(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월05일
(11) 등록번호 10-2777129
(24) 등록일자 2025년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *A01N 63/60* (2020.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/111 (2013.01)
A01N 63/60 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-7010839
(22) 출원일자(국제) 2018년09월17일
심사청구일자 2021년09월17일
(85) 번역문제출일자 2020년04월14일
(65) 공개번호 10-2020-0065005
(43) 공개일자 2020년06월08일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2018/051015
(87) 국제공개번호 WO 2019/051563
국제공개일자 2019년03월21일
(30) 우선권주장
2017903773 2017년09월15일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Nucleic Acids Research, Vol.38(19), pp.6652-6663 (2010)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
커먼웰쓰 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션
오스트레일리아, 에이씨티 2601, 블랙 마운틴, 클러니즈 로스 스트리트, 빌딩 101
(72) 발명자
스미스 네일 앤드류
오스트레일리아 2614 오스트레일리안 캐피탈 테리토리 쿡 드위어 스트리트 27
왕 밍-보
오스트레일리아 2617 오스트레일리안 캐피탈 테리토리 맥켈라 슬래서 크레센트 43에이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

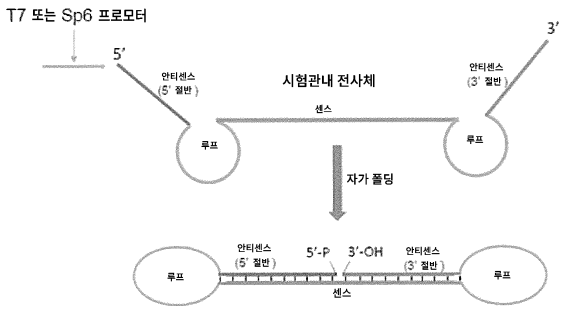
전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 **RNA 분자**

(57) 요 약

본 발명은 새로운 이중 가닥 RNA(dsRNA) 구조 및 유전자 침묵화에서 이의 용도에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, dsRNA는 이중 헤어핀(덤벨) 구조를 포함한다. 또 다른 구현예에서, dsRNA 분자의 센스 및 안티센스 가닥의 일부는 비-정규 염기쌍과 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는 리보뉴클레오티드를 함유한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 15/8286 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/531 (2013.01)
C12N 2310/533 (2013.01)
C12N 2330/50 (2013.01)

(72) 발명자
도란 티모시 제임스
오스트레일리아 3226 빅토리아 오션 그루브 돌핀 코트 18
티자드 마크
오스트레일리아 3216 빅토리아 하이톤 차드리 코트 3
알루 안나푸르나 데비
인도 517507 안드라 프라데시 티루파티 망가람 칼캄바디 로드 인디안 인스티튜트 오브 사이언스 에듀케이션 앤드 리서치
그래비스 이안 케빈
오스트레일리아 2905 오스트레일리안 캐피탈 테리토리 리차드슨 그림샤 스트리트 39
가오 링링
오스트레일리아 플로렛 더블유에이 6014 언더우드 애비뉴 147 씨에스아이알오 에이 앤 에프 내
앤더슨 조나단 폴
오스트레일리아 플로렛 더블유에이 6014 언더우드 애비뉴 147 씨에스아이알오 에이 앤 에프 내
장 다아이
오스트레일리아 브루스 에이씨티 2615 크립스 서킷 11/121
디 페이터 로버트
오스트레일리아 액톤 에이씨티 2601 클루니스 로스 스트리트 커먼웰쓰 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치 오가니제이션 내

(30) 우선권주장
2018902840 2018년08월03일 오스트레일리아(AU)
2018902896 2018년08월08일 오스트레일리아(AU)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 RNA 성분, 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분을 포함하는 RNA 분자로서,

제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 제1 RNA 성분에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 40개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 적어도 40개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 40개의 인접한 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자의 제1 영역과 완전히 상보적이며 염기쌍을 형성할 수 있고,

제2 RNA 성분은 직접적으로 또는 연결 리보뉴클레오티드 서열을 통하여 제1 5' 리보뉴클레오티드 또는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되고,

제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 적어도 21개의 뉴클레오티드 길이의 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제2 루프 서열 및 적어도 21개의 뉴클레오티드 길이의 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 적어도 21개의 인접한 뉴클레오티드 길이에 걸쳐 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고,

RNA 분자는 5' 말단 및 3' 말단을 포함하는 단일 가닥의 리보뉴클레오티드이고,

표적 RNA 분자는 절지동물 세포 또는 식물 세포에 있는 RNA 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오티드 서열, (ii)제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성되는 5' 리더 서열 및 (iii) 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 3' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성되는 3' 트레일러 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 RNA 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 둘 다 적어도 40개의 인접한 뉴클레오티드 길이인 RNA 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, (a) 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열이 측면에 있거나, 또는 (b) 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 측면에 있는 RNA 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 하기 중 하나 이상을 특징으로 하는 RNA 분자:

(i) 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열이 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 둘 다이고,

(ii) RNA 분자는 연결 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 20개 미만의 리보뉴클레오티드이고,

(iii) 연결 리보뉴클레오티드 서열이 표적 RNA 분자와 혼성화되고,

(iv) 연결 리보뉴클레오티드 서열이 표적 RNA 분자의 상보체의 일부와 동일하고,

(v) 연결 리보뉴클레오티드 서열이 1개 내지 10개 리보뉴클레오티드 길이이고,

(vi) RNA 분자는 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 및 이와 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이는 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일하고,

(vii) 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열이 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 동일하고,

(viii) 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열이 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일하고,

(ix) 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열이 개입 루프 서열을 갖지 않고,

(x) 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 각각 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열과 전체적으로 염기쌍을 이루고, 이는 표적 RNA 분자의 영역과 각각 상보적이고,

(xi) 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 상보적이고,

(xii) 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 상보적이고,

(xiii) (a) 제1 5' 리보뉴클레오티드 및 제2 3' 리보뉴클레오티드가 인접하며, 각각 염기쌍을 형성하고 서로 직접 공유 결합되지 않거나, 또는 (b) 제2 5' 리보뉴클레오티드 및 제1 3' 리보뉴클레오티드가 인접하며, 각각 염기쌍을 형성하고 서로 직접 공유 결합되지 않고,

(xiv) 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA의 제1 영역과 혼성화되고, 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA의 제2 영역과 혼성화되고, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 인접하고, 2개의 안티센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않고,

(xv) 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA의 제1 영역과 적어도 60% 동일하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA의 제2 영역과 적어도 60% 동일하고, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, 제1 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 인접하고 표적 RNA와 혼성화되고, 2개의 센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않고,

(xvi) RNA 분자는 5' 리더 서열, 3' 트레일러 서열, 또는 둘 다를 포함하고,

(xvii) RNA 분자에서의 적어도 하나의 또는 모든 루프 서열이 20개 초과의 뉴클레오티드이고,

(xviii) RNA 분자가 볼록부를 갖지 않거나, 1개 또는 2개 이상의 볼록부를 갖거나, RNA 분자의 이중-가닥 영역이 이중-가닥 영역에서 염기쌍을 형성하지 않는 1개 또는 2개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다.

청구항 6

제1항에 있어서, 표적 RNA가 식물 세포에 있는 RNA 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포에서 생성되는 RNA 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 서로 혼성화하여 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 형성할 수 있는 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하는 dsRNA 영역을 포함하는, RNA 분자로서,

전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오티드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는 RNA 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드로서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 RNA 분자의 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자 및 상기 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 진균 세포 또는 식물 세포인 숙주 세포.

청구항 12

제10항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되는 숙주 세포.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자 및 상기 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 비-인간 유기체 또는 이의 일부.

청구항 14

제13항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 비-인간 유기체 또는 이의 일부의 게놈 내로 안정적으로 통합되는 비-인간 유기체 또는 이의 일부.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 제조하는 방법으로서, 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 상기 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드를 발현하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

제13항의 비-인간 유기체를 제조하는 방법으로서, 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하여 이것이 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되도록 하는 단계, 및 세포로부터 비-인간 유기체를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제10항의 숙주 세포의 추출물로서, 추출물이 RNA 분자, 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 추출물.

청구항 18

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자, 및 하나 이상의 적합한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 19

식물 또는 절지동물에서 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 하향조절하는 방법으로서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 식물 또는 절지동물에 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 20

식물 또는 절지동물을 제어하는 방법으로서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 식물 또는 절지동물에 전달하는 단계를 포함하고, RNA 분자는 식물 또는 절지동물 상에 유해한 효과를 갖는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 조성물로서, RNA 분자는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 또는 질병의 예방에 대해 유익한 효과를 갖는 조성물.

청구항 22

식물에 RNA 분자를 도입하는 방법으로서, 식물 또는 이의 일부에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 RNA 분자를 포함하는 조성물을 국소적으로 적용하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 새로운 이중 가닥 RNA(dsRNA) 구조 및 유전자 침묵화에서 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동물 세포에서 RNA 간섭(RNAi)을 유도하기 위해 사용되는 통상적 dsRNA 분자는 단일-가닥 센스 및 안티센스 RNA의 어닐링에 의해 또는 헤어핀 RNA(hpRNA)로도 불리는 줄기-루프 구조의 형성을 허용하는 상보성 영역을 갖는 자가-상보적 RNA로부터 형성된다. 식물에서, 긴 헤어핀 RNA를 발현하는 트랜스유전자는 RNAi의 유도에서 매우 효과적인 것으로 증명되었다. 긴 hpRNA의 일부 연구에서 hpRNA 구조의 개방 말단에 비해 hpRNA의 루프 말단에 더 가까운 서열로부터 형성되는, 짧은 간섭 RNA(siRNA)로 불리는 dsRNA의 가공된 RNA 산물이 더 풍부함을 나타내어, hpRNA의 dsRNA 줄기의 다이서 가공이 루프 말단으로부터 시작되는 것으로 나타남을 시사하였다. 전체 루프는 hpRNA 구조로부터 정확히 절제될 수 있고, 이는 RNA아제 효소 다이서가 결합하여 siRNA 가공을 시작하기 위한 dsRNA 말단부를 제공할 수 있다.

[0003] dsRNA 유도된 유전자 침묵화는 유기체의 표현형 변경에 있어서 귀중한 도구인 것으로 증명되었으나, RNAi를 위해 사용될 수 있는 대안적인, 바람직하게는 개선된 dsRNA 분자가 필요하다.

발명의 내용

[0004] 본 발명자들은 하나 이상의 하기 특징을 갖는; 쉽게 합성되고, dsRNA 구조를 보다 쉽게 형성하고, 진핵 세포에서 표적 유전자의 효율적인 침묵화를 유도하는, 본원에서 루프-말단 dsRNA(ledRNA)로 불리는 새로운 설계의 RNAi-유도 분자를 고안하였다. ledRNA는 또한 식물 잎에 국소 적용되는 경우 효과적이다.

[0005] 제1 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분, 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분 및 선택적으로, (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오티드 서열, (ii) 5' 리더 서열 및 (iii) 3' 트레일러 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 리보핵산(RNA) 분자를 제공하며,

[0006] 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 혼성화될 수 있고,

[0007] 제2 RNA 성분은, 연결 리보뉴클레오티드 서열이 존재하는 경우 이를 통해 또는 연결 리보뉴클레오티드 서열이 존재하지 않는 경우 직접적으로, 제1 5' 리보뉴클레오티드 또는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되고,

[0008] 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고,

[0009] 5' 리더 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성되고,

[0010] 3' 트레일러 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 3' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성된다.

[0011] 제2 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분, 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분 및 선택적으로, (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오티드 서열, (ii) 5' 리더 서열 및 (iii) 3' 트레일러 서열 중 하나 이상 또는 모두를 포함하는 RNA 분자를 제공하며,

[0012] 제1 RNA 성분은, 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 각각 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성됨으로써 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드는 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드와 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 또는 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자의 제1 영역 또는 그 상보체 각각 또는 둘 다와 서열이 동일하고,

[0013] 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오티드 서열이 존재하는 경우 이를 통해, 제1 5' 리보뉴클레오티드 또는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되고,

[0014] 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고, 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성하고,

[0015] 5' 리더 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 5' 리보뉴클레오티드에

공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성되고,

[0016] 3' 트레일러 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제2 3' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우에는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성된다.

