GUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUA</u> <u>AAAUA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
169	CLTA4 sgRNA_5',3'-3x(2'OMe)	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUGC</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGU</u> <u>UUA</u> <u>AAU</u> <u>UAGG</u> <u>CUA</u> <u>GU</u> <u>CC</u> <u>GU</u> <u>UA</u> <u>UAC</u> <u>U</u> <u>GU</u> <u>AA</u> <u>AGG</u> <u>GCACCGA</u> <u>GU</u> <u>CG</u>	113
170	CLTA4 sgRNA_5',3'-3x(2'OMe)	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUGC</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGU</u> <u>UUA</u> <u>AAU</u> <u>UAGG</u> <u>CUA</u> <u>GU</u> <u>CC</u> <u>GU</u> <u>UA</u> <u>UAC</u> <u>U</u> <u>GU</u> <u>AA</u> <u>AGG</u> <u>GCACCGA</u> <u>GU</u> <u>CG</u>	113
171	CLTA4_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUGC</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGU</u> <u>UUA</u> <u>AAU</u> <u>UAGG</u> <u>CUA</u> <u>GU</u> <u>CC</u> <u>GU</u> <u>UA</u> <u>UAC</u> <u>U</u> <u>GU</u> <u>AA</u> <u>AGG</u> <u>GCACCGA</u> <u>GU</u> <u>CG</u>	113
172	CLTA4_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUGC</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGU</u> <u>UUA</u> <u>AAU</u> <u>UAGG</u> <u>CUA</u> <u>GU</u> <u>CC</u> <u>GU</u> <u>UA</u> <u>UAC</u> <u>U</u> <u>GU</u> <u>AA</u> <u>AGG</u> <u>GCACCGA</u> <u>GU</u> <u>CG</u>	113
173	CLTA4_47x(2'OMeC/U )_QB3	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUGC</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGU</u> <u>UUA</u> <u>AAU</u> <u>UAGG</u> <u>CUA</u> <u>GU</u> <u>CC</u> <u>GU</u> <u>UA</u> <u>UAC</u> <u>U</u> <u>GU</u> <u>AA</u> <u>AGG</u> <u>GCACCGA</u> <u>GU</u> <u>CG</u>	113
174	CLTA4_49x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUG</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
175	CLTA4_49x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGAGCUAUG</u> <u>GU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100
176	CLTA4_49x(2'OMeG/A )_Bos	CLTA4 ON- <u>靶</u> 标	<u>GCAGAUGUAGUGU</u> <u>UUCCACAGGUUAAGGU</u> <u>AAACAGCAUAGCA</u> <u>AGGC</u> <u>UAGUCCGUUA</u> <u>ACU</u> <u>GU</u> <u>AGG</u> <u>ACCGAGU</u> <u>GGU</u> <u>GU</u> <u>UUU</u>	100

[0353]

177	CLTA4_39x(2'OMeC/U )_Bos	CLTA4 ON- <sup>●</sup> 标	标	(SEQ ID NO: 84)
				GCAGAUAGGUAGGUUUCACAGUUUAGGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAUA AGGCCUAGGUCCGUUAUCAACUAGGUUCCGUU (SEQ ID NO: 85)
178	CLTA4_39x(2'OMeC/U )_Bos	CLTA4 ON- <sup>●</sup> 标	标	(SEQ ID NO: 85)
				GCAGAUAGGUAGGUUUCACAGUUUAGGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAUA AGGCCUAGGUCCGUUAUCAACUAGGUUCCGUU (SEQ ID NO: 85)
179	CLTA4_39x(2'OMeC/U )_Bos	CLTA4 ON- <sup>●</sup> 标	标	(SEQ ID NO: 85)
				GCAGAUAGGUAGGUUUCACAGUUUAGGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAUA AGGCCUAGGUCCGUUAUCAACUAGGUUCCGUU (SEQ ID NO: 85)
<b>2'脱氨基修饰的sgRNA</b>				
180	CLTA1_5'-20x(2'脱氧)	CLTA1 ON1- <sup>●</sup> 标	标	(AGTCCCTCATCTCCCTCAAGGUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCG GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 86)
181	CLTA1_5'-26x(2'脱氧)	CLTA1 ON1- <sup>●</sup> 标	标	(AGTCCCTCATCTCCCTCAAGGGTTAAAGGUAGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCG GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 87)
182	CLTA1_5'-37x(2'脱氧)	CLTA1 ON1- <sup>●</sup> 标	标	(AGTCCCTCATCTCCCTCAAGGGTTAAAGAGCTATGCTGGUAAACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCG GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 88)
<b>2'脱氨基,3'PACE修饰的sgRNA</b>				
183	CLTA4_2'脱氧 3'PACE+15	CLTA4 mg ON- <sup>●</sup> 标	标	(GCAGAUAGGUAGGUUAAAGGUUAAAGGUUAAACGUAAAAGUGGCACCGAGUC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 89)
184	CLTA4_2'脱氧 3'PACE+15	CLTA4 mg OFF5- <sup>●</sup> 标	标	(GCAGAUAGGUAGGUUAAAGGUUAAAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 89)
<b>2'OH<sup>●</sup>,3'PACE修饰的sgRNA</b>				
185	5'-1x(2'OMe,3'PACE)_ CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- <sup>●</sup> 标	标	( <sup>A</sup> *GUCCUCAUCUCCCUAAGGUUAAAGGUUAAUAGGUUACAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 90)
186	5'-1x(2'OMe,3'PACE)_ CLTA1 sgRNA	CLTA1mg ON1- <sup>●</sup> 标	标	( <sup>A</sup> *GUCCUCAUCUCCCUAAGGUUAAAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC AGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 90)
187	5'-2x(2'OMe,3'PACE)_ CLTA1 sgRNA	CLTA1 ON1- <sup>●</sup> 标	标	( <sup>A</sup> *G*UCCUCAUCUCCCUAAGGUUAAAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC AAGUUAAAUAAGGUAGGUUAAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGGUUUUUU (SEQ ID NO: 89)

[0354]

			GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 91)
188	5'-2x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 ON1- <del>标记</del> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*UCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC$ AAGUUUAAAAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 91)
189	5'-2x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*UCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC$ AAGUUUAAAAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 91)
190	5'-2x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*UCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGC$ AAGUUUAAAAGCUAGUCGUUAUCUAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 91)
191	5'-3x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*A^*GUCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAU$ AGCAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGA GUCCGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 92)
192	5'-3x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*A^*GUCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAU$ AGCAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGA GUCCGUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 92)
193	5'-4x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 ON1- <del>标记</del> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*U^*C^*CUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAG$ CAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUCCUUTUUUUU (SEQ ID NO: 93)
194	5'-4x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*U^*C^*CUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAG$ CAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUCCUUTUUUUU (SEQ ID NO: 93)
195	5'-4x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*U^*C^*CUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAG$ CAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUCCUUTUUUUU (SEQ ID NO: 93)
196	5'-5x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 <sup>mg</sup> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*A^*G^*U^*CCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCA$ UAGGUCAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCG AGUCCGUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 94)
197	5'-5x(2'OMe,3'PACE)_- CLTA1 sgRNA	CLTA1 ON1- <del>标记</del> ON1- <del>标记</del>	$\Delta^*G^*A^*G^*U^*CCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCA$ UAGGUCAAGUUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCG AGUCCGUGGUUUUUU (SEQ ID NO: 94)
198	CLTA1_3'-4x(2'OMe,3' PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- <del>标记</del> ON1- <del>标记</del>	AGUCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCA AAGGUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGAGU GUGGUUUU*U*U*U*U (SEQ ID NO: 95)
199	CLTA1_3'-4x(2'OMe,3' PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- <del>标记</del> ON1- <del>标记</del>	AGUCCUCAUCUCCCUAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCA AAGGUUAAAAGGUCAAGGUUAACUJGAAAAAGUGGCACCGAGU GUGGUUUU*U*U*U*U (SEQ ID NO: 95)

[0355]

200	CLTA1_3'-4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 95)	113
201	CLTA1_3'-4x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 95)	113
202	CLTA1_3'-5x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 96)	113
203	CLTA1_3'-5x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 96)	113
204	CLTA1_3'-5x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 96)	113
205	CLTA1_3'-5x(2'OMe,3'PACE) sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1- <sup>靶</sup> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUU <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> *U <sup>U</sup> (SEQ ID NO: 96)	113
206	5'-3x(2'OMe,3'PACE) <sub>-</sub> plusOverhg_CLTA1	CLTA1 ON1- <sup>靶</sup> 标	C <sub>o</sub> *A <sup>1</sup> G <sup>2</sup> U <sup>3</sup> U <sup>4</sup> U <sup>5</sup> U <sup>6</sup> U <sup>7</sup> U <sup>8</sup> U <sup>9</sup> U <sup>10</sup> U <sup>11</sup> U <sup>12</sup> U <sup>13</sup> U <sup>14</sup> U <sup>15</sup> U <sup>16</sup> U <sup>17</sup> U <sup>18</sup> U <sup>19</sup> U <sup>20</sup> U <sup>21</sup> U <sup>22</sup> U <sup>23</sup> U <sup>24</sup> U <sup>25</sup> U <sup>26</sup> U <sup>27</sup> U <sup>28</sup> U <sup>29</sup> U <sup>30</sup> U <sup>31</sup> U <sup>32</sup> U <sup>33</sup> U <sup>34</sup> U <sup>35</sup> U <sup>36</sup> U <sup>37</sup> U <sup>38</sup> U <sup>39</sup> U <sup>40</sup> U <sup>41</sup> U <sup>42</sup> U <sup>43</sup> U <sup>44</sup> U <sup>45</sup> U <sup>46</sup> U <sup>47</sup> U <sup>48</sup> U <sup>49</sup> U <sup>50</sup> U <sup>51</sup> U <sup>52</sup> U <sup>53</sup> U <sup>54</sup> U <sup>55</sup> U <sup>56</sup> U <sup>57</sup> U <sup>58</sup> U <sup>59</sup> U <sup>60</sup> U <sup>61</sup> U <sup>62</sup> U <sup>63</sup> U <sup>64</sup> U <sup>65</sup> U <sup>66</sup> U <sup>67</sup> U <sup>68</sup> U <sup>69</sup> U <sup>70</sup> U <sup>71</sup> U <sup>72</sup> U <sup>73</sup> U <sup>74</sup> U <sup>75</sup> U <sup>76</sup> U <sup>77</sup> U <sup>78</sup> U <sup>79</sup> U <sup>80</sup> U <sup>81</sup> U <sup>82</sup> U <sup>83</sup> U <sup>84</sup> U <sup>85</sup> U <sup>86</sup> U <sup>87</sup> U <sup>88</sup> U <sup>89</sup> U <sup>90</sup> U <sup>91</sup> U <sup>92</sup> U <sup>93</sup> U <sup>94</sup> U <sup>95</sup> U <sup>96</sup> U <sup>97</sup> U <sup>98</sup> U <sup>99</sup> U <sup>100</sup> U <sup>101</sup> U <sup>102</sup> U <sup>103</sup> U <sup>104</sup> U <sup>105</sup> U <sup>106</sup> U <sup>107</sup> U <sup>108</sup> U <sup>109</sup> U <sup>110</sup> U <sup>111</sup> U <sup>112</sup> U <sup>113</sup> U <sup>114</sup> U <sup>115</sup> U <sup>116</sup> U <sup>117</sup> U <sup>118</sup> U <sup>119</sup> U <sup>120</sup> U <sup>121</sup> U <sup>122</sup> U <sup>123</sup> U <sup>124</sup> U <sup>125</sup> U <sup>126</sup> U <sup>127</sup> U <sup>128</sup> U <sup>129</sup> U <sup>130</sup> U <sup>131</sup> U <sup>132</sup> U <sup>133</sup> U <sup>134</sup> U <sup>135</sup> U <sup>136</sup> U <sup>137</sup> U <sup>138</sup> U <sup>139</sup> U <sup>140</sup> U <sup>141</sup> U <sup>142</sup> U <sup>143</sup> U <sup>144</sup> U <sup>145</sup> U <sup>146</sup> U <sup>147</sup> U <sup>148</sup> U <sup>149</sup> U <sup>150</sup> U <sup>151</sup> U <sup>152</sup> U <sup>153</sup> U <sup>154</sup> U <sup>155</sup> U <sup>156</sup> U <sup>157</sup> U <sup>158</sup> U <sup>159</sup> U <sup>160</sup> U <sup>161</sup> U <sup>162</sup> U <sup>163</sup> U <sup>164</sup> U <sup>165</sup> U <sup>166</sup> U <sup>167</sup> U <sup>168</sup> U <sup>169</sup> U <sup>170</sup> U <sup>171</sup> U <sup>172</sup> U <sup>173</sup> U <sup>174</sup> U <sup>175</sup> U <sup>176</sup> U <sup>177</sup> U <sup>178</sup> U <sup>179</sup> U <sup>180</sup> U <sup>181</sup> U <sup>182</sup> U <sup>183</sup> U <sup>184</sup> U <sup>185</sup> U <sup>186</sup> U <sup>187</sup> U <sup>188</sup> U <sup>189</sup> U <sup>190</sup> U <sup>191</sup> U <sup>192</sup> U <sup>193</sup> U <sup>194</sup> U <sup>195</sup> U <sup>196</sup> U <sup>197</sup> U <sup>198</sup> U <sup>199</sup> U <sup>200</sup> U <sup>201</sup> U <sup>202</sup> U <sup>203</sup> U <sup>204</sup> U <sup>205</sup> U <sup>206</sup> U <sup>207</sup> U <sup>208</sup> U <sup>209</sup> U <sup>210</sup> U <sup>211</sup> U <sup>212</sup> U <sup>213</sup> U <sup>214</sup> U <sup>215</sup> U <sup>216</sup> U <sup>217</sup> U <sup>218</sup> U <sup>219</sup> U <sup>220</sup> U <sup>221</sup> U <sup>222</sup> U <sup>223</sup> U <sup>224</sup> U <sup>225</sup> U <sup>226</sup> U <sup>227</sup> U <sup>228</sup> U <sup>229</sup> U <sup>230</sup> U <sup>231</sup> U <sup>232</sup> U <sup>233</sup> U <sup>234</sup> U <sup>235</sup> U <sup>236</sup> U <sup>237</sup> U <sup>238</sup> U <sup>239</sup> U <sup>240</sup> U <sup>241</sup> U <sup>242</sup> U <sup>243</sup> U <sup>244</sup> U <sup>245</sup> U <sup>246</sup> U <sup>247</sup> U <sup>248</sup> U <sup>249</sup> U <sup>250</sup> U <sup>251</sup> U <sup>252</sup> U <sup>253</sup> U <sup>254</sup> U <sup>255</sup> U <sup>256</sup> U <sup>257</sup> U <sup>258</sup> U <sup>259</sup> U <sup>260</sup> U <sup>261</sup> U <sup>262</sup> U <sup>263</sup> U <sup>264</sup> U <sup>265</sup> U <sup>266</sup> U <sup>267</sup> U <sup>268</sup> U <sup>269</sup> U <sup>270</sup> U <sup>271</sup> U <sup>272</sup> U <sup>273</sup> U <sup>274</sup> U <sup>275</sup> U <sup>276</sup> U <sup>277</sup> U <sup>278</sup> U <sup>279</sup> U <sup>280</sup> U <sup>281</sup> U <sup>282</sup> U <sup>283</sup> U <sup>284</sup> U <sup>285</sup> U <sup>286</sup> U <sup>287</sup> U <sup>288</sup> U <sup>289</sup> U <sup>290</sup> U <sup>291</sup> U <sup>292</sup> U <sup>293</sup> U <sup>294</sup> U <sup>295</sup> U <sup>296</sup> U <sup>297</sup> U <sup>298</sup> U <sup>299</sup> U <sup>300</sup> U <sup>301</sup> U <sup>302</sup> U <sup>303</sup> U <sup>304</sup> U <sup>305</sup> U <sup>306</sup> U <sup>307</sup> U <sup>308</sup> U <sup>309</sup> U <sup>310</sup> U <sup>311</sup> U <sup>312</sup> U <sup>313</sup> U <sup>314</sup> U <sup>315</sup> U <sup>316</sup> U <sup>317</sup> U <sup>318</sup> U <sup>319</sup> U <sup>320</sup> U <sup>321</sup> U <sup>322</sup> U <sup>323</sup> U <sup>324</sup> U <sup>325</sup> U <sup>326</sup> U <sup>327</sup> U <sup>328</sup> U <sup>329</sup> U <sup>330</sup> U <sup>331</sup> U <sup>332</sup> U <sup>333</sup> U <sup>334</sup> U <sup>335</sup> U <sup>336</sup> U <sup>337</sup> U <sup>338</sup> U <sup>339</sup> U <sup>340</sup> U <sup>341</sup> U <sup>342</sup> U <sup>343</sup> U <sup>344</sup> U <sup>345</sup> U <sup>346</sup> U <sup>347</sup> U <sup>348</sup> U <sup>349</sup> U <sup>350</sup> U <sup>351</sup> U <sup>352</sup> U <sup>353</sup> U <sup>354</sup> U <sup>355</sup> U <sup>356</sup> U <sup>357</sup> U <sup>358</sup> U <sup>359</sup> U <sup>360</sup> U <sup>361</sup> U <sup>362</sup> U <sup>363</sup> U <sup>364</sup> U <sup>365</sup> U <sup>366</sup> U <sup>367</sup> U <sup>368</sup> U <sup>369</sup> U <sup>370</sup> U <sup>371</sup> U <sup>372</sup> U <sup>373</sup> U <sup>374</sup> U <sup>375</sup> U <sup>376</sup> U <sup>377</sup> U <sup>378</sup> U <sup>379</sup> U <sup>380</sup> U <sup>381</sup> U <sup>382</sup> U <sup>383</sup> U <sup>384</sup> U <sup>385</sup> U <sup>386</sup> U <sup>387</sup> U <sup>388</sup> U <sup>389</sup> U <sup>390</sup> U <sup>391</sup> U <sup>392</sup> U <sup>393</sup> U <sup>394</sup> U <sup>395</sup> U <sup>396</sup> U <sup>397</sup> U <sup>398</sup> U <sup>399</sup> U <sup>400</sup> U <sup>401</sup> U <sup>402</sup> U <sup>403</sup> U <sup>404</sup> U <sup>405</sup> U <sup>406</sup> U <sup>407</sup> U <sup>408</sup> U <sup>409</sup> U <sup>410</sup> U <sup>411</sup> U <sup>412</sup> U <sup>413</sup> U <sup>414</sup> U <sup>415</sup> U <sup>416</sup> U <sup>417</sup> U <sup>418</sup> U <sup>419</sup> U <sup>420</sup> U <sup>421</sup> U <sup>422</sup> U <sup>423</sup> U <sup>424</sup> U <sup>425</sup> U <sup>426</sup> U <sup>427</sup> U <sup>428</sup> U <sup>429</sup> U <sup>430</sup> U <sup>431</sup> U <sup>432</sup> U <sup>433</sup> U <sup>434</sup> U <sup>435</sup> U <sup>436</sup> U <sup>437</sup> U <sup>438</sup> U <sup>439</sup> U <sup>440</sup> U <sup>441</sup> U <sup>442</sup> U <sup>443</sup> U <sup>444</sup> U <sup>445</sup> U <sup>446</sup> U <sup>447</sup> U <sup>448</sup> U <sup>449</sup> U <sup>450</sup> U <sup>451</sup> U <sup>452</sup> U <sup>453</sup> U <sup>454</sup> U <sup>455</sup> U <sup>456</sup> U <sup>457</sup> U <sup>458</sup> U <sup>459</sup> U <sup>460</sup> U <sup>461</sup> U <sup>462</sup> U <sup>463</sup> U <sup>464</sup> U <sup>465</sup> U <sup>466</sup> U <sup>467</sup> U <sup>468</sup> U <sup>469</sup> U <sup>470</sup> U <sup>471</sup> U <sup>472</sup> U <sup>473</sup> U <sup>474</sup> U <sup>475</sup> U <sup>476</sup> U <sup>477</sup> U <sup>478</sup> U <sup>479</sup> U <sup>480</sup> U <sup>481</sup> U <sup>482</sup> U <sup>483</sup> U <sup>484</sup> U <sup>485</sup> U <sup>486</sup> U <sup>487</sup> U <sup>488</sup> U <sup>489</sup> U <sup>490</sup> U <sup>491</sup> U <sup>492</sup> U <sup>493</sup> U <sup>494</sup> U <sup>495</sup> U <sup>496</sup> U <sup>497</sup> U <sup>498</sup> U <sup>499</sup> U <sup>500</sup> U <sup>501</sup> U <sup>502</sup> U <sup>503</sup> U <sup>504</sup> U <sup>505</sup> U <sup>506</sup> U <sup>507</sup> U <sup>508</sup> U <sup>509</sup> U <sup>510</sup> U <sup>511</sup> U <sup>512</sup> U <sup>513</sup> U <sup>514</sup> U <sup>515</sup> U <sup>516</sup> U <sup>517</sup> U <sup>518</sup> U <sup>519</sup> U <sup>520</sup> U <sup>521</sup> U <sup>522</sup> U <sup>523</sup> U <sup>524</sup> U <sup>525</sup> U <sup>526</sup> U <sup>527</sup> U <sup>528</sup> U <sup>529</sup> U <sup>530</sup> U <sup>531</sup> U <sup>532</sup> U <sup>533</sup> U <sup>534</sup> U <sup>535</sup> U <sup>536</sup> U <sup>537</sup> U <sup>538</sup> U <sup>539</sup> U <sup>540</sup> U <sup>541</sup> U <sup>542</sup> U <sup>543</sup> U <sup>544</sup> U <sup>545</sup> U <sup>546</sup> U <sup>547</sup> U <sup>548</sup> U <sup>549</sup> U <sup>550</sup> U <sup>551</sup> U <sup>552</sup> U <sup>553</sup> U <sup>554</sup> U <sup>555</sup> U <sup>556</sup> U <sup>557</sup> U <sup>558</sup> U <sup>559</sup> U <sup>560</sup> U <sup>561</sup> U <sup>562</sup> U <sup>563</sup> U <sup>564</sup> U <sup>565</sup> U <sup>566</sup> U <sup>567</sup> U <sup>568</sup> U <sup>569</sup> U <sup>570</sup> U <sup>571</sup> U <sup>572</sup> U <sup>573</sup> U <sup>574</sup> U <sup>575</sup> U <sup>576</sup> U <sup>577</sup> U <sup>578</sup> U <sup>579</sup> U <sup>580</sup> U <sup>581</sup> U <sup>582</sup> U <sup>583</sup> U <sup>584</sup> U <sup>585</sup> U <sup>586</sup> U <sup>587</sup> U <sup>588</sup> U <sup>589</sup> U <sup>590</sup> U <sup>591</sup> U <sup>592</sup> U <sup>593</sup> U <sup>594</sup> U <sup>595</sup> U <sup>596</sup> U <sup>597</sup> U <sup>598</sup> U <sup>599</sup> U <sup>600</sup> U <sup>601</sup> U <sup>602</sup> U <sup>603</sup> U <sup>604</sup> U <sup>605</sup> U <sup>606</sup> U <sup>607</sup> U <sup>608</sup> U <sup>609</sup> U <sup>610</sup> U <sup>611</sup> U <sup>612</sup> U <sup>613</sup> U <sup>614</sup> U <sup>615</sup> U <sup>616</sup> U <sup>617</sup> U <sup>618</sup> U <sup>619</sup> U <sup>620</sup> U <sup>621</sup> U <sup>622</sup> U <sup>623</sup> U <sup>624</sup> U <sup>625</sup> U <sup>626</sup> U <sup>627</sup> U <sup>628</sup> U <sup>629</sup> U <sup>630</sup> U <sup>631</sup> U <sup>632</sup> U <sup>633</sup> U <sup>634</sup> U <sup>635</sup> U <sup>636</sup> U <sup>637</sup> U <sup>638</sup> U <sup>639</sup> U <sup>640</sup> U <sup>641</sup> U <sup>642</sup> U <sup>643</sup> U <sup>644</sup> U <sup>645</sup> U <sup>646</sup> U <sup>647</sup> U <sup>648</sup> U <sup>649</sup> U <sup>650</sup> U <sup>651</sup> U <sup>652</sup> U <sup>653</sup> U <sup>654</sup> U <sup>655</sup> U <sup>656</sup> U <sup>657</sup> U <sup>658</sup> U <sup>659</sup> U <sup>660</sup> U <sup>661</sup> U <sup>662</sup> U <sup>663</sup> U <sup>664</sup> U <sup>665</sup> U <sup>666</sup> U <sup>667</sup> U <sup>668</sup> U <sup>669</sup> U <sup>670</sup> U <sup>671</sup> U <sup>672</sup> U <sup>673</sup> U <sup>674</sup> U <sup>675</sup> U <sup>676</sup> U <sup>677</sup> U <sup>678</sup> U <sup>679</sup> U <sup>680</sup> U <sup>681</sup> U <sup>682</sup> U <sup>683</sup> U <sup>684</sup> U <sup>685</sup> U <sup>686</sup> U <sup>687</sup> U <sup>688</sup> U <sup>689</sup> U <sup>690</sup> U <sup>691</sup> U <sup>692</sup> U <sup>693</sup> U <sup>694</sup> U <sup>695</sup> U <sup>696</sup> U <sup>697</sup> U <sup>698</sup> U <sup>699</sup> U <sup>700</sup> U <sup>701</sup> U <sup>702</sup> U <sup>703</sup> U <sup>704</sup> U <sup>705</sup> U <sup>706</sup> U <sup>707</sup> U <sup>708</sup> U <sup>709</sup> U <sup>710</sup> U <sup>711</sup> U <sup>712</sup> U <sup>713</sup> U <sup>714</sup> U <sup>715</sup> U <sup>716</sup> U <sup>717</sup> U <sup>718</sup> U <sup>719</sup> U <sup>720</sup> U <sup>721</sup> U <sup>722</sup> U <sup>723</sup> U <sup>724</sup> U <sup>725</sup> U <sup>726</sup> U <sup>727</sup> U <sup>728</sup> U <sup>729</sup> U <sup>730</sup> U <sup>731</sup> U <sup>732</sup> U <sup>733</sup> U <sup>734</sup> U <sup>735</sup> U <sup>736</sup> U <sup>737</sup> U <sup>738</sup> U <sup>739</sup> U <sup>740</sup> U <sup>741</sup> U <sup>742</sup> U <sup>743</sup> U <sup>744</sup> U <sup>745</sup> U <sup>746</sup> U <sup>747</sup> U <sup>748</sup> U <sup>749</sup> U <sup>750</sup> U <sup>751</sup> U <sup>752</sup> U <sup>753</sup> U <sup>754</sup> U <sup>755</sup> U <sup>756</sup> U <sup>757</sup> U <sup>758</sup> U <sup>759</sup> U <sup>760</sup> U <sup>761</sup> U <sup>762</sup> U <sup>763</sup> U <sup>764</sup> U <sup>765</sup> U <sup>766</sup> U <sup>767</sup> U <sup>768</sup> U <sup>769</sup> U <sup>770</sup> U <sup>771</sup> U <sup>772</sup> U <sup>773</sup> U <sup>774</sup> U <sup>775</sup> U <sup>776</sup> U <sup>777</sup> U <sup>778</sup> U <sup>779</sup> U <sup>780</sup> U <sup>781</sup> U <sup>782</sup> U <sup>783</sup> U <sup>784</sup> U <sup>785</sup> U <sup>786</sup> U <sup>787</sup> U <sup>788</sup> U <sup>789</sup> U <sup>790</sup> U <sup>791</sup> U <sup>792</sup> U <sup>793</sup> U <sup>794</sup> U <sup>795</sup> U <sup>796</sup> U <sup>797</sup> U <sup>798</sup> U <sup>799</sup> U <sup>800</sup> U <sup>801</sup> U <sup>802</sup> U <sup>803</sup> U <sup>804</sup> U <sup>805</sup> U <sup>806</sup> U <sup>807</sup> U <sup>808</sup> U <sup>809</sup> U <sup>810</sup> U <sup>811</sup> U <sup>812</sup> U <sup>813</sup> U <sup>814</sup> U <sup>815</sup> U <sup>816</sup> U <sup>817</sup> U <sup>818</sup> U <sup>819</sup> U <sup>820</sup> U <sup>821</sup> U <sup>822</sup> U <sup>823</sup> U <sup>824</sup> U <sup>825</sup> U <sup>826</sup> U <sup>827</sup> U <sup>828</sup> U <sup>829</sup> U <sup>830</sup> U <sup>831</sup> U <sup>832</sup> U <sup>833</sup> U <sup>834</sup> U <sup>835</sup> U <sup>836</sup> U <sup>837</sup> U <sup>838</sup> U <sup>839</sup> U <sup>840</sup> U <sup>841</sup> U <sup>842</sup> U <sup>843</sup> U <sup>844</sup> U <sup>845</sup> U <sup>846</sup> U <sup>847</sup> U <sup>848</sup> U <sup>849</sup> U <sup>850</sup> U <sup>851</sup> U <sup>852</sup> U <sup>853</sup> U <sup>854</sup> U <sup>855</sup> U <sup>856</sup> U <sup>857</sup> U <sup>858</sup> U <sup>859</sup> U <sup>860</sup> U <sup>861</sup> U <sup>862</sup> U <sup>863</sup> U <sup>864</sup> U <sup>865</sup> U <sup>866</sup> U <sup>867</sup> U <sup>868</sup> U <sup>869</sup> U <sup>870</sup> U <sup>871</sup> U <sup>872</sup> U <sup>873</sup> U <sup>874</sup> U <sup>875</sup> U <sup>876</sup> U <sup>877</sup> U <sup>878</sup> U <sup>879</sup> U <sup>880</sup> U <sup>881</sup> U <sup>882</sup> U <sup>883</sup> U <sup>884</sup> U <sup>885</sup> U <sup>886</sup> U <sup>887</sup> U <sup>888</sup> U <sup>889</sup> U <sup>890</sup> U <sup>891</sup> U <sup>892</sup> U <sup>893</sup> U <sup>894</sup> U <sup>895</sup> U <sup>896</sup> U <sup>897</sup> U <sup>898</sup> U <sup>899</sup> U <sup>900</sup> U <sup>901</sup> U <sup>902</sup> U <sup>903</sup> U <sup>904</sup> U <sup>905</sup> U <sup>906</sup> U <sup>907</sup> U <sup>908</sup> U <sup>909</sup> U <sup>910</sup> U <sup>911</sup> U <sup>912</sup> U <sup>913</sup> U <sup>914</sup> U <sup>915</sup> U <sup>916</sup> U <sup>917</sup> U <sup>918</sup> U <sup>919</sup> U <sup>920</sup> U <sup>921</sup> U <sup>922</sup> U <sup>923</sup> U <sup>924</sup> U <sup>925</sup> U <sup>926</sup> U <sup>927</sup> U <sup>928</sup> U <sup>929</sup> U <sup>930</sup> U <sup>931</sup> U <sup>932</sup> U <sup>933</sup> U <sup>934</sup> U <sup>935</sup> U <sup>936</sup> U <sup>937</sup> U <sup>938</sup> U <sup>939</sup> U <sup>940</sup> U <sup>941</sup> U <sup>942</sup> U <sup>943</sup> U <sup>944</sup> U <sup>945</sup> U <sup>946</sup> U <sup>947</sup> U <sup>948</sup> U <sup>949</sup> U <sup>950</sup> U <sup>951</sup> U <sup>952</sup> U <sup>953</sup> U <sup>954</sup> U <sup>955</sup> U <sup>956</sup> U <sup>957</sup> U <sup>958</sup> U <sup>959</sup> U <sup>960</sup> U <sup>961</sup> U <sup>962</sup> U <sup>963</sup> U <sup>964</sup> U <sup>965</sup> U <sup>966</sup> U <sup>967</sup> U <sup>968</sup> U <sup>96</sup>	