[0017] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 키메라 RNA 분자이다.

[0018] 제3 영역에서, 본 발명은 서로 혼성화하여 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하는 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하는, 키메라 리보핵산(RNA) 분자를 제공하며,

[0019] i) 센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0020] ii) 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0021] iii) 제1 5' 리보뉴클레오티드는 제2 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,

[0022] iv) 제2 5' 리보뉴클레오티드는 제1 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하여 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍을 형성하고,

[0023] v) 전체적으로, 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 약 5% 내지 약 40%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,

[0024] vi) dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,

[0025] vii) RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오티드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,

[0026] viii) RNA 분자 또는 적어도 일부 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있고,

[0027] ix) RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있다.

[0028] 제4 양태에서, 본 발명은 제1 RNA 성분 및 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 제2 RNA 성분을 포함하는 키메라 RNA 분자를 제공하며,

[0029] 제1 RNA 성분은 제1 이중-가닥 RNA(dsRNA) 영역을 포함하고, 이는 서로 혼성화하여 제1 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 및 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열과 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개 뉴클레오티드의 제1 개입 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고,

[0030] 제2 RNA 성분은 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열, 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열과 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 공유 연결하는 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제2 개입 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고,

[0031] 제1 RNA 성분에서,

[0032] i) 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0033] ii) 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0034] iii) 제1 5' 리보뉴클레오티드는 제2 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0035] iv) 제2 5' 리보뉴클레오티드는 제1 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0036] v) 전체적으로, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 5% 내지 40%의 리보

뉴클레오티드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고,

[0037] vi) 제1 dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고,

[0038] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오티드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성하고,

[0039] (a) 키메라 RNA 분자 또는 적어도 일부의 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있거나,

[0040] (b) 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체 영역과 서열이 적어도 50% 동일한 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 서열을 포함하거나,

[0041] (c) (a) 및 (b) 둘 다이다.

[0042] 제1, 제2 및 제4 양태에서, 제1 RNA 성분의 제1 5' 리보뉴클레오티드 및 제1 3' 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하여 하나의 염기쌍을 형성한다. 그 염기쌍은 제1 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍으로 본원에서 정의된다. 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열이 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되고 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 구현예에서, 제1 5' 리보뉴클레오티드는 센스 서열 및 안티센스 서열 중 하나에 직접 연결되고, 제1 3' 리보뉴클레오티드는 센스 서열 및 안티센스 서열 중 다른 하나에 직접 연결된다.

[0043] 바람직한 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드는 모두 표적 RNA 분자의 제1 영역의 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성할 수 있다. 하나의 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열은 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 둘 다이다.

[0044] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 연결 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 적어도 부분적으로 표적 RNA 분자의 영역 또는 그 상보체와 동일한, 표적 유전자와 서열이 관련된다. 바람직한 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 RNA 성분에서의 센스 서열과 함께 하나의 인접한 센스 서열의 일부를 형성하거나, 제1 및 제2 RNA 성분에서의 안티센스 서열과 함께 하나의 인접한 안티센스 서열의 일부를 형성한다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 연결 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 20개 미만의 리보뉴클레오티드이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자와 혼성화된다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체의 일부와 동일하다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 10개의 리보뉴클레오티드이다.

[0045] 제1, 제2 또는 제4 양태의 구현예에서, RNA 분자는 (i) 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오티드 서열, (ii) 5' 연장 서열 및 (iii) 3' 연장 서열 중 하나 이상 또는 전부를 포함하며, 각각, 5' 연장 서열은, 존재하는 경우, 제1 RNA 성분에 또는 제2 RNA 성분에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성되고, 3' 연장 서열은, 존재하는 경우, 제2 RNA 성분에 또는 제1 RNA 성분에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성된다. 하나의 구현예에서, 제1 RNA 성분 및 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오티드 서열을 통해 공유 연결된다. 대안적인 구현예에서, 제1 RNA 성분 및 제2 RNA 성분은 임의의 연결 리보뉴클레오티드 서열의 존재 없이 직접 연결된다.

[0046] 제1 내지 제4 양태의 구현예에서, RNA 분자는 각각 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일한 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, RNA 분자는 센스 리보뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성한 하나 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 하나 이상의 안티센스 서열은 표적 분자의 영역과 상보적이고, 바람직하게는 전체적으로 상보적이다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 동일하며, 이는 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 동일하다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 개입 루프 서열을 갖지 않는다, 즉, 이들은 표적 RNA 분자 대비 인접해있다.

[0047] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 및 이와 염기쌍을 형성한 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이 안티센스 서열은 각각 표적 RNA 분자의 영역과 상

보적이다. 이들이 상보적인 표적 RNA 분자의 영역은 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 상보적이다. 하나의 구현예에서, 제2의 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 제1의 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 상이한 표적 RNA 분자의 영역과 상보적이다. 바람직한 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 개입 루프 서열을 갖지 않는다, 즉 이들은 표적 RNA 분자의 상보체 대비 인접해 있다. 바람직한 구현예에서, 2개 이상의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열 및 센스 리보뉴클레오티드 서열 중 하나 또는 둘 다는 정규 염기쌍을 통해, 또는 일부 정규 및 일부 비-정규 염기쌍, 바람직하게는 G:U 염기쌍을 통해 이의 전장을 따라 염기쌍을 형성한다.

[0048] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 단일 가닥의 리보뉴클레오티드이다. 예를 들어, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오티드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오티드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오티드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 5'에서 3'으로의 순서는 센스 리보뉴클레오티드 서열, 이어서 안티센스 리보뉴클레오티드 서열일 수 있거나, 반대일 수 있다. 하나의 구현예에서, 5' 말단에서의 리보뉴클레오티드 및 3' 말단에서의 리보뉴클레오티드는 인접해있고, 각각 염기쌍을 형성하며, 직접 공유 결합되지 않고, 예를 들어 도 1을 참고한다.

[0049] 제1 내지 제4 양태의 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA의 제1 영역과 혼성화되는 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 표적 RNA의 제2 영역과 혼성화되는 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, RNA 분자는 표적 RNA와 혼성화되는 단 하나의 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 2개의 안티센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA의 제1 및 제2 영역은 표적 RNA에서 인접해 있다. 대안적으로, 이들은 인접하지 않다.

[0050] 제1 내지 제4 양태의 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA의 제1 영역과 적어도 60% 동일한 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 표적 RNA의 제2 영역과 적어도 60% 동일한 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 표적 RNA의 제2 영역은 표적 RNA의 제1 영역과 상이하고, RNA 분자는 표적 RNA와 혼성화되는 단 하나의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 2개의 센스 서열은 RNA 분자에서 인접하지 않다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA의 제1 및 제2 영역은 표적 RNA 분자에서 인접해 있다. 대안적으로, 이들은 인접하지 않다. 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 각각 독립적으로, 표적 RNA의 각각의 영역과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일하다, 즉, 제1 센스 서열은 그 표적 영역과 적어도 70% 동일할 수 있고 제2 서열은 그 표적 서열과 적어도 80% 동일할 수 있는 등이다.

[0051] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오티드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오티드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오티드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오티드이다. 보다 바람직한 구현예에서, RNA 분자에서의 염기쌍 형성이 일부 비-정규 염기쌍, 가장 바람직하게는 일부 G:U 염기쌍이 포함되는 적어도 21개의 인접한 염기쌍 길이인 이중-가닥 영역에 포함되며, 이중-가닥 영역은 적어도 21개 뉴클레오티드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0052] 제1 및 제2 양태의 바람직한 구현예에서, 제2 RNA 성분은 다음을 특징으로 한다:

[0053] i) 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제3 RNA 서열 및 제3 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되며,

[0054] ii) 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제3 5' 리보뉴클레오티드, 제4 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0055] iii) 제2 5' 리보뉴클레오티드는 제2 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0056] iv) 제3 3' 리보뉴클레오티드는 제3 5' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0057] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오티드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다. 가장 바람직하게는, 제2 안티센스 서열로부터 생성된 asRNA 분자는 제1 RNA 성분의 제1 안티센스 서열로부터 생성된 asRNA 없이 또는 이와 함께, 표적 RNA의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0058] 제4 양태의 바람직한 구현예에서, 제2 RNA 성분은 다음을 특징으로 한다:

[0059] i) 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제3 5' 리보뉴클레오티드, 제3 RNA 서열 및 제3 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되며,

[0060] ii) 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 순서로 공유 연결된, 제4 5' 리보뉴클레오티드, 제4 RNA 서열 및 제4 3' 리보뉴클레오티드의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드로 구성되고,

[0061] iii) 제3 5' 리보뉴클레오티드는 제4 3' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0062] iv) 제3 3' 리보뉴클레오티드는 제3 5' 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하고,

[0063] 키메라 RNA 분자는 진핵 세포에서 또는 시험관내 가공될 수 있고 이에 의해 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열이 절단되어 20개 내지 24개 리보뉴클레오티드 길이의 짧은 안티센스 RNA(asRNA) 분자를 생성한다.

[0064] 이들 바람직한 구현예에서, 전체적으로 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 5% 내지 40%의 리보뉴클레오티드가 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않고/않거나 제2 dsRNA 영역이 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는 것이 보다 바람직하다. 보다 바람직하게는, 전체적으로 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 21%, 약 24%, 또는 15% 내지 30%, 또는 보다 더 바람직하게는 16% 내지 25%의 리보뉴클레오티드는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 제2 dsRNA 영역에서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 가장 바람직하게는, 이들 구현예에서,

[0065] (a) 키메라 RNA 분자 또는 적어도 일부의 asRNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있거나,

[0066] (b) 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 상보체의 영역과 서열이 적어도 50% 동일한, 바람직하게는 표적 RNA 분자의 상보체의 영역과 적어도 60% 동일한, 보다 바람직하게는 적어도 70% 동일한, 보다 더 바람직하게는 적어도 80% 동일한, 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일한 또는 100% 동일한, 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 서열을 포함하거나,

[0067] (a) 및 (b) 둘 다이다.

[0068] 제1 내지 제4 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더/연장 서열 및 3' 트레일러/연장 서열을 둘 다 포함한다.

[0069] 제1 내지 제4 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자의 각각의 리보뉴클레오티드는 2개의 다른 뉴클레오티드에 공유 연결된다, 즉, 공유 폐쇄된 원이다. 대안적으로, RNA 분자는 덤벨 모양(도 1)으로 나타낼 수 있지만, 이중-가닥 구조의 한 부분에 갭 또는 닉(nick)을 가질 수 있다.

[0070] 제1 내지 제4 양태의 하나의 구현예에서, RNA 분자의 루프 서열 중 적어도 하나의 또는 전부는 20개 뉴클레오티드보다 길다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드 길이이다. 보다 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드 길이이다. 보다 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 200개 리보뉴클레오티드 길이이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 200개 리보뉴클레오티드 길이이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 루프 중 적어도 하나는 4개 내지 50개 리보뉴클레오티드 길이이다. 가장 바람직한 구현예에서, 루프는 모두 4개 내지 50개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 진핵 세포는 척추동물 세포이고, RNA 분자의 각각의 루프는 20개 내지 50개, 또는 20개 내지 30개 리보뉴클레오티드 길이이다.

[0071] 제1 내지 제4 양태의 구현예에서, RNA 분자는 이중-가닥 영역에 볼록부(bulge)가 없거나, 1개 또는 2개 이상의 볼록부(bulge)를 갖는다. 상기 맥락에서, 볼록부는 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않고 dsRNA 영역 중 상보적 서열에서의 대응 위치에 미스매치된 뉴클레오티드를 갖지 않는, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 하나의 뉴클레오티드, 또는 2개 이상의 인접한 뉴클레오티드이다. RNA 분자의 dsRNA 영역은 센스 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다 내에서 2개 또는 3개 초과 뉴클레오티드의 서열을 포함할 수 있고, 이는 dsRNA 구조가 형성되는 경우 dsRNA 영역에서 루프로 튀어나온다. 루프가 튀어나오는 서열은 자체가 일부 내부 염기쌍을 형성할 수 있고, 예를 들어 자체가 줄기-루프 구조를 형성할 수 있다.

[0072] 제1 내지 제4 양태의 구현예에서, RNA 분자는 이중-가닥 영역에 볼록부를 갖지 않거나, 1개 또는 2개 이상의 볼록부를 갖는다. 상기 맥락에서, 볼록부는 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않고 dsRNA 영역 중 상보적 서열에서의 대응 위치에 미스매치된 뉴클레오티드를 갖지 않는, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 하나의 뉴클레오티드, 또는 2개 이상의 인접한 뉴클레오티드이다. RNA 분자의 dsRNA 영역은 센스 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다 내에서 2개 또는 3개 초과 뉴클레오티드의 서열을 포함할 수 있고, 이는 dsRNA 구조가 형성되는 경우 dsRNA 영역에서 루프로 튀어나온다. 루프가 튀어나오는 서열은 자체가 일부 내부 염기쌍을 형성할 수 있고, 예를 들어 자체가 줄기-루프 구조를 형성할 수 있다.

[0073] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 3개, 또는 4개 이상의 루프를 갖는다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 2개의 루프만을 갖는다. 하나의 구현예에서, RNA 분자의 제1 이중-가닥 영역, 또는 제1 및 제2 dsRNA 영역은 이중-가닥 영역에서 염기쌍을 형성하지 않는 1개, 또는 2개 이상의 뉴클레오티드, 또는 염기쌍을 형성하지 않는 이중-가닥 영역 내 최대 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0074] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, 표적 RNA 분자 또는 본 발명의 RNA 분자, 또는 둘 다는 진핵 세포에 있다. 예를 들어, 진핵 세포는 식물 세포, 동물 세포 또는 진균 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 진핵 세포는 진균 세포이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 세포, 예를 들어 박테리아 세포 또는 다른 미생물 세포에서 생성되며, 이는 표적 RNA를 포함하는 세포와 상이하다. 유사하게, 하나의 구현예에서 본 발명의 RNA 분자는 본 발명의 RNA 분자가 생성되는 경우 표적 RNA를 포함하지 않는 진핵 세포에서 생성되지만, 본 발명의 RNA 분자 및/또는 그 가공 RNA 산물을 포함하는 진핵 세포는, 예를 들어 표적 RNA가 바이러스 RNA 또는 다른 도입된 RNA인 경우, 표적 RNA에 대한 숙주가 될 수 있다. 이러한 세포는 바이러스 또는 다른 도입된 RNA에 대해 예방적으로 보호될 수 있다.

[0075] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 시험관내 또는 세포에서 또는 둘 다에서 전사에 의해 효소적으로 제조될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 세포에서 발현된다, 즉 RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산으로부터의 전사에 의해 세포에서 생성된다. RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산은 바람직하게는 DNA 분자이며, 이는 세포에서 벡터 상에 존재하거나 세포의 게놈 내로 세포의 핵 게놈 또는 세포의 원형자 DNA에 통합될 수 있다. RNA 분자를 인코딩하는 하나 이상의 핵산은 또한 바이러스 벡터와 같은 RNA 분자일 수 있다.

[0076] 따라서 하나의 구현예에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자를 포함하는 세포를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 세포에서 발현되었고 세포로부터 단리되고/되거나 정제된, 본원에서 기재되는 RNA 분자를 제공한다. 따라서 본 발명은 제1 내지 제4 양태 중 하나 이상에 따른 단리된 RNA 분자의 제조물을 제공하며, 이는 표적 RNA를 포함하거나 표적 RNA를 포함할 수 있는 세포에 대한 투여에 적합하다.

[0077] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 표적 RNA는 단백질을 인코딩한다. 대안적으로, 하나 이상의 표적 RNA, 예컨대 rRNA, tRNA, snoRNA 또는 miRNA는 단백질을 인코딩하지 않는다.

[0078] 제1 내지 제4 양태의 구현예에서, 전체적으로 dsRNA 영역을 형성하는 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 리보뉴클레오티드의 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 21%, 약 24%, 또는 약 15% 내지 약 30%, 또는 바람직하게는 약 16% 내지 약 25%는 비-정규 염기쌍으로 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자에서 하나의 dsRNA 영역, 또는 모든 dsRNA 영역에서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%의 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 각각의 G:U 염기쌍에서 G 뉴클레오티드는 독립적으로 센스 리보뉴클레오티드 서열 또는 바람직하게는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에 있을 수 있다. dsRNA 영역의 G:U 염기쌍에서 G 뉴클레오티드에 관하여, 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 60% 또는 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 80% 또는 90%가 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에 있고, 가장 바람직하게는 이의 적어도 95%가 dsRNA 영역에서 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에 있다. 상기 특징은 RNA 분자에서 모든 dsRNA 영역에 적용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 전체적으로 RNA 분자에서 하나의 dsRNA 영역에서 또는 모든 dsRNA 영역에서, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 보다 바람직하게는 1% 미만의 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하지 않거나 가장 바람직하게는 염기쌍을 형성하지 않는 리보뉴클레오티드가 없다. 바람직한 구현예에서, 전체적으로 하나의 dsRNA 영역 또는 dsRNA 영역들에서 4개 내지 6개 리보뉴클레오티드 당 하나씩은 RNA 분자 내에서 비-정규 염기쌍을 형성하거나 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 전체적으로 하나의 dsRNA 영역 dsRNA 영역들은 8개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 대안적인 구현예에서, dsRNA 영역은 적어도 8개의 인접한 정규 염기쌍, 예를 들어 8개 내지 12개 또는 8개 내지 14개의 인접한 정규 염기쌍을 포함한다. 바람직한 구현예에

서, dsRNA 영역에서 모든 리보뉴클레오티드는 정규 염기쌍 또는 비-정규 염기쌍과 염기쌍을 형성한다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드 또는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드, 또는 둘 다는 염기쌍을 형성하지 않는다. 하나의 구현예에서, 각각의 센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드 및 각각의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드는 본 발명의 RNA 분자에서 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0079] 하나의 구현예에서, 제1 RNA 성분의 또는 제2 RNA 성분의, 또는 둘 다의 안티센스 RNA 서열은 표적 RNA 분자 영역의 상보체 또는 2개의 이러한 영역과 서열이 100% 미만이 동일하거나, 약 80% 내지 99.9% 동일하거나, 약 90% 내지 98% 동일하거나, 약 95% 내지 98% 동일하거나, 바람직하게는 98% 내지 99.9% 동일하며, 이는 표적 RNA 분자에서 인접할 수도 인접하지 않을 수도 있다. 바람직한 구현예에서, 안티센스 RNA 서열은 표적 RNA 분자의 상보체 영역과, 예를 들어 21개, 23개, 25개, 27개, 30개, 또는 32개의 인접한 뉴클레오티드를 포함하는 영역과 서열이 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 센스 또는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 또는 둘 다는 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1,000개, 또는 약 100개 내지 약 1,000개의 인접한 뉴클레오티드 길이이다. 식물 세포 또는 진균 세포에서, 또는 비-척추동물 세포를 위해 RNA 분자를 사용하는 경우, 적어도 100개 뉴클레오티드 길이가 바람직하다. 척추동물 세포에서 RNA 분자를 사용하는 경우, dsRNA에서의 센스 및 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에 있어서 50개 이하 뉴클레오티드, 예를 들어 31개 내지 50개 뉴클레오티드 길이가 바람직하다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 리보뉴클레오티드 수는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 리보뉴클레오티드 수의 약 90% 내지 약 110%, 바람직하게는 95% 내지 105%, 보다 바람직하게는 98% 내지 102%, 보다 더 바람직하게는 99% 내지 101%이다. 가장 바람직한 구현예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 리보뉴클레오티드 수는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열에서의 리보뉴클레오티드 수와 동일하다. 이러한 특징은 RNA 분자에서 각각의 dsRNA 영역에 적용될 수 있다.

[0080] 제1 내지 제4 양태의 구현예에서, RNA 분자에서 제1 3' 리보뉴클레오티드 및 제2 5' 리보뉴클레오티드는 적어도 4개의 리보뉴클레오티드, 또는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드, 또는 바람직하게는 4개 내지 200개 리보뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 4개 내지 50개 리보뉴클레오티드로 구성되는 루프 서열에 의해 공유 연결된다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제2 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 또는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. 상기 구현예에서, RNA 분자는 혼성화하여 RNA 분자를 형성하는 2개의 별도 가닥의 RNA를 포함하지만, 이는 단일 RNA 전사체로서 핵산 분자로부터의 전사에 의해 생성된 후 2개의 RNA 가닥을 포함하도록 가공되었을 수 있다.

[0081] 임의의 인트론을 스플라이싱해낸 후 그러나 다이서 효소 또는 다른 RN아제 에 의한 RNA 분자의 임의의 가공 전에, 단일 가닥의 RNA로서 생성되는 본 발명의 RNA 분자의 전반적 길이는 전형적으로 50개 내지 2000개 리보뉴클레오티드, 바람직하게는 60개 또는 70개 내지 2000개 리보뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 80개 또는 90개 내지 2000개 리보뉴클레오티드, 보다 더 바람직하게는 100개 또는 110개 내지 2000개 리보뉴클레오티드이다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 최소 길이는 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 180개, 또는 200개 뉴클레오티드이고, 최대 길이는 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1200개, 1400개, 1500개 또는 2000개 리보뉴클레오티드이다. 언급된 최소 및 최대 길이의 각각의 조합이 고려된다. 표적 유전자가 하향-조절되어야 하는 시험관내 또는 세포, 예컨대 박테리아 또는 다른 미생물 세포 내, 또는 진핵 세포 내 전사에 의한 이러한 길이의 RNA 분자의 생성은 쉽게 달성된다

[0082] 제1 내지 제4 양태의 하나의 구현예에서, 키메라 RNA 분자는 동일하거나 바람직하게는 상이한 2개 이상의 dsRNA 영역을 포함한다.

[0083] 제1 내지 제4 양태의 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 진핵 세포에서 발현된다, 즉 세포에서 전사에 의해 생성된다. 이러한 구현예에서, 더 큰 비율의 dsRNA 분자는 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 유사 RNA 분자의 가공과 비교되는 경우, 22개 및/또는 20개 리보뉴클레오티드 길이의 RNA 분자의 가공에 의해 형성된다. 즉, 이들 구현예의 RNA 분자는 RNA 분자로부터 생성된 20개 내지 24개 뉴클레오티드 asRNA의 총 수의 비율로서, 그 dsRNA 영역이 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 유사 RNA 분자보다 보다 쉽게 가공되어 22개-리보뉴클레오티드 및/또는 20개-리보뉴클레오티드의 짧은 안티센스 RNA를 제공한다.

[0084] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 본원에서 기재되는 RNA 분자의 2개 이상의 특징의 조합을 포함한다.

[0085] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자, 바람직하게는 본원에서 기재되는 키메라 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 더 큰 DNA 분자, 예컨대 염색체 내로 통합될 수 있는 DNA 작제물이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 RNA 분자의 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 숙주 세포는 박테리아 세포, 예컨대 대장균(*E. coli*), 진균 세포, 예컨대 효모 세포, 또는 진핵 세포, 예컨대 식물 세포 또는 동물 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 폴리뉴클레오티드에 대해 이종성이다. RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 키메라 또는 재조합 폴리뉴클레오티드, 또는 단리된 및/또는 외인성 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 시험관내 기능할 수 있으며, 예를 들어 박테로오파지 프로모터, 예컨대 T7 RNA 폴리머라제 프로모터 또는 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터, 예컨대 U6 프로모터 또는 H1 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 II 프로모터이며, 이는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 발생적으로 조절되는 프로모터 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드의 전사 동안 또는 이후 스플라이싱되어 나갈 수 있는 적어도 하나의 루프 서열에 인트론을 포함하는 RNA 전구체 분자를 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 하나의 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 하나의 구현예에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 예컨대 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와의 사용에 적합한 이원성 벡터이다.