[0356]

212	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2overhg_CLTAI	CLTAI ON1- 标 记	$\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
213	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2overhg_CLTAI	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
214	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2overhg_CLTAI	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
215	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2NC_overhg_CLTA 1	CLTA1 ON1- 标记	$\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
216	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2NC_overhg_CLTA 1	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
217	5'-5x(2'OMe,3'PACE) plus2NC_overhg_CLTA 1	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{CCUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAACAGC$ AUAGCCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGCACC	115
218	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3overhg_CLTAI -4x(2'OMe,3'PACE)	CLTA1 ON1- 标记	$\text{C}_o^*\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116
219	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3overhg_CLTAI -4x(2'OMe,3'PACE)	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{C}_o^*\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116
220	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3overhg_CLTAI -4x(2'OMe,3'PACE)	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{C}_o^*\text{U}_o^*\text{C}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116
221	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3NC_overhg_CLTA 1 3'-4x(2'OMe,3'PACE)	CLTA1 ON1- 标记	$\text{G}_o^*\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116
222	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3NC_overhg_CLTA 1 3'-4x(2'OMe,3'PACE)	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{G}_o^*\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116
223	5'-7x(2'OMe,3'PACE) plus3NC_overhg_CLTA	CLTA1mg ON1- 标记	$\text{G}_o^*\text{A}_o^*\text{G}_o^*\text{A}^*\text{G}^*\text{U}^*\text{C}^*\text{C}^*\text{CUCAUCUCCUCAAGCUUAAAGGUAGCUAUGCUGGUAAAC}$ AGCAUAGCAAGGUUAAAUAAGGUAGCUAUGCUGGUAAUCUACUUGAAAAAGUGGC	116

[0357]

	1' 3'-4x(2'OMe,3'PACE)		ACCGAGUCGGGUCUUU*U*U*U*(SEQ ID NO: 101)
224	CLTAI <u>2'OMe,3'PACE</u> +20 sgRNA	CLTAI ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 102)
225	CLTAI <u>2'OMe,3'PACE</u> +20 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 102)
226	CLTAI <u>2'OMe,3'PACE</u> +20 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 102)
227	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 9 sgRNA	CLTAI ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 103)
228	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 9 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 103)
229	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 9 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 103)
230	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 9 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> OFF1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 103)
231	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 9 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> OFF3- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 103)
232	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 8 sgRNA	CLTAI ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 104)
233	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 8 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 104)
234	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 8 sgRNA	CLTAI <sup>1mg</sup> ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 104)
235	CLTAI <u>2'OMePACE+1</u> 7 sgRNA	CLTAI ON1- <u>靶</u> 标	AGUCCUCAUCCCCUCAAGC*GUUUUAGAGCUAUGCUGGUACACGCAUAGCA AGUUAAAAGGUAGGUAGGUUACUACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 105)

[0358]

236	CLTA1_2'OMePACE+1 7 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCA <sup>*</sup> AGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 105)	113
237	CLTA1_2'OMePACE+1 7 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCA <sup>*</sup> AGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUCG GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 105)	113
238	CLTA1_2'OMePACE+1 7,18 sgRNA	CLTA1 ON1-靶 标	AGUCCUCAUCUCCCUCA <sup>*</sup> AGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 106)	113
239	CLTA1_2'OMePACE+1 7,18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCA <sup>*</sup> AGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 106)	113
240	CLTA1_2'OMePACE+1 7,18 sgRNA	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	AGUCCUCAUCUCCCUCA <sup>*</sup> AGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUUU (SEQ ID NO: 106)	113
<b>2' O 甲基,3'硫代磷酸酯修饰的sgRNA</b>				
241	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 ON1-靶 标	<u>AsG</u> <u>S</u> <u>C</u> CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
242	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	<u>AsG</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>C</u> CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
243	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 <sup>1mg</sup> ON1-靶标	<u>AsG</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>C</u> CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
244	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF1-靶标	<u>AsG</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>C</u> CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
245	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA1 <sup>1mg</sup> OFF3-靶标	<u>AsG</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>C</u> CUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGC AAGUUUAAAUAAGGCUAGGUCAUCUAGAAAAGUGGGACCGAGUC GGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
246	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4 靶 标	<u>G</u> <u>c</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>g</u> CUAGGUAGGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAG CAAGUUAAAAGGUAGGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAG CGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113
247	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4 靶 标	<u>G</u> <u>c</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>g</u> CUAGGUAGGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAG CAAGUUAAAAGGUAGGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGUACAGCAUAG CGGGCUUUUU <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> (SEQ ID NO: 107)	113

[0359]

248	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
249	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
250	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
251	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg OFF5'-靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
252	CLTA4_5'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
253	CLTA4_5'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
254	CLTA4_5'-3x(2'OMe, 3'P(S)),3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGAUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAG</u> CAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAGU	113
255	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGsAsUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUA</u> GCAAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAG	113
256	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg ON- 靶标	<u>GsCsAsGsAsUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUA</u> GCAAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAG	113
257	CLTA4_5',3'-5x(2'OMe, 3'P(S))	CLTA4mg OFF5'-靶标	<u>GsCsAsGsAsUGUAGGUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUA</u> GCAAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAG	113
<b>2'OMe基,3'硫代酸酯基PACE修饰的sgRNA</b>				
258	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1 ON1- 靶标	<u>A*<u>G*</u><u>S*</u><u>S*</u>SCCUCAUCUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA</u> GCAAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAG	113
259	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg ON1-靶标	<u>A*<u>G*</u><u>S*</u><u>S*</u>SCCUCAUCUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA</u> GCAAAGUUAAAAGGUAGCUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAGUGGCCACCGAG	113

			UCGGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 110)
260	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sG^*sU^*sCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ GCAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 110)
261	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg OFF1-靶标	$\Delta^*sG^*sU^*sCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ GCAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 110)
262	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg OFF3-靶标	$\Delta^*sG^*sU^*sCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ GCAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAAGGUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 110)
263	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 111)
264	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 111)
265	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg OFF1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 111)
266	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA1mg OFF3-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 111)
267	CLTA1_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE) <sub>75</sub> 聚体	CLTA1 ON1-靶 标	$\Delta^*sG^*sU^*sCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ GCAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAAGGUCAAGGUUAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 112)
268	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE) <sub>74</sub> 聚体	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 112)
269	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE) <sub>75</sub> 聚体	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 112)
270	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE) <sub>77</sub> 聚体	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*sGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ AAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 113)
271	CLTA1_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE) <sub>77</sub> 聚体 +G	CLTA1mg ON1-靶标	$G^*sAGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAAGAGCUAUGCUGGUAAACAGCAUA$ CAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAG GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 114)
272	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4 ON-靶 标	$G^*sC^*sA^*sGAUGUACUGUUUCCACAGUUAAAGGUCAAGGUUAAACAGCAU$ AGCAAGUUAAAAGGUCAAGGUUAAACUUGAAAAGUGGCACCGAG GGUGCUUUU <sub>U</sub> * <sub>U</sub> (SEQ ID NO: 113)

[0360]

[0361]

273	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4 ON- 靶 标	GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
274	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4 ON- 靶 标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
275	CLTA4_5',3'-3x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4mg OFF5'-靶标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
276	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4mg ON- 靶标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
277	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4mg ON- 靶标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
278	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4mg ON- 靶标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
279	CLTA4_5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代PACE)	CLTA4mg OFF5'-靶标	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	<u>G</u> *s <u>C</u> *s <u>A</u> *s <u>G</u> AUGUAGGUUUCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAU AGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU*SU*SU (SEQ ID NO: 115)	113
<b>2-氨基修饰的sgRNA (包括未修饰的对照)</b>					
280	EN1	EN1mg ON- 靶 标	GAUGUUUGUCGAUGAAAAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 117)	GAUGUUUGUCGAUGAAAAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 117)	113
281	EN1	EN1mg OFF- 靶 标	GAUGUUUGUCGAUGAAAAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 117)	GAUGUUUGUCGAUGAAAAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 117)	113
282	EN1_2氨基A+16	EN1mg ON- 靶 标	GAUGUUUGUCGAUGAA(2aA)AAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAU GCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	GAUGUUUGUCGAUGAA(2aA)AAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAU GCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	113
283	EN1_2氨基A+16	EN1mg OFF- 靶 标	GAUGUUUGUCGAUGAA(2aA)AAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAU GCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	GAUGUUUGUCGAUGAA(2aA)AAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAU GCAAGGUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	113
284	PCDH4	PCDH4mg ON-靶标	GAUUUAGACGAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	GAUUUAGACGAAGGUUAAAAGGUUACAGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCA AGUUUAAAAGGCCUAGGUUACUJUGAAAAGUGGCACCGA GUCCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 118)	113

[0362]

285	PCDHA4	PCDHA4mg OFF-靶标	GAUUUAGACGAAGGAUUGAAGGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAAUCAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCC GUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 119)	113
286	PCDHA4_2氨基A+15	PCDHA4mg ON-靶标	GAUUUAGACGAAGG(2aAUUGAAAGUUUAAGGCUAUGCUGGUAAACAGGCAUA GCAAGGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 120)	113
287	PCDHA4_2氨基A+15	PCDHA4mg OFF-靶标	GAUUUAGACGAAGG(2aAUUGAAAGUUUAAGGCUAUGCUGGUAAACAGGCAUA GCAAGGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 120)	113
<b>5-甲基修饰的sgRNA</b>				
288	CLTA4_21x(5-MeU)	CLTA4mg ON-靶标	GCAGA(5mU)G(5mU)AG(5mU)G(5mU) (5mU)CCACAGUUUAAGAGC(5mU)A(5mU)UGC(5mU)GG(5mU)AACAGCA(5mU)A GCAAGGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUUAUCAAC(5mU) (5mU)GAAAAAG(5mU)GGCACCGAGUCGG(5mU)GC(5mU) (5mU) (5mU) (5mU) (5mU) (5mU)U (SEQ ID NO: 121)	113
289	CLTA4_21x(5-MeU)	CLTA4mg OFF5-靶标	GCAGA(5mU)G(5mU)AG(5mU)G(5mU) (5mU)CCACAGUUUAAGAGC(5mU)A(5mU)UGC(5mU)GG(5mU)AACAGCA(5mU)A GCAAGGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUUAUCAAC(5mU) (5mU)GAAAAAG(5mU)GGCACCGAGUCGG(5mU)GC(5mU) (5mU) (5mU) (5mU) (5mU)U (SEQ ID NO: 121)	113
<b>Z碱基修饰的sgRNA</b>				
290	CLTA1_ZZ_70,71	CLTA1 ON1-靶标	AGUCUCUACUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAAGAGCUAUGCAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCC GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 122)	113
291	CLTA1_ZZ_95,96	CLTA1 ON1-靶标	AGUCUCUACUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAAGAGCUAUGCAGCAUAGCA AGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUUAUCACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCC GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 122)	113
<b>sgRNA经修饰以不利于错误折叠</b>				
292	CLTA1_opti_短 5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代 PACE) 2'OMe 54,57	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*s$ GUCCUCAUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAAGAGCUAUGCAG AAGGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAACAAAGAAAUGGGCACCGAGUCC GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 123)	100
293	CLTA1_opti_短 5',3'-1x(2'OMe, 3'硫代 PACE) 2'OMe 64,67	CLTA1mg ON1-靶标	$\Delta^*s$ GUCCUCAUCCCCUCAAGCUAUGCUGGUAAAGAGCUAUGCAG AAGGUUAAAUAAGGCUAUGCUGGUAAUCACUAGAAAUGGGCACCGAGUCC GUGCUUUUUU (SEQ ID NO: 124)	113

	<u>N</u> = 2'OMe
	<u>N</u> = 2'脱氧基
	Ns = 3'P(S)
	N* = 3'-PACE
	N*S = 3'-硫代PACE
	N* = 2'OMe,3'-PACE
	N*S = 2'OMe,3'- 硫代 PACE
	Ns = 2'OMe,3'P(S)
	N <sub>o</sub> = 5'-凸出(5'至20个核苷酸指导序列); "NC"意指出与前间区序列邻近序列不互补 (2sl) = 2-硫代U
	(2aA) = 2-氨基A
	(5mU) = 5- 甲基U
	Z = Z碱基
	IntFl = 整合于RNA序列中的内部位置处的荧光团

[0363] 表3中的DNA靶标构建体具有如下序列：

CLTA1 ON1-靶标:	AGAATTAACTGTGGTCACATTTGCTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATCTTACGCAAGTT CGATGAGTATGCCAGTCACTTCAATTGGTTGAATGTTCCCGTACATGCGAGTTCTGTCGACCAT GTGCCCGGGATTGAATTCCCTCAAGGGTGGTGATAGATGCTACGGTGGTGATGCGCATGCGCTCAGTC CTCATCTCCCTCAAGC <u><u>AAGCAGGCCCCG</u></u> CTGGTGGGTCGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGGGTC GTGTCAAGCAACTGTCCACGCCCTCAGGTCGTAAACATAACGTACTAAGGCACGAGTAAAC AAGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTGCCATTAGTCTGA (SEQ ID NO: 10)
CLTA1 OFF1-靶标:	AGAATTAACTGTGGTCACATTTGCTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATCTTACGCAAGTT CGATGAGTATGCCAGTCACTTCAATTGGTTGAATGTTCCCGTACATGCGAGTTCTGTCGACCAT GTGCCCGGGATTGAATTCCCTCAAGGGTGGTGATAGATGCTACGGTGGTGATGCGCATGCGCTCAGTC CTCATCTCCCTCAAGC <u><u>AAGCAGGCCCCG</u></u> CTGGTGGGTCGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGGGTC GTGTCAAGCAACTGTCCACGCCCTCAGGTCGTAAACATAACGTACTAAGGCACGAGTAAAC AAGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTGCCATTAGTCTGA (SEQ ID NO: 11)
CLTA1 OFF2-靶标:	AGAATTAACTGTGGTCACATTTGCTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATCTTACGCAAGTT CGATGAGTATGCCAGTCACTTCAATTGGTTGAATGTTCCCGTACATGCGAGTTCTGTCGACCAT GTGCCCGGGATTGAATTCCCTCAAGGGTGGTGATAGATGCTACGGTGGTGATGCGCATAAATTTCAGCC CTCATCTCCCTCAAGC <u><u>AAGCAGGCCCCG</u></u> CTGGTGGGTCGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGGGTC GTGTCAAGCAACTGTCCACGCCCTCAGGTCGTAAACATAACGTACTAAGGCACGAGTAAAC AAGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTGCCATTAGTCTGA (SEQ ID NO: 12)
CLTA1 OFF3-靶标:	AGAATTAACTGTGGTCACATTTGCTTATCGACTGGCTTCATCTCACAGCTCATCTTACGCAAGTT CGATGAGTATGCCAGTCACTTCAATTGGTTGAATGTTCCCGTACATGCGAGTTCTGTCGACCAT GTGCCCGGGATTGAATTCCCTCAAGGGTGGTGATAGATGCTACGGTGGTGATGCTCTCCAGCCCACTC CTCATCCCCCTCAAGC <u><u>GGGTTACTT</u></u> AGGGTCCAGGCTGGGTGGAGTCCCTAGTGAAGCCACCAATATAGGGTC GTGTCAAGCAACTGTCCACGCCCTCAGGTCGTAAACATAACGTACTAAGGCACGAGTAAAC AAGATCGATAGCAAGAACATGGTATAGACTGACGGAGAGCTGCCATTAGTCTGA (SEQ ID NO: 13)
CLTA1mg ON1-靶标:	GCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAA ATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATG AGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCCGCACATTCCCGAA AAGTGCCACCTAAATTGAAGCCTAAATTGTTAAATATTGTTAAATTCGCTTAAATTGTTAAATCAGC TCATTTTTAACCAATAGGCCAAATGCCAAATCCCTATAAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG GCGAAAAACCGCTTACAGGGCAGTGGCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTGGG TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGACGTTGACGGGAA AGCCGGCGAACGTGGCAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAG TGTAGCGGTACCGCTGCCGTAAACACCACCCGCCGCTTAATGCCGTACAGGGCGTCC CATTGCCATTAGGCTGCCACTGTGGGAAGGGCAGTGGCTGGCCCTTCGCTATTACGCC AGCTGGCAGGGGGATGTGCTGCAAGGGATAAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCAGC ACGGTTGAAACGACGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCAATTGGGTACGATC GATGCCGCTCGCAGGCCAAAGATGCTCCCGCATGCCCTAGTCCTCATCTCCCTCAAGC <u><u>AGGCCCC</u></u> TGCTGGTCACTGAAGAGCCACCCGTGGCGTGTGATATGCAAGCTCCAGCTTTGTTCCAGTCAG TGTTAATGCGCGTGGCGTAATCATGGTCAGTGTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA CAATTCCACACACATACGAGGCCAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGCCTAATGAGTGAGCTA ACTCACATTAATTGCGTTGCCCTACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCGTCCAGCTGCA TAATGAATCGGCAACGCCGCGGGAGAGGCCGTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTTCGCTCA CTGACTCGCTGCCGCTCGGTCGGCTCGGCTGCCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCCGTAAAC

[0365]

	<p>GTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG      AACCGTAAAAGGCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCCCCCCTGACGAGCATCACAAA      ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGGCTTCCCTGG      AAGCTCCCTCGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCCCT      TCGGGAAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCAGGTGAGTCGCT      CCAAGCTGGCTGTGTCACCGAACCCCCCTTCAGCCGACCGCTGCCCTTATCGGTAACATATCG      TCTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC      AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAA      GGACAGTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAGAGTGGTAGCTTG      ATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGA      AAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAACT      CACGTTAAGGGATTGGTCACTGAGATTCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTAAATTAAAA      ATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC      AGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGCTATTCGTTATCCATAGTGCCTGACTCCCCGCTG      AGATAACTACGATACGGGAGGGCTACCATCTGGCCCCAGTGCCTGCAATGATACCGCAGACCCACG      CTCACCGGCTCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGAGGCCAGAAGTGGCCT      GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTCCAG      TTAATAGTTGCGCAACGTTGCTACAGGATCGTGGTGTACGCTCGTGTGTTGGT      GGCTTCATTAGCTCCGGTCCACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCAAAAAA      GCGGTTAGCTCCTCGGTCCATCGTGTGCAAGAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGG      TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTACTGTATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGACTGGTGA      GTACTCAACCAAGTATTCTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTTGGCTCAATA      CGGGATAATACCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:14)</p>
[0366]	<p>CLTA1mg OFF1-靶标:</p> <p>GCCTTCTGGTGAGCAAAACAGGAAGGAAATGCCGCAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAA      ATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTCAATATTATTGAAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATG      AGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTCCCGAA      AAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTAATATTGTTAAATTGCGTTAAATTGTTAAATCAGC      TCATTTTTAACCAATAGGCCAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAACGAGATAG      GGTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAG      GCGAAAACCGCTATCAGGGCAGGGCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTGGGG      TCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTGACGGGAA      AGCCGGCAACGTGGCAGAAAGGAAGGAAAGGCCAGGAGCGGGCTAGGGCGCTGGCAAG      TGTAGCGGTACGCTGCCGTAACCACCAACCCGCCGCTTAATGCCGCTACAGGGCGCTCC      CATCGCCATTAGCTGCCGCACTGTTGGAAGGGCAGTGGTGGGGCTTTCGCTATTACGCC      AGCTGGCAGGGGGATGTCGCTGCAAGGGATAAGTGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACG      ACGTTGAAACGACGCCAGTGGCCTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCAATTGGTACGATC      GATGCCGCTCGCAGGGCAAAGAGGCTCTGTATGCACTCAGTCCACTCCCTCAAGCAGGCGA      CCCTTGGTGCAGTACAAACCGCTCGCAGTGGTATGCACTCAGTCCAGTTGCTCCCTTACTG      GGGTTAATTGCGCTGGCTATCATGGTATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA      CAATTCCACACACATCGAGCCGAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGCTAATGAGTGGCTA      ACTCACATTAAATTGCGCTGCCGCTACTGCCGCTTCCAGTGGAAACCTGTGCGCTGCGCAT      TAATGAATCGGCAACGCCGGGGAGAGGGGTTTGGCTATTGGGCGCTTCCGCTTCGCTCA      CTGACTCGCTGCCGCTCGGTGCTGCCGCTGCCGAGCGGTACGCTCACTCAAAGGGCTAATACG      GTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG      AACCGTAAAAGGCCGCTGCTGGCTTTCCATAGGCTGCCCCCCCTGACGAGCATCACAAA      ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGGCTTCCCTGG      AAGCTCCCTCGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCCCT      TCGGGAAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCAGGTGAGTCGCT      CCAAGCTGGCTGTGTCACCGAACCCCCCTTCAGCCGACCGCTGCCCTTATCGGTAACATATCG      TCTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC</p>

	<p>AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGGCCACTACGGCTACACTAGAA      GGACAGTATTGGTATCTCGCCTCTGCTGAAGCCAGTACCTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG      ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA      AAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACT      CACGTTAAGGGATTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTAAATTAAAA      ATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTACCAATGCTTAATC      AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTGCTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCGTGTTG      AGATAACTACGATACGGGAGGGTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGAATGATACCGCAGACCCACG      CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGGCCAGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCCT      GCAACTTTATCCGCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAG      TTAATAGTTGCCAACGTTGCTACAGGATCGTGGTGTACGCTCGTGTGTTGCT      GGCTTCATTCACTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCAAAAAA      GCGGTTAGCTCCTCGGTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGCCGCAGTGTATCACTCATGG      TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGA      GTACTCAACCAAGTCATTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGCGTCAATA      CGGATAATACCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:15)</p>
[0367]	<p>CLTA1mg_OF F3 靶标:</p> <p>GGCTTCTGGTGAGCAAAACAGGAAGGAAATGCCCAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAA      ATGTTGAATACTCATACTCTCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCATG      AGCGGATACATATTGAATGTTAGAAAATAACAAATAGGGGTTCCCGCAGACATTTCCCGAA      AAGTGCACCTAAATTGTAAGCCTAATATTGTTAAATTGCTTAATTTGTTAAATCAGC      TCATTTTAAACCAATAGGCCAAATGCCAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG      GGTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCAACGTCAAAGG      GCGAAAACCGCTATCAGGGCAGTGGCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTGGGG      TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTGACGGGAA      AGCCGGCAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAAAGGAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAG      TGTAGCGGTACGCTGCCGTAACCACCAACCCGCCGCTTAATGCCGCTACAGGGCGTCC      CATTGCCATTCAAGGCTGCCAACTGTTGGAAGGGCAGTGGTGCAGGGCTCTCGTATTACGCC      AGCTGGCAGGGGATGTGCTGCAAGGCAGTTAAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACG      ACGTTGAAACGACGCCAGTGGCAGTGGCAGCTACGACTCACTATTAGGGCAATTGGTACGATC      GATGCCGCTCAGGAGAGGGAGCCATGCTCATCTCCAGCCACTCCATCCCCCTCAAGCCGGTCC      CAGGCTGAGGGCTAAAGCTGTTGCCGTGATATGCACTCCAGCTTGTGTTAGTGA      GGGTTAATTGCCGCTGGCTAATCATGGTCAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA      CAATTCCACACACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGA      ACTCACATTAAATTGCGTGCCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGCTCCAGTCAT      TAATGAATCGCCAACGCCGGAGAGGGGGTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTCCGCTCA      CTGACTCGCTGCCGCTGGCTGCTGCCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCCGTAATACG      GTTATCCACAGAATCAGGGATAACGAGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGAAAGGCCAGG      AACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCTTCCATAGGCTGCCCTGACGAGCATCACAAA      ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAGACAGGACTATAAAGATACCAGGGTTCCCCCTGG      AAGCTCCCTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACGGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCT      TCGGGAAAGCTGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGAGGTATCTCAGTCGGTGTAGTCGTTGCT      CCAAGCTGGCTGTCAGCAGCAGCTACGAGCTTCTGAGCTAACAGGATTAGC      TCTTGAGTCAAACCGGTAAGACACGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC      AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAGTGGCTAACACTGGCTACAGGAA      GGACAGTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTG      ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA      AAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACT      CACGTTAAGGGATTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTAAATTAAAA      ATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTACCAATGCTTAATC      AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTGCTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCGTGTTG</p>