[0086] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 진핵 숙주 세포, 바람직하게는 식물에 있는 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자를 인코딩하는 영역과 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 프로모터 영역은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 인코딩하는 대응하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 프로모터와 비교되는 경우 더 낮은 메틸화 수준을 갖는다. 하나의 구현예에서, 더 낮은 메틸화 수준은 대응하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 프로모터와 비교되는 경우, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만 또는 20% 미만이다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 적어도 2개 카피의 본 발명의 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함한다. 상기 구현예에서:

[0087] i) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 한 카피의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 갖는 대응하는 진핵 세포 대비 적어도 동일하고/하거나,

[0088] ii) 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성의 감소 수준은 정규 염기쌍과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 대응하는 dsRNA 영역을 갖는 RNA 분자를 포함하는 대응하는 세포 대비 더 낮다.

[0089] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 기재되는 RNA 분자, 본원에서 기재되는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 비-인간 세포, 예컨대 박테리아 세포, 진균 세포, 식물 세포 또는 비-인간 동물 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 세포 배양에서의 비-인간 세포 또는 인간 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 진핵 세포, 예컨대 동물 세포가 아닌 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 미생물 세포, 예컨대 원핵 세포이다. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 살아있다. 대안적인 구현예에서, 숙주 세포는 죽어있다.

[0090] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자, 바람직하게는 본원에서 기재되는 키메라 RNA 분자, 이를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 이를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 비-인간 유기체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 한 트랜스제닉이다. 하나의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 비-인간 유기체의 게놈 내로 안정적으로 통합된다.

[0091] 또 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하는 단계를 포함하는, 본 발명의 RNA 분자를 제조하는 방법을 제공한다. 이 구현예에서, 방법은 RNA 분자를 적어도 부분적으로 정제하는 단계를 추가로 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0092] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포, 바람직하게는 식물 세포 또는 진균 내로 도입하여, 바람직하게는 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 또는 이의 일부가 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되도록 하는 단계를 포함하는, 세포 또는 비-인간 유기체, 바람직하게는 식물 또는 진균을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 세포 또는 자손 세포로부터, 예를 들어 식물을 재생함으로써 생성된다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 세포 또는 하나 이상의 자손 세포를 비-인간 유기체 내로 도입하여 생성된다. 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 세포 게놈 내로의 안정적 통합에 대안

적으로, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 게놈 내로의 통합 없이 세포 내로 도입되어, 예를 들어 세포 또는 유기체에서 RNA 분자를 일시적으로 발현할 수 있다.

[0093] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포 또는 유기체 또는 이의 일부의 추출물을 제공하며, 여기서 추출물은 본 발명의 RNA 분자, RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자, RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 또는 본 발명의 방법에 의해 제조되는 추출물 중 하나 이상, 및 하나 이상의 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 약학 조성물, 예컨대 인간 또는 다른 동물에 대한 투여에 적합한 조성물이다. 약학 조성물은 예방 또는 질병의 치료, 또는 국소 적용, 예컨대 미용 적용에 적합할 수 있다. 하나의 구현예에서, 조성물은 식물, 바람직하게는 야외의 식물 또는 식물 집단으로의, 또는 곤충 또는 곤충 집단으로의 적용에 적합하다. 하나의 구현예에서, 조성물은 작물에, 예를 들어 야외의 작물 식물 상에 분무하여 적용하기 적합하다.

[0094] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자 또는 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다를 포함하는 추출물 또는 조성물은 RNA 분자, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터의 안정성을 증강시키는 적어도 하나의 화합물을 추가로 포함하며, 이에 의해 적어도 하나의 화합물은 RNA 분자를 보조하고, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 세포, 예컨대 유기체의 세포에 의해 섭취된다. 하나의 구현예에서, 화합물은 전달감염 촉진제, 예를 들어 지질-함유 화합물이다.

[0095] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포 또는 유기체에서 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키거나 하향조절하는 방법을 제공하며, 방법은 세포 또는 유기체에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 또는 본 발명의 조성물을 전달하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 단백질을 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 방법은 하나를 초과하는 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시키며, 표적 RNA 분자들은 상이하고, 예를 들어 유전자 패밀리로부터, 서열이 관련되는 2개 이상의 표적 RNA의 수준 및/또는 활성이 감소된다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 발명은 비-인간 유기체를 제어하는 방법을 제공하며, 방법은 비-인간 유기체에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자는 비-인간 유기체 상에서 유해한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 절지동물, 예컨대 곤충, 또는 식물, 예컨대 잡초이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 유기체는 식물이며, 절지동물은 식물 또는 이의 일부를 먹고, 이에 의해 절지동물이 제어된다.

[0097] 하나의 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 질병을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에 본 발명의 하나 이상의 RNA 분자(들) 또는 RNA 분자의 가공에 의해 생성되는 작은 RNA 분자(20 nt 내지 24 nt 길이), 또는 둘 다, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, RNA 분자 또는 작은 RNA 분자, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 조성물은 국소, 경구 투여되거나 주사된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 척추동물이다. 하나의 구현예에서, 척추동물은 포유류, 예컨대 인간, 가축 동물, 예컨대 소 또는 양, 또는 새, 예컨대 닭 및 다른 가금이다.

[0098] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물을 제공하며, 여기서 RNA 분자 또는 작은 RNA 분자는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 질병 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 RNA 분자 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 RNA 분자 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자는 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 RNA 분자(들) 또는 이로부터 생성되는 작은 RNA 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 추출물, 또는 본 발명의 조성

물 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다.

[0100] 본원의 임의의 구현예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 임의의 다른 구현예에 준용되도록 적용되어야 한다.

[0101] 본 발명은 본원에서 기재되는 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않으며, 단지 예시의 목적을 위한 것이다. 기능적으로-동등한 산물, 조성물 및 방법은 본원에서 기재되는 바와 같이, 명확히 본 발명의 범위 내에 있다.

[0102] 본 명세서를 통해, 구체적으로 달리 언급되지 않는 한 또는 맥락 상 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 해당 조성물, 단계 그룹 또는 해당 조성물 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 이들 단계, 해당 조성물, 단계 그룹 또는 해당 조성물 그룹을 포괄하려는 것이다.

[0103] 이후 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 첨부되는 도면을 참조하여 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0104] **도 1.** 두 ledRNA 분자의 도식적 설계. (A) 상기 ledRNA 분자는 개입 스페이서 서열 없이 공유 연결되고 표적 RNA와 동일성을 갖는 2개의 인접한 센스 서열로 간주될 수 있는 센스 서열, 센스 서열과 상보적이고 2개 영역, 5' 영역 및 3' 영역으로 구분되는 안티센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. (B) 상기 ledRNA 분자는 개입 스페이서 서열 없이 공유 연결되고 표적 RNA의 상보체와 동일성을 갖는 2개의 인접한 안티센스 서열로 간주될 수 있는 안티센스 서열, 안티센스 서열과 상보적이고 2개 영역으로 구분되는 센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. 전사에 의해, 예를 들어 프로모터, 예컨대 T7 또는 Sp6 프로모터로부터의 시험관내 전사에 의해 생성되는 RNA 분자는 상보적 센스 및 안티센스 서열 간 염기쌍 형성에 의해 자가-어닐링하여 각각의 말단에 루프를 갖고 안티센스 또는 센스 서열에 "닉"을 갖는 이중-가닥 영역을 형성한다. 추가 서열은 5'-연장부 또는 3'-연장부로서 5' 말단 및/또는 3' 말단에 연결될 수 있다.

도 2. ledRNA는 센스/안티센스 어닐링 또는 헤어핀 RNA보다 dsRNA를 형성하는 데 더 효율적이다. 3가지 형태의 이중-가닥 RNA 분자의 모식도를 나타낸다: a, 2개의 별도 가닥의 어닐링에 의해 형성되는 통상적 dsRNA; b, 5'-연장부 및 3'-연장부를 갖는 헤어핀 RNA; 및 c, ledRNA 분자. 하부 패널은 GUS 유전자 또는 GFP 유전자를 표적화하는 3가지 유형의 RNA 분자에 대한 RNA 전사체의 겔 전기영동 후 사진을 나타낸다.

도 3. 처리(a 및 b) 및 미처리 원위(c 및 d) 조직의 노던 블롯 혼성화는 ledRNA가 dsRNA보다 안정하며 담배 잎 조직을 통해 확산됨을 나타낸다. 원위 조직(c 및 d, 상부 패널)에서, 강한 ledRNA 신호와 대조적으로 dsRNA 신호는 검출할 수 없었다.

도 4. ledRNA 처리는 처리 영역(1) 및 미처리 영역 위(3) 모두에서 GUS의 하향조절을 유도하였다.

도 5. ledRNA는 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 잎에서 FAD2.1 유전자의 침묵화를 유도한다.

도 6. 노던 블롯 혼성화는 6시간 및 24시간째에 ledFAD2.1로의 처리에 의해 FAD2.1 mRNA의 강한 하향조절을 확인시켜준다.

도 7. *GUS* 표적 유전자 영역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[G:U] 작제물의 센스 서열(SEQ ID NO:11의 뉴클레오티드 9 내지 208)의 정렬. 52개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 치환하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 8. *GUS* 표적 유전자 영역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[1:4] 작제물의 센스 서열(SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 9 내지 208)의 정렬. 대응하는 야생형 센스 서열 대비 hpGUS[1:4]에서 4번째마다의 뉴클레오티드를 치환하였고, 이에 의해 4번째마다의 뉴클레오티드는 C가 G로 변화되었고, G가 C로 변화되었고, A가 T로 변화되었고, T가 A로 변화되었다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 G 및 C는 별표시하지 않고, 치환된 A 및 T는 세미콜론을 붙여 나타낸다.

도 9. *GUS* 표적 유전자 영역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:14) 및 hpGUS[2:10] 작제물의 센스 서열(SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 9 내지 208)의 정렬. 대응하는 야생형 센스 서열 대비 hpGUS[2:10]에서 10개 뉴클레오티드의 각 블록의 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드를 치환하였고, 이에 의해 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드에 있어서, C는 G로 변화되었고, G는 C로 변화되었고, A는 T로 변화되었고, T는 A로 변화되었다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 G 및 C는 별표시하지 않고, 치환된 A 및 T는 세미콜론을 붙여 나타낸다.

도 10. GUS mRNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA를 인코딩하는 유전 작제물의 구조를 나타내는 모식도.

도 11. 담배 식물을 형질전환하여 GUS 표적 유전자를 제공하기 위해 사용된 벡터 pWBPPGH의 모식도. T-DNA는 벡터의 오른쪽 경계(RB)로부터 왼쪽 경계(LB)로 연장된다. T-DNA 상의 선별 마커 유전자는 하이그로마이신 내성을 인코딩하는 35S-HPT-tml' 유전자이다.

도 12. GUS 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 변형 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물로 형질전환된 식물에서의 GUS 활성. hp 비함유: hpGUS 작제물을 함유하지 않는 대조군 PPGH11 및 PPGH24 식물. 대응하는 대조군 PPGH11 또는 PPGH24 식물 대비 10% 미만 GUS 활성을 나타내는 식물의 수 및 평가된 식물의 수 대비 이러한 식물의 백분율을 괄호 안에 제공한다.

도 13. (a) 모든 트랜스제닉 식물: hpGUS[wt]에 대해 59개 식물, hpGUS[G:U]에 대해 74개 식물, hpGUS[1:4]에 대해 33개 식물 및 hpGUS[2:10]에 대해 41개 식물의 평균 GUS 활성. (b) 모든 침묵화된 식물(hpGUS[wt]에 대해 32개, hpGUS[G:U]에 대해 71개, hpGUS[1:4]에 대해 33개 및 hpGUS[2:10]에 대해 28개)의 평균 GUS 활성.

도 14. hpGUS[wt], hpGUS[G:U] 또는 hpGUS[1:4]를 함유하는 트랜스제닉 자손 식물의 GUS 활성.