	<p>AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCAGACCCACG    CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGAAGGCCGAGCGAGAACTGGTCCT    GCAACTTTATCCGCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG    TTAATAGTTGCCAACGTTGCTACAGGCATCGTGGTACGCTCGTGTATGGCTTACCTGGTAT    GGCTTCATTCACTCCGGTCCCAACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAA    GCGGTTAGCTCCTCGTCCGATCGTGTACAGAAGTAAGTTGCCGAGTGTATCACTCATGG    TTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGTACTGGTA    GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCCGAGCTGCTCTGCCGGTCAATA    CGGATAATACCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:16)</p>
<p>CLTA4 ON-靶 标:</p> <p>[0368]</p>	<p>GGGGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAGTACTCACCAG    TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAG    TGATAACACTGCGGCCACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGGAGCTAACCGTTTTG    CACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTGATCGTGGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA    ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTAGCAATGGCAACAACGTTGCCAAACTATTAACTGGCA    ACTACTTACTCTAGCTCCGGCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTTGAGGACCA    CTTCTCGCCTCGGCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTGAGCGTGGGT    CTCGCGGTATCATTGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGATCGTAGTTATCACACGAC    GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCGCTACTGATTAAG    CATTGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTAGATTGATTAAAACCTCATTTTAAT    TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTC    GTTCCACtGaGGCTCAGACCCCGTAGAAAGATCAAAGGATCTCTGAGATCCTTTCTGCGC    GTAATCTGCTGTTGCAAACAAAAACCCACCGCTACAGCGTGGTTGTTGCCGATCAAGAGC    TACCAACTCTTTCCGAAGGTAACTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTCTAGT    GTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACGCCACATACCTCGCTGCTAATCC    TGTACCGAGGCTGCTTGCAGTGGCATAAGTCGTGCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGT    TACCGATAAGGGCAGCGGTGGCTGAACGGGGGTTCTGACACAGCCAGCTGGAGCGAAC    GACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGGCCACGCTCCGAAGGGAGA    AAGGCAGGACAGGTATCCGTAAGCGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCAGGAGGGAGCTCCAGGG    GAAACGCCTGGTATCTTATAGTCCTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGAATTG    ATGCTCGTCAGGGGGCGAGCCTATGGAAAACGCCAGCACGCGCTTCTGAGTGTGAGCTCA    TTTGCTGGCTTGTACATGTTCTCGTGTATCCCTGATTCTGTGATAACCGTATTAA    CCGCCTTGAGTGGCTGATACGCTCGCCGAGCGAACGACCGAGCGAGCTGAGCG    GGAAGCGGAAGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCCCGCGTGGCCGATTCAATGAGC    TGGCACGACAGGTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGAACGCAATTATGAGTTAGCTA    CTCATTAGGCACCCAGGTTACCTTATGCTTCCGCTGTATGTTGTGGAATTGAGCG    ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCAAGCGCAGAACCTCA    AGGGAAACAAAGCTGGTACCGGCCCCCTCGACACCGAGTGCATTGATTCTGTTGTAATTG    TCCAATTCTGAGCCGGGGGATCGGAGATGTTAGTGTGTTCCACAGGGGATCCACTAGT    CGGCGCCACCGCGTGGAGCTCAATTGCCCTATAGTGAGCTGATTACGCGCCTACTGCCG    TCGTTTACAACGCTGTGACTGGAAAACCTGGCGTACCCAACTTAATGCCCTGAGCACATCC    CCCTTCTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGACCGATGCCCTCCAAACGCGCAGC    CTGAATGGGAATGGAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAATTCTGCGTTAAATTGTTAAAT    CAGCTATTAAACCAATAGGCCAAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAG    ATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGAGCTCA    AAGGGCGAAAACCGTCTACGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTT    GGGGTGAGGTGGCTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAGGCCGATTTAGAGCTTACGG    GGAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAGGAAGGGAGAACAGCGAAGGAGCGGGCGTAGGGCGTGG    CAAGTGTAGCGGTACGCTGCCGTAAACCACACCCGCCGCTTAATGCCGCTACAGGGCG    GTCAGGTGGACTTTCCGGGAAATGTGCCGGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCA    AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTCAATAATTGAAAAGGAAGAGTA</p>

	TGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTATTCCCTTTGCGGCAATTGCGCTCTGTTTG TCACCCAGAACCGCTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGACGAGTGGTTACATC GAACCTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTGAGAGTTTCGCCCCGAAAGAACGTTCCAATGATGA GCACTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGGTATTATCCGATTGAC (SEQ ID NO:17)
CLTA4mg ON-靶标:  [0369]	GCGTTCTGGGTAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGGATAAGGGGACACGGAA ATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCATG AGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAATAACAAATAGGGGTCGCGCACATTCCCGAA AAGTGCCACCTAAATTGAAGCGTAATATTGTTAAATTCGCTTAATTTGTTAAATCAGC TCATTTTTAACCAATAGGCCAATCGGAAAATCCCTATAAAATCAAAGAACGAGATAG GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTTGACTCAACGTCAAAGG GCGAAAACCGCTTACAGGCCATGGCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTGGGG TCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTACGGGGAA AGCCGGCAACGTGGCAGAAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAG TGTAGCGGTACCGCTGCCGTAACCACCCACCCGCCGCTTAATGCCGCTACAGGGCGTCC CATTGCCATTAGCGCTGCCAATGTTGGGAAGGGGATCGGTGCGCTACAGCTTGGGG AGCTGGCAGGGGATGTGCTGCAAGGGATTAGTTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCAG ACGTTGAAACGACGCCAGTGAGCGCTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGGGTACGATC GATGCCGCTCAAGAGCTTCACTGAGTAGGATTAAGATATTGAGATGTAGTGTGTTCCACAGGGTGG CTCTTCAGTGACCAGCGGAACCTGCTGCCGTATGAGCTCAGCTTGTGAAATTGTTATCCGCTCA CAATTCCACACACATACGAGCGGAAGCATAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGA ACTCACATTAAATTGCGTTGCCCTACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGCCAGCTGCAT TAATGAATCGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTTGGCGCTCTCCGCTCGCTCA CTGACTCGCTGCCCTCGGTGCTCGCTGCCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAA GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG AACCGTAAAAGGCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAA ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAACCCGACAGGACTATAAGAACGATACCGGTTCCCG AAGCTCCCTGCGCTCTCCGTTCCGACCCCTGCCCTACCGGATACCTGTCGCCCTTCC TCGGAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGTCGTTGCT CCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCGTTCAAGCCGCTGCCCTTACCGTAACTATCG TCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC AGAGCGAGGTATGAGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGCTTAACCTCGGACTACAG GGACAGTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTTG ATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGA AAAAAAGGATCTCAAGAACGATCTTGTATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAA CACGTTAAGGGATTGGTATGAGATTATCAAAAGGATCTCACCTAGATCTTAA ATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTTCCATAGTGCCTGACTCCCGTGT AGATAACTACGATACGGGAGGGTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCAGACCCACG CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGCCT GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCAGGATCGTGGTGTACGCTCGTTGGT TTAATAGTTGCCAACGTTGCTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTGGT GGCTTCATTAGCTCCGGTCCCAAGTCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCA GGCGTTAGCTCCCGTCCGATCGTGTGAGAAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGG TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGA GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTCTGCCGGGTCAATA CGGGATAACCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:18)
CLTA4mg OFF5-靶标:	GCGTTCTGGGTAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGGATAAGGGGACACGGAA ATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCATG AGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAATAACAAATAGGGGTCGCGCACATTCCCGAA

[0370]	<p>AAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAAATTGCGTTAAATTGTTAAATCAGC    TCATTTTTAACCAATAGGCCAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG    GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG    GCGAAAACCGTCTATCAGGCCATGGCCACTACGTGAACCACCTAACCTAATCAAGTTTTGGGG    TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAA    AGCCGGCGAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAG    TGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCCACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCC</p>
IL2RGmg_ON 靶标:	<p>GGCTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGAAAATGCCAAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAA    ATGTTGAATACTCATACTCTCTTTCAATATTATTGAAAGCATTATCAGGGTATTGCTCATG    AGCGGATACATATTGAAATGTTAGAAAATAACAAATAGGGGTCGCGCACATTCCCGAA    AAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAAATCGCTTAATTTGTTAAATCAGC    TCATTTTTAACCAATAGGCCAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG    GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG    GCGAAAACCGTCTATCAGGCCATGGCCACTACGTGAACCACCTAACCTAATCAAGTTTTGGGG    TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAA    AGCCGGCGAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAG    TGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCCACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCC</p>

[0371]	<p>CATTCGCCATTCAAGGCTGCGCACTGTGGGAAGGGCGATCGTGCGGGCCTTCGCTATTACGCC      AGCTGGCAAAGGGGATGTCGCAAGGCCATTAAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACG      ACGTTGAAAACGACGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGATTGGTACGATC      GATGCGGCTCGGCAGCTGCAAGGAATAAGAGGGATGTGAATGGTAATGATGGCTAACAT<u>GGCGC</u>      TTGCTCTTCAATTCCCTGGGTAGTCGCGTGATATGCAGCTCAGCTTGTCCCTTAGTGA      GGGTTAATTGCGCCTGGCTAATCATGGTCAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA      CAATTCCACACAAACATACGAGCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGAGCTA      ACTCACATTAATTGCGTTGCCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGCGTGCAGCTGCAT      TAATGAATCGCCAACGCCGGGGAGAGGGGTTTGCCTATTGGCGCTCTTCCGCTCCCGCTCA      CTGACTCGCTGCCCTCGGTGCGCTGCCGAGCGGTACAGCTCACTCAAAGCGGTAAACAG      GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAG      AACCGTAAAAGGCCGCTTGCCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA      ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGATAACCGAGGTTCCCGTGG      AAGCTCCCTCGCTGCCCTCCGTGCGCTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCCCT      TCGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGAGTCGTTGCT      CCAAGCTGGCTGTGCAAGAACCCCCCTCAGCCGACCGCTGCCCTATCGGTAACAGGATTAGC      TCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGGCCACTGGTAACAGGATTAGC      AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACACTGGCTACACTAGAA      GGACAGTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTTGT      ATCCGCAACAAACACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGA      AAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC      CACGTTAAGGGATTGGTCAAGGATTCTCACCTAGATCTTAAATTAA      ATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC      AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGCTCATCCAGTTGCTGACTCCCCGCTG      AGATAACTACGATACGGGAGGGTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCAGACCCACG      CTCACCGGCTCCAGATTACAGCAATAAACAGCCAGCGGAAGGCCAGCGAGCGAGAACGTTGCT      GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGATTGCTACAGGATCGTGGTACGCTCGTTGGT      TTAATGTTGCGCAACGTTGCTGCTACAGGATCGTGGTACGCTCGTTGGT      GGCTTCATTCAAGCTCCGGTCCACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCAAAAAA      GCGGTTAGCTCCTCGGTCCCGATCGTGTGCAAGAAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGG      TTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGACTGGTGA      GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTTGGCGGTCAATA      CGGATAATACCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:20)</p>
EN1mg_ON 鞣 标:	<p>GGCTTCTGGGTAGCAAAACAGGAAGGCAAATGCCCAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAA      ATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTCAATATTATTGAAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATG      AGCGGATACATATTGAAATGTTAGAAAATAACAAATAGGGTCCCGCACATTCCCGAA      AAGTGCCACCTAAATTGAAAGCGTAATATTGTTAAATTGCGTTAAATTGTTAAATCAGC      TCATTTTTAACCAATAGGCCAATCGGAAAATCCCTATAAATCAAAGAACGAGATAG      GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAG      GCGAAAACCGCTCTACAGGGCGATGGCCACTACGTAACCATCACCCTAATCAAGTTTGGG      TCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTGACGGGAA      AGCCGGGAACGTGGCGAGAAAAGGAAGGAAAGGAAAGCGAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAG      TGTAGCGGTACGGCTGCCGTAACCACCCACCCGCCGCTTAATGCCGCTACAGGGCGCTCC      CATTGCCATTCAAGCTGCCAATGTTGGAAGGGCGATCGTGGCGCTTCGCTATTACGCC      AGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCATTAAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACG      ACGTTGAAACGAGGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGATTGGTACGATC      GATGCGGCTCCTCTTACTGCAAGCGAAGTCCGGCTCAGGATGTTGCGATGAAAAGTGGTGG      TGCGGTGCACTGGCGCTGGCTGCGCGTGAATGCACTCAGCTCAGTTGTTCCCTTAGTGA      GGGTTAATTGCGCCTGGCTAATCATGGTCAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA      CAATTCCACACAAACATACGAGCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGAGCTA</p>

	ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCGTTCCAGTCGGAAACCTGCGCCAGTCAT TAATGAATCGCCAACGCGGGGAGAGGCCTTGCCTTGCCTCCGCTTCCGCTCA CTGACTCGCTCGCTCGTCGGCTCGGCTGGCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGCGGTAAATACG GTTATCCACAGAATCAGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG AACCGTAAAGGCCGCTTGCCTGGCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAA ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGCGTTCCCCCTGG AAGCTCCCTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGGCCTACCGATACTGTCCGCTTCCGCT 
EN1mg_OFF 靶标:	GCGTTTCTGGGTGAGAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGAATAAGGCCACACGGAA ATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTCAATATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATG AGCGGATACATATTGAATGTTAGAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTCCCGAA AAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAATTGCGTTAAATTGTTGTTAATCAGC TCATTGTTAACCAATAGGCCAATCGCAAATCCCTTATAATCAAAGAATAGCCGAGATAG GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAGG GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCAGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTGGGG TCGAGGTGCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTGACGGGAA AGCCGGCAACGTGGCAGAAAGGAAGGAAGAACCGAAGAGCGAGGGCGCTAGGGCTGGCAAG TGTAGCGGTACGCTGCGTAACACCACACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCTCC CATTGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGAGGGCGATCGTGCAGGCTCTCGTATTACGC AGCTGGCAGGGGATGTGCTGCAAGCGATTAAGTGGTAACGCCAGGGTTCCAGTCAG ACGTTGTAACACGACGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCAATTGGTACGATC GATGCCGCTCGTCTTCCGCCAGGATGTTGCTGATGAAGAAGTGGTGA TGCAGGCTGGGTGCTGGTTGCCGGCGCTGATATGCGCTCCAGCTTGTCCCTTGTG GGGTTAATTGCGCTGGCGTAATCATGGTACAGTGTGTTCTGTGTAATTGTTATCCGCTCA CAATTCCACACACATACGAGCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCTGGGTGCTTAATGAGTGA ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCGTTCCAGTCGGAAACCTGCGCCAGTCAT TAATGAATCGCCAACGCGGGGAGAGGCCTTGCCTTGGCGTCTCCGCTTCCGCTCA CTGACTCGCTGCGCTCGTCGGCTGGCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGCGGTAAATACG GTTATCCACAGAATCAGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG AACCGTAAAGGCCGCTTGCCTGGCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAA ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGCGTTCCCCCTGG AAGCTCCCTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGGCCTACCGATACTGTCCGCTTCCGCT 

	TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTCGTCGCT CCAAGCTGGGTGTCACGAACCCCCGGTCAAGACACCACTTATGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGC TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACCACTTATGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGC AGAGCGAGGTATGAGGCGGTCTACAGAGTTCTGAAGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA GGACAGTATTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG ATCCGGCAACAAACACCAGCCTGGTAGCGGTGGTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGCAGA AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAAACGAAA 
PCDHA4mg ON 靶标:	

	<p>CACGTTAAGGGATTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAACAA      ATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACCTGGCTGACAGTACCAATGCTTAATC      AGTGGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCGTGCTG      AGATAACTACGATACGGGAGGGTACCATCTGGCCCCAGTGCCTGCAATGATACCGCAGACCCACG      CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGGCCAGCCGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCCT      GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG      TTAATAGTTGCGCAACGTTGCTACAGGCATCGTGGTGCACGCTCGTGTGCTTGGTAT      GGCTTCATTCACTCCGGTTCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAA      GCGGTTAGCTCCCGGTCCGATCGTGTCAAGAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGG      TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGA      GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTCTGCCGGGTCAATA      CGGGATAATACCCGCCACATAGC (SEQ ID NO:23)</p>
[0374] PCDHA4mg OFF 靶标:	<p>GCGTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGGATAAGGGGACACGGAA      ATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATG      AGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAA      AAGTGCCACCTAAATTGAAGCGTAATATTGTTAAAATTGCGTTAAATTGTTAAATCAGC      TCATTTTAACCAATAGGCCAAATCGGAAAATCCCTATAAAATCAAAGAACGAGATAG      GGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGACTCCACTACGTAACCATCCTAAAGAACGTTGACTCAACG      GCGAAAACCGTCTACAGGGCAGTGGCCACTACGTAACCATCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTGACGGGAA      TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAAACCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTGACGGGAA      AGCCGGCAACGCGCAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAG      TGAGCGGTACCGCTGCCGTAAACCACACCCGCCGTTAATGCCGCTACAGGGCGCTCC      CATTGCCATTCAAGCTGCCACTGTTGGAAGGGCGATCGTGCCTGGGCTCTCGTATTACGCC      AGCTGGCAGGGGATGTCGTCAGGGGATTAAAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACG      ACGTTGAAACGACGCCAGTGGCCTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCAATTGGTACGATC      GATGCCGCTCGGAACGCTGGTATTCCATGCCAGATTAGACGAAGGTTGAATGGGAA      TATTATTACTCTCTCCAGTGTGCGCTGATGCTGCTGCTGATATGCACTCCAGCTTGTGCTTACTG      GGGTTAATTGCGCTGGCGTAATCATGGTCAAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCA      CAATTCCACACACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTCCTAAATGAGTGA      ACTCACATTAAATTGCGTGCCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGTC      TAATGAATCGCCAACGCGGGGAGGGCGTTTGCCTAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA      CTGACTCGCTGCCCTCGTCGTTCCGCTGCCGAGGGTACGCTCACTCAAAGGCCGTAATACG      GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAACATGTGAGGAAAGGCCAGAACAGCAG      AACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA      ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAGACCGACAGGACTATAAACAGAACGAGGCCGTTCC      AAGCTCCCTCGCCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCC      TCGGGAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTGCTCG      CCAAGCTGGCTGTGTCAGGAACCCCGTTCAAGCCGCTGCCGCTTACCGTAACTATCG      TCTTGAGTCAACCCGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC      AGAGCGAGGTATGAGGCGCTGCTACAGAGTCTGAGGCTGAGCCAGTTACCTGGAAAGGTTAGCT      GGACAGTATTGGTATCTGCGCTGCTGAAGCCAGTTACCTGGAAAGGAGTTAGCT      ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGA      AAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAAACGAAA      CACGTTAAGGGATTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAACAA      ATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACCTGGCTGACAGTACCAATGCTTAATC      AGTGGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCGTGCTG      AGATAACTACGATACGGGAGGGTACCATCTGGCCCCAGTGCCTGCAATGATACCGCAGACCCACG      CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGGCCAGCCGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCCT      GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG      TTAATAGTTGCGCAACGTTGCTACAGGCATCGTGGTGCACGCTCGTGTGCTTGGTAT</p>

[0375]

	GGCTTCATTCAAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAA GCGGTTAGCTCCTCGGTCCGATCGTGTCAAGAAGTAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGG TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGA GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTTGGCCGGCGTCAATA CGGGATAATAACCGCGGCCACATAGC (SEQ ID NO:24)
--	---

[0376] 在20 $\mu$ L的反应体积中,在50nM sgRNA,39nM重组纯化的Cas9蛋白(酿酒链球菌;Agilent)和10mM或0.8mM MgCl<sub>2</sub>(pH7.6)的存在下,将50f摩尔线性化DNA靶标在37℃温育30分钟。完成后,加入0.5 $\mu$ l的RNase It(Agilent),并在37℃继续温育5分钟,然后在70℃温育15分钟。随后加入0.5 $\mu$ L蛋白酶K(Mol.Bio.级,NEB),并在37℃温育15分钟。将等分试样加载到DNA 1000或DNA 7500LabChip中,并在Bioanalyzer 2200上进行分析,或者将其加载到Genomic DNA ScreenTape中,并在TapeStation上进行分析。检查步骤用于从与靶DNA的结合释放Cas9,测定其用于切割。切割产量/得率通过以下公式计算:a/(a+b)×100,其中a是两个裂解产物的条带强度的总和,而b是剩余的未切割的DNA(如果存在的话)。100%的切割百分比意味着所有靶DNA构建体都被切割。

[0377] 化学合成了一系列指导RNA。根据Dellinger等(2011)J.Am.Chem.Soc.,133,11540-56中描述的程序,使用2'-0-硫羰氨基甲酸酯(2'-0-thionocarbamate)保护的核苷亚磷酸胺,在ABI 394合成仪(Life Technologies,Carlsbad,CA,USA)上合成指导RNA寡聚物。在与2'-0-硫羰氨基甲酸酯保护的亚磷酸胺相同的条件下将2'-0-甲基亚磷酸胺掺入RNA寡聚物中。用于合成硫代膦酰基乙酸酯(硫代PACE)修饰的RNA的2'-0-甲基-3'-0-(二异丙基氨基)膦基乙酸-1,1-二甲基氰乙基酯-5'-0-二甲氧基三苯甲基核苷基本上根据发表的方法来合成。参见Dellinger等(2003)J.Am.Chem.Soc.,125,940-50;和Threlfall等(2012)Org.Biomol.Chem.,10,746-54。对于含硫代磷酸酯的寡聚物,偶联反应后的碘氧化步骤用硫化步骤代替,其使用3-((N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮在吡啶-乙腈(3:2)混合物中的0.05M溶液进行6分钟。

[0378] 使用反相高效液相色谱(HPLC)纯化所有寡核苷酸,并通过使用Agilent 1290 Infinity系列LC系统与Agilent 6520Q-TOF(渡越时间(time-of-flight))质谱仪(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)联用进行液相色谱-质谱(LC-MS)来分析。使用从LC-MS衍生的总离子色谱图获得的质谱的去卷积来估计sgRNA的合成和纯化的产率。100-聚体sgRNA的化学合成通常从标称的1微摩尔级合成产生25-35%全长产物。使用离子配对缓冲条件的反相HPLC纯化通常从粗制品中给出20%的产率,最终sgRNA的估计纯度在90%至95%的范围内。

[0379] 结果示于表4中。“%靶切割”表示被切割的靶DNA构建体的百分比。实验用或不用添加摩尔过量的与靶DNA潜在竞争的无靶标竞争物DNA(tcDNA)进行,因此可看出添加的非特异性DNA对测定的潜在影响。

[0380] 表4

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
<b>2-件双指导骨架</b>						
<b>未修饰的双指导RNA (dgRNA)</b>						
1	0.8	N	<b>99%</b>	—		
2	0.8	Y	<b>99%</b>	5%		
3	0.8	N	<b>96%</b>	—		
4	0.8	Y	<b>100%</b>	5%		
5	0.8	N	<b>96%</b>	—		
6	0.8	Y	<b>0%</b>	5%		
7	0.8	N	<b>99%</b>	—		
8	0.8	Y	<b>100%</b>	5%		
9	10	N	<b>94%, 93%</b>	—		
10	0.8	Y	<b>88%</b>	—		
<b>荧光团偶联的dgRNA</b>						
11	10	N	<b>92%, 93%</b>	—	94%, 93%	—
<b>2' O 甲基修饰的dgRNA</b>						
12	0.8	Y	<b>87%</b>	—	88%	—
<b>2' O 甲基, 3' 硫代磷酸酯修饰的dgRNA</b>						
13	0.8	Y	<b>87%</b>	—	88%	—
<b>2' O 甲基, 3' 硫代酸酯基PACE修饰的dgRNA</b>						
14	0.8	Y	<b>89%</b>	—	88%	—
15	0.8	Y	<b>86%</b>	—	88%	—
<b>2-硫代U修饰的dgRNA</b>						
16	0.8	N	<b>96%</b>	—	99%	—
17	0.8	Y	<b>95%</b>	5%	99%	5%
18	0.8	N	<b>95%</b>	—	96%	—
19	0.8	Y	<b>100%</b>	5%	100%	5%

[0382]

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
20	0.8	N	97%	—	96%	—
21	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
22	0.8	N	98%	—	99%	—
23	0.8	Y	99%	5%	100%	5%
24	0.8	N	94%	—	99%	—
25	0.8	Y	83%	5%	99%	5%
26	0.8	N	93%	—	96%	—
27	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
28	0.8	N	90%	—	96%	—
29	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
30	0.8	N	95%	—	99%	—
31	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
32	0.8	N	92%	—	99%	—
33	0.8	Y	84%	5%	99%	5%
34	0.8	N	90%	—	96%	—
35	0.8	Y	94%	5%	100%	5%
36	0.8	N	70%	—	96%	—
37	0.8	Y	0%	5%	0%	5%
38	0.8	N	96%	—	99%	—
39	0.8	Y	59%	5%	100%	5%

## 单一指导骨架

未修饰的单一指导RNA (sgRNA)					
40	10	N	93%	—	
41	10	N	94%	—	
42	10	N	94%	—	
43	10	N	92%	—	
44	10	N	90%, 92%	—	
45	10	N	92%	—	
46	10	N	93%	—	
47	0.8	N	86%	—	
48	0.8	N	87%	—	
49	0.8	Y	87%	—	
50	0.8	N	82%	—	

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
51	0.8	N	<b>92%</b>	—		
52	10	N	<b>60%</b>	—		
53	0.8	N	<b>90%</b>	—		
54	0.8	N	<b>90%</b>	—		
55	0.8	Y	<b>79%</b>	—		
56	0.8	N	<b>79%</b>	—		
57	0.8	N	<b>94%</b>	—		
58	10	N	<b>73%</b>	—		
59	0.8	N	<b>84%</b>	—		
60	0.8	Y	<b>≥ 85%</b>	—		
61	0.8	Y	<b>89%</b>	—		
62	0.8	N	<b>87%, 82%</b>	—		
63	0.8	N	<b>23%, 22%</b>	—		
64	0.8	N	<b>78%</b>	—	87%	—
65	0.8	Y	<b>76%</b>	—	87%	—
66	0.8	N	<b>65%</b>	—	87%	—
67	0.8	N	<b>81%</b>	—	87%	—
68	0.8	N	<b>85%</b>	—	87%	—
69	0.8	Y	<b>71%</b>	—	87%	—
70	0.8	N	<b>32%</b>	—	87%	—
71	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
72	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
73	0.8	Y	<b>79%</b>	—	87%	—
74	0.8	N	<b>88%</b>	—	87%	—
75	0.8	N	<b>93%</b>	—	87%	—
76	0.8	N	<b>87%</b>	—	87%	—
77	0.8	Y	<b>79%</b>	—	87%	—
78	0.8	N	<b>89%</b>	—	87%	—
79	0.8	N	<b>88%</b>	—	87%	—
80	0.8	N	<b>3%</b>	—	86%	—
81	0.8	N	<b>5%</b>	—	86%	—
82	0.8	N	<b>89%</b>	—	86%	—
83	0.8	N	<b>68%</b>	—	87%	—
84	0.8	Y	<b>50%</b>	—	87%	—
85	0.8	N	<b>69%</b>	—	87%	—

[0383]

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
86	0.8	N	<b>69%</b>	—	87%	—
87	0.8	N	<b>76%</b>	—	87%	—
88	0.8	Y	<b>42%</b>	—	87%	—
89	0.8	N	<b>72%</b>	—	87%	—
90	0.8	N	<b>78%</b>	—	87%	—
91	0.8	N	<b>85%</b>	—	87%	—
92	0.8	Y	<b>51%</b>	—	87%	—
93	0.8	N	<b>82%</b>	—	87%	—
94	0.8	"	<b>83%</b>	—	87%	—
<b>DMT修饰的sgRNA</b>						
95	10	N	<b>93%</b>	—	92%	—
96	10	N	<b>93%</b>	—	92%	—
<b>荧光团修饰的sgRNA</b>						
97	10	N	<b>91%, 91%</b>	—	90%, 92%	—
98	0.8	N	<b>86%</b>	—	87%	—
99	0.8	Y	<b>77%</b>	—	87%	—
100	0.8	N	<b>87%</b>	—	87%	—
101	0.8	N	<b>86%</b>	—	87%	—
102	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
103	0.8	Y	<b>82%</b>	—	87%	—
104	0.8	N	<b>90%</b>	—	87%	—
105	0.8	N	<b>92%</b>	—	87%	—
106	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
107	0.8	Y	<b>82%</b>	—	87%	—
108	0.8	N	<b>90%</b>	—	87%	—
109	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
110	0.8	N	<b>92%</b>	—	87%	—
111	0.8	Y	<b>84%</b>	—	87%	—
112	0.8	N	<b>92%</b>	—	87%	—
113	0.8	N	<b>89%</b>	—	87%	—
114	0.8	N	<b>84%, 84%</b>	—	87%, 82%	—
115	0.8	N	<b>12%, 6%</b>	—	23%, 22%	—
116	0.8	N	<b>93%, 90%</b>	—	87%, 82%	—
117	0.8	N	<b>8%, 9%</b>	—	23%, 22%	—
<b>3'硫代磷酸酯修饰的sgRNA</b>						

[0384]

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
118	10	N	<b>95%</b>	—	90%, 92%	—
119	10	N	<b>94%</b>	—	90%, 92%	—
120	10	N	<b>97%</b>	—	90%, 92%	—
121	10	N	<b>94%</b>	—	90%, 92%	—
<b>2' O甲基修饰的sgRNA</b>						
122	10	N	<b>91%</b>	—	94%	—
123	10	N	<b>92%</b>	—	93%	—
124	0.8	N	<b>86%</b>	—	87%	—
125	"	Y	<b>77%</b>	—	87%	—
126	"	N	<b>85%</b>	—	87%	—
127	0.8	N	<b>88%</b>	—	87%	—
128	10	N	<b>92%</b>	—	94%	—
129	0.8	N	<b>83%</b>	—	87%	—
130	0.8	Y	<b>78%</b>	—	87%	—
131	0.8	N	<b>83%</b>	—	87%	—
132	0.8	N	<b>85%</b>	—	87%	—
133	10	N	<b>92%</b>	—	94%	—
134	0.8	N	<b>86%</b>	—	87%	—
135	0.8	Y	<b>78%</b>	—	87%	—
136	0.8	N	<b>83%</b>	—	87%	—
137	0.8	N	<b>88%</b>	—	87%	—
138	10	N	<b>91%</b>	—	94%	—
139	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
140	0.8	Y	<b>81%</b>	—	87%	—
141	0.8	N	<b>83%</b>	—	87%	—
142	0.8	N	<b>87%</b>	—	87%	—
143	10	N	<b>89%</b>	—	92%	—
144	0.8	N	<b>91%, 88%</b>	—	87%, 82%	—
145	0.8	N	<b>24%, 25%</b>	—	23%, 22%	—
146	10	N	<b>93%, 92%</b>	—	90%, 92%	—
147	0.8	N	<b>22%</b>	—	87%	—
148	0.8	Y	<b>3%</b>	—	87%	—
149	0.8	N	<b>12%</b>	—	87%	—
150	0.8	N	<b>5%</b>	—	87%	—
151	10	N	<b>0%, 0%</b>	—	90%, 92%	—

[0385]

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
152	10	N	<b>0%, 0%</b>	—	90%, 92%	—
153	0.8	N	<b>85%</b>	—	86%	—
154	0.8	N	<b>87%</b>	—	86%	—
155	0.8	N	<b>89%</b>	—	87%	—
156	0.8	Y	<b>78%</b>	—	87%	—
157	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
158	0.8	N	<b>93%</b>	—	87%	—
159	0.8	N	<b>90%</b>	—	86%	—
160	0.8	N	<b>90%</b>	—	87%	—
161	0.8	Y	<b>86%</b>	—	87%	—
162	0.8	N	<b>90%</b>	—	87%	—
163	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
164	0.8	N	<b>92%</b>	—	90%	—
165	0.8	N	<b>89%</b>	—	87%	—
166	0.8	Y	<b>80%</b>	—	87%	—
167	0.8	N	<b>90%</b>	—	87%	—
168	0.8	N	<b>94%</b>	—	87%	—
169	0.8	N	<b>90%</b>	—	84%	—
170	0.8	Y	<b>≥ 85%</b>	—	≥ 85%	—
171	0.8	N	<b>7%</b>	—	84%	—
172	0.8	Y	<b>0%</b>	—	≥ 85%	—
173	10	N	<b>15%</b>	—	73%	—
174	0.8	N	<b>85%</b>	—	84%	—
175	0.8	Y	<b>75%</b>	—	≥ 85%	—
176	10	N	<b>86%</b>	—	73%	—
177	0.8	"	<b>0%</b>	—	84%	—
178	0.8	Y	<b>0%</b>	—	≥ 85%	—
179	10	N	<b>15%</b>	—	73%	—
<b>2'脱氧基修饰的sgRNA</b>						
180	10	N	<b>27%, 19%</b>	—	90%, 92%	—
181	10	N	<b>0%, 0%</b>	—	90%, 92%	—
182	10	N	<b>0%, 0%</b>	—	90%, 92%	—
<b>2'脱氧基,3'PACE修饰的sgRNA</b>						
183	0.8	N	<b>72%, 77%</b>	—	87%, 82%	—
184	0.8	N	<b>8%, 9%</b>	—	23%, 22%	—

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
<b>2' O 甲基,3'PACE修饰的sgRNA</b>						
185	0.8	N	<b>82%</b>	—	87%	—
186	0.8	Y	<b>72%</b>	—	87%	—
187	10	Y	<b>95%</b>	—	93%	—
188	10	Y	<b>95%</b>	—	94%	—
189	0.8	Y	<b>91%</b>	—	87%	—
190	0.8	Y	<b>84%</b>	—	87%	—
191	0.8	Y	<b>85%</b>	—	87%	—
192	0.8	Y	<b>77%</b>	—	87%	—
193	10	Y	<b>88%</b>	—	94%	—
194	0.8	Y	<b>70%</b>	—	87%	—
195	0.8	Y	<b>56%</b>	—	87%	—
196	0.8	Y	<b>40%</b>	—	87%	—
197	0.8	Y	<b>23%</b>	—	87%	—
198	10	Y	<b>88%</b>	—	93%	—
199	10	Y	<b>89%</b>	—	94%	—
200	0.8	Y	<b>84%</b>	—	87%	—
201	0.8	Y	<b>75%</b>	—	87%	—
202	10	Y	<b>90%</b>	—	93%	—
203	10	Y	<b>90%</b>	—	94%	—
204	0.8	Y	<b>86%</b>	—	87%	—
205	0.8	Y	<b>82%</b>	—	87%	—
206	10	Y	<b>88%</b>	—	93%	—
207	0.8	Y	<b>82%</b>	—	87%	—
208	0.8	Y	<b>78%</b>	—	87%	—
209	10	Y	<b>77%</b>	—	93%	—
210	0.8	Y	<b>71%</b>	—	87%	—
211	"	Y	<b>69%</b>	—	"	—
212	10	N	<b>80%</b>	—	93%	—
213	0.8	N	<b>56%</b>	—	87%	—
214	0.8	Y	<b>41%</b>	—	"	—
215	10	Y	<b>78%</b>	—	93%	—
216	0.8	Y	<b>58%</b>	—	87%	—
217	0.8	Y	<b>44%</b>	—	"	—
218	10	Y	<b>80%</b>	—	93%	—

[0387]

[0388]

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
219	0.8	Y	<b>39%</b>	—	87%	—
220	0.8	Y	<b>13%</b>	—	"	—
221	10	Y	<b>74%</b>	—	93%	—
222	0.8	Y	<b>36%</b>	—	87%	—
223	0.8	Y	<b>19%</b>	—	87%	—
224	10	Y	<b>86%</b>	—	93%	—
225	0.8	Y	<b>84%</b>	—	87%	—
226	0.8	Y	<b>80%</b>	—	"	—
227	10	Y	<b>88%</b>	—	93%	—
228	0.8	Y	<b>83%</b>	—	87%	—
229	0.8	Y	<b>82%</b>	—	87%	—
230	0.8	N	<b>80%</b>	—	87%	—
231	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
232	10	N	<b>88%</b>	—	93%	—
233	0.8	N	<b>85%</b>	—	87%	—
234	0.8	Y	<b>73%</b>	—	87%	—
235	10	Y	<b>82%</b>	—	93%	—
236	0.8	Y	<b>89%</b>	—	87%	—
237	0.8	Y	<b>76%</b>	—	87%	—
238	10	Y	<b>65%</b>	—	93%	—
239	0.8	Y	<b>84%</b>	—	87%	—
240	0.8	Y	<b>56%</b>	—	87%	—
<b>2' O 甲基,3' 硫代磷酸酯修饰的sgRNA</b>						
241	10	N	<b>92%</b>	—	92%	—
242	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
243	0.8	Y	<b>88%</b>	—	87%	—
244	0.8	N	<b>85%</b>	—	87%	—
245	0.8	N	<b>91%</b>	—	87%	—
246	0.8	N	<b>91%</b>	—	84%	—
247	0.8	Y	<b>≥ 85%</b>	—	<b>≥ 85%</b>	—
248	0.8	N	<b>84%</b>	—	84%	—
249	0.8	Y	<b>90%</b>	—	89%	—
250	0.8	N	<b>90%, 87%</b>	—	87%, 82%	—
251	0.8	N	<b>16%, 19%</b>	—	23%, 22%	—
252	0.8	N	<b>93%</b>	—	89%	—

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
253	0.8	N	<b>90%, 90%</b>	—	87%, 82%	—
254	0.8	N	<b>17%, 22%</b>	—	23%, 22%	—
255	0.8	N	<b>93%</b>	—	89%	—
256	0.8	N	<b>91%, 91%</b>	—	87%, 82%	—
257	0.8	N	<b>13%, 16%</b>	—	23%, 22%	—
<b>2' O 甲基, 3' 硫代磷酸酯PACE修饰的sgRNA</b>						
258	10	N	<b>89%</b>	—	92%	—
259	0.8	N	<b>84%</b>	—	87%	—
260	0.8	Y	<b>80%</b>	—	87%	—
261	0.8	N	<b>77%</b>	—	87%	—
262	0.8	N	<b>83%</b>	—	87%	—
263	0.8	N	<b>92%</b>	—	87%	—
264	0.8	Y	<b>79%</b>	—	87%	—
265	0.8	N	<b>88%</b>	—	87%	—
266	0.8	N	<b>94%</b>	—	87%	—
267	10	N	<b>74%</b>	—	93%	—
268	0.8	N	<b>11%</b>	—	86%	—
269	0.8	N	<b>15%</b>	—	"	—
270	0.8	N	<b>49%</b>	—	"	—
271	0.8	N	<b>31%</b>	—	"	—
272	0.8	N	<b>91%</b>	—	84%	—
273	0.8	Y	<b>77%</b>	—	≥ 85%	—
274	0.8	N	<b>90%, 91%</b>	—	87%, 82%	—
275	0.8	N	<b>9%, 8%</b>	—	23%, 22%	—
276	0.8	N	<b>90%</b>	—	84%	—
277	0.8	Y	<b>≥ 85%</b>	—	≥ 85%	—
278	0.8	N	<b>86%, 88%</b>	—	87%, 82%	—
279	0.8	N	<b>11%, 7%</b>	—	23%, 22%	—
<b>2-氨基A修饰的sgRNA (包括未修饰的对照)</b>						
280	0.8	Y	<b>88%, 88%</b>	—		
281	0.8	Y	<b>76%, 75%</b>	—		
282	0.8	Y	<b>87%, 91%</b>	—	88%, 88%	—
283	0.8	Y	<b>90%, 90%</b>	—	76%, 75%	—
284	0.8	Y	<b>85%, 87%</b>	—		
285	0.8	Y	<b>88%, 88%</b>	—		

条目#	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	tcDNA	%靶切割	%CV	%切割的对比 对照	%CV对照
286	0.8	Y	<b>93%, 96%</b>	—	85%, 87%	—
287	0.8	Y	<b>82%, 79%</b>	—	88%, 88%	—
<b>5-甲基U修饰的sgRNA</b>						
288	0.8	N	<b>86%, 83%</b>	—	87%, 82%	—
289	0.8	N	<b>11%, 11%</b>	—	23%, 22%	—
<b>Z碱基修饰的sgRNA</b>						
290	10	N	<b>19%</b>	—	92%	—
291	10	N	<b>93%</b>	—	"	—
<b>sgRNA经修饰以不利于错误折叠</b>						
292	0.8	N	<b>93%</b>	—	90%	—
293	0.8	N	<b>93%</b>	—	86%	—

[0391] 结果表明,在特定位置含有修饰的指导RNA可被活性Cas蛋白和gRNA:Cas蛋白复合体容许,因为该修饰不能防止中靶多核苷酸的靶特异性切割。测试并发现特定位置被容许的修饰包括2'-0-甲基核糖核苷酸(=2' OMe),2'-脱氧核糖核苷酸,外消旋硫代磷酸酯核苷酸间连接,3'-膦酰基乙酸酯(=PACE),3'-硫代膦酰基乙酸酯(=硫代PACE),Z核苷酸,2-硫尿嘧啶,2-氨基腺嘌呤,5-甲基尿嘧啶,与Cy5荧光团偶联的5-氨基烯丙基尿嘧啶,2-(4-丁基酰胺荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头,及其组合。

[0392] 预期本文公开和测试的化学修饰,特别是在测试位置(如表3和4所列的)处的化学修饰,会在多种指导RNA中的等同位置处被容许。

[0393] 如本文所公开的,将化学修饰的核苷酸整合入指导RNA中以图改进某些特性。这些特性包括改进的指导RNA的核酸酶抗性(也称为改进的稳定性),减少的gRNA:Cas蛋白复合体的脱靶效应(也称为改进的特异性),改进的gRNA:Cas蛋白复合体在切割、切口或结合靶多核苷酸时的功效,改进的转染效率和/或改进的细胞器定位。

[0394] 表3和表4中的测定结果表明:(1)在指导RNA中,许多位置可容许多种化学修饰;(2)指导RNA的5'和3'端可容许多种末端保护修饰,这些修饰可用于抑制核酸外切RNA降解;(3)2-硫代U可用于抑制涉及G-U摇摆配对的脱靶相互作用,从而通过抑制脱靶杂交相互作用增加指导配对的特异性;(4)5'盐酸通常是容许良好的;(5)指导RNA的表面暴露区(从公开的晶体结构推断)容许广泛的从U至5-甲基U的修饰,这潜在地使修饰的RNA更可能排除免疫响应如被未修饰的RNA刺激;和(6)对于RNA折叠,G-C对比A-U对更强且更稳定。至少有一个指导RNA能够容许用比未修饰的A-U对更热力学稳定的2'-0-甲基A-2'-0-甲基U对来代替一些G-C对。

[0395] 更具体地,本实施例显示在双指导RNA(如表3和4中的条目12所示)和单指导RNA(条目143-146、169-170)的5'和3'端容许2'-0-甲基修饰,从而允许末端保护来稳定gRNA以抵抗核酸外切酶。2'-0-甲基修饰在大多数但非全部内部位置处被容许,从而允许针对包括核酸内切酶(条目146,153-168,174-179)在内的各种核酸酶的稳定化。然而,本实施例还表明,并不是指导RNA中的每个位置都容许2'-0-甲基(如条目151-152和171-173所示),表明5'末端处太多连续的2'-0-甲基修饰(例如26个以上连续的2'-0-甲基修饰的核苷酸)或5'

末端20聚体指导序列下游(3')的C和U核苷酸的过多2'-0-甲基修饰是不太容许的(例如在条目154-156中测试的位置所揭示的,在条目171-173中的序列位置+56和+69处的2'-0-甲基尿嘧啶的一个或两个的抑制作用)。

[0396] 本实施例显示,在体外在含有10mM Mg<sup>2+</sup>的缓冲液中使用期间(条目146),整个20聚体指导序列中的2'-0-甲基修饰是可容许的,但是在存在于细胞中时,在生理条件下这样广泛的修饰是不太容许的(条目147-150)。因此,在一些实施方案中,整个20聚体指导序列中包含15个或更多个,或者17个或更多个,或者18个或更多个,或者20个2'-0-甲基修饰的gRNA用于本文所述的体外方法,例如基因组编辑以体外修饰DNA序列,调节目的基因的体外表达,体外切割DNA靶序列等用途。

[0397] 本实施例显示2'-脱氧基修饰的广泛并入是不太容许的并且可基本上完全抑制(条目180-182)。然而,2'-脱氧基修饰在一些位置可良好地被容许(条目183),因此这种修饰可用于抑制核酸酶。

[0398] 本实施例还显示,在CRISPR-Cas9指导RNA中的三个已知茎环的每个环中,荧光团或染料标记是容许的(条目116)。这些标记在指导序列上的5'凸出中也是容许的(条目114),在sgRNA中的其他位置是容许的(条目114),并且在双指导应用中使用的tracrRNA的环中是容许的(条目11)。在本实施例中,测试了两种不同类型的荧光团:基本上代替核苷酸的磷酸二酯连接的荧光团(无核糖环)(条目114和116),和共价偶联至指导RNA中并入的5-氨基烯丙基U的染料标记(Cy5)(条目11)。

[0399] 本实施例还显示Z碱基在合成的指导RNA中是容许的,特别是作为对其中一些C被Z碱基替代的合成的指导RNA的修饰(条目290-291)。本实施例还表明,如表3和4所示,一些其它碱基在多个位置处是容许的。

[0400] 本实施例进一步显示指导RNA的5'和3'端可容许多个末端保护修饰。这样的修饰可用于抑制外切核酸分解性RNA降解。对这种修饰的容忍性的支持可见于Hendel等,Nat.Biotechnol.(2015)33:9,985-9中。表3和4中的条目143-144、185-223、241-257、258-266和272-279提供了对指导RNA的5'和3'端的修饰的额外的支持。在一些实施方案中,指导RNA在5'端或3'端或5'和3'端包含7个或更少的修饰的核苷酸,或者是6个或更少,或者5个或更少,或者4个或更少,或者3个或更少,或者2个或更少,或者1个。可类似地保护双指导RNA(条目12-15)。

[0401] 本实施例进一步表明,2-硫代U可用于阻止涉及G-U摇摆配对的脱靶相互作用,从而通过抑制脱靶杂交相互作用增加指导序列配对的特异性(条目16-39)。参与指导RNA与CLTA1脱靶3(也称为“CLTA1OFF3-靶标”或“CLTA1OFF3”)之间的杂交的碱基对之一是G-U摇摆对。用2-硫代U替代指导RNA中的对应的U将切割从100%(条目8)降低到59%(条目39)。用2-硫代U替换其他U(例如在序列位置+3或+9处,条目23和31)不具有相同的效果,推测是因为这些U与测试的脱靶位点的每一个完全杂交时不参与G-U摇摆配对。因此,当脱靶位点参与G-U摇摆配对时,2-硫代U能增加指导RNA的靶特异性。

[0402] 本实施例还显示附接于指导序列的5'-凸出序列通常是良好地被容许的(参见条目83-95、114和206-223)。例如,在5'端的大体积二甲氧基三苯甲基(dmt)基团是良好地被容许的(条目95)。dmt的色谱特性可用于促进从合成过程中通常产生的不完全加长的副产物纯化出全长合成RNA。因此,在一些实施方案中,合成的指导RNA包含5'凸出序列,例如,包

含与指导序列互补的15个或更少核苷酸的短多核苷酸序列，并且通过聚合物接头(如多核苷酸或类似的基于磷酸二酯的接头)在其3'端共价连接至指导序列的5'端，其中接头可为5个或更多个(或者6或7个)连续的尿苷核苷酸。

[0403] 本实施例还显示指导RNA的表面暴露区(从他人发表的晶体结构推断)容许广泛修饰尿嘧啶核苷酸为5-甲基尿嘧啶(5-甲基U)(条目288)，其可使修饰的RNA更有可能排除免疫反应，如被未经修饰的RNA刺激。具体地，合成的指导RNA的5'和3'端是潜在的免疫刺激性的，并且本实施例显示5'和3'端容许5-甲基U修饰(条目288)。

[0404] 本实施例还显示，合成的指导RNA可容许用2'-0-甲基A-2'-0-甲基U对替代一些G-C对，前者比未修饰的A-U对在热力学上更稳定(参见条目292-293中的非末端-2'-0-甲基U和互补-2'-0-甲基A修饰)。这是有利的，因为已知对于折叠的RNA，G-C对比A-U对更强且更稳定。在合成的指导RNA中用这种热稳定的A-U对替代G-C对允许通过防止涉及非所欲的G-C对的错误折叠结构来改进活性结构的折叠，如可通过常用的RNA折叠算法预测的。

[0405] 例示性实施方案

[0406] 根据本公开主题提供的例示性实施例包括但不限于权利要求和如下实施方案：

[0407] A1. 一种合成的指导RNA，其包含：

[0408] crRNA区段，其包含(i)能够与靶序列杂交的指导序列，(ii)茎序列；和

[0409] tracrRNA区段，其包含与所述茎序列部分或完全互补的核苷酸序列，

[0410] 其中所述合成的指导RNA包含至少一个修饰的核苷酸，且其中所述合成的指导RNA具有gRNA功能性。

[0411] A2. 实施方案A1的合成的指导RNA，其包含2'-脱氧基模块。

[0412] A3. 实施方案A1或A2的合成的指导RNA，其包含选自下组的2'-卤素模块：2'-氟，2'-氯，2'-溴和2'-碘。

[0413] A4. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含硫代磷酸酯基团。

[0414] A5. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含PACE基团。

[0415] A6. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含硫代PACE基团。

[0416] A7. 实施方案A2-A6任一项合成的指导RNA，其包含2'-0-甲基模块。

[0417] A8. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含2-硫尿嘧啶。

[0418] A9. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含4-硫尿嘧啶。

[0419] A10. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含2-氨基腺嘌呤。

[0420] A11. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含次黄嘌呤。

[0421] A12. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含5-甲基胞嘧啶。

[0422] A13. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含5-甲基尿嘧啶。

[0423] A14. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含5-氨基烯丙基-尿嘧啶。

[0424] A15. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含Z核糖核苷酸。

[0425] A16. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含Z脱氧核糖核苷酸。

[0426] A17. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含方酸缀合物。

[0427] A18. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA，其包含染料接头。

[0428] A19. 实施方案18的合成的指导RNA，其中所述染料接头是2-(4-丁基酰胺荧光素)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头。

- [0429] A20.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含具有2' -0-甲基和3' -硫代磷酸酯的核苷酸。
- [0430] A21.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含具有2' -0-甲基和3' -PACE的核苷酸。
- [0431] A22.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含具有2' -0-甲基和3' -硫代PACE的核苷酸。
- [0432] A23.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含具有2' -脱氧基和3' -PACE的核苷酸。
- [0433] A24.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含5-甲基胞昔。
- [0434] A25.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含甲基膦酸酯。
- [0435] A26.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含PACE的酯,其中所述酯任选为甲酯。
- [0436] A27.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含单一RNA链,所述单一RNA链包含cr RNA区段和tracr RNA区段二者。
- [0437] A28.实施方案A1-A26任一项的合成的指导RNA,其包含两条RNA链,且cr RNA区段和tracr RNA区段在不同的RNA链中。
- [0438] A29.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在各RNA链的5' 端、3' 端、或5' 端和3' 端二者处包含修饰的核苷酸。
- [0439] A30.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在指导序列中包含修饰的核苷酸。
- [0440] A31.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在指导序列的5' 包含修饰的核苷酸。
- [0441] A32.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在茎序列中包含修饰的核苷酸。
- [0442] A33.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在骨架区中包含修饰的核苷酸。
- [0443] A34.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在骨架区中包含至少一个非天然、正交碱基对,其中所述碱基对独立地选自isoG-isoC和Z碱基-P碱基。
- [0444] A35.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含2' -氨基基团。
- [0445] A36.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含二硫代磷酸酯连接基团。
- [0446] A37.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含硼烷膦酸酯连接基团。
- [0447] A38.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含非锁核酸修饰(ULNA)。
- [0448] A39.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含锁核酸修饰(LNA)。
- [0449] A40.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含非结构化的核酸修饰(UNA)。
- [0450] A41.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含假U。
- [0451] A42.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含2' -MOE。
- [0452] A43.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含2' -阿拉伯糖。
- [0453] A44.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含4' -硫代核糖。
- [0454] A45.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含方酸连接。
- [0455] A46.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含三唑连接。
- [0456] A47.一种用于切割或切口靶多核苷酸的方法,包括使靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和前述实施方案任一项的合成的指导RNA接触,并切割或切口所述靶多核苷酸。

- [0457] A48. 实实施方案A47的方法,其中所述切割或切口在体外进行。
- [0458] A49. 实实施方案A47的方法,其中所述切割或切口在细胞中进行。
- [0459] A50. 实实施方案A47的方法,其中所述切割或切口在体内进行。
- [0460] A51. 实实施方案A47-A50任一项的方法,其中所述CRISPR相关蛋白是Cas9。
- [0461] A52. 实实施方案A47-A51任一项的方法,其中所述切割或切口导致基因编辑。
- [0462] A53. 实实施方案A47-A52任一项的方法,其中所述切割或切口导致基因表达的改变。
- [0463] A54. 一种用于结合靶多核苷酸的方法,包括使所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和前述实施方案任一项的合成的指导RNA接触。
- [0464] A55. 实实施方案A54的方法,其中所述CRISPR相关蛋白包括不具有切割或切口活性的突变体。
- [0465] A56. 实实施方案A54或A55的方法,其中所述CRISPR相关蛋白是融合蛋白,所述融合蛋白包含非天然存在于CRISPR系统中的蛋白组分。
- [0466] A57. 实实施方案A54至A56任一项的方法,其导致靶多核苷酸的表达的变化。
- [0467] A58. 实实施方案A54至A57任一项的方法,其用于标记所述靶多核苷酸。
- [0468] 进一步的例示性实施方案
- [0469] B1. 一种合成的指导RNA,其包含:
- [0470] (a) crRNA区段,其包含(i)能够与多核苷酸中的靶序列杂交的指导序列,(ii)茎序列;和
- [0471] (b) tracrRNA区段,其包含与所述茎序列部分或完全互补的核苷酸序列,
- [0472] 其中所述合成的指导RNA包含一个或多个修饰,且其中所述合成的指导RNA具有gRNA功能性。
- [0473] B2. 实实施方案1的合成的指导RNA,其包含2'-0-甲基模块、2'-脱氧基模块、Z碱基、硫代磷酸酯核苷酸间连接、膦酰基乙酸酯核苷酸间连接、硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接,或其组合。
- [0474] B3. 实实施方案1或2的合成的指导RNA,其包含一个或多个选自下组的修饰:具有3'-硫代磷酸酯基团的2'-0-甲基核苷酸、具有3'-膦酰基羧酸酯基团的2'-0-甲基核苷酸、具有3'-膦酰基乙酸酯基团的2'-0-甲基核苷酸、具有3'-硫代膦酰基羧酸酯基团的2'-0-甲基核苷酸、具有3'-硫代膦酰基乙酸酯基团的2'-0-甲基核苷酸、具有3'-膦酰基乙酸酯基团的2'-脱氧核苷酸、具有3'-硫代膦酰基乙酸酯基团的2'-脱氧核苷酸,和Z碱基。
- [0475] B4. 实实施方案1、2或3的合成的指导RNA,其包含一个或多个选自下组的修饰:2'-氟代核糖基、2-硫尿嘧啶碱基、4-硫尿嘧啶碱基、2-氨基腺嘌呤碱基、次黄嘌呤碱基、5-甲基胞嘧啶碱基、5-甲基尿嘧啶碱基、甲基膦酸酯核苷酸间连接、5-氨基烯丙基尿嘧啶碱基、方酸连接、三唑连接、缀合至核苷酸的染料,及其组合。
- [0476] B5. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含选自下组的修饰:2'-MOE、2'-氨基、2'-F-阿拉伯糖、2'-LNA、2'-ULNA、3'-甲基膦酸酯、3'-硼烷膦酸酯、3'-二硫代磷酸酯、2'-OMe-3'-P(S)2、2'-OMe-3'-P(CH3)、2'-OMe-3'-P(BH3)、4'-硫代核糖基、L-糖、2-硫代胞嘧啶、6-硫代鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、假尿嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、5,6-脱氢尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-乙炔基胞嘧啶、5-乙炔基尿嘧啶、5-烯丙基尿嘧啶、5-烯

丙基胞嘧啶、5-烯丙基氨基胞嘧啶、P核碱基、异胞嘧啶(isoC)、异鸟嘌呤(isoG)、UNA、x(A, G, C, T)、y(A, G, C, T)、无碱基核苷酸、PEG、烃接头、卤素取代的烃接头、杂原子(O, N, S)烃接头、含有(酮、羧基、酰胺、亚硫酰基、氨基甲酰基、或硫羰氨基甲酰基)的烃接头、精胺接头，及其组合。

- [0477] B6.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含增强稳定性的修饰。
- [0478] B7.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含至少两种修饰;其中第一种修饰是增强稳定性的修饰且第二种修饰是改变特异性的修饰。
- [0479] B8.实施方案6或7的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰位于指导序列中。
- [0480] B9.实施方案6或7的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰位于指导序列的上游。
- [0481] B10.实施方案6或7的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰位于crRNA区段的前5和/或最后5个核苷酸内。
- [0482] B11.实施方案6或7的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰位于tracrRNA区段中。
- [0483] B12.实施方案6或7的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰位于tracrRNA区段的前五个和/或最后5个核苷酸内。
- [0484] B13.实施方案6-12任一项的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含2'-0-甲基模块、2'-氟模块、或2'-脱氧基模块。
- [0485] B14.实施方案6-13任一项的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含硫代磷酸酯核苷酸间连接、膦酰基乙酸酯核苷酸间连接、硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接、甲基膦酸酯核苷酸间连接、硼烷膦酸酯核苷酸间连接或二硫代磷酸酯核苷酸间连接。
- [0486] B15.实施方案6-14任一项的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含3'-膦酰基乙酸酯或3'-硫代膦酰基乙酸酯。
- [0487] B16.实施方案6-15任一项的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含2'-0-甲基-3'-硫代磷酸酯核苷酸、2'-0-甲基-3'-膦酰基乙酸酯核苷酸、或2'-0-甲基-3'-硫代膦酰基乙酸酯核苷酸。
- [0488] B17.实施方案6-16任一项的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含2'-氟-3'-硫代磷酸酯核苷酸、2'-氟-3'-膦酰基乙酸酯核苷酸、或2'-氟-3'-硫代膦酰基乙酸酯核苷酸。
- [0489] B18.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含改变特异性的修饰。
- [0490] B19.实施方案18的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰位于指导序列中。
- [0491] B20.实施方案18或19任一项的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰包括2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶或2-氨基腺嘌呤。
- [0492] B21.实施方案18-20任一项的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰包含硫代磷酸酯核苷酸间连接、膦酰基乙酸酯核苷酸间连接、硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接、甲基膦酸酯核苷酸间连接、硼烷磷酸酯核苷酸间连接、或二硫代磷酸酯核苷酸间连接。
- [0493] B22.实施方案18-21任一项的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰包含3'-膦酰基乙酸酯或3'-硫代膦酰基乙酸酯。