도 15. hpGUS[G:U] 작제물로 형질전환된 16개 식물로부터의 DNA의 서던 블롯의 자가방사선촬영. DNA를 HindIII로 소화시킨 후 겔 전기영동하고 OCS-T 탐침으로 탐침분석하였다. 레인 1: 크기 마커(HindIII-소화된 람다 DNA); 레인 2 및 3, 모체 식물 PPGH11 및 PPGH24로부터의 DNA; 레인 4~19: 16개의 상이한 트랜스제닉 식물로부터의 DNA.

도 16. 트랜스제닉 담배 식물에서 발현된 헤어핀 RNA로부터 유도된 센스(상부 패널) 및 안티센스(하부 패널) sRNA를 검출하기 위한 노던 블롯 혼성화 실험의 자가방사선촬영그래프. 레인 1 및 2는 hpGUS 작제물이 없는 모체 식물 PPGH11 및 PPGH24로부터 수득된 RNA를 함유하였다. 레인 3 내지 11은 hpGUS[wt] 식물로부터의 RNA를 함유하였고 레인 12 내지 20은 hpGUS[G:U] 식물로부터의 RNA를 함유하였다.

도 17. 트랜스제닉 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영. 레인 1 내지 10은 hpGUS[wt] 식물의 것이었고, 레인 11 내지 19는 hpGUS[G:U] 식물의 것이었다. 안티센스 sRNA는 20 nt 내지 24 nt 길이에 해당하는 이동성을 갖는다. 블롯을 레인-로딩 대조군으로 U6 RNA에 대한 안티센스로 재탐침분석하였다.

도 18. 트랜스제닉 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 반복 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영

도 19. 트랜스제닉 식물에서 hpGUS 작제물에서의 35S 프로모터 및 센스 GUS 영역의 접합 영역의 DNA 메틸화 분석. 접합 단편을 PCR-증폭한 후 식물 DNA를 McrBC 효소로 처리하거나(+) 처리하지 않았다(-).

도 20. 트랜스제닉 식물에서 hpGUS 작제물에서의 35S 프로모터 영역의 DNA 메틸화 분석. 35S 단편을 PCR-증폭한 후 식물 DNA를 McrBC 효소로 처리하거나(+) 처리하지 않았다(-).

도 21. 가공된 RNA의 크기 분포 및 존재비. (a) EIN2 작제물. (b) GUS 작제물.

도 22. hpEIN2[G:U] 작제물의 센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:22의 뉴클레오티드 17 내지 216) 및 아라비돕시스 탈리아나(A. thaliana) EIN2 표적 유전자에 대응하는 cDNA 영역의 뉴클레오티드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:27)의 정렬. 야생형 서열에서의 43개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 23. hpCHS[G:U] 작제물의 센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:24의 뉴클레오티드 13 내지 212)과 아라비돕시스 탈리아나 CHS 표적 유전자에 대응하는 cDNA 영역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:28, 하부 서열)의 정렬. 야생형 서열에서 65개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 24. hpEIN2[G:U/U:G] 작제물의 안티센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:25의 뉴클레오티드 8 내지 207)과 아라비돕시스 탈리아나 EIN2 표적 유전자의 상보체 영역의 뉴클레오티드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:29)의 정렬. 야생형 서열에서 49개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 안티센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 25. hpCHS[G:U/U:G] 작제물의 안티센스 서열(상부 서열, SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 13 내지 212)과 아라비돕시스 탈리아나 CHS 표적 유전자의 상보체 영역의 뉴클레오티드 서열(하부 서열, SEQ ID NO:30)의 정렬. 야

생형 서열에서 49개 시티딘(C) 뉴클레오티드를 티미딘(T) 뉴클레오티드로 대체하여 안티센스 서열을 제조하였다. 보존된 뉴클레오티드는 별표시하고, 치환된 C는 별표시하지 않는다.

도 26. EIN2(ethylene insensitive 2) 및 CHS(칼론 신타아제) hpRNA 작제물의 모식도. 35S: CaMV 35S 프로모터; EIN2 및 CHS 영역을 야생형 서열(wt) 또는 G:U 변형 서열(G:U)로 나타낸다. 화살표는 DNA 단편의 배향을 나타낸다 - 오른쪽에서 왼쪽으로의 화살표는 안티센스 서열을 나타낸다. 제한 효소 부위를 또한 나타낸다.

도 27. hpEIN2[wt] 또는 hpEIN2[G:U]를 함유하는, EIN2 검정에서의 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 묘목의 하배축 길이

도 28. 액틴2 RNA 수준으로 정상화된, hpCHS[wt] 또는 hpCHS[G:U] 작제물에 대해 트랜스제닉인, 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나에서의 CHS mRNA에 대한 qRT-PCR. Col-0은 야생형(비트랜스제닉) 아라비돕시스 탈리아나이다.

도 29. hpEIN2[wt] 또는 hpEIN2[G:U]로 형질전환된 식물로부터의 RNA의 노던 블롯 혼성화의 자가방사선촬영. 상부 패널은 그 라인에 대한 하배축 길이를 나타낸다. 자가방사선촬영은 안티센스 sRNA를 검출하기 위한 EIN2 센스 탐침으로 탐침분석된 노던 블롯을 나타낸다. 동일한 블롯을 로딩 대조군(U6 RNA)으로서 U6 RNA 탐침으로 재-탐침분석하였다.

도 30. 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 식물의 게놈 DNA에서 35S 프로모터 및 35S-센스 EIN2 서열의 DNA 메틸화 분석.

도 31. 헤어핀 RNA 작제물의 프로모터 및 5' 영역에서의 DNA 메틸화 수준.

도 32. hpEIN2[wt] 집단의 최소 메틸화된 라인에서의 35S 프로모터는 여전히 유의미한 메틸화를 나타낸다.

도 33. G:U hpEIN2 라인에서의 35S 프로모터는 약한 메틸화(10% 미만)만을 나타낸다.

도 34. 72시간째에 CHO 및 Vero 세포에서 G:U 유전자 침묵화를 갖는 ledRNA 및 hpRNA.

도 35. 48시간째에 Hela 세포에서 평가된 덤벨 플라스미드.

도 36. dsRNA 분자의 가능한 변형예.

도 37. 그린 피치(green peach) 진디에서 *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자의 발현을 하향조절하기 위해 ledRNA가 보충된 인공 식이의 섭취 후 감소된 진디 수행능력. 상부 패널 (a): 50 ng/㎕ ledRNA 100 ㎕으로 10일 기간 후 성체 진디 당 평균 약충 수. 하부 패널 (b): *MpC002*, *MpRack-1*의 200 ng/㎕ ledRNA 또는 대조군 ledGFP를 함유하는 100 ㎕ 상에서 섭취 후 5일 시간 경과에 걸쳐 생존하는 진디의 백분율.

서열 목록에 대한 키

SEQ ID NO:1 - GFP ledRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:2 - GUS ledRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:3 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 ledRNA의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:4 - GFP ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:5 - GUS ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:6 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:7 - GFP를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:8 - GUS를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:9 - 니코티아나 벤타미아나 FAD2.1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:10 - GUS mRNA를 표적화하는 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:11 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[G:U]를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:12 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[1:4]를 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:13 - 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[2:10]을 인코딩하는 작제물에 대해 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:14 - GUS 유전자의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 781~1020의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:15 - hpGUS[wt] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:16 - hpGUS[G:U] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오티드.

SEQ ID NO:17 - hpGUS[1:4] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오티드.

SEQ ID NO:18 - hpGUS[2:10] RNA의 헤어핀 구조(그 루프 포함)의 리보뉴클레오티드.

SEQ ID NO:19 - 아라비돕시스 탈리아나 EIN2 유전자, 접근 번호 NM_120406에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:20 - 아라비돕시스 탈리아나 CHS 유전자, 접근 번호 NM_121396, 1703 nt에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:21 - 제한 효소 부위가 측면에 있는 아라비돕시스 탈리아나 EIN2 유전자에 대응하는 cDNA로부터의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:22 - hpEIN2[G:U] 작제에서 사용된, 43개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고, SEQ ID NO:21에 대한 것과 같이 EIN2의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:23 - 제한 효소 부위가 측면에 있는 아라비돕시스 탈리아나 CHS 유전자에 대응하는 cDNA로부터의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:24 - hpCHS[G:U]의 작제에서 사용된, 65개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고, SEQ ID NO:23에 대한 것과 같이 CHS의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:25 - hpEIN2[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 50개의 C가 T로 대체된, EIN2의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:26 - hpCHS[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 49개의 C가 T로 대체된, CHS의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:27 - 아라비돕시스 탈리아나로부터의 EIN2 유전자(접근 번호 NM_120406)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 601~900의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:28 - 아라비돕시스 탈리아나로부터의 CHS 유전자(접근 번호 NM_121396)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 813~1112의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:29 - 아라비돕시스 탈리아나로부터의 EIN2 유전자(접근 번호 NM_120406)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 652~891의 상보체의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:30 - 아라비돕시스 탈리아나로부터의 CHS 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 804~1103의 상보체의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:31 - 아라비돕시스 탈리아나의 cDNA의 FANCM I 단백질 코딩 영역, 접근 번호 NM_001333162. 표적 영역 뉴클레오티드 675~1174(500개 뉴클레오티드)

SEQ ID NO:32 - 브라시카 나푸스(*Brassica napus*)의 cDNA의 FANCM I 단백질 코딩 영역. 표적 영역 뉴클레오티드 896~1395(500 bp)

SEQ ID NO:33 - 아라비돕시스 탈리아나의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-At[wt]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오티드 38~537; 루프 서열, 뉴클레오티드 538~1306; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1307~1806.

SEQ ID NO:34 - 아라비돕시스 탈리아나의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-At[G:U]를 인코딩하

는 뉴클레오티드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오티드 38~537; 루프 서열, 뉴클레오티드 538~1306; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1307~1806.

SEQ ID NO:35 - 브라시카 나푸스의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-Bn[wt]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오티드 34~533; 루프 서열, 뉴클레오티드 534~1300; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1301~1800.

SEQ ID NO:36 - 브라시카 나푸스의 FANCM I 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpFANCM-Bn[G:U]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. FANCM 센스 서열, 뉴클레오티드 34~533; 루프 서열, 뉴클레오티드 534~1300; FANCM 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1301~1800.

SEQ ID NO:37 - 브라시카 나푸스 DDM1 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열; 접근 번호 XR_001278527.

SEQ ID NO:38 - 브라시카 나푸스 DDM1 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpDDM1-Bn[wt]를 인코딩하는 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:39 - 브라시카 나푸스의 DDM1 단백질 코딩 영역을 표적화하는 hpDDM1-Bn[G:U]를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열. DDM1 센스 서열, 뉴클레오티드 35~536; 루프 서열, 뉴클레오티드 537~1304; DDM1 안티센스 서열, 뉴클레오티드 1305~1805.

SEQ ID NO:40 - EGFP cDNA.