- [0494] B23.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含荧光染料或标记。
- [0495] B24.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含一个或多个同位素标记。
- [0496] B25.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述指导RNA缀合至寡核苷酸、适配体、氨基酸、肽、蛋白质、类固醇、脂质、叶酸、维生素、糖、或寡糖。
- [0497] B26.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述合成的指导RNA是单一指导RNA,其中所述crRNA区段和tracrRNA区段经环L连接。
- [0498] B27.实施方案26的合成的指导RNA,其中所述环L包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个核苷酸。
- [0499] B28.实施方案26或27的合成的指导RNA,其中所述环L包含GNRA的核苷酸序列,其中N表示A,C,G或U且R表示A或G。
- [0500] B29.实施方案26、27或28合成的指导RNA,其中所述环L包含GAAA的核苷酸序列。
- [0501] B30.实施方案26-29的合成的指导RNA,其中所述环L包含一个或多个修饰的核苷酸。
- [0502] B31.实施方案30的合成的指导RNA,其中所述环L包含荧光染料。
- [0503] B32.实施方案31的合成的指导RNA,其中所述染料缀合至2-(4-丁基酰胺-染料)丙烷-1,3-二醇双(磷酸二酯)接头。
- [0504] B33.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述crRNA区段在指导RNA的5'端。
- [0505] B34.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述tracrRNA区段在指导RNA的3'端。
- [0506] B35.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述crRNA区段包含25-70个核苷酸。
- [0507] B36.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述指导序列包含15-30个核苷酸。
- [0508] B37.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述茎序列包含10-50个核苷酸。
- [0509] B38.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含一个或多个三唑连接。
- [0510] B39.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含一个或多个方酸连接。
- [0511] B40.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述指导RNA包含如下的核苷酸组合物:
- [0512]  $M_m N_n$
- [0513] 其中每个N独立地表示未修饰的核苷酸,并且每个M选自2'-0-甲基核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-P(S)核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-PACE核糖核苷酸,2'-0-甲基-3'-硫代PACE核糖核苷酸和2'-脱氧核苷酸;
- [0514] 其中每个M在指导RNA的序列中的任何位置处;且
- [0515] 其中m是1至220的整数,n是0至219的整数,且 $50 < m+n \leq 220$ 。
- [0516] B41.实施方案38的合成的指导RNA,其中 $m+n < 150$ ,且m和n的每一个独立地选自0至150的整数,条件是m不为0。
- [0517] B42.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述指导RNA包含如下的核苷酸

序列：

[0518]  $M_m N_n M'_{m'} N'_{n'} M''_{m''}$

[0519] 其中每个M, M' 和M'' 独立地表示修饰的核苷酸, 并且每个N和N' 独立地表示未修饰的核糖核苷酸；

[0520] 其中任何给定的M与任何其它M相同或不同, 任何给定的N与任何其它N相同或不同, 任何给定的M' 与任何其它M' 相同或不同, 任何给定的N' 与任何其它N' 相同或不同, 任何给定的M'' 与任何其它M'' 相同或不同；且

[0521] 其中m为0至40的整数, n为20至130的整数, m' 为0至10的整数, n' 为0至50的整数, m'' 为0至10的整数, 条件是 $m+m'+m''$  大于或等于1。

[0522] B43. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA, 其中所述crRNA区段包含如下的核苷酸序列：

[0523]  $M_m N_n M'_{m'} N'_{n'}$

[0524] 其中M和M' 各自表示修饰的核苷酸, N和N' 各自表示未修饰的核糖核苷酸；

[0525] 其中任何给定的M与任何其它M相同或不同, 任何给定的N与任何其它N相同或不同, 任何给定的M' 与任何其它M' 相同或不同, 任何给定的N' 与任何其它N' 相同或不同；且

[0526] 其中n和n' 各自独立地选自0至50的整数

[0527] 其中m和m' 各自独立地选自0和25的整数, 条件是 $m+m'$  大于或等于1。

[0528] B44. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA, 其中所述指导序列包含如下的核苷酸序列：

[0529]  $M_m N_n M'_{m'} N'_{n'}$

[0530] 其中M和M' 各自表示修饰的核苷酸, N和N' 各自表示未修饰的核糖核苷酸；

[0531] 其中任何给定的M与任何其它M相同或不同, 任何给定的N与任何其它N相同或不同, 任何给定的M' 与任何其它M' 相同或不同, 任何给定的N' 与任何其它N' 相同或不同；且

[0532] 其中m, n, m' 和n' 各独立地选自0至40的整数, 条件是 $m+m'$  大于或等于1。

[0533] B45. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA, 其中所述tracrRNA区段包含如下的核苷酸序列：

[0534]  $N_n M_m N'_{n'} M'_{m'}$

[0535] 其中M和M' 各自表示修饰的核苷酸, 且N和N' 各自表示未修饰的核糖核苷酸；

[0536] 其中任何给定的M与任何其它M相同或不同, 任何给定的N与任何其它N相同或不同, 任何给定的M' 与任何其它M' 相同或不同, 任何给定的N' 与任何其它N' 相同或不同；且

[0537] 其中n是0至130的整数, m是0至40的整数, n' 是0至130的整数, m' 是0至40的整数, 条件是 $m+m'$  大于或等于1。

[0538] B46. 实施方案40-43任一项的合成的指导RNA, 其中m, m' , m+m' 或m+m'+m'' 是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。

[0539] B47. 实施方案40-43任一项的合成的指导RNA, 其中m, m' , m+m' 或m+m'+m'' 是1、2、3、4、5、或6。

[0540] B48. 实施方案40-45任一项的合成的指导RNA, 其中n是16、17、18或19。

[0541] B49. 实施方案40-45任一项的合成的指导RNA, 其中n, n' 或n+n' 是75至115的整数。

[0542] B50. 实施方案40-47任一项的合成的指导RNA, 其中每个M独立地选自下组: 2' 修饰

的核苷酸、3' 修饰的核苷酸,及其组合。

[0543] B51. 实施方案48的合成的指导RNA,其中所述2' -修饰的核苷酸选自下组:2' -脱氧核苷酸、2' -0-甲基核苷酸、2' -氟代核苷酸和2' -0-C<sub>1-3</sub>烷基-0-C<sub>1-3</sub>烷基核苷酸。

[0544] B52. 实施方案48的合成的指导RNA,其中所述3' -修饰的核苷酸选自下组:3' -膦酰基乙酸酯核苷酸和3' -硫代膦酰基乙酸酯核苷酸。

[0545] B53. 实施方案48的合成的指导RNA,其中所述2' -修饰的核苷酸和3' -修饰的核苷酸的组合包含2' -0-甲基-3' -硫代磷酸酯核苷酸、2' -0-甲基-3' -膦酰基乙酸酯核苷酸或2' -0-甲基-3' -硫代膦酰基乙酸酯核苷酸。

[0546] B54. 一种用于切割靶多核苷酸的方法,包括使所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和前述实施方案任一项的合成的指导RNA接触以及切割所述靶多核苷酸。

[0547] B55. 实施方案52的方法,其还包括使所述靶多核苷酸与外源CRISPR相关蛋白接触。

[0548] B56. 实施方案53的方法,其中所述CRISPR相关蛋白是Cas9。

[0549] B57. 实施方案52-54任一项的方法,其中所述切割导致靶基因的功能敲除。

[0550] B58. 实施方案52-55任一项的方法,其还包括通过用外源或内源模板多核苷酸进行同源性定向修复来修复切割的靶多核苷酸。

[0551] B59. 实施方案56的方法,其中所述的外源或内源模板多核苷酸包含与切割位点任一侧的序列具有基本序列同一性的至少一个序列。

[0552] B60. 实施方案52-57任一项的方法,其还包括通过非同源末端连接来修复切割的靶多核苷酸。

[0553] B61. 实施方案56-58任一项的方法,其中所述修复步骤产生所述靶多核苷酸的一个或多个插入、缺失或取代。

[0554] B62. 实施方案59的方法,其中所述插入、缺失、或取代导致从包含所述靶多核苷酸的基因表达的蛋白中一个或多个氨基酸变化。

[0555] B63. 实施方案52-60任一项的方法,其中使所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和合成的指导RNA在体外接触。

[0556] B64. 实施方案52-61任一项的方法,其中使所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和合成的指导RNA在体外或体内的细胞的基因组内接触。

[0557] B65. 实施方案62的方法,其中所述细胞在将所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和合成的指导RNA接触之前分离自多细胞来源。

[0558] B66. 实施方案63的方法,其中所述来源是植物、多细胞原生生物、或真菌。

[0559] B67. 实施方案62-64任一项的方法,其中所述细胞,或来源于其的细胞,在将所述靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和合成的指导RNA接触之后回到所述来源。

[0560] B68. 一种在细胞中修饰靶多核苷酸的方法,包括将实施方案1-51任一项的合成的指导RNA引入所述细胞以及将CRISPR相关蛋白或在细胞中表达CRISPR相关蛋白的核酸引入所述细胞。

[0561] B69. 实施方案66的方法,其中所述CRISPR相关蛋白是Cas9。

[0562] B70. 一种改变细胞中至少一个基因产物的表达的方法,包括将实施方案1-51任一项的合成的指导RNA引入所述细胞以及进一步将CRISPR相关蛋白或在细胞中表达CRISPR相

关蛋白的核酸引入所述细胞,其中所述细胞含有且表达具有靶序列且编码所述基因产物的DNA分子。

[0563] B71. 实施方案68的方法,其中所述CRISPR相关蛋白是Cas9。

[0564] B72. 实施方案69的方法,其中所述CRISPR相关蛋白切割所述DNA分子。

[0565] B73. 一种RNA分子的集合或文库,其包含两种或更多种实施方案1-51任一项的合成的指导RNA。

[0566] B74. 一种试剂盒,其包含实施方案1-51任一项的合成的指导RNA或实施方案71的RNA分子的集合或文库。

[0567] B75. 实施方案72的试剂盒,其还包含CRISPR相关蛋白或编码所述CRISPR相关蛋白的核酸。

[0568] B76. 实施方案73的试剂盒,其中所述CRISPR相关蛋白是Cas9。

[0569] B77. 前述实施方案的任一项的合成的指导RNA、方法或试剂盒,其中所述合成的指导RNA包含末端修饰。

[0570] B78. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其具有单一RNA链或两条分离的互补RNA链,其中所述指导RNA在各RNA链的两端包含至少一个增强稳定性的修饰。

[0571] C1. 一种合成的指导RNA,其包含:

[0572] (a) crRNA区段,其包含 (i) 能够与多核苷酸中的靶序列杂交的指导序列, (ii) 茎序列; 和

[0573] (b) tracrRNA区段,其包含与所述茎序列部分或完全互补的核苷酸序列,

[0574] 其中所述合成的指导RNA包含一个或多个修饰,且其中所述合成的指导RNA具有gRNA功能性。

[0575] C2. 实施方案C1的合成的指导RNA,其中所述修饰的一个或多个包含增强稳定性的修饰。

[0576] C3. 实施方案C2的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰的一个或多个位于指导序列中。

[0577] C4. 实施方案C2的合成的指导RNA,其中所述增强稳定性的修饰包含2' -0-甲基模块、Z碱基、2' -脱氧核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸间连接、膦酰基乙酸酯(PACE)核苷酸间连接、或硫代膦酰基乙酸酯(硫代PACE)核苷酸间连接,或其组合。

[0578] C5. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在指导RNA的5' 端包含少于26个连续的2' -0-甲基修饰的核苷酸。

[0579] C6. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含Z碱基,所述Z碱基在合成的指导RNA中替代胞嘧啶。

[0580] C7. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在与尿苷对应的位置处包含至少一个2-硫尿嘧啶,所述尿苷能参与与潜在脱靶序列的U-G摇摆配对。

[0581] C8. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含一个或多个选自下组的修饰: 具有3' -硫代磷酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、具有3' -硫代膦酰基乙酸酯基团的2' -0-甲基核苷酸、和具有3' -膦酰基乙酸酯基团的2' -脱氧核苷酸。

[0582] C9. 前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含至少两个修饰。

- [0583] C10.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含多至50个修饰。
- [0584] C11.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含单一RNA链或两条分离的RNA链,以及各条RNA链的5' 端、各条RNA链的3' 端、或各条RNA链的5' 端和3' 端二者处的一个或多个修饰。
- [0585] C12.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在5' 端或3' 端或5' 端和3' 端二者包含7个或更少的连续的修饰的核苷酸。
- [0586] C13.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其在5' 端、3' 端或茎-环的一项或多项处包含一个或多个5-甲基尿苷核苷酸。
- [0587] C14.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述修饰的一个或多个改变碱基配对热稳定性。
- [0588] C15.实施方案C14的合成的指导RNA,其中所述一个或多个修饰增强碱基配对热稳定性。
- [0589] C16.实施方案C15的合成的指导RNA,其中所述一个或多个修饰独立地选自2-硫尿嘧啶(2-硫代U)、4-硫尿嘧啶(4-硫代U)、2-氨基腺嘌呤、2'-0-甲基、2'-氟、5-甲基尿苷、5-甲基胞苷和锁核酸修饰(LNA)。
- [0590] C17.实施方案C15的合成的指导RNA,其中所述一个或多个修饰降低碱基配对热稳定性。
- [0591] C18.实施方案C17的合成的指导RNA,其中所述一个或多个修饰独立地选自2-硫尿嘧啶、2'-脱氧基、硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、硼烷磷酸酯连接、膦酰基乙酸酯连接、硫代膦酰基乙酸酯连接和非锁核酸修饰(ULNA)。
- [0592] C19.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含一个或多个2'-0-甲基A-2'-0-甲基U碱基对。
- [0593] C20.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述修饰的一个或多个是改变特异性的修饰。
- [0594] C21.实施方案C20的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰位于指导序列中。
- [0595] C22.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其中所述改变特异性的修饰包含2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、2-氨基腺嘌呤、2'-0-甲基、2'-氟、LNA、硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、硼烷磷酸酯连接、膦酰基乙酸酯连接、硫代膦酰基乙酸酯连接、ULNA、2'-脱氧基、5-甲基尿苷、5-甲基胞苷,或其组合。
- [0596] C23.前述实施方案任一项的合成的指导RNA,其包含荧光染料或标记。
- [0597] C24.实施方案C23的合成的指导RNA,其中所述荧光染料或标记结合至合成的指导RNA的茎-环。
- [0598] C25.一种用于基因组编辑以修饰DNA序列、或调控目的基因表达、或切割靶多核苷酸的方法,包括:使所述DNA序列、目的基因、或靶多核苷酸与CRISPR相关蛋白和前述实施方案任一项的合成的指导RNA接触,并编辑、调控或切割所述DNA序列、目的基因或靶多核苷酸。
- [0599] C26.实施方案C25的方法,其中所述方法在体外进行,且所述合成的指导RNA在整个指导序列中包含15或更多个2'-0-甲基修饰。

[0600] C27. 一种RNA分子的集合或文库,其包含两种或更多种前述实施方案任一项的合成的指导RNA。

[0601] C28. 一种试剂盒,其包含前述实施方案任一项的合成的指导RNA。

[0602] C29. 一种RNA分子的阵列,其包含两种或更多种前述实施方案任一项的合成的指导RNA。

[0603] 前述对例示性或优选的实施方案的描述应当被认为是说明而非限制本发明,其由权利要求所限定。如容易理解的,在不脱离如权利要求所述的本发明的情况下,上述特征的许多变化和组合是可以利用的。这些变化不被认为是偏离本发明的范围,并且所有这些变化都意图包括在所附权利要求的范围内。本文引用的所有参考文献通过提述以其整体并入。

<110> 安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies, Inc.)

<120> 具有化学修饰的指导 RNA

<130> 20150013-12

<160> 123

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1368

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌

<400> 1

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

[0001] Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180 185 190  
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala  
195 200 205  
Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn  
210 215 220  
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn  
225 230 235 240  
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe  
245 250 255  
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp  
260 265 270  
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp  
275 280 285  
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp  
290 295 300  
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser  
305 310 315 320  
[0002] Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys  
325 330 335  
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe  
340 345 350  
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser  
355 360 365  
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp  
370 375 380  
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg  
385 390 395 400  
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu  
405 410 415  
Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe  
420 425 430  
Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile  
435 440 445  
Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp

450 455 460  
Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu  
465 470 475 480  
Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr  
485 490 495  
Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser  
500 505 510  
Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys  
515 520 525  
Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln  
530 535 540  
Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr  
545 550 555 560  
Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp  
565 570 575  
Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly  
580 585 590  
[0003] Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
595 600 605  
Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
610 615 620  
Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala  
625 630 635 640  
His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr  
645 650 655  
Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp  
660 665 670  
Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe  
675 680 685  
Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe  
690 695 700  
Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu  
705 710 715 720  
His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly

725 730 735  
Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly  
740 745 750  
Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln  
755 760 765  
Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile  
770 775 780  
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro  
785 790 795 800  
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
805 810 815  
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg  
820 825 830  
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys  
835 840 845  
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg  
850 855 860  
[0004] Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys  
865 870 875 880  
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys  
885 890 895  
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp  
900 905 910  
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr  
915 920 925  
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp  
930 935 940  
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser  
945 950 955 960  
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
965 970 975  
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val  
980 985 990  
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe

995 1000 1005  
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala  
1010 1015 1020  
Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe  
1025 1030 1035  
Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala  
1040 1045 1050  
Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu  
1055 1060 1065  
Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val  
1070 1075 1080  
Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
1085 1090 1095  
Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys  
1100 1105 1110  
Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro  
1115 1120 1125  
[0005] Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val  
1130 1135 1140  
Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys  
1145 1150 1155  
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser  
1160 1165 1170  
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys  
1175 1180 1185  
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu  
1190 1195 1200  
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
1205 1210 1215  
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
1220 1225 1230  
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
1235 1240 1245  
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys

1250 1255 1260  
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
1265 1270 1275  
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala  
1280 1285 1290  
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
1295 1300 1305  
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
1310 1315 1320  
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
1325 1330 1335  
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr  
1340 1345 1350  
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
1355 1360 1365  
<210> 2  
<211> 7  
[0006] <212> PRT  
<213> 猿猴病毒 40  
<400> 2  
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5  
<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 猿猴病毒 40  
<400> 3  
Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val  
1 5  
<210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 合成的构建体

<400> 4

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<220>

<221> misc\_feature

<223> tat 蛋白

<400> 5

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Lys Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Val

20

[0007] <210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> misc\_feature

<223> 中等 S 蛋白, 部分

<400> 6

Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Pro Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Val

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 7

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

1 5 10 15

Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 8

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Arg Lys Val

20 25

[0008] <210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 9

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 10

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 10  
agaatttaac tgggtcaca ttgccttat cgactggctt catctcacag ctcatctac 60  
gcaagttcga tggatgtcc agtcacttc aatttggttg aatgttccc tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggttgaat tcctcaaggg tggatgataga tgctacggtg 180  
gtgatgcgca tgcgttcgt cctcatctcc ctcaagcagg ccccgctgg gggtcggagt 240  
ccctagtgaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgttaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390  
<210> 11  
<211> 390  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 11  
agaatttaac tgggtcaca ttgccttat cgactggctt catctcacag ctcatctac 60  
gcaagttcga tggatgtcc agtcacttc aatttggttg aatgttccc tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggttgaat tcctcaaggg tggatgataga tgctacggtg 180  
gtgatgcgta tgcgttcgt cctcaactcc ctcaagcagg cgaccctgg gggtcggagt 240  
ccctagtgaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
ggtcgttaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggat 360  
agactgacgg agagctcgcc attagtctga 390  
<210> 12  
<211> 390  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 12  
agaatttaac tgggtcaca ttgccttat cgactggctt catctcacag ctcatctac 60  
gcaagttcga tggatgtcc agtcacttc aatttggttg aatgttccc tgacatgcga 120  
gttctgtcga ccatgtgccg cggttgaat tcctcaaggg tggatgataga tgctacggtg 180  
gtgatgcaat aaatttcagc cctcatctcc ctcaagcagg ggttacttta gggtcggagt 240  
ccctagtgaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300

ggtcgtaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggat 360  
 agactgacgg agagctgcc attagtctga 390  
 <210> 13  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
 <400> 13  
  
 agaatttaac tgggtcaca ttgccttat cgactggctt catctcacag ctcatctac 60  
 gcaagttcga tgagtatgcc agtcacttc aatttggttg aatgttcccg tgacatgcga 120  
 gttctgtcga ccatgtgccg cggttgaat tcctcaaggg tggtgataga tgctacggtg 180  
 gtgatgtctt ccagccact cctcatcccc ctcaagccgg tcccaaggctg gggtcggagt 240  
 ccctagtgaa gccaccaata tagtggtcgt gtcaagcaac tgtccacgct ccaccctcga 300  
 ggtcgtaaca taaacgtact aaggcacgag taaacaagat cgatagcaag aacatggat 360  
 agactgacgg agagctgcc attagtctga 390  
 <210> 14  
 [0010] <211> 2838  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
 <400> 14  
  
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
 cacggaaatg ttgaatactc atactttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtctt catgagcgga tacatatttgc aatgtattta gaaaaataaaa caaatagggg 180  
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac cttaatttgc agcgttaata ttttgtaaa 240  
 attcgcgtta aattttgtt aatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgccaa 300  
 aatcccttat aatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgggttc cagttggaa 360  
 caagagtcacatca ctatcaaaa acgtggactc caacgtcaaa gggcaaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgtt aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggggt cgaggtgccg 480  
 taaaggacta aatcggaacc ctaaaggag ccccccgtt agagcttgc gggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaaagg aagggaagaa agcgaaagga gccccgccta gggcgctggc 600  
 aagtgtacgc gtcacgctgc gctgtaccac cacaccgcg cgcgttaatgcg 660



tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtagta ctcaaccaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gccggcgaccg agttgctt gcccggcgta aatacggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838  
 <210> 15  
 <211> 2838  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
 <400> 15  
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
 cacggaaaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtct catgagcgga tacatatttgc aatgtattta gaaaaataaaa caaatagggg 180  
 ttcccgccac atttccccga aaagtgccac ctaaattgtt agcgtaata ttttgtaaa 240  
 attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
 aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgtc cagttggaa 360  
 [0012] caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtaaaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg 480  
 taaagacta aatcggaaacc ctaaaggaggccccgattt agagttgac gggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa agcgaagga gccccggctt gggcgctggc 600  
 aagttagcgcgtc acgtggactc cacaccggcc gcgcttaatg cgccgttaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcaactgttgg gaagggcgat cggtgccggc 720  
 ctctcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 780  
 aacgccagggtttccactt caccgttgc taaaacgacg gccagtggac gcgcttata 840  
 cgactcaacta tagggcgaat tgggtacgtt cgtgcggcc tcgcaggca aagaggctc 900  
 ctgtatgcac tcagtcctca actccctcaa gcaggcgacc ctgggtgcac tgacaaaccg 960  
 ctccctgcgc tgatatgcag ctccagctt tggcgaaagg tggcgatgtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggcata gctgtttctt gtgtgaaatt gttatccgtt cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaaatg agttagctaa 1140  
 ctacattaa ttgcgttgcc ctactgccc gcttccactt cggggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgttcc 1260  
 gcttcctgc tcactgactc gctgcgttcg gtcgttccg tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggttaatcgtt gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg ttcccccgt gaagtcctt cgtgcgtct 1560  
cctgttccga ccctgcccgt tacccggatac ctgtccgcct ttcccccgtt gggaaagcgtg 1620  
ggcgtttctc atagctcacg ctgttaggtat ctccggatcg tgtaggtcgt tcgctccaag 1680  
ctgggtgtg tgcaacaacc ccccggttcag cccgaccgct ggcgttatac cggttaactat 1740  
cgctttgagt ccaacccggta aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
aggatttagca gagcgaggta tgtagggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcttaac 1860  
tacggctaca cttagaaggac agtatttggc atctgcgttc tgctgaagcc agttacccctc 1920  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgtggtagt cgggggtttt 1980  
tttgttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaaggat ttgggtcatg 2100  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttaacc aatgcataat cagtggggca 2220  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcggttag 2280  
ataactacga tacggggaggc ttaccatct ggccccatgt ctgcaatgtat accgcgagac 2340  
ccacgcgtcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcata ttaattgttg ccggaaagct 2460  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgtcaacgttg ttgcatttgc tacaggatc 2520  
gtgggtgtcac gtcgtcggtt tggtatggct tcattcagct ccgggtccca acgtcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gtccttcgg tccctcgatc 2640  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
tcttctactg tcatgcccattc cgtaagatgc ttctgtga ctgggtgatc ctcaaccaag 2760  
tcattctgag aatagtgtat gccccggaccg agttgcgtt gcccggcgatc aatacgggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838

<210> 16

<211> 2838

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

E4007

gcgtttctgg gtgagcaaaa a

cacggaaat

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtatTTT gaaaaataaa caaatagggg 180

[0014]

ttccgcgcac attccccga aaagtgccac ctaaattgtt agcgtaata ttttgtaaa 240  
 attcggtta aatttttgtt aaatcagctc atttttttaac caataggccg aaatcgccaa 300  
 aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagttggaa 360  
 caagagtcga ctatcaaaga acgtggacit caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccg 480  
 taaaggacta aatcggaacc ctaaaggagccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa agcgaaagga gcccgcgcta gggcgctggc 600  
 aagtgttagcg gtcacgctgc gcttaaccac cacacccgccc ggcgttaatg cgccgctaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcaactgttgg gaagggcgat cggtcgccc 720  
 ctctcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
 aacgccagggtttcccaactgacgttgg taaaacgacg gccagtggc ggcgttaata 840  
 cgactcaacta tagggcgaat tgggtacgt cgatcgccc tcaggagagg gagccatgct 900  
 catctccagc ccactctca tccccctcaa gccggtccc ggctgagagg ctaaagctt 960  
 tcttgcgcg tgatatgcag ctccagctt tggccctt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggcata gctgttccctt ggtgaaatt gtatccgt cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagccctggg gtgcctaattt agtgagctaa 1140  
 ctacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gcttcccaactt cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgcttattgg ggcgtttcc 1260  
 gcttcctcgc tcactgactc gctgcgttcg gtcgttgcg tggcgccgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 ttagccaaagg gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg ccgcgttgc ggcgttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccttg gaagctccct cgtgcgcct 1560  
 cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaaagcggt 1620  
 ggcgtttccctc atagctcacg ctgttaggtt ctcaaggccgg tggcttgcgt tgcgtccaa 1680  
 ctgggcgttg tgcacgaacc ccccggttcg cccgaccgct ggcccttac cggtaactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccggtaaagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcgaggta tggtaggggtt gtcacagat tcttgaagtgtt gttggcttaac 1860  
 tacggctaca ctggatggac agtattttgtt atctgcgttc tgctgaagcc agttaccc 1920  
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgtatccggc aaacaaacca ccgcgttgc ggtgggttt 1980  
 ttgtttgcgtt agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcccttgcac 2040  
 ttgttgcgtt ggtctgcgtc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaaggat ttgttgcgtt 2100  
 agattatcaa aaaggatctt caccttagatc ttttaaatt aaaaatgttggaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgtatc aacttggtctt gacagttacc aatgtttatc cgttggggca 2220

cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
 ataactacga tacgggaggg ctaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340  
 ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggtc ctgcaactt atccgcctcc atccagtc ttaatttttgc 2460  
 agagtaagta gttcgccagt taatgttttgc 2520  
 gtgggtcac gtcgtcggt tggtatggct tcattcagct ccgggttccca acgtacaagg 2580  
 cgagttacat gatccccat gttgtgaaa aaagcggtt gtccttcgg tcctccgatc 2640  
 gttgtcagaa gtaagtggc cgcaatgttta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtagtca accaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gcccggaccg agttgctt gcccggcgtc aatacggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 2995

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

[0015]

&lt;400&gt; 17

gccgggcaag agcaactcgg tcgcccata cactatttctc agaatgactt ggttgagtac 60  
 tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcacatgacag taagagaatt atgcagtgtct 120  
 gcccataacca ttagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacatg cggaggaccg 180  
 aaggagctaa ccgccttttgc acacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcggtgg 240  
 gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacatg gcctgttagca 300  
 atggcaacaa cgttgcgcaaa actattaaact ggcgaactac ttactctagc ttccggcaaa 360  
 caattaaatg actggatgga ggcggataaa gttcaggac cacttctgcg ctggccctt 420  
 ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggatc 480  
 attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcg tagttatcta cacgacgggg 540  
 agtcaggcaaa ctatggatgaa acgaaataga cagatcgatg agatagggtc ctactgatt 600  
 aagcattggtaactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 660  
 catttttaat tttaaaaggat ctaggtgaag atccttttgc ataatctcat gaccaaaatc 720  
 ccttaacgtg agtttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 780  
 tcttgcgtatc cttttttct ggcgtatc tgctgcgttc aaacaaaaaa accaccgtca 840  
 ccagcgggtgg ttgtttgccc ggtcaagag ctaccaactt ttttccgaa ggtactggc 900  
 ttccagcagag cgcagataacc aaatactgtt ctcttagtgc agccgtatgtt aggccaccac 960



<210> 18  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 18  
gctttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcggc tacatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac attccccga aaagtgcac ctaaattgtt agcgttaata ttttgtaaa 240  
attcgcgtt aatttttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgcaa 300  
aatccctat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagttggaa 360  
caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa ggggaaaaa ccgtctatca 420  
ggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccc 480  
taaaggacta aatcggaacc ctaaaggaggccccgattt agagcttgac gggaaagcc 540  
ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gggggcgcta gggcgctggc 600  
[0017] aagtgtacgc gtcacgctgc gcttaaccac cacacccgccc gcttaatg cgccgtaca 660  
ggcgcggtcc cattgcccatttcgtcgcaactgttgg gaagggcgat cggcgccggc 720  
ctctcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt 780  
aacgccagggtttccactt caccgttgcgtaaaacgacg gccagtggcgcgctata 840  
cgactacta tagggcgaat tgggtacat cgtgcggcc tcaagagctt cactgagtag 900  
gattaagata ttgcagatgt agtgtttcca cagggtggtt cttcgttgca ccagcgaaac 960  
ctgctgcgcg tgatatgcag ctccagctt tgggtttttt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
ttggcgtaat catggcata gctgtttctt gtgtgaaatt gttatccgtt cacaattcca 1080  
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattt agtgagctaa 1140  
ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gcttccagt cgggaaacct gtcgtgcccag 1200  
ctgcattaaat gaatcgccca acgcgggggg agaggcggtt tgcgttggg ggcgttcc 1260  
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgttcg gtcgttggc tgcggcgagc ggtatcgtt 1320  
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcaggggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
tgagcaaaagg gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtcgagtttggcga 1500  
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccctgtt gaaatccctt cgtgcgtct 1560  
cctgttccga ccctgcgtt taccggatac ctgtccgtt ttctcccttc ggaaagcgtg 1620

gcgcgtttc atagctc acg ctgtaggat ctcagg tcgttgcgt tcgctccaag 1680  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgltcag cccgaccgct gcgccttac cggttaactat 1740  
cgcttgcgtt ccaacccggta aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
aggatttagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaac 1860  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggat atctgcgtc tgctgaagcc agttaccc 1920  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggttt 1980  
tttgcac agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2040  
tttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaaactcac gttaaaggat ttggcatg 2100  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaattt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
atctaaagta tatatgtatc aacttggctc gacagttacc aatgcctaat cagtgaggca 2220  
ccatctcag cgatctgtctt atttcggtca tccatagtgc cctgactccc cgtcgtag 2280  
ataactacga tacgggaggg ctaccatct ggccccagtg ctgcaatgtat accgcgagac 2340  
ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaactttt atccgcctcc atccagtctt ttaatgttg ccggaaagct 2460  
agagtaagta gttcgccagt taatgttg cgcaacgttg ttgcattgc tacaggatc 2520  
gtgggtgtcac gctcgcttggat tcatttcgtt ccgggtccca acgtcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggtta gctccctcgg tccctcgatc 2640  
gttgtcagaa gtaagtggc cgcaacgttg ttgcattgc tacaggatc actgcataat 2700  
tctttactgt tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtgatc ctcaaccaag 2760  
tcattctgatc aatgtgtat gccccggccg agttgcgtt gccccggccgc aatacggat 2820  
aataccggcgc cacatagc 2838

[0018]

<210> 19  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 19

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga 60  
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtathta gaaaaataaa caaatagggg 180  
ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctaaattgtta agcgttaata ttttgttaaa 240  
attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aatcggcaa 300  
aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgc cagttggaa 360

[0019]

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgt aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggt cgaggtgcgc 480  
 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagctgac ggggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctgc 600  
 aagtgtacgc gtcacgctgc gcttaaccac cacacccgccc gcgttaatgc gcccgtaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgctg caactgttgg gaagggcgat cggtcgccc 720  
 ctctcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
 aacgccaggg tttcccaagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtggc gcgcgtata 840  
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgt cgatgcggcc tctctgaata gagttggaa 900  
 gagatgcata caacatatgt agtatttcca cagggaaatac aatggacaaa tgacctcaag 960  
 agcaggcgcg tgatatgcag ctccagctt tggccctt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgt cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaaggctggg gtgcctaatt agtgagctaa 1140  
 ctcacattaa ttgcgttgcc ctcactgccc gcttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgctgtattgg gcgtcttcc 1260  
 gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcg gtcgtccgc tgccggcggc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtaaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 ttagcaaaaag gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg cccggttgct ggcgttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccctg gaagctccct cgtgcgtct 1560  
 cctgttccga ccctgcgtt tacggatac ctgttccgtt ttctccctt gggaaaggcg 1620  
 gcgcgttttc atagctcacg ctgttaggtat ctgcgttcgg ttttaggtcg tgcgtccaaag 1680  
 ctggcgctgtg tgcacgaacc ccccggttccgc cccgaccgct gcgccttatac cggtactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccggta aagacacgac ttatcgccac tggcagcggc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcgaggta ttttaggggt gctacagatgt ttttgaagtgc gtggcctaacc 1860  
 tacggctaca cttagaaggac agtatttggt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccc 1920  
 gaaaaaagag ttggtagctc ttgtatccggc aaacaaacca ccgtggtagt cggtggttt 1980  
 ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcccttgatc 2040  
 ttttctacgg ggtctgcgtc tcagtggaaac gaaaactcac gttttagggat ttgttgcgt 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagtacc aatgttaat cagtggggca 2220  
 cctatctcgatcgatcgatcttgcgtca tccatagttt cctgcgtcc cgtcggttag 2280  
 ataactacgta tacggggaggc ttaccatct ggccccagtg ctgcaatgtat acccgagac 2340  
 ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaaag ggccgagcgc 2400



[0021]

ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gcttccagt cggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgctgtattgg gcgcgtttcc 1260  
 gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcgc gtcgtccgc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 ttagcaaaag gccagcaaaa ggcagggAAC cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttcccccgtt gaagctccct cgtgcgtct 1560  
 cctgttccga ccctgcgcgtt accggatac ctgtccgcgtt ttcccccgtt gggaaagcgtg 1620  
 ggcgtttctc atagctcacg ctgttaggtat ctgcgttgcg tgtaggtcgt tgcgtccaaag 1680  
 ctgggcgtgt tgcacgaacc ccccggttccag cccgaccgct gcgccttatac cggttaactat 1740  
 cgtcttgagt ccaacccggtaa aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcgaggta tgtagggcggtt gctacagagt tcttgaagtgtt gtggcctaacc 1860  
 tacggctaca cttagaaggac agtatttggat atctgcgtc tgctgaagcc agttaccc 1920  
 gaaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtagt cgggttttt 1980  
 ttgttttgcgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcccttgatc 2040  
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaaaggat ttgttgcattg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ttttaaattt aaaaaatgaag tttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggtctt gacagttacc aatgtttatc cagtggggca 2220  
 cctatctcag cgatctgtctt attcgttca tccatagttt cctgactccc cgtcggttag 2280  
 ataactacga tacgggagggtt accatctt ggccccagtg ctgcaatgtt accgcgagac 2340  
 ccacgcgtcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggtc ctgcaactttt atccgcctcc atccagtcta ttaattttggccggaaagct 2460  
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttgcgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
 gtgggtcac gtcgtcggtt tggtatggct tcattcagctt ccgggtccca acgtcaagg 2580  
 cgagttacat gatccccat gttgtcggaa aaagcggtaa gtccttggccatccatc 2640  
 gttgtcggaa gtaagtggc cgcgtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttctgtgttgc ctgggttagta ctcaaccaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gcccggacccg agttgcctt gcccggcgctc aatacgggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838  
 <210> 21  
 <211> 2838  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> 合成的构建体

<400> 21

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
 cacggaaatg ttgaatactc atactctcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtct catgagcgg a tacatattg aatgtattt gaaaaataaa caaatagggg 180  
 ttccgcgcac attccccga aaagtgccac ctaaattgt a agcgttaata ttttgtaaa 240  
 attcgcgtta aattttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgca 300  
 aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc cagttggaa 360  
 caagagtcca ctatcaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgt aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggt cgaggtgccg 480  
 taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac gggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaagga gggggcgcta gggcgctggc 600  
 aagtgtagcg gtcacgctgc gcttaaccac cacacccgccc gegcttaatg cgccgctaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgctg caactgttg gaagggcgat cggtgccggc 720  
 ctcttcgcta ttacgccc tggcgaaagg gggatgtct gcaaggcgat taagttgggt 780  
 aacgccaggg tttcccaagt cacgacgtt gaaaaacgacg gccagtgagc ggcgtataa 840  
 cgactcacta tagggcgaat tgggtacgt cgatgcggcc tcccttac tgcagccgaa 900  
 gtccggccctc aggatgttgcgat gatgaaaaa gttgggtggc cggcgtcgat gggccgctgg 960  
 ctgcggcgcg tggatgtcag ctccagctt tggccctt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggcata gctgttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa 1140  
 ctcacattaa ttgcgttgccg ctcactgccc gtttcccaatg cgggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgtctcc 1260  
 gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440  
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccctgtt gaagctccct cgtgcgtct 1560  
 cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttcccttc gggaaagcggt 1620  
 ggcgtttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcg ttttaggtgt tgcgtccaa 1680  
 ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggttag cccgaccgct ggcgttccatc cggtactat 1740  
 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcggccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcggaggta ttttaggggtt gctacaggt tcttgaagtg tggccataac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatttggta atctgcgtcc tgcgtgaagcc agtaccc 1920

[0022]

ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggttt 1980  
 ttgttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcagaaga tccttgatc 2040  
 tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaaggat ttggcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagtacc aatgcttaat cagtgaggca 2220  
 cctatctcg cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctgttag 2280  
 ataactacga tacgggaggg cttaaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 2340  
 ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggc ctgcaactt atccgcctcc atccagtc ttaattgttg ccggaaagct 2460  
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 2520  
 gtgggtcac gtcgtcggt tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 2580  
 cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggta gtccttcgg tcctccgatc 2640  
 gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctttactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtagta ctcaaccaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gccccgaccg agttgcttt gccccggcgc aatacggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838

&lt;210&gt; 22

[0023] &lt;211&gt; 2838

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;400&gt; 22

gcgttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcga 60  
 cacggaaatg ttgaataactc atactttcc ttttcaata ttattgaagc atttacagg 120  
 gttattgtct catgagcgga tacatatttgc aatgtattta gaaaaataaaa caaatagggg 180  
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctaaattgtt agcgttaata ttttgtaaa 240  
 attcgcgtta aattttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgccaa 300  
 aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgtc cagttggaa 360  
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccc 480  
 taaaggacta aatcggaacc ctaaaggagc ccccccattt agagcttgac ggggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gccccgccta gggcgctggc 600  
 aagtgtacgc gtcacgctgc gcttaaccac cacacccgccc gcttaatgc cgccgctaca 660

[0024]

gggcgcgtcc cattcggccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcggc 720  
ctcttcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
aacgccaggg ttttcccaagt cacgacgttg taaaacgcg gccagtgagc gcgcgtataa 840  
cgactcacta tagggcgaat tgggtacgat cgatgcggcc tgcgtccccc gccggccgaa 900  
ctcgccgcgc aggatgttgt cgatgaagaa gttggtgatg cggtgccggt gctggtggtt 960  
gcccggcgcg tgatatgcag ctccagctt tggccctt agtgagggtt aattgcgcgc 1020  
ttggcgtaat catggcata gctgtttccct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1080  
cacaacatac gagccggaag cataaaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg agtgagctaa 1140  
ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgcgc gctttcccaagt cggaaacct gtcgtgcgcag 1200  
ctgcattaaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgtctcc 1260  
gcttccctcgc tcactgacac gctgcgcctcg gtcgttcggc tgccggcgc ggtatcagct 1320  
cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1440  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggcga 1500  
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg ttcccccctg gaagctccct cgtgcgcct 1560  
cctgttccga ccctgcccgtt taccggatac ctgtccgcctt ttcctccctc gggaaagcggt 1620  
gcccgttccctc atagctcacg ctgttaggtat ctcaaggctgg tgtaggtcg tgcgtccaaag 1680  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggttag cccgaccgct ggccttatac cggttaactat 1740  
cgcttgcgttccctc aagacacgc ttatcgccac tggcagcgc cactggtaac 1800  
aggattagca gagcgaggta tgtagggcggt gctacagatg tcttgaagtg gtggcctaacc 1860  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgcctc tgctgaagcc agttacccctc 1920  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtgggttt 1980  
tttgcgttgcata agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcccttgcata 2040  
tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaaggat ttggctatg 2100  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
atctaaagta tataatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcctaat cagtgaggca 2220  
ccatctcgttccat cgtatctgtctt attcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcggttag 2280  
ataactacga tacgggagggtt accatctt ggcggccatgt ctgcaatgtat accgcgcgac 2340  
ccacgcgtcac cggctccaga ttatcgtca ataaaccgcg cagccggaaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc ctgcaactttt atccgcctcc atccagtcata ttaattgttg ccggaaagct 2460  
agagtaagta gttcgccagta aatagtttgcgcaacgttg ttgcattgc tacaggcatc 2520  
gtgggtgtcac gctcggttgcgtt tggatggct tcattcagct ccgggtccca acgtcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gtttgcaaa aaagcggtta gctccctggc tccctccgatc 2640  
gttgcgttgcata gtaagtggc cgcgtgtta tcactcatgg ttatggcgc gactgcataat 2700

tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtagta ctcaaccaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gccggcgaccg agttgctt gcccggcgta aatacggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838  
 <210> 23  
 <211> 2838  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
 <400> 23  
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 60  
 cacggaaaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtct catgagcgga tacatatttgc aatgtattta gaaaaataaaa caaatagggg 180  
 ttcccgccac atttccccga aaagtgccac ctaaattgtt agcgtaata ttttgtaaa 240  
 attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcggcaa 300  
 aatcccttat aaatcaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgtc cagttggaa 360  
 [0025] caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtaaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 420  
 gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg 480  
 taaagacta aatcggaaacc ctaaaggagccccgattt agagttgac gggaaagcc 540  
 ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa agcgaagga gccccggctt gggcgctggc 600  
 aagttagcgcgtc acgtggactc cacaccggcc gcgcttaatg cgccgtaca 660  
 gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcaactgttgg gaagggcgat cggtgccggc 720  
 ctctcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 780  
 aacgccagggtttccactt caccgttgc taaaacgacg gccagtggac gcgctata 840  
 cgactcaacta tagggcgaat tgggtacgt cgtgcggcc tcggAACATT ggttaattaaa 900  
 cttaacgcct cagatttgc cgaaggattt aatggggaca ttgtttattt atttcgaat 960  
 gatacgcgcg tggatgtcgc ctccagctt tggcgaaagg gggatgtgct aattgcgcgc 1020  
 ttggcgtaat catggcata gctgtttctt gtgtgaaattt gttatccgt cacaatttca 1080  
 cacaacatac gagccggaaag cattaaagtgt aaagcctggg gtccttaatg agtggactaa 1140  
 ctacattaa ttgcgttgcc ctactgccc gcttccactt cggggaaacct gtcgtgccag 1200  
 ctgcattaaat gaaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgtttcc 1260  
 gcttcctgc tcactgactc gctgcgttcg gtcgtccggc tgcggcgagc ggtatcagct 1320  
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1380  
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaaac cgtaaaaagg cgcgttgct ggcgttttc 1440

[0026]

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1500  
 aacccgacag gactataaag ataccagcg ttccccctg gaagtcctc ctgtgcgtct 1560  
 cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaaagcgtg 1620  
 gcgccttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcg ttaggtcgt tcgctccaag 1680  
 ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggtcag cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat 1740  
 ctgttgcgtt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 1800  
 aggattagca gagcggagta ttagggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 1860  
 tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccc 1920  
 gaaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgcgtggtag cgggggttt 1980  
 ttgttgca agcagcagat tacgcccaga aaaaaaggat ctcaagaaga tccttgatc 2040  
 ttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gtttaaggat ttggcatg 2100  
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca 2160  
 atctaaagta tatatgagta aacttggct gacagtacc aatgttaat cagtggcga 2220  
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 2280  
 ataactacga tacgggaggg ttaccatct ggcccagtg ctgcaatgtat accgcgagac 2340  
 ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 2400  
 agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcata ttaattttg cggggaaagct 2460  
 agagtaagta gttcgccagt taatgtttt cgcaacgttg ttgcattgc tacaggatc 2520  
 gtgggtcac gtcgtcggt tggatggct tcattcagct cccgttccca acgtcaagg 2580  
 cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggta gtccttcgg tcctccgatc 2640  
 gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtttcaactcatgg ttatggcagc actgcataat 2700  
 tctttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttctgtga ctggtagta ctcaaccaag 2760  
 tcattctgag aatagtgtat gccccggaccg agttgcgtt gcccggcgatc aatacgggat 2820  
 aataccgcgc cacatagc 2838

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 2838

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;400&gt; 24

gcgtttcigg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggaa ataagggcga 60  
 cacggaaatg ttgaataactc atactttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 120  
 gttattgtct catgagcgga tacatatttga aatgtatttta gaaaaataaaa caaatagggg 180

[0027]

cctatctcg ccatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtag 2280  
ataactacga tacggggagggtt accatctt ggccccatgt ctgcaatgtt accgcgagac 2340  
ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccgaaag ggccgagcgc 2400  
agaagtggtc tgcacactt atccgcctcc atccagttttaatttttgc cgggaagct 2460  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttgc cacaacgttgc tgcatttc tacaggcatc 2520  
gtgggtcac gtcgtcggtt tggatggct tcattcagtttccaa acgtcaagg 2580  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtt agetccttcgg tccctcgatc 2640  
gttgcagaa gtaagttggc cgcagtgtt tcaactatgg ttagtgcagc actgcataat 2700  
tctttactg tcatgccatc cgtaaagatgc ttttctgttgc ctggtgatgttcaaccaag 2760  
tcattctgag aatagtgtat gcccgcaccc agttgttgc tcccgccgtc aatacggat 2820  
aataccgcgc cacatagc 2838  
<210> 25  
<211> 56  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
[0028] <223> 合成的构建体  
<400> 25  
aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56  
<210> 26  
<211> 86  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 26  
ggAACCAUUC AAAACAGCAU AGCAAGUUUA AAUAAGGCUA GUCCGUUAUC AACUUGUAAA 60  
aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86  
<210> 27  
<211> 56  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 合成的构建体

<400> 27

ugguaaugau ggcucaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 28

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 28

ggaaccuuuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 29

<211> 56

<212> RNA

<213> 人工序列

[0029] <220>

<223> 合成的构建体

<400> 29

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 30

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57)..(57)

<223> u is 5-(3-Aminoallyl)-尿苷-5'-triphosphate, labeled with Cyanine5

<400> 30

ggaaccuuuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 31  
<211> 56  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基  
<222> (53)..(55)  
<400> 31  
ugguaaugau ggcuucaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaaac 56  
<210> 32  
<211> 86  
[0030] <212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基  
<222> (83)..(85)  
<400> 32  
ggaaccuuuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60  
aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86  
<210> 33  
<211> 56  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 2'-O-甲基

<222> (53)..(55)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (53)..(56)

<400> 33

ugguaaugau ggcuucaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

[0031] <210> 34

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (83)..(85)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (83)..(86)

<400> 34

ggaaccuuuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 35

<211> 56

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

[0032] <220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (53)..(55)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (53)..(56)

<400> 35

ugguaaugau ggcucaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 36

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (1)..(4)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (83)..(85)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (83)..(86)

&lt;400&gt; 36

ggaaccauuc aaaacagcau agcaaguuua aauaaggcua guccguuauc aacuuguaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

[0033] &lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (1)..(2)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (55)..(55)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (55)..(56)

&lt;400&gt; 37

uguaaugau ggcuacaaca guuuuagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

&lt;210&gt; 38

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (85)..(85)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

[0034]

<222> (85)..(86)

<400> 38

ggAACCAUUC AAAACAGCAU AGCAAGUUUA AAUAAGGCUA GUCCGUUAUC AACUUGUAAA 60

AGUGGCACCG AGUCGGUGCU UUUUUU 86

<210> 39

<211> 56

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2-硫尿嘧啶核苷酸

<222> (3)..(3)

<400> 39

AGUCCUCAUC UCCCUCAAGC GUUUAAGAGC UAUHGUGUUU UGAAUGGUCC CAAAAC 56

<210> 40

<211> 56

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2-硫尿嘧啶核苷酸

<222> (9)..(9)

<400> 40

aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 41

<211> 56

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0035] <221> 2-硫尿嘧啶核苷酸

<222> (11)..(11)

<400> 41

aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuguuu ugaauggucc caaaac 56

<210> 42

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 42

aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 43

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 43

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 44

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 44

gcagauguag uguuuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 45

<211> 111

[0036] <212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 45

uccucaucuc ccucaagcgu uuaagagcua ugcugguaac agcauagcaa guuuuaauaa 60

gcuaguccg uuaucacuu gaaaaagugg caccgagucg gugcuuuuuu u 111

<210> 46

<211> 110

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 46

ccucaucucc cucaagcguu uaagagcuaau gcugguaaca gcauagcaag uuuuaauaaag 60

gcuaguccg uuaucacuuug gaaaaaguggc accgagucgg ugcuuuuuuuu 110

<210> 47

<211> 114  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 47  
gaguccuau cucccuacaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuaaa 60  
uaaggcuagu cgguaaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114  
<210> 48  
<211> 115  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 48  
ggaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuua 60  
[0037] auaggcuag uccguuaauca acuugaaaaa guggcaccga gucgugcuuu uuuu 115  
<210> 49  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 49  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aauucuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu uuu 113  
<210> 50  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 50

aguccucauc ucccucaagc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaaacuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 51  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 51  
aguccucauc ucccucaagc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaaacuaguu uguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 52  
<211> 111  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
[0038] <223> 合成的构建体  
<400> 52  
ggacuuuuuu uaguccuau cuccucaag cguuuuagag cuagaaauag caaguuaaaa 60  
uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu u 111  
<210> 53  
<211> 116  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<400> 53  
gaugaggacu uuuuuuaguc cuaucuccc ucaagcguuu uagagcuaga aauagcaagu 60  
uaaaaauaagg cuaguccguu aucaacuuga aaaaguggca ccgagucggu gcuuuu 116  
<210> 54  
<211> 111  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 54

gcuuguuuuuu uaguccuau cucccuacaag cguuuuagag cuagaaauag caaguuaaaa 60

uaaggcuagu ccguuaucua cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu u 111

<210> 55

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> a is 5'-dimethoxytrityl-adenosine

<222> (1)..(1)

<400> 55

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaaaau 60

[0039] aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu uuu 113

<210> 56

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 56

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaaaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu uuu 113

<210> 57

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 荧光团

<222> (39)..(39)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他

<400> 57

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 58

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0040] <221> 2'-O-甲基

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 荧光团

<222> (39)..(39)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他

<220>

<221> 2'-O-甲基

<222> (110)..(112)

<400> 58

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 59

<211> 113

<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(4)  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (39)..(39)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (39)..(39)  
[0041] <223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (110)..(112)  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (110)..(113)  
<400> 59  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 60  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(4)  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (39)..(39)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (39)..(39)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (109)..(111)  
<220>  
[0042] <221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (109)..(112)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (110)..(112)  
<400> 60  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggna acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 61  
<211> 102  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(1)

<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(2)  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (2)..(2)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (68)..(68)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (68)..(68)  
[0043] <223> n 为 a, c, g, 或 u  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (100)..(100)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (100)..(100)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (101)..(101)  
<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (101)..(102)  
<400> 61  
ungcagaugu aguguuucca caguuaaga gcuaguaaua gcaaguuaaa auaggcuag 60  
uccguuanca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcun uu 102

<210> 62  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(1)  
<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(2)  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (34)..(34)  
<220>  
[0044] <221> misc\_feature  
<222> (34)..(34)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (74)..(74)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (74)..(74)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他  
<220>  
<221> 荧光团  
<222> (90)..(90)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (90)..(90)  
<223> n 为 a, c, g, 或 u, 未知或其他

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (99)..(99)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (99)..(100)

<400> 62

gcagaauguag uguuuuccaca guuuuaagagc uagnaaauagc aaguuuuaau aaggcuaguc 60

cguuaaucaac uugnaaaagu ggcaccgagn cggugcuuuu 100

<210> 63

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0045] <221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(3)

<400> 63

aguccucauc ucccucaaggc guuuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 64

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<400> 64

aguccucauc ucccucaaggc guuuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 65  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(5)  
<400> 65  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 66  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
[0046] <220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (109)..(113)  
<400> 66  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 67  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (20)..(20)

<400> 67  
aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 68  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (19)..(19)  
<400> 68  
aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 69  
[0047] <211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (18)..(18)  
<400> 69  
aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 70  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (17)..(17)

<400> 70

aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 71

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (17)..(18)

<400> 71

[0048] aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 72

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (110)..(112)

<400> 72

aguccucauc ucccucaagg guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 73  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (110)..(112)  
<400> 73  
gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 74  
[0049] <211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(20)  
<400> 74  
aguccucauc ucccuacaagc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 75  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(26)

<400> 75

aguuccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 76

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(37)

<400> 76

[0050] aguuccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 77

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(7)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (9)..(11)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (13)..(14)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (20)..(20)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (30)..(31)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (33)..(33)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (35)..(36)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (42)..(42)  
<220>  
[0051] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (45)..(45)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (76)..(77)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (80)..(82)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (90)..(90)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (95)..(96)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (100)..(101)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (104)..(104)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (106)..(112)  
<400> 77  
aguccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 78  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
[0052] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(7)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (9)..(11)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (17)..(17)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (27)..(28)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (30)..(30)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (32)..(33)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (36)..(36)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (39)..(39)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (42)..(42)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (44)..(44)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (47)..(47)  
<220>  
[0053] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (57)..(57)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (62)..(63)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (67)..(68)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (73)..(74)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (77)..(78)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (87)..(87)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (90)..(90)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (92)..(93)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (97)..(98)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (101)..(101)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (103)..(109)  
<400> 78  
[0054] aguccucauc ucccucaaggc guuuuaggagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 79  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(7)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (9)..(11)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (17)..(17)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (27)..(28)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (30)..(30)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (32)..(33)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (36)..(36)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (39)..(39)  
<220>  
[0055] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (42)..(42)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (44)..(44)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (47)..(47)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (57)..(57)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (62)..(63)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (67)..(68)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (73)..(74)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (77)..(78)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (87)..(87)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (90)..(90)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (92)..(93)  
<220>  
[0056] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (97)..(98)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (101)..(101)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (103)..(109)  
<400> 79  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 80  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (8)..(8)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (17)..(18)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (21)..(21)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (26)..(26)  
<220>  
[0057] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (28)..(29)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (32)..(32)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (34)..(34)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (37)..(38)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (40)..(41)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (43)..(44)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (46)..(46)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (48)..(49)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (51)..(52)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (58)..(58)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (61)..(64)  
<220>  
[0058] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (67)..(67)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (78)..(79)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (83)..(89)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (91)..(92)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (94)..(94)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (97)..(99)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (102)..(103)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (105)..(105)  
<400> 80  
aguuccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 81  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
[0059] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (8)..(8)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (17)..(18)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (21)..(21)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (26)..(26)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (28)..(29)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (32)..(33)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (35)..(36)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (38)..(39)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (41)..(42)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (46)..(46)  
<220>  
[0060] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (48)..(48)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (51)..(54)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (57)..(57)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (68)..(69)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (73)..(79)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (81)..(82)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (84)..(84)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (87)..(89)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (92)..(93)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (95)..(95)

<400> 81

aguccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaguauuagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 82

[0061] <211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (110)..(112)

<400> 82

gcagauguag uguuuuccaca guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 83

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (6)..(6)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (8)..(8)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (11)..(11)  
<220>  
[0062] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (13)..(17)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (30)..(31)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (33)..(33)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (35)..(36)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (39)..(39)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (42)..(42)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (45)..(45)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (47)..(47)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (50)..(50)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (56)..(56)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (60)..(60)  
<220>  
[0063] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (65)..(66)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (69)..(71)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (76)..(77)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (80)..(82)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (90)..(90)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (93)..(93)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (95)..(96)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (100)..(101)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (104)..(104)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (106)..(112)