SEQ ID NO:41 - 프로모터에 대해 안티센스/루프/센스의 순서로, hpEGFP[wt]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:42 - EGFP 센스 서열에서 157개의 C에서 T로의 치환을 갖는 hpEGFP[G:U]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:43 - EGFP 센스 서열에서 C에서 T로의 치환을 갖지 않는 ledEGFP[wt]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:44 - EGFP 센스 서열에서 162개의 C에서 T로의 치환을 갖는 ledEGFP[G:U]의 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:45 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[G:U]를 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:46 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[1:4]를 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:47 - 측면에 제한 효소 부위를 갖지 않고 헤어핀 RNA 분자 hpGUS[2:10]을 인코딩하는 작제물에 대한 GUS 센스 영역을 제공하기 위해 사용된 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:48 - 측면 서열을 갖지 않는 hpEIN2[G:U]의 작제에서 사용된, 43개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고 SEQ ID NO:21에서와 같이 EIN2의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:49 - 측면 서열을 갖지 않는 hpCHS[G:U]의 작제에서 사용된, 65개의 C가 T로 대체된 것을 제외하고 SEQ ID NO:23에서와 같이 CHS의 200 nt 센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:50 - 측면 서열을 갖지 않는 hpEIN2[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 50개의 C가 T로 대체된 EIN2의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:51 - 측면 서열을 갖지 않는 hpCHS[G:U/U:G]의 작제에서 사용된, 49개의 C가 T로 대체된 CHS의 200 nt 안티센스 서열을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:52 - 200 bp GUS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(GUS-WT-F)

SEQ ID NO:53 - 200 bp GUS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(GUS-WT-R)

SEQ ID NO:54 - 모든 C가 T로 대체된 hpGUS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-GU-F)

SEQ ID NO:55 - 모든 C가 T로 대체된 hpGUS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역

방향)(GUS-GU-R)

SEQ ID NO:56 - 4번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[1:4] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-4M-F)

SEQ ID NO:57 - 4번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[1:4] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(GUS-4M-R)

SEQ ID NO:58 - 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[2:10] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(GUS-10M-F)

SEQ ID NO:59 - 9번째마다 및 10번째마다의 뉴클레오티드가 치환된 hpGUS[2:10] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(GUS-10M-R)

SEQ ID NO:60 - 순방향 프라이머(35S-F3)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:61 - 역방향 프라이머(GUSwt-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:62 - 순방향 프라이머(GUSgu-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:63 - 역방향 프라이머(GUS4m-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:64 - 순방향 프라이머(35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:65 - 역방향 프라이머(35S-R1)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:66 - 야생형 200 bp EIN2 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(EIN2wt-F)

SEQ ID NO:67 - 야생형 200 bp EIN2 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(EIN2wt-R)

SEQ ID NO:68 - 야생형 200 bp CHS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(CHSwt-F)

SEQ ID NO:69 - 야생형 200 bp CHS 센스 서열을 증폭하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(CHSwt-R)

SEQ ID NO:70 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(EIN2gu-F)

SEQ ID NO:71 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(EIN2gu-R)

SEQ ID NO:72 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(CHSgu-F)

SEQ ID NO:73 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(CHSgu-R)

SEQ ID NO:74 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(asEIN2gu-F)

SEQ ID NO:75 - 모든 C가 T로 대체된, hpEIN2[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(asEIN2gu-R)

SEQ ID NO:76 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(순방향)(asCHSgu-F)

SEQ ID NO:77 - 모든 C가 T로 대체된, hpCHS[G:U/U:G] 단편을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머(역방향)(asCHSgu-R)

SEQ ID NO:78 - 순방향 프라이머(CHS-200-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:79 - 역방향 프라이머(CHS-200-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:80 - 순방향 프라이머(액틴2-For)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:81 - 역방향 프라이머(액틴2-Rev)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:82 - 순방향 프라이머(Top-35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:83 - 역방향 프라이머(Top-35S-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:84 - 순방향 프라이머(Link-35S-F2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:85 - 역방향 프라이머(Link-EIN2-R2)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:86 - 센스 si22의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:87 - 안티센스 si22의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:88 - 순방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:89 - 역방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:90 - 순방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:91 - 역방향 프라이머의 리보뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO:92 - dsRNA 분자의 가능한 변형

SEQ ID NO:93 - 브라시카 나푸스 *DDM1* 유전자(접근 번호 XR_001278527)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:94 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:95 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:96 - 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:97 - 아라비돕시스 탈리아나 *FANCM* 유전자(접근 번호 NM_001333162)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:98 - 아라비돕시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:99 - 아라비돕시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:100 - 아라비돕시스 탈리아나 *FANCM* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:101 - 브라시카 나푸스 *FANCM* 유전자(접근 번호 XM_022719486.1)에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:102 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:103 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는, G:U 염기쌍을 갖는 헤어핀 RNAi(hpRNA) 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:104 - 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자를 표적화하는, ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:105 - 니코티아나 벤타미아나 *TOR* 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:106 - 니코티아나 벤타미아나의 *TOR* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:107 - 보리, 호르데움 불가레(Hordeum vulgare)의 아세토락테이트 신타아제(ALS) 유전자(접근 번호 LT601589)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:108 - 보리(호르데움 불가레)의 ALS 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레

오티드 서열.

SEQ ID NO:109 - 보리(호르데움 불가레)의 HvNCED1 유전자(접근 번호 AK361999)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:110 - 보리 호르데움 불가레의 HvNCED2 유전자(접근 번호 DQ145931)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:111 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티붐(*Triticum aestivum*)의 *NCED1* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:112 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티붐의 *NCED2* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:113 - ABA-OH-2를 인코딩하는 보리 유전자(접근 번호 DQ145933)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:114 - 보리 호르데움 불가레 및 밀 트리티쿰 애스티붐의 ABA-OH-2 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:115 - EIN2를 인코딩하는 아라비돕시스 탈리아나 유전자(At5g03280)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:116 - 아라비돕시스 탈리아나의 EIN2 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:117 - CHS를 인코딩하는 아라비돕시스 탈리아나 유전자(접근 번호 NM_121396)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:118 - 아라비돕시스 탈리아나의 CHS 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:119 - 루피누스 앵구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*) N-유사 유전자(접근 번호 XM_019604347)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:120 - 루피누스 앵구스티폴리우스 N-유사 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:121 - 비티스 슈도레티쿨라타(*Vitis pseudoreticulata*) *MLO* 유전자(접근 번호 KR362912)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:122 - 비티스 *MLO* 유전자를 표적화하는 제1 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:123 - 마이주스 페르시캐(*Myzus persicae*)의 MpCO02 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:124 - 마이주스 페르시캐의 MpRack-1 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:125 - 마이주스 페르시캐 CO02 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 작제물의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:126 - 마이주스 페르시캐 Rack-1 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 작제물의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:127 - 헬리코베르파 아르미게라(*Helicoverpa armigera*) *ABCwhite* 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:128 - 헬리코베르파 아르미게라의 ABC 트랜스포터 white 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:129 - 리네피테마 휴밀레(*Linepithema humile*) PBAN-유형 뉴로펩타이드-유사(XM_012368710)에 대응

하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:130 - 아르헨티나 개미에서 PBAN 유전자(접근 번호 XM_012368710)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:131 - 루실리아 쿠프리나(*L. cuprina*)의 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A를 인코딩하는 유전자(접근 번호 XM_023443547)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:132 - 루실리아 쿠프리나의 RN아제 1/2를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:133 - 루실리아 쿠프리나의 키틴 신타아제를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:134 - 루실리아 쿠프리나의 엑디손 수용체(EcR)를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:135 - 루실리아 쿠프리나의 감마-튜불린 1/1-유사를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:136 - *TaMIo* 표적 유전자(AF384144).

SEQ ID NO:137 - *TaMIo*를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:138 - 비티스 슈도레티쿨라타 *MLO* 유전자(접근 번호 KR362912)에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열.

SEQ ID NO:139 - 비티스 *MLO* 유전자를 표적화하는 제1 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 일반 기법 및 정의

[0106] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다(예컨대, 세포 배양, 분자 유전학, 유전자 침묵화, 단백질 화학, 및 생화학에서).

[0107] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명에서 이용되는 재조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기법은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다. 이러한 기법은 원천 문헌, 예컨대 [J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan *et al.* (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트 포함)]에 기재되어 있고 설명된다.

[0108] 본원에서 사용되는 용어 "안티센스 조절 요소" 또는 "안티센스 리보핵산 서열" 또는 "안티센스 RNA 서열"은 이것이 혼성화되는 표적 RNA 분자의 적어도 일부와 적어도 부분적으로 상보적인 RNA 서열을 의미한다. 소정 구현예에서, 안티센스 RNA 서열은, 예를 들어 표적 RNA 분자의 번역 감소를 통해, 표적 RNA 분자의 발현 또는 양 또는 그 활성을 조절한다(증가시키거나 감소시킨다). 소정 구현예에서, 안티센스 RNA 서열은 표적 프리-mRNA의 스플라이싱을 변경하여 상이한 스플라이스 변이체를 생성한다. 안티센스 서열의 예시적 성분에는 비제한적으로 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오시드, 올리고뉴클레오티드 유사체, 올리고뉴클레오티드 모사체, 및 이의 키메라 조합이 포함된다.

[0109] 용어 "안티센스 활성"은 본 개시의 맥락에서 사용되어 그 표적 RNA 분자에 대한 안티센스 RNA 서열의 혼성화에 기인할 수 있는 임의의 검출 가능한 및/또는 측정 가능한 활성을 나타낸다. 이러한 검출 및/또는 측정은 직접적

이거나 간접적일 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 활성은 표적 RNA 분자 전사체의 양을 검출하고 하거나 측정하여 평가된다. 안티센스 활성은 또한 표적 RNA 분자와 연관된 표현형에서의 변화로서 검출될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "표적 RNA 분자"는 본 개시에 따라 안티센스 RNA 서열에 의해 조절되는 유전자 전사체를 나타낸다. 따라서, "표적 RNA 분자"는 그 발현 또는 활성이 안티센스 RNA 서열에 의해 조절될 수 있는 임의의 RNA 분자일 수 있다. 예시적인 표적 RNA 분자에는 비제한적으로 이의 전구체 형태를 포함하는, 표적 단백질을 인코딩하는 DNA로부터 전사된 RNA(비제한적으로 프리-mRNA 및 mRNA 또는 이의 일부를 포함함), rRNA, tRNA, 작은 핵 RNA, 및 miRNA가 포함된다. 표적 RNA는 병원체 또는 해충, 예컨대 바이러스의 게놈 RNA, 또는 이로부터 유래된 RNA 분자, 예컨대 바이러스 병원체의 복제 형태, 또는 이로부터의 전사체일 수 있다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 내인성 유전자(또는 유전자로부터 전사된 mRNA) 또는 그 발현이 특정 표현형, 형질, 장애 또는 질병 상태와 연관되는 진핵 세포 내로 도입되거나 도입될 수 있는 유전자로부터의 RNA, 또는 감염성 제제로부터의 핵산 분자일 수 있다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 진핵 세포에 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 단백질을 인코딩한다. 상기 맥락에서, 안티센스 활성은, 예를 들어 그 활성, 예컨대 효소 활성, 또는 효소로서가 아닌 기능을 통해, 또는 그 기능과 연관된 표현형을 통해, 표적 단백질의 양을 검출하거나 측정함으로써 평가될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "표적 단백질"은 본 개시에 따른 안티센스 RNA 서열에 의해 조절되는 단백질을 나타낸다.

[0110] 소정 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 RNA 분자 및/또는 절단된 표적 RNA 분자 및/또는 대안적으로 스플라이스된 표적 RNA 분자의 양을 검출함으로써 및/또는 측정함으로써 평가된다.

[0111] 안티센스 활성은 다양한 방법을 사용하여 검출되거나 측정될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 활성은 특정 샘플에서의 활성을 비교하고 그 활성을 대조군 샘플의 활성과 비교함으로써 검출되거나 평가될 수 있다.

[0112] 용어 "표적화"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 안티센스 RNA 서열과 특정 표적 RNA 분자 또는 표적 RNA 분자 내의 특정 뉴클레오티드 영역의 연합을 나타낸다. 하나의 예에서, 본 개시에 따른 안티센스 RNA 서열은 표적 RNA 분자의 적어도 하나의 영역과 상보성을 공유한다. 상기 맥락에서, 용어 "상보성"은 리보뉴클레오티드 상의 염기 간 수소 결합을 통해, 표적 RNA 분자 상의 리보뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성할 수 있는 리보뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 예를 들어, RNA에서, 아데닌(A)은 우라실(U)과 상보적이며 구아닌(G)은 시토신(C)과 상보적이다.

[0113] 소정 구현예에서, "상보적 염기"는 본 발명의 RNA 분자에서 센스 RNA 서열의 또는 그 표적 RNA 분자의 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성할 수 있는 안티센스 RNA 서열의 리보뉴클레오티드를 나타낸다. 예를 들어, 안티센스 RNA 서열의 소정 위치에서의 리보뉴클레오티드가 표적 RNA 분자의 소정 위치에서의 리보뉴클레오티드와 수소 결합할 수 있는 경우, 안티센스 RNA 서열 및 표적 RNA 분자 간 수소 결합의 위치는 그 리보뉴클레오티드에서 상보적인 것으로 간주된다. 대조적으로, 용어 "비-상보적"은 서로 수소 결합을 형성하지 않거나 달리 혼성화를 지지하지 않는 리보뉴클레오티드쌍을 나타낸다. 용어 "상보적"은 또한 안티센스 RNA 서열이 상보성을 통해 또 다른 핵산과 혼성화되는 능력을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, RNA 서열 및 그 표적은 각 분자에서 충분한 수의 대응하는 위치가 서로 결합할 수 있는 리보뉴클레오티드에 의해 점유되어 본 발명의 RNA 분자 및/또는 표적 RNA 분자에서 안티센스 RNA 서열 및 센스 RNA 서열 간 안정한 연합을 허용하는 경우 서로 상보적이다. 당업자는 안티센스 RNA 서열 및 표적이 연합된 채 유지되는 능력을 제거하지 않으면서 미스매치의 도입이 가능함을 인식한다. 따라서, 미스매치된(즉, 표적의 대응하는 뉴클레오티드와 상보적이 아닌) 최대 약 20%의 뉴클레오티드를 포함할 수 있는 안티센스 RNA 서열이 본원에서 기재된다. 바람직하게는 안티센스 화합물은 약 15% 이하, 보다 바람직하게는 약 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% 이하의 미스매치를 함유하거나 미스매치를 함유하지 않는다. 잔여 리보뉴클레오티드는 상보적이거나 다르게는 안티센스 RNA 서열 및 센스 RNA 서열 또는 표적 RNA 분자 간 혼성화(예컨대, G:U쌍 또는 A:G쌍)를 손상시키지 않는다. 당업자는 본원에서 기재되는 안티센스 RNA 서열이 표적 RNA 분자의 적어도 하나의 영역과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%(완전) 상보적임을 인식할 것이다.

[0114] 본원에서 사용되는 "키메라 RNA 분자"는 자연에서 자연적으로 확인되지 않는 임의의 RNA 분자를 나타낸다. 하나의 예에서, 본원에서 개시되는 키메라 RNA 분자는 dsRNA의 영역(들)에 미스매치를 생성하기 위해 변형되었다. 예를 들어, 키메라 RNA 분자는 시토신을 우라실로 전환하도록 변형될 수 있다. 하나의 예에서, 키메라 RNA 분자는 비-메틸화 시토신을 우라실로 전환하기 충분한 시간 동안 이러한 조건 하에 바이설파이트로의 처리를 통해 변형되었다.

[0115] 당업자는 다양한 리보뉴클레오티드 조합이 염기쌍을 형성할 수 있음을 이해할 것이다. 정규 및 비-정규 염기쌍

형성이 본 개시에 의해 고려된다. 하나의 예에서, 염기쌍 형성은 DNA 분자에 A:T 또는 G:C를 또는 RNA 분자에 U:A 또는 G:C를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 염기쌍 형성은 A:G 또는 G:T 또는 U:G를 포함할 수 있다.

[0116] 본 개시에서 사용되는 용어 "정규 염기쌍 형성"은 데옥시리보뉴클레오티드에 대해 A:T 또는 G:C 또는 리보뉴클레오티드에 대해 A:U 또는 G:C인 2개의 뉴클레오티드 간 염기쌍 형성을 의미한다.

[0117] 본 개시에서 사용되는 용어 "비-정규 염기쌍 형성"은 2개의 DNA 또는 2개의 RNA 서열의 맥락에서, 정규 염기쌍 형성이 아닌 2개의 뉴클레오티드 염기 간 상호작용을 의미한다. 예를 들어, 비-정규 염기쌍 형성에는 G 및 U 간(G:U) 또는 A 및 G 간(A:G) 쌍 형성이 포함된다. 비-정규 염기쌍 형성의 예에는 퓨린 - 퓨린 또는 피리미딘 - 피리미딘이 포함된다. 본 개시의 맥락에서 가장 일반적으로, 비-정규 염기쌍 형성은 G:U이다. 비-정규 염기쌍의 다른 예는, 덜 선호되지만, A:C, G:T, G:G 및 A:A이다.

[0118] 본 개시는 일련의 리보뉴클레오티드에 걸쳐 "혼성화되는" RNA 성분을 나타낸다. 당업자는 "혼성화하다" 및 "혼성화되는"과 같은 용어가 상보적 핵산 서열에 기반하여 어닐링되는 분자를 설명하기 위해 사용됨을 이해할 것이다. 이러한 분자는 혼성화되기 위해 100% 상보적일 필요는 없다(즉, 이들이 "전체적으로 염기쌍을 형성할" 필요는 없음). 예를 들어, 서열 상보성에 하나 이상의 미스매치가 존재할 수 있다. 하나의 예에서, 본원에서 기재되는 RNA 성분은 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화된다. 용어 "엄격한 혼성화 조건"은 RNA 분자의 길이를 이용한 혼성화 온도의 변이를 포함하여, 당분야에 친숙한 파라미터를 나타낸다. 리보뉴클레오티드 혼성화 파라미터는 이러한 방법을 컴파일링하는 참고문헌[Sambrook, et al. (상기 문헌), 및 Ausubel, et al. (상기 문헌)]에서 확인될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 엄격한 혼성화 조건은 혼성화 완충액(3.5xSSC, 0.02% Ficoll, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민(BSA), 2.5 mM NaH_2PO_4(pH7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중 65℃에서의 혼성화에 이어, 50℃에서 0.2.xSSC, 0.01% BSA 중 1회 이상의 세척을 나타낼 수 있다. 더 짧은 RNA 성분, 예컨대 20개 내지 24개 뉴클레오티드 길이의 RNA 서열은 저엄격성 조건 하에 혼성화된다. 용어 "저엄격성 혼성화 조건"은 RNA 분자의 길이를 이용한 혼성화 온도의 변이를 포함하는, 당분야에 친숙한 파라미터를 나타낸다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 저엄격성 혼성화 조건은 혼성화 완충액(3.5xSSC, 0.02% Ficoll, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민(BSA), 2.5 mM NaH_2PO_4(pH7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중 42℃에서의 혼성화에 이어, 30℃에서 0.2.xSSC, 0.01% BSA 중 1회 이상의 세척을 나타낼 수 있다.

[0119] 본 발명은 또한 인접한 리보뉴클레오티드에 걸쳐 "전체적으로 염기쌍을 형성하는" RNA 성분을 포괄한다. 용어 "전체적으로 염기쌍을 형성한다"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 일련의 인접한 리보뉴클레오티드 염기쌍 형성을 나타낸다. 전체적으로 염기쌍을 형성한 일련의 인접한 리보뉴클레오티드는 시리즈 내에 갭 또는 염기쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 포함하지 않는다. 용어 "인접한"은 일련의 리보뉴클레오티드를 나타내기 위해 사용된다. 인접한 시리즈를 포함하는 리보뉴클레오티드는 연속 시리즈의 포스포디에스테르 결합에 의해 연결될 것이고, 각각의 리보뉴클레오티드는 다음과 직접 결합된다.

[0120] 본 발명의 RNA 분자는 센스 서열 및 대응하는 안티센스 서열을 포함한다. 이들 서열 간 상관관계가 본원에서 정의된다. 표적 RNA 분자에 관한 안티센스 서열의 서열 상관관계 및 활성이 또한 본원에서 정의된다.

[0121] 용어 "공유 연결된"은 본 개시의 맥락에서 제1 및 제2 RNA 성분 또는 임의의 RNA 서열 또는 리보뉴클레오티드 간 연결을 나타내기 위해 사용된다. 당업자가 이해할 바와 같이, 공유 연결 또는 결합은 원자 간 전자쌍 공유가 관여되는 화학적 결합이다. 하나의 예에서, 제1 및 제2 RNA 성분 또는 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열은 자가-상보성을 통해 자체 상에서 다시 폴딩될 수 있는 단일 RNA 가닥의 일부로서 공유 연결된다. 상기 예에서, 성분은 포스포디에스테르 결합에 의해 하나 이상의 리보뉴클레오티드에 걸쳐 공유 연결된다.

[0122] 본 개시의 맥락에서, 용어 "혼성화"는 상보적 염기의 염기쌍 형성을 통한 상보적 폴리뉴클레오티드의 쌍 형성을 의미한다. 특정 기전에 제한되지 않고, 쌍 형성의 가장 일반적인 기전에는 수소 결합이 관여되며, 이는 상보적 리보뉴클레오티드 간 왓슨-크릭 수소 결합일 수 있다.

[0123] 본원에서 사용되는 어구 "RNA 분자가 비-인간 유기체 상에서 유해한 효과를 갖는다" 또는 유사한 어구는 분자의 표적 RNA 분자가 비-인간 유기체에 존재하며, 표적 RNA 분자에 대한 표적 RNA 분자를 발현하는 세포의 노출이 RNA 분자가 없는 동일한 세포와 비교되는 경우 표적 RNA 분자의 수준 및/또는 활성을 감소시킴을 의미한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자는 성장, 생식 또는 성장에 중요한 단백질을 인코딩한다. 일례로서, 비-인간 유기체가 작물 해충 또는 병원체, 또는 동물의 해충 또는 병원체인 경우, RNA 분자는 해충 또는 병원체에 의한 섭취, 세포 아폽토시스, 세포 분화 및 발생, 성적 생식 능력 또는 욕구, 근육 형성, 근육 단일수축, 근육 수축, 청소년 호르몬 형성, 청소년 호르몬 조절, 이온 조절 및 수송, 세포막 전위의 유지, 아미노산 생합성, 아미노산

분해, 정자 형성, 페로몬 합성, 페로몬 감지, 더듬이 형성, 날개 형성, 다리 형성, 알 형성, 유충 성숙, 소화 효소 형성, 혈림프 합성, 혈림프 유지, 신경전달, 유충 단계 변이, 번데기화, 번데기화로부터의 우화, 세포 분열, 에너지 대사, 호흡, 키틴 대사, 세포골격 구조의 형성에 대해 유해한 효과를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 비-인간 유기체는 잡초이며 RNA 분자는 아미노산 생합성, 광합성, 지방산 합성, 세포막 온전성, 색소 합성 또는 성장에 대해 유해한 효과를 갖는다.

[0124] 본원에서 사용되는 어구 "RNA 분자가 질병의 적어도 하나의 증상에 대해 유익한 효과를 갖는다" 또는 유사한 어구는 분자의 표적 RNA가 대상체에 존재하며 RNA 분자에 대한 표적 RNA를 발현하는 세포의 노출이 RNA 분자가 없는 동일한 세포와 비교되는 경우 표적 RNA의 수준 및/또는 활성을 감소시킴을 의미한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA는 질병의 존재 하에 역할을 담당하는 단백질을 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 질병은 암 또는 암성 질병, 감염성 질병, 심혈관 질병, 신경학적 질병, 프리온 질병, 염증성 질병, 자가면역 질병, 폐 질병, 신장 질병, 간 질병, 미토콘드리아 질병, 내분비 질병, 생식 관련 질병 및 조건, 및 세포 또는 유기체에서 발현되는 유전자 산물 수준에 반응할 수 있는 임의의 다른 적응증이다.

[0125] 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 대상체에 투여될 수 있다. "대상체", "환자" 또는 "개체"와 같은 용어는 맥락에서, 본 개시와 상호 교환적으로 사용될 수 있는 용어이다. 하나의 예에서, 대상체는 포유류이다. 포유류는 반려 동물, 예컨대 개 또는 고양이, 또는 가축 동물, 예컨대 말 또는 소일 수 있다. 일례에서, 대상체는 인간이다. 예를 들어, 대상체는 성체일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 어린이일 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 청소년일 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 곤충에게 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 식물에 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자 및 이를 포함하는 조성물은 진균 세포 또는 집단에 투여될 수 있다.

[0126] 용어 "및/또는", 예컨대, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 두 의미 모두 또는 어느 하나의 의미에 대한 명시적 지지를 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

[0127] 본원에서 사용되는 용어 약은, 달리 언급되지 않는 한, 명명된 값의 +/- 20%, 보다 바람직하게는 +/- 10%를 나타낸다.

[0128] 본 명세서에 걸쳐 단어 "포함한다(comprise)", 또는 변형, 예컨대 "포함하는(comprises 또는 comprising)"은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 포함을 시사하지만 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계 그룹의 배제는 시사하지 않음이 이해될 것이다.

[0129] RNA 분자

[0130] 소정 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 제2 RNA 성분에 공유 연결되는 제1 RNA 성분을 포함한다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자는 자가-혼성화되거나 폴딩되어 "덤벨" 또는 ledRNA 구조를 형성하며, 예를 들어 도 1을 참고한다. 하나의 구현예에서, 분자는 하기 중 하나 이상을 추가로 포함한다:

[0131] - 제1 및 제2 RNA 성분을 공유 연결하는 연결 리보뉴클레오티드 서열;

[0132] - 5' 리더 서열; 및,

[0133] - 3' 트레일러 서열.

[0134] 하나의 구현예에서, 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 혼성화될 수 있다.

[0135] 또 다른 구현예에서, 제1 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 RNA 분자에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드의 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 RNA 분자에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체와 서열이

동일하다. 이의 일례로서 이들 두 구현예의 제1 RNA 성분을 도 1a의 왼쪽 방향 절반에 또는 도 1b의 오른쪽 방향 절반에 도식적으로 나타낸다.

[0136] 또 다른 구현예에서, 제1 RNA 성분은 제1 5' 리보뉴클레오티드, 제1 RNA 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드로 구성되며, 여기서 제1 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 제1 RNA 성분에서 서로 염기쌍을 형성하고, 제1 RNA 서열은 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제1 루프 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 각각 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드이고 이에 의해 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드는 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드와 전체적으로 염기쌍을 형성하고, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일하다.

[0137] 이러한 구현예에서, 제1 5' 리보뉴클레오티드 및 제1 3' 리보뉴클레오티드 간에 형성되는 염기쌍은 제1 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍인 것으로 간주된다, 즉 이것이 dsRNA 영역의 말단을 정의한다.

[0138] 하나의 구현예에서, 제1 센스 서열은 표적 RNA의 영역과 실질적인 서열 동일성을 가지며, 이 동일성은 20개 미만의 뉴클레오티드 길이의 서열에 대한 것일 수 있다. 하나의 구현예에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 서열이 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 5' 말단으로부터의 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자 영역과 100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하다.

[0139] 하나의 구현예에서 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또한, 상기 구현예에서, 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자 영역과 100% 동일할 수 있고, 나머지 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다.

[0140] 하나의 구현예에서, 제1 안티센스 서열은 표적 RNA 영역의 상보체와 실질적인 서열 동일성을 가지며, 이 동일성은 상보체의 20개 미만의 뉴클레오티드 길이의 서열에 대한 것일 수 있다. 하나의 구현예에서 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 또는 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는 서열이 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는 100% 동일하다. 하나의 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 5' 말단으로부터 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자 영역의 상보체와 100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자의 상보체와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하다.

[0141] 하나의 구현예에서 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역의 상보체는 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또한, 상기 구현예에서, 처음 3개, 처음 4개, 처음 5개, 처음 6개, 또는 처음 7개의 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자 영역의 상보체와

100% 동일하며, 나머지 리보뉴클레오티드는 표적 RNA 분자의 상보체와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 적어도 20개의 인접한 리보뉴클레오티드 및 표적 RNA 분자의 제1 영역은 100% 동일하다.

[0142] 또 다른 구현예에서, 제2 RNA 성분은 5'에서 3' 순서로, 제2 5' 리보뉴클레오티드, 제2 RNA 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드로 구성되며, 여기서 제2 5' 및 3' 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하고, 제2 RNA 서열은 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드의 제2 루프 서열 및 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 센스 리보뉴클레오티드 서열은 제2 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 염기쌍을 형성한다. 이 구현예에서, 제2 5' 리보뉴클레오티드 및 제2 3' 리보뉴클레오티드 간에 형성된 염기쌍은 제2 RNA 성분의 자가-혼성화에 의해 형성되는 dsRNA 영역의 말단부 염기쌍으로 간주된다.

[0143] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 리더 서열, 또는 5' 연장 서열을 포함하며, 이는 전사 시작 부위부터 나머지 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 시작부까지 유전 작제물에서 프로모터로부터의 전사 결과 생성될 수 있다. 상기 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열이 나머지 분자에 비해 상대적으로 짧은 것이 바람직하며, RN아제 처리에 의한 구현예에 있어서, RNA 분자는 전사-후 제거될 수 있다. 5' 리더 서열 또는 5' 연장 서열은 대부분 염기쌍을 형성하지 않을 수 있거나, 하나 이상의 줄기-루프 구조를 함유할 수 있다. 상기 구현예에서, 5' 리더 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제1 5' 리보뉴클레오티드에, 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 100개, 적어도 200개 리보뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 최대 250개 리보뉴클레오티드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 5' 리더 서열은 적어도 50개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 적합한 증폭 반응을 통해 RNA 분자의 증폭을 위한 연장 서열로서 작용할 수 있다. 구현예에 있어서, 연장 서열은 폴리머라제를 통한 증폭을 촉진할 수 있다.

[0144] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 전사 종료 또는 RNA 분자를 인코딩하는 작제물에서의 폴리아데닐화 신호 전까지 계속되는 전사의 결과로 생성될 수 있는 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열을 포함한다. 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열은 폴리A 테일을 포함할 수 있다. 상기 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열이 나머지 분자 대비 상대적으로 짧은 것이 바람직하며, RN아제 처리에 의한 구현예에 있어서, RNA 분자로부터 전사-후 제거될 수 있다. 3' 트레일러 서열 또는 3' 연장 서열은 대부분 염기쌍을 형성하지 않을 수 있거나, 하나 이상의 줄기-루프 구조를 함유할 수 있다. 상기 구현예에서, 3' 트레일러 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제2 3' 리보뉴클레오티드에 또는 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 3' 리더 서열은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 100개, 적어도 200개 리보뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 최대 250개 리보뉴클레오티드 길이이다. 또 다른 구현예에서, 3' 리더 서열은 적어도 50개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 3' 트레일러 서열은 적합한 증폭 반응을 통해 RNA 분자의 증폭을 위한 연장 서열로서 작용할 수 있다. 구현예에 있어서, 연장 서열은 폴리머라제를 통한 증폭을 촉진할 수 있다.

[0145] 하나의 구현예에서, 2개의 리보뉴클레오티드를 제외한 모두가 2개의 다른 뉴클레오티드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 자가-상보적 영역을 가진 단 하나의 RNA 가닥으로 구성되며, 이에 따라 단 하나의 5' 말단부 뉴클레오티드 및 하나의 3' 말단부 뉴클레오티드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 4개의 리보뉴클레오티드를 제외한 모두가 2개의 다른 뉴클레오티드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 혼성화되는 상보적 영역을 갖는 2개의 RNA 가닥으로 구성되며, 이에 따라 단 2개의 5' 말단부 뉴클레오티드 및 2개의 3' 말단부 뉴클레오티드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 각각의 리보뉴클레오티드는 2개의 다른 뉴클레오티드에 공유 연결된다, 즉 RNA 분자는 원형일 뿐만 아니라 자가-상보적 영역을 가지며, 이에 따라 5' 말단부 뉴클레오티드 및 3' 말단부 뉴클레오티드를 갖지 않는다.

[0146] 하나의 구현예에서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 센스 RNA 서열 또는 안티센스 RNA 서열, 또는 둘 다에서 페어링되지 않은 뉴클레오티드로 생성되는 하나 이상의 볼록부를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 일련의 볼록부를 포함한다. 구현예에 있어서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 볼록부를 가질 수 있다. 각각의 볼록부는 독립적으로, 1개 또는 2개 이상의 페어링되지 않은 뉴클레오티드 내지 10개만큼 많은 뉴클레오티드일 수 있다. 더 긴 서열은 dsRNA 영역에서 센스 또는 안티센스 서열에서 루프로 빠져나올 수 있고, 이는 내부적으로 염기쌍을 형성하거나 페어링되지 않은 채 유지될 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자의 이중-가닥 영역은 볼록부를 포함하지 않는다, 즉 dsRNA 영역의 전장에

따라 전체적으로 염기쌍을 형성한다.

[0147] 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열은 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나, 둘 다이다. 또 다른 구현예에서, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 개입 뉴클레오티드가 존재한다. 이러한 개입 뉴클레오티드는 표적 RNA 분자와 서열이 관련되지는 않지만, 인접한 센스 및 안티센스 서열의 염기쌍 형성 안정화를 보조할 수 있는 것으로 이해된다.

[0148] 또 다른 구현예에서, 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열의 20개의 연속 뉴클레오티드는 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되며, 제1 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 20개의 연속 뉴클레오티드는 임의의 개입 뉴클레오티드 없이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 개입 뉴클레오티드가 존재한다. 이러한 개입 뉴클레오티드는 RNA 분자의 이중-가닥 영역의 일부로서 염기쌍을 형성할 수 있지만, 표적 RNA와 서열이 관련되지 않는다. 이들은 이중-가닥 영역에 증가된 안정성을 제공하거나 RNA 분자의 2개 말단을 함께 유지하고 5' 또는 3' 말단, 또는 둘 다가 염기쌍을 형성하지 않은 채 놔두지 않는 것을 보조할 수 있다.

[0149] 하나의 구현예에서, 상기 참조된 제1 및 제2 RNA 성분은 연결 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 제1 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 분자의 다른 성분 간 스페이서로서 작용한다. 예를 들어, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 상기 영역 및 루프 간에 스페이서로서 작용할 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 여러 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 이들 서열 간에 스페이서로서 작용하는 연결 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 실질적으로 동일한 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 리보뉴클레오티드 서열이 RNA 분자에서 제공되며, 각각 연결 리보뉴클레오티드 서열에 의해 다른 서열(들)과 분리된다.

[0150] 하나의 구현예에서, 상기 참조된 RNA 분자는 5' 리더 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 서열은 제2 RNA 성분이 제1 3' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되거나 제2 RNA 성분이 제1 5' 리보뉴클레오티드에 연결되는 경우 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 리보뉴클레오티드 서열로 구성된다. 하나의 구현예에서, RNA 분자는 지질기, 예컨대 콜레스테롤, 또는 비타민, 예컨대 바이오틴, 또는 폴리펩타이드의 부착에 의한 구현예에 있어서, 변형된 5' 또는 3' 말단을 갖는다. 이러한 변형은 RNA가 기능할 진핵 세포 내로의 RNA 분자의 흡수를 보조할 수 있다.

[0151] 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 100개 미만의 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 50개 미만의 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 20개 미만의 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 10개 미만의 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 5개 미만의 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 100개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 50개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 20개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 10개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열은 1개 내지 5개 리보뉴클레오티드 길이이다. 하나의 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열의 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 연결 리보뉴클레오티드 서열의 리보뉴클레오티드는 모두 염기쌍을 형성하거나, 1개, 2개 또는 3개를 제외한 모든 리보뉴클레오티드가 염기쌍을 형성한다.

[0152] 하나의 구현예에서, 제1 또는 제2 RNA 성분은 헤어핀 구조를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 RNA 성분은 각각 헤어핀 구조를 포함한다. 이러한 구현예에서, 헤어핀 구조는 줄기-루프일 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서, RNA 분자는 각각 헤어핀 구조를 포함하는 제1 및 제2 RNA 성분을 포함할 수 있고, 여기서 헤어핀은 링커 서열에 의해 공유 결합된다. 예를 들어, 도 1을 참고한다. 하나의 구현예에서, 링커 서열은 하나 이상의 페어링되지 않은 리보핵산(들)이다. 하나의 구현예에서, 링커 서열은 1개 내지 10개의 페어링되지 않은 리보뉴클레오티드이다.

[0153] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 이중 헤어핀 구조, 즉 "ledRNA 구조" 또는 "덤벨 구조"를 갖는다. 상기 구현예

에서, 제1 헤어핀은 제1 RNA 성분이며 제2 헤어핀은 제2 RNA 성분이다. 이러한 구현예에서, 제1 3' 리보뉴클레오티드 및 제2 5' 리보뉴클레오티드, 또는 제2 3' 리보뉴클레오티드 및 제1 5' 리보뉴클레오티드 중 한 쪽