<400> 83

gcagaauguag uguuuuccaca guuuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 84

[0064] <211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(5)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (26)..(29)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (32)..(33)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (35)..(36)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (38)..(39)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (41)..(42)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (46)..(46)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (48)..(49)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (52)..(54)  
<220>  
[0065] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (57)..(57)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (68)..(69)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (73)..(79)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (81)..(82)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (84)..(84)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (87)..(89)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (92)..(93)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (95)..(95)

<400> 84

gcagauuguag uguuuuccaca guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 85

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0066] <221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (6)..(6)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (8)..(8)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (11)..(11)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (13)..(17)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (25)..(25)

<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (30)..(31)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (34)..(34)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (37)..(37)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (40)..(40)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (50)..(50)  
<220>  
[0067] <221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (55)..(56)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (59)..(61)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (66)..(67)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (70)..(72)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (80)..(80)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (83)..(83)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (85)..(86)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (90)..(91)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (94)..(94)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (96)..(99)

<400> 85

gcagauguag uguuuuccaca guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 86

[0068] <211> 113

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-脱氧基-核苷酸

<222> (1)..(20)

<400> 86

agtccatc tccctcaagc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaaaau 60

aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 87

<211> 113

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-脱氧基-核苷酸

<222> (1)..(26)

<400> 87

agtccatc tccatcaggc gtttaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 88

<211> 113

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-脱氧基-核苷酸

<222> (1)..(37)

<400> 88

[0069] agtccatc tccatcaggc gtttaagagc tatgctggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 89

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-脱氧基-核苷酸

<222> (15)..(15)

<220>

<221> 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (15)..(16)

<400> 89

gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 90  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(1)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(2)  
<400> 90  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 91  
[0070] <211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(2)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(3)  
<400> 91  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 92  
<211> 113  
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<400> 92

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 93

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

[0071] <220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(5)

<400> 93

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 94

<211> 115

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(5)

<220>

<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(6)

<400> 94

ggaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuua 60

auaaggcuag uccguuauca acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuuu 115

<210> 95

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0072] <221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (109)..(112)

<220>

<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (109)..(113)

<400> 95

aguuccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 96

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (108)..(112)

<220>

<221> 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (108)..(113)

<400> 96

aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 97

<211> 114

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 5'-凸出 (20-nt 指导序列的 5' )

<222> (1)..(1)

<220>

[0073] <221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<400> 97

caguccuau cucccucaag cguuuaagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuua 60

uaaggcuagu ccguuaucac cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 98

<211> 114

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 5'-凸出 (20-nt 指导序列的 5' )

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 脯酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<400> 98

gaguccuau cucccuacaag cguuuuaagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuuaaa 60

uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uuuu 114

<210> 99

<211> 115

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0074] <221> 5'-凸出 (20-nt 指导序列的 5' )

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(5)

<220>

<221> 脯酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(6)

<400> 99

ucaguccuca ucucccucaa gcguuuuaaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuuaa 60

auaaggcuag uccguuaucu acuugaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuuu 115

<210> 100

<211> 115

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5'-凸出 (20-nt 指导序列的 5' )

&lt;222&gt; (1)..(2)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (1)..(5)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (1)..(6)

&lt;400&gt; 100

agaguccuca ucucccucaa gcguuuuaga gcuaugcugg uaacagcaua gcaaguuuaa 60

auaaggcuag uccguuuauca acuugaaaaa guggcacgga gucggugcuu uuuuu 115

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

[0075] &lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 5'-凸出 (20-nt 指导序列的 5' )

&lt;222&gt; (1)..(3)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (1)..(7)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (1)..(8)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 2'-O-甲基核苷酸

&lt;222&gt; (112)..(115)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

&lt;222&gt; (112)..(116)

<400> 101  
cucaguccuc aucuccuca agcguuuaag agcuaugcug guaacagcau agcaaguuua 60  
aauaaggcua guccguuauc aacuugaaaa aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 116  
<210> 102  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (20)..(20)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (20)..(21)  
<400> 102  
[0076] aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 103  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (19)..(20)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (19)..(20)  
<400> 103  
aguccucauc ucccucaagg guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 104  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (18)..(18)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (18)..(19)  
<400> 104  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 105  
[0077] <211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (17)..(17)  
<220>  
<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (17)..(18)  
<400> 105  
aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60  
aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 106  
<211> 113  
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (17)..(18)

<220>

<221> 腺酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (17)..(19)

<400> 106

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 107

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

[0078] <220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (110)..(112)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (110)..(113)

<400> 107

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 108  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(3)  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(4)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (108)..(112)  
<220>  
[0079] <221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (108)..(113)  
<400> 108  
gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113  
<210> 109  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(5)  
<220>  
<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(6)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (108)..(112)

<220>

<221> 硫代磷酸酯核苷酸间连接

<222> (108)..(113)

<400> 109

gcagaauguag uguuuuccaca guuuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 110

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

[0080] <221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (110)..(112)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (110)..(113)

<400> 110

aguccucauc ucccuacaagc guuuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 111

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (112)..(112)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (112)..(113)

<400> 111

[0081] aguccucauc ucccucaaggc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 112

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (72)..(74)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (72)..(75)

<400> 112

aguccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuu 75

<210> 113

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

[0082] <221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (76)..(76)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (76)..(77)

<400> 113

aguccucauc ucccucaaggc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuauc 77

<210> 114

<211> 78

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (77)..(77)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (77)..(78)

<400> 114

gaguccuau cucccuacaag cguuuuagag cuaugcuggu aacagcauag caaguuuaaa 60

uaaggcuagu ccguuauc 78

<210> 115

[0083] <211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (110)..(112)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (110)..(113)

<400> 115

gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 116

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

[0084] <221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (112)..(112)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (112)..(113)

<400> 116

gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 117

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 117

gauguugucg augaaaaagu guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuaaau 60  
aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 118

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2-氨基腺嘌呤

<222> (15)..(15)

<400> 118

gauguugucg augaaaaagu guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 119

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

[0085] <220>

<223> 合成的构建体

<400> 119

gauuuagacg aaggauugaa guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 120

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2-氨基腺嘌呤

<222> (15)..(15)

<400> 120

gauuuagacg aaggauugaa guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 121  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (6)..(6)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (8)..(8)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (11)..(11)  
<220>  
[0086] <221> 5-甲基尿苷  
<222> (13)..(15)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (31)..(31)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (33)..(33)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (36)..(36)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (39)..(39)  
<220>  
<221> 5-甲基尿苷  
<222> (47)..(47)

<220>

<221> 5-甲基尿苷

<222> (81)..(82)

<220>

<221> 5-甲基尿苷

<222> (90)..(90)

<220>

<221> 5-甲基尿苷

<222> (104)..(104)

<220>

<221> 5-甲基尿苷

<222> (107)..(112)

<400> 121

gcagauguag uguuuuccaca guuuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 122

[0087] <211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> Z 碱基

<222> (70)..(71)

<223> Z 碱基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (70)..(71)

<223> n 为 a, c, g, 或 u, 或未知或其他

<400> 122

aguuccucauc ucccuacaagc guuuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuagun nguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 123

<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (1)..(1)  
<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (1)..(2)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基-核苷酸  
<222> (54)..(54)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基-核苷酸  
[0088] <222> (57)..(57)  
<220>  
<221> 2'-O-甲基核苷酸  
<222> (99)..(99)  
<220>  
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接  
<222> (99)..(100)  
<400> 123  
aguccucauc ucccucaaggc guuuuaggc uaguaauagc aaguuuuaau aagguaauc 60  
cguuaucaac aagaaauugu ggcaccgagu cggugcuuuu 100  
<210> 124  
<211> 113  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的构建体  
<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基-核苷酸

<222> (64)..(64)

<220>

<221> 2'-O-甲基-核苷酸

<222> (67)..(67)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (112)..(112)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

[0089] <222> (112)..(113)

<400> 124

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugecuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggguuuauc cguuaucaac aagaaauugu ggcaccgagu cggugcuuuu uuuu 113

<210> 125

<211> 113

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> Z 碱基

<222> (95)..(96)

<223> Z 碱基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (95)..(96)

<223> n 为 a, c, g, 或 u, 或未知或其他

<400> 125

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguuaucac uugaaaaagu ggcannngagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 126

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

[0090] <220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (73)..(73)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (73)..(74)

<400> 126

aguccucauc ucccuacaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguu 74

<210> 127

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (1)..(2)

<220>

<221> 2'-O-甲基核苷酸

[0091] <222> (74)..(74)

<220>

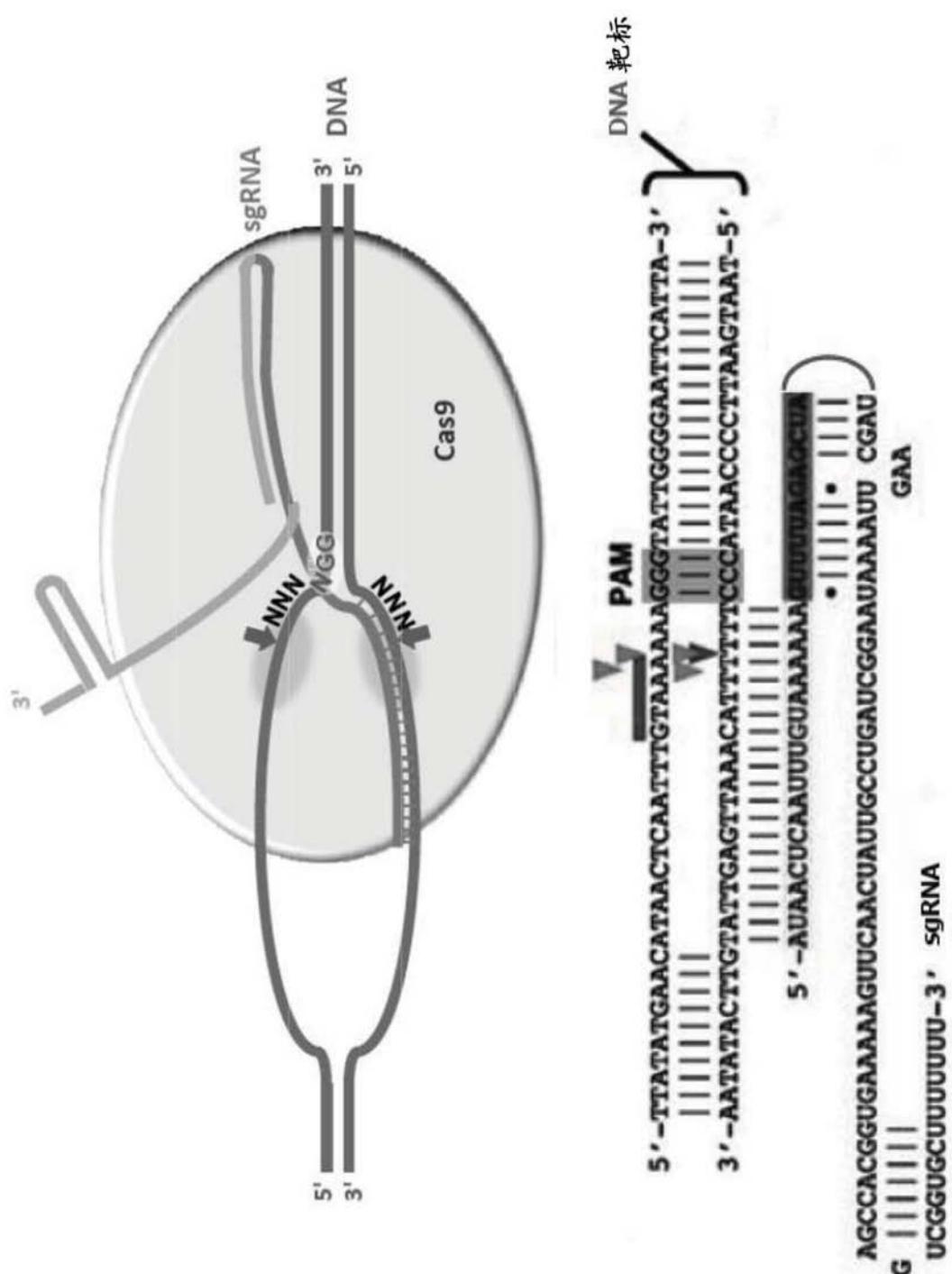
<221> 硫代膦酰基乙酸酯核苷酸间连接

<222> (74)..(75)

<400> 127

aguccucauc ucccucaaggc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuaau 60

aaggcuaguc cguua 75



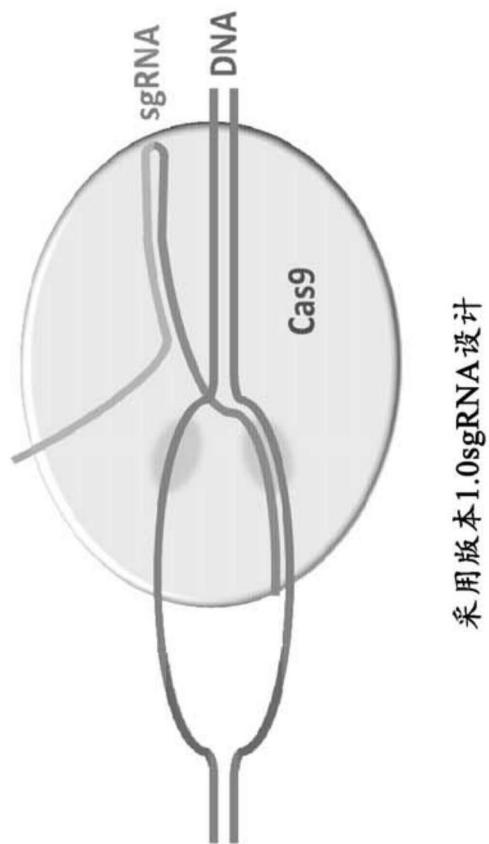


图2A

其中最终浓度		20 $\mu$ L切割 rxn
Rxn体积	20 $\mu$ L	
Cas9蛋白	40 nM (125 ng/20 $\mu$ L rxn)	
指导RNA	50 nM	
#DNA	2.6 nM	
TrisHCl pH 7.6	100 mM	
NaCl	50 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	

图2B

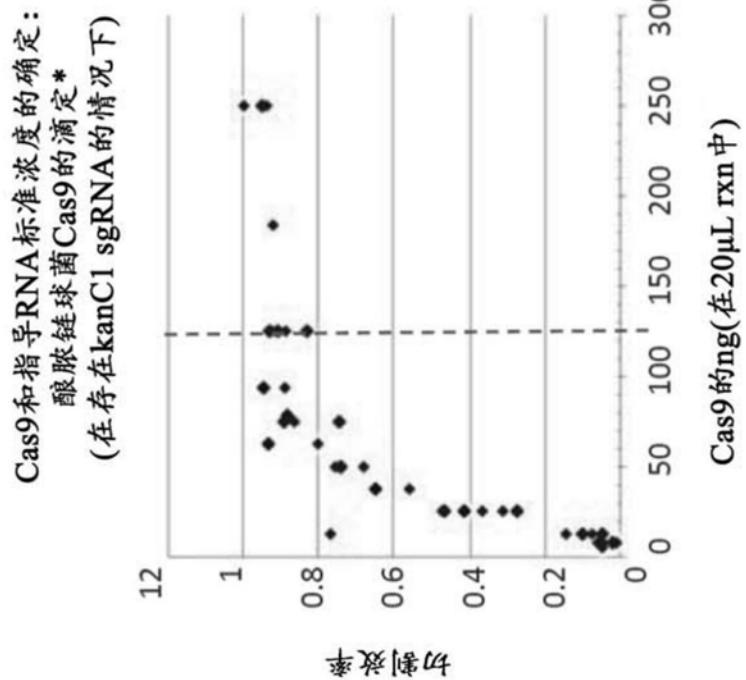


图2C

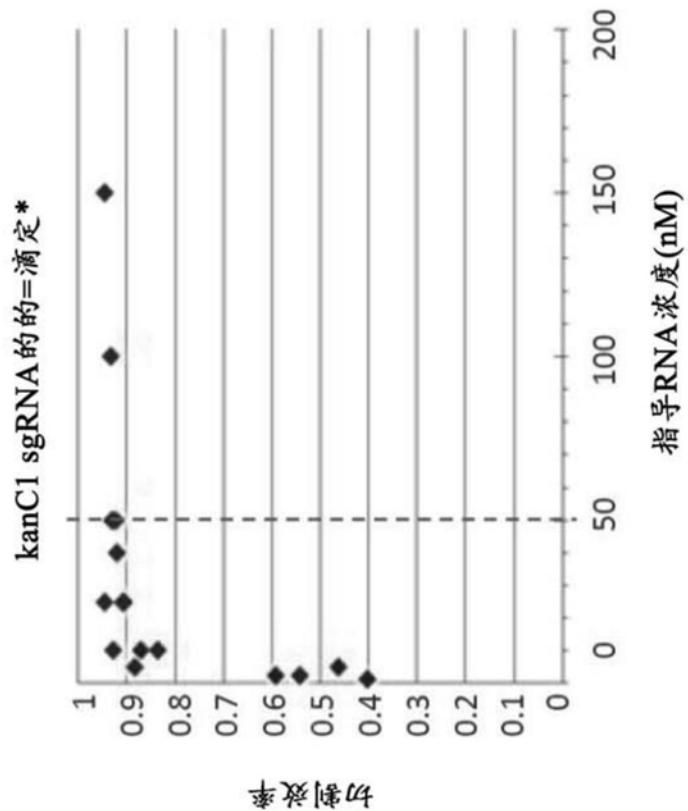


图2D

## 标准切割条件：

如果我们的蛋白制备物中每ng的Cas9都是活性的

⑯

储液	体积 (uL)	浓度	化学计量学
10x 缓冲液	2.0	1x	⑯
125 ng/uL Cas9 wt 蛋白	1.0	40 nM	20
1 uM 指导 RNA	1.0	50 nM	1
25 ng/uL 线性化的 CLTA 靶标	4.0	2.5 nM	
ddH2O (DEPC- 处理的)	12.0		
	20.0		

在预加热的SureCycler中：

- 于37°C温育30分钟
- +RNA酶混合剂，于37°C温育5分钟，然后在70°C温育15分钟
- +蛋白酶K，于37°C温育15分钟

在生物分析仪上分析粗制品

图3

TABLE 1

合成的指导RNA的名称 Cas9容许的化学修饰	长度 (nt)	体外切割靶标的百分比	序列 (5' → 3')
CTA1 (未修饰的对照)	113	95%	AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGCCUUTUAGGCTAUGCUGGUACAGCAUAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAUCA
2xOMePACE_CTA1	113	95%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU A <sup>*</sup> G <sup>+</sup> CCUCAUCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
4xOMePACE_CTA1	113	88%	CAACTGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU A <sup>*</sup> G <sup>+</sup> U <sup>+</sup> C <sup>+</sup> CUCAUCUCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_4xOMePACE	113	91%	AUCAACTGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_5xOMePACE	113	91%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAUAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_2'OMe <sup>+</sup> 20	113	93%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_2'OMe <sup>+</sup> 19	113	93%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_2'OMe <sup>+</sup> 18	113	91%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_2'OMe <sup>+</sup> 17	113	93%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_2'OMe <sup>+</sup> 17,18	113	90%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_20_Deoxy	113	7%	AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_20_2'OMe	113	89%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_37_2'OMe	113	88%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_5'SS	113	96%	AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_5'SSS	113	94%	CAACTGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_5'SSSS	113	100%	AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
CTA1_3'SSSS	113	94%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
3xOMe <sub>β</sub> PACE_CTA1_3xOMeThio	113	89%	ACTUGAAAAAGUGCACCGAGTCGGGCTTTTTU AGUCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
3xOMe <sub>β</sub> PACE_CTA1_3x2'OMe <sub>β</sub> PACE	113	92%	AG <sup>*</sup> S <sup>+</sup> S <sup>+</sup> SCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU
		89%	AG <sup>*</sup> S <sup>+</sup> S <sup>+</sup> SCCTCAUCUCCCCUCAAGGCUAUGCUGGUACAGCAAGUTUAAAAGGCUAGUCGUTAU

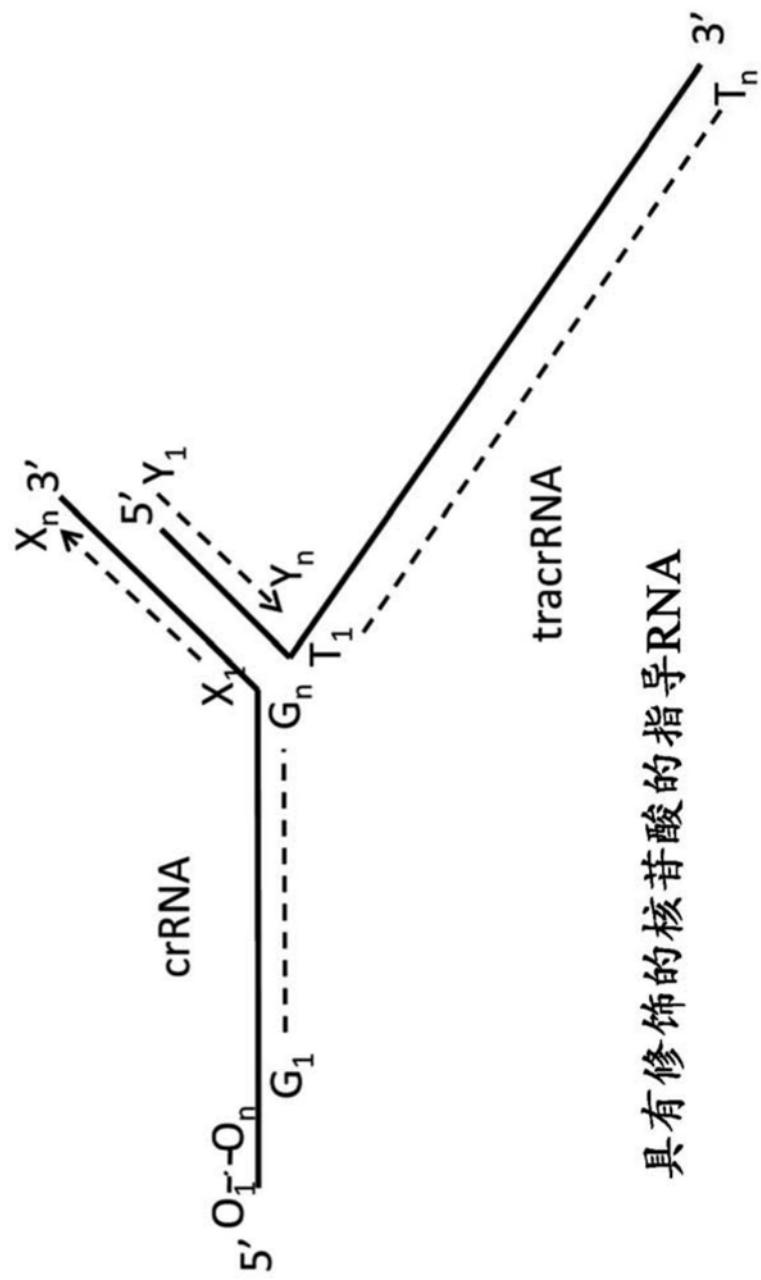
图4

CLTA1_ZZ_70,71	113	19%	AGUCCCAUCUCCCUAAGGCUAGCGUAGGGAAACGCAUAGCAAGUTUAAAUAAGGCAAGGTUAGGUZGGUTAUCA ACTUGAAAAGUTGGCAACGAUCGAGUCCGUTGCUUUUUUU AGUCCCAUCUCCCUAAGGCUAGCGUAGGGAAACGCAUAGCAAGUTUAAAUAAGGCAAGGTUAGGUZGGUTAUCA ACTUGAAAAGUTGGCAACGAUCGAGUCCGUTGCUUUUUUU (dmt)AGUCCCAUCUCCCUAAGGCUAGCGUAGGGAAACGCAUAGCAAGUTUAAAUAAGGCAUAGGUZGGUTAUCA UAUCAACUUGAAAATGGCAACGGCAUCGGCUAGGUZGGUTAUCA
CLTA1_QB3+GNRA_DMT-ON	113	93%	
Cas9不容许的化学修饰			
<hr/>			
CLTA1_37_Deoxy	113	0%	AGUCCCAUCUCCCUAAGGCUAGCGUAGGGAAACGCAUAGCAAGUTUAAAUAAGGCAAGGTUAGGUZGGUTAUCA ACTUGAAAAGUTGGCAACGGCAUCGGCUAGGUZGGUTAUCA

注解

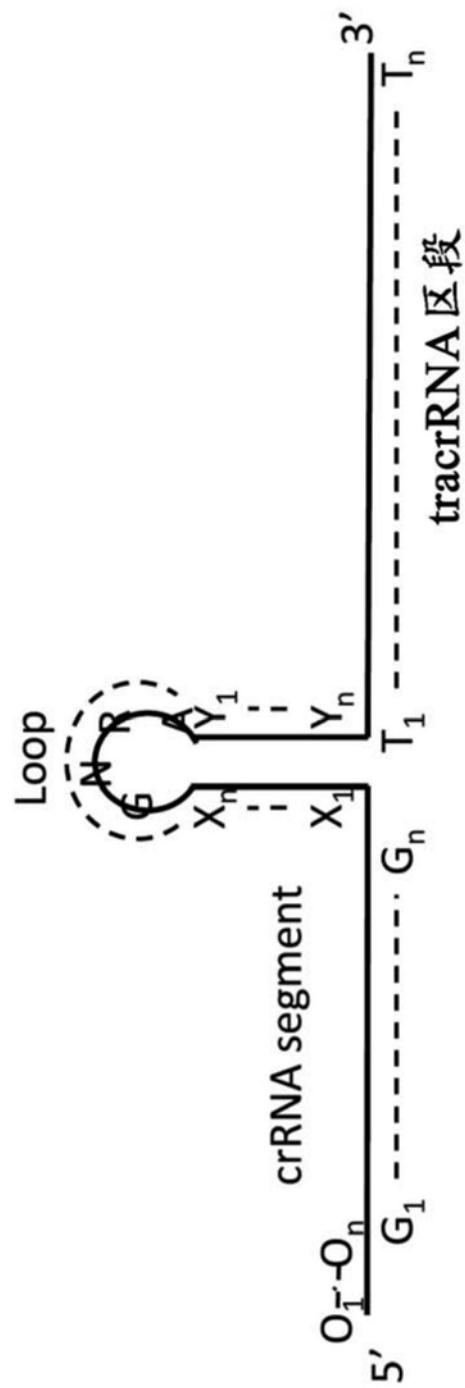
**N\*** = 核苷酰N的2'OMe, 3'PACE修饰**N\* s** = 核苷酰N的2'OMe, 3'de-PACE修饰**N** = 核苷酰N的2'OMe修饰**N** = 2'脱氯核苷酰N**NsN** = 4位注明的烷基酰胺连接**Z** = Z核苷酸**dmt** = 二甲基三苯甲基

图4续



具有修饰的核苷酸的指导RNA

图5A



具有修饰的核苷酸的单一指导RNA

图5B

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43		
1																																													
2																																													
3																																													
4																																													
5																																													
6																																													
7																																													
8																																													
9																																													
10																																													
11																																													
12																																													
13																																													
14																																													
15																																													
16																																													
17																																													
18																																													
19																																													
20																																													
21																																													
22																																													
23																																													
24																																													
25																																													
26																																													
27																																													
28																																													
29																																													
30																																													
31																																													
32																																													
33																																													
34																																													
35																																													
36																																													
37																																													
38																																													
39																																													
40																																													
41																																													
42																																													
43																																													

图6

1. 2'-OMe
2. 2'-H
3. 2'-MOE类似物
4. 2'-氟类似物
5. 2'-氨基类似物
6. 2'-阿拉伯糖类似物
7. 2'-F-阿拉伯糖类似物
8. 2'-LNA类似物
9. 2'-ULNA类似物
10. 4'-硫核糖基模块
11. O-P(S)连接
12. PACE连接
13. 硫代PACE连接
14. 甲基膦酸酯
15. 硼烷膦酸酯
16. 二硫代磷酸酯
17. 2'-硫代(U/C)
18. 4'-硫代嘧啶
19. 6'-硫代鸟嘌呤
20. 2'-氨基腺嘌呤
21. 2'-氨基嘌呤
22. 假尿嘧啶
23. 次黄嘌呤
24. 7-脱氮(A/G)
25. 7-脱氮-8-氨基(A/G)
26. 5-甲基(U/C)
27. 5-差甲基
28. 5-差甲基(U/C)
29. 5-丙块基(U/C)
30. 5-乙块基(U/C)
31. 5-烯丙基(U/C)
32. 5-氨基丙基(U/C)
33. 5-甲基-2-嘧啶
34. Z/P碱基
35. UNA
36. x(A/G/C/T)
37. y(A/G/C/T)
38. Iso(C/G)
39. 无碱基核苷酸
40. PEG
41. 烷间隔基
42. 接头-染料
43. 精胺修饰

单修饰 双修饰	糖	磷连接	碱基修饰*	其他
糖/糖	×	×	×	×
糖/P连接	×	×	×	×
糖/碱基	×	×	×	×
糖/其他	×	×	×	×
P连接/P连接	×	×	×	×
P连接/其他	×	×	×	×
P连接/其他	×	×	×	×
碱基/碱基	×	×	×	×
碱基/其他	×	×	×	×
其他/其他	×	×	×	×

\*碱基修饰包括碱基对修饰

糖修饰 (“糖”): 2'-O-甲基(=2'-OMe)(2'-OC1-C4烷基)、2'-H、2'-MOE(2'-O-C1-C3烷基-O-C1-C3烷基)、2'-F、2'-氨基、2'-阿拉伯糖基、2'-F-阿拉伯糖基、2'-LNA、2'-ULNA、4'-硫核糖基核苷酸  
核苷酸间连接和3'和/或5'末端核苷酸修饰 (“磷连接”或“P连接”): -P(S) (硫代磷酸酯)、-PACE (膦酰基乙酸酯、膦酰基羧酸酯)、-硫代PACE (硫代膦酰基乙酸酯、硫代膦酰基羧酸酯)、-P(CH3) (甲基膦酸酯)、-P(BH3)(硼烷膦酸酯)、-P(S)2 (二硫代磷酸酯)  
碱基修饰: 2-硫尿嘧啶, 2-硫胞嘧啶, 4-硫尿嘧啶, 6-硫鸟嘌呤, 2-氨基腺嘌呤, 2-氨基鸟嘌呤, 2-氨基次黄嘌呤, 7-脱氨基鸟嘌呤, 7-脱氨基-8-氨基鸟嘌呤, 7-脱氨基-8-氨基杂腺嘌呤, 5-甲基胞嘧啶, 5-甲基尿嘧啶, 5-羟甲基胞嘧啶, 5-羟甲基尿嘧啶, 5,6-脱氢尿嘧啶, 5-丙炔基胞嘧啶, 5-丙炔基尿嘧啶, 5-乙炔基胞嘧啶, 5-乙炔基尿嘧啶, 5-烯丙基胞嘧啶, 5-烯丙基尿嘧啶, 5-氨基丙基胞嘧啶和无碱基核苷酸  
碱基对修饰: Z/P核苷酸, UNA, isoG/isoC, 6-硫代G/5-甲基-嘧啶, X(A, G, C, T)和Y(A, G, C, T)  
其他: 末端修饰和/或间隔基/接头 (末端或内部) 修饰: PEG、烃间隔基(包括: 杂原子(O, S, N)取代的烃间隔基; 卤素取代的烃间隔基; 含(酮基, 羰基, 酰氨基, 亚硫酰氨基甲酰基)的烃间隔基), 精胺, 染料接头, 包括6-荧光素-亚磷酰胺等, 方酸缓合物, Diels-Alder缓合物, 或“点击”化学缓合物。

## 用于体外测试的荧光团修饰的CLTA1 sgRNA

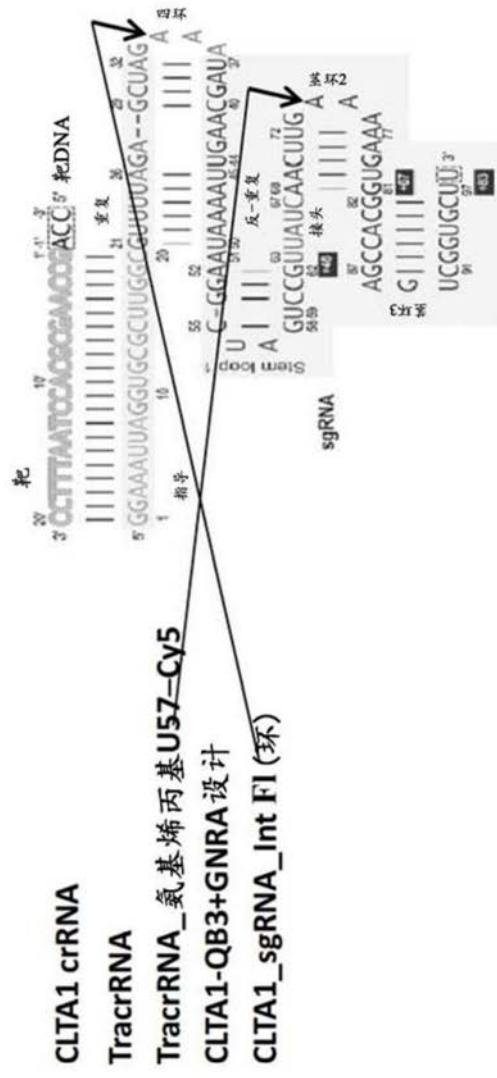
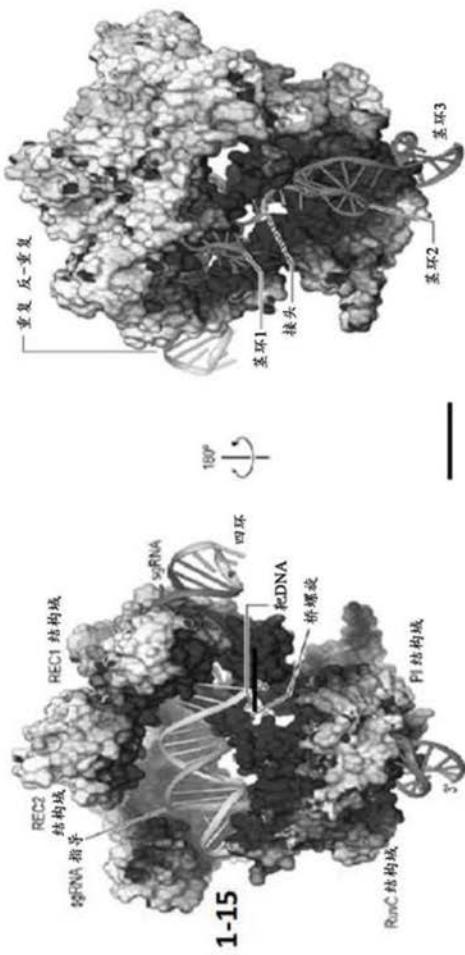


图8A



Cas9复合体的X射线结构：  
Nishimasu等, *Cell* 2014, 156, 1-15

图8B

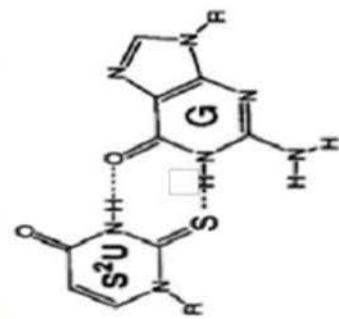
## 用化学修饰以提高特异性

靶标名称	CLTA1 中靶或脱靶位点	基因组坐标	COSMID 得分	MIT 设计得分
CLTA1 ON1	AGTCCTCATCTCCCTCAAGCAGG TCAGGGAGTAGAGGGAGTTCGTCC	Chr9:36211735-36211757	0	100.0
CLTA1 OFF1	AGTCCTCAACTCCCTCAAGCAGG TCAGGGAGTTGAGGGAGTTCGTCC	Chr8:15688928-15688950	0.35	61.1
CLTA1 OFF2	AGCCCTCATTTCCCTCAAGCAGG TCGGGAGATAAGGGAGTTCGTCC	Chr3:54189084-54189106	0.65	6.4
CLTA1 OFF3	ACTCCTCATCCCCCTCAAGCCGG TGAGGGAGTAGGGGGAGTTCGGCC	Chr15:88845439-88845461	0.83	4.5

实例：• CLTA1\_2 硫代U+11 crRNA: 5' AGUCCUCAUC (2sU) CCCUCAAGCGUTUAAGAGCUAUGCUGUTUGA  
AUUUCCCCAAAC 3'

- ## • CLTA1 2硫代U+9

- CLTA1 2硫代U+3

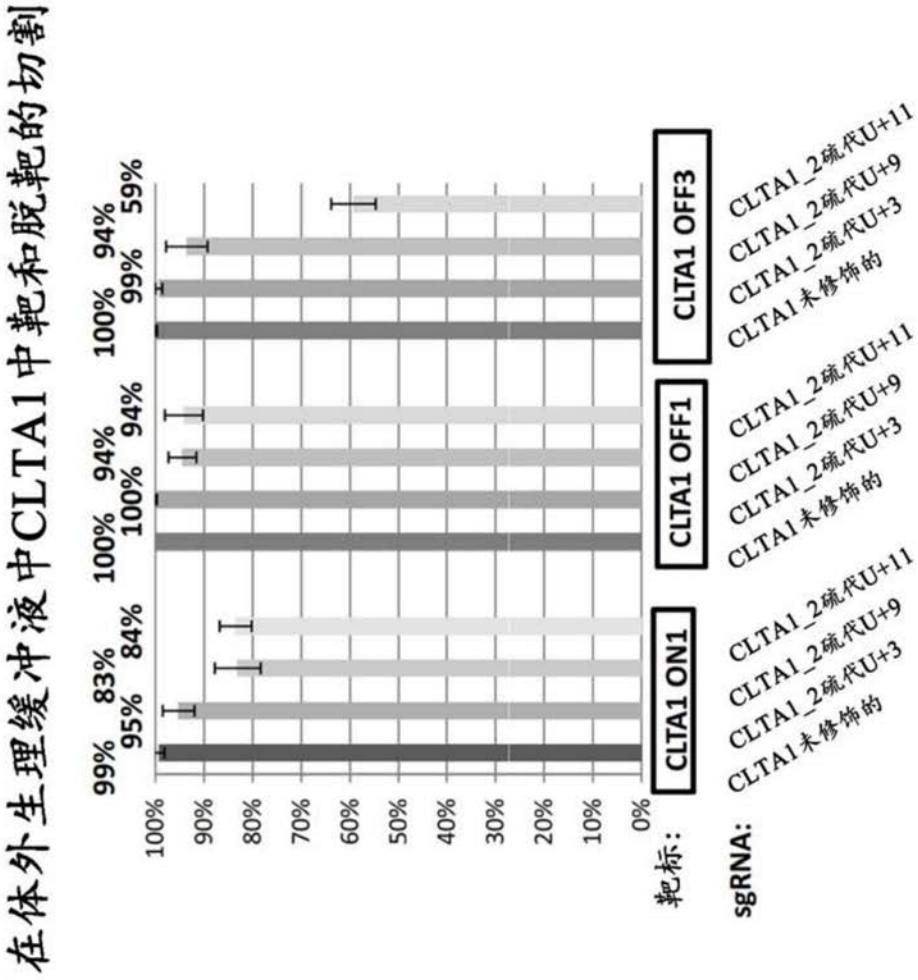


2-硫代U中的硫  
不能与G进行H-键合  
以形成降低特异性  
的摆动配对。

图9A

## 2-硫代U在脱靶位点设计U-G摆动配对时增加 指导RNA的靶标特异性

靶标名称	CLTA1 中靶或脱靶位点
CLTA1 ON1	AGTCCTCATCT <u>CCCTCAAGCAGG</u> TCAGGAGTAG <u>AGGGAGTTCGTCC</u>
CLTA1 OFF1	AGTCCTCAACT <u>CCCTCAAGCAGG</u> TCAGGAGTT <u>GAGGGAGTTCGTCC</u>
CLTA1 OFF3	ACTCCTCAT <u>CCCCCTCAAGCGGG</u> TGAGGAGTAG <u>GGGGAGTTCGGCC</u>



用于体外切割的生理条件:  
0.8 mM MgCl<sub>2</sub> + 无靶标竞争者DNA  
37°C, 1 hr

图9B

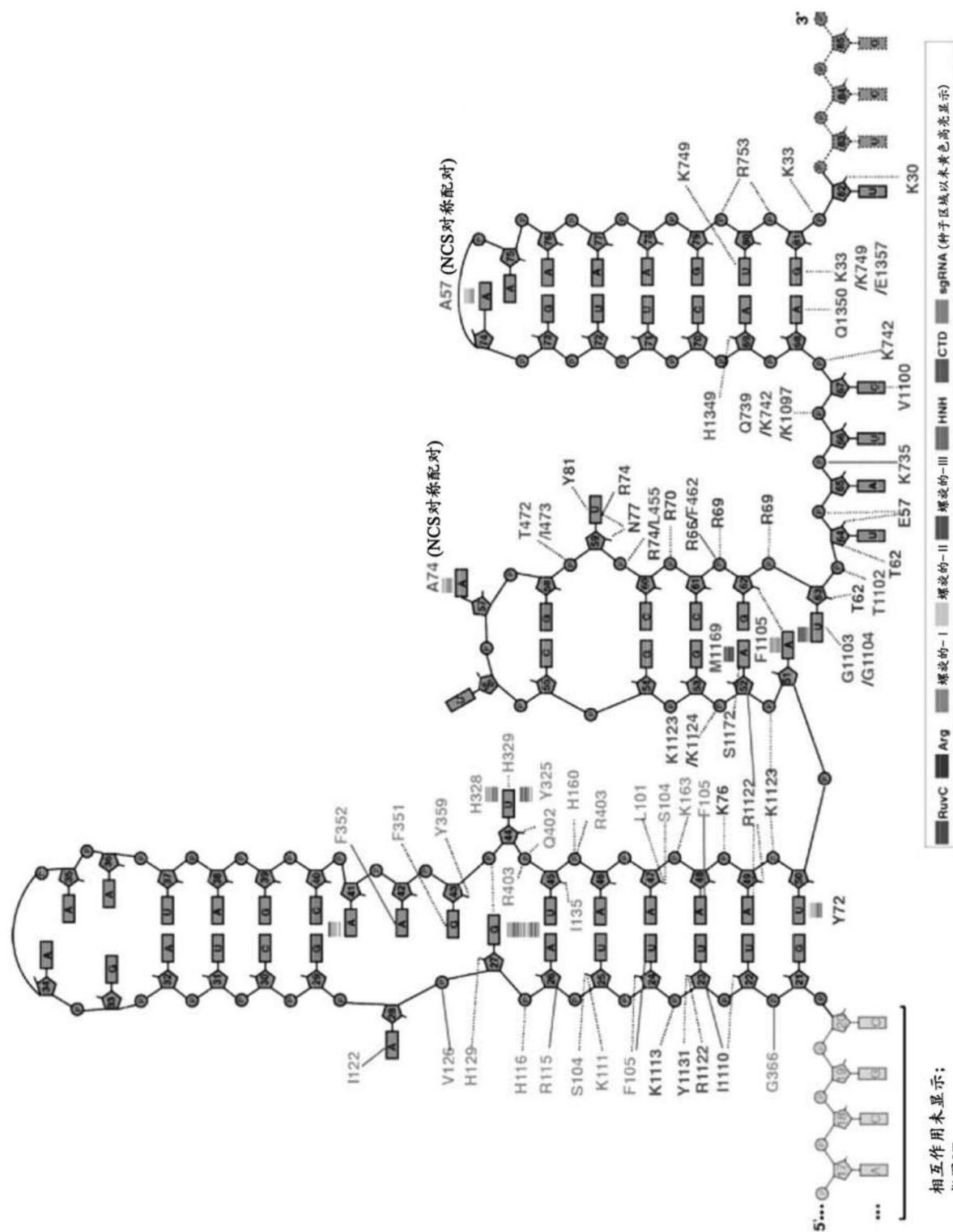


图10

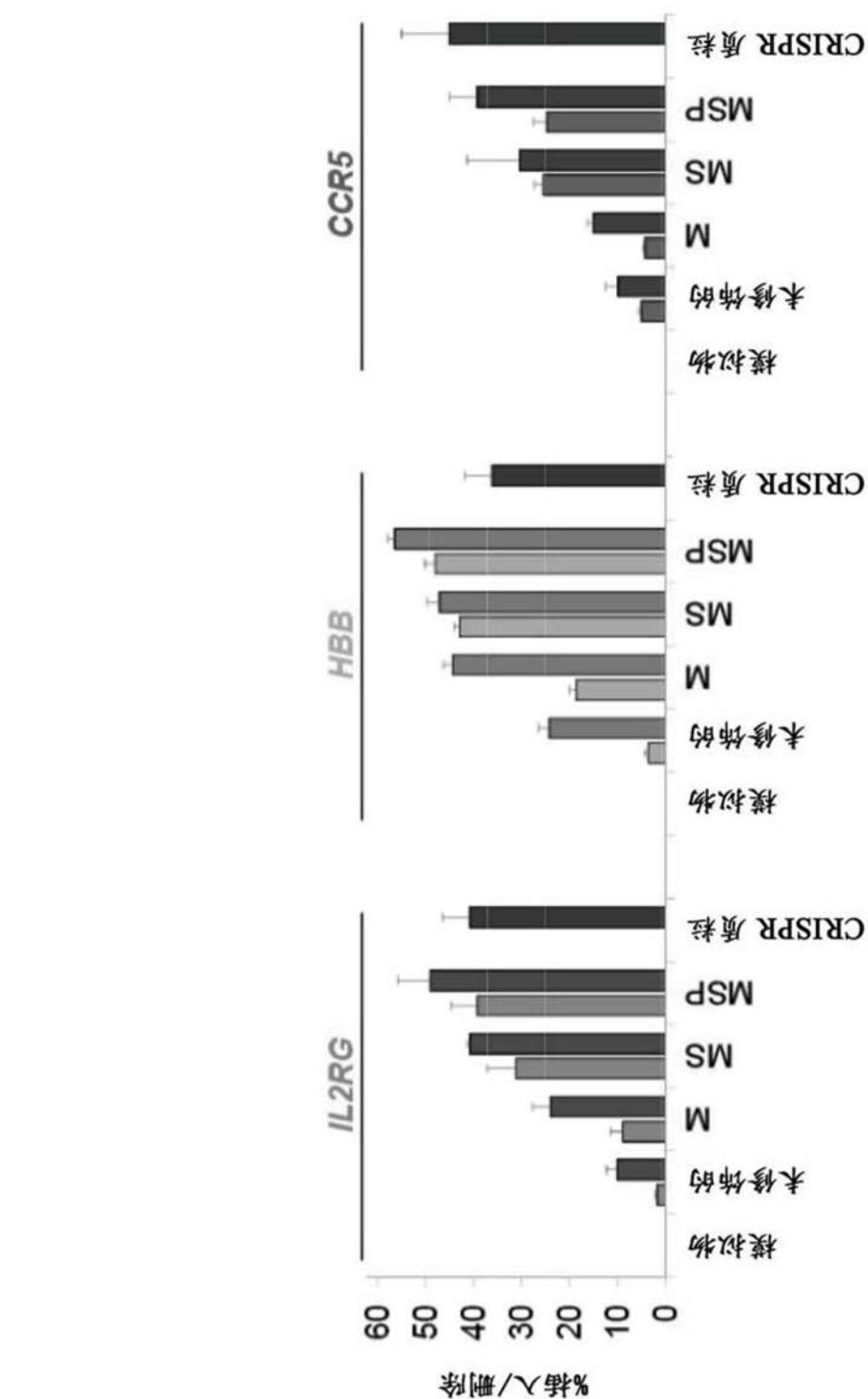


图11A

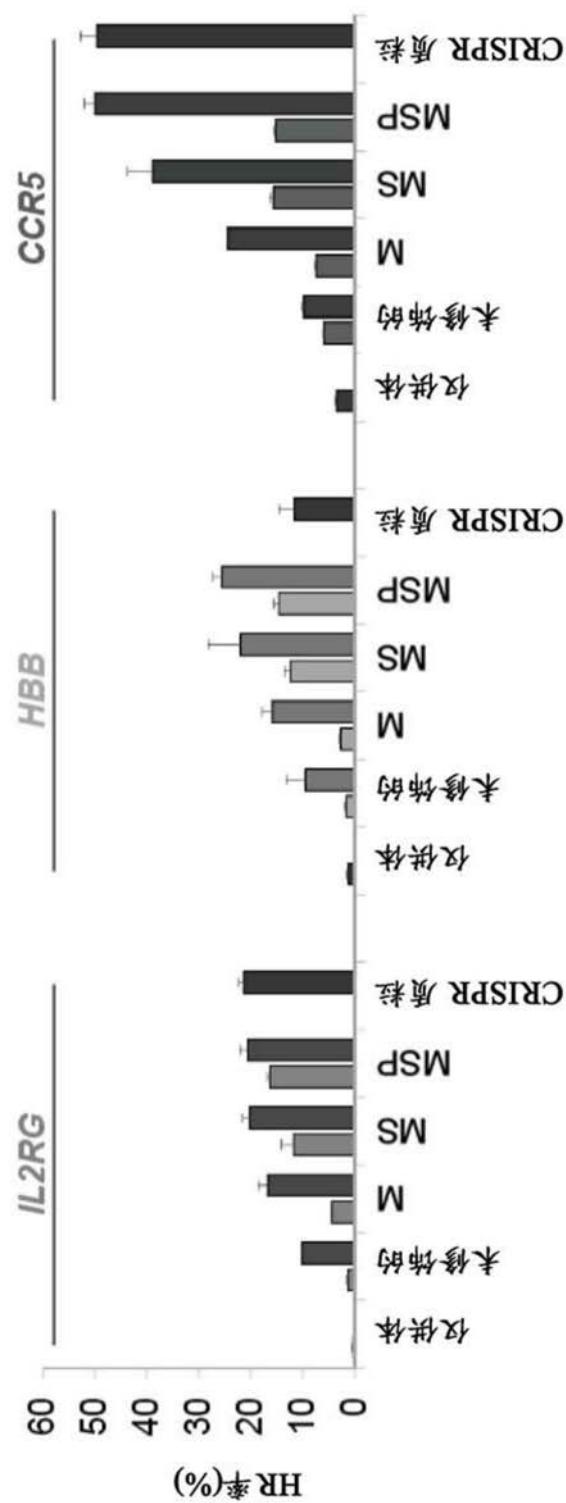


图11B

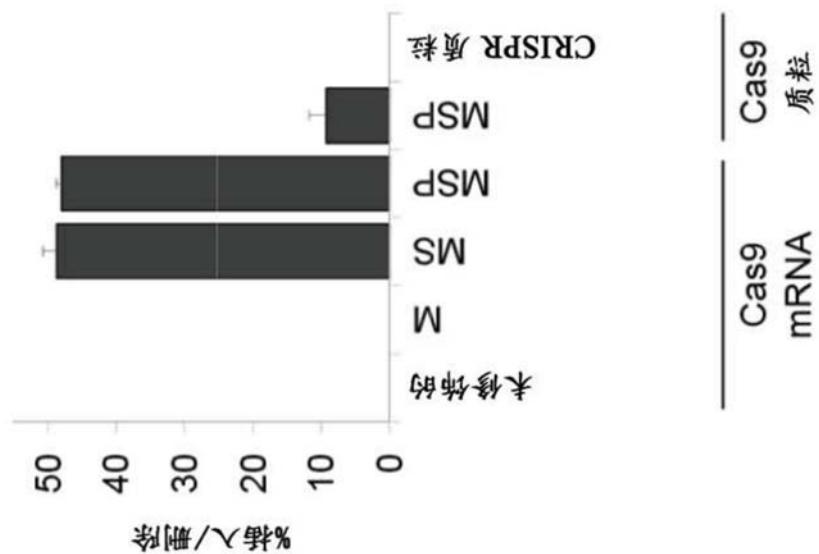


图12A

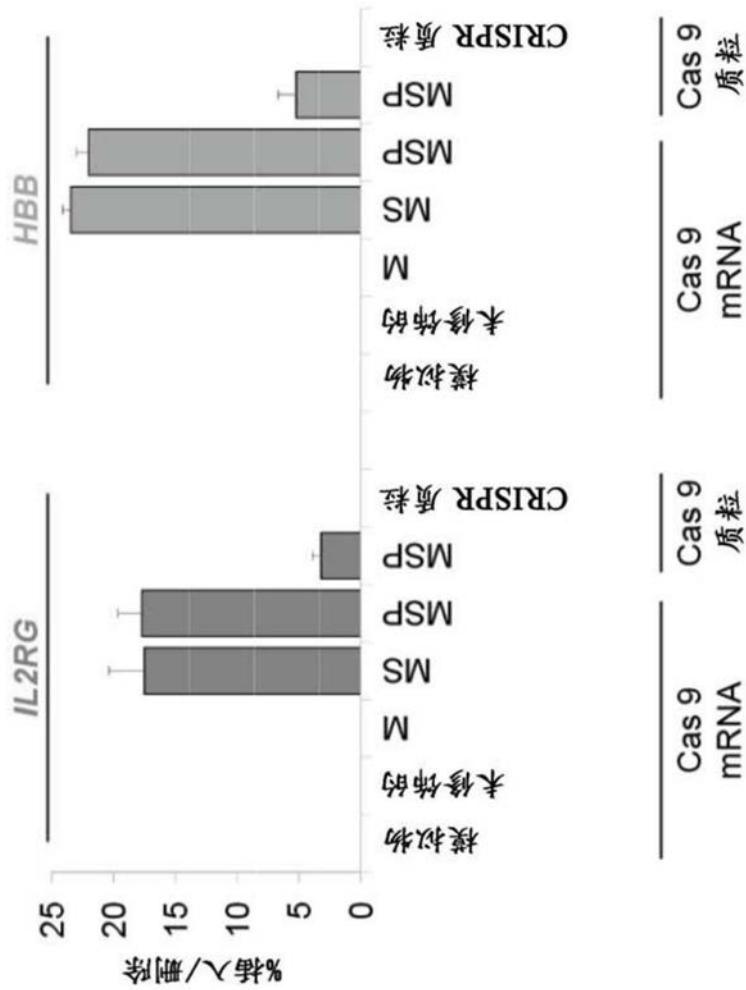


图12C

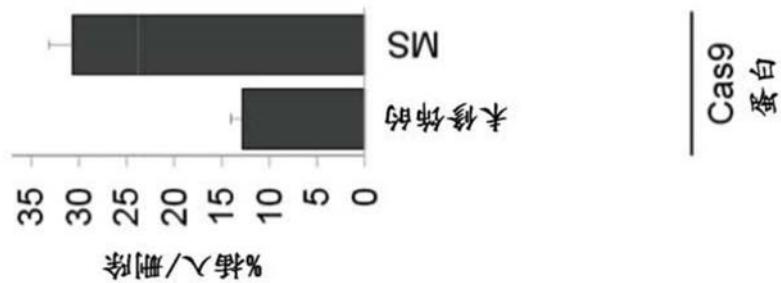


图12B

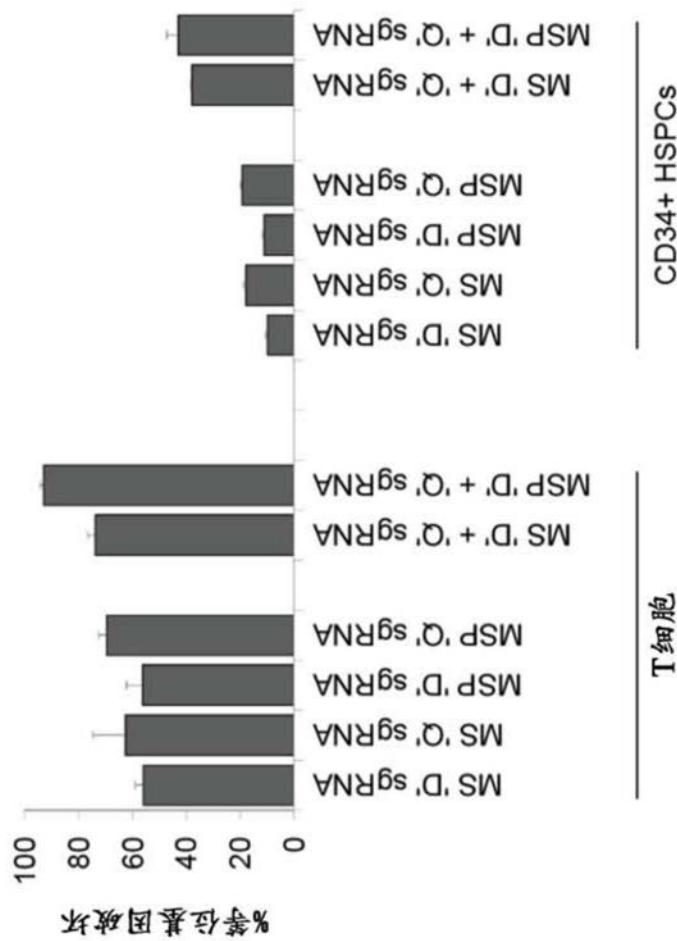


图12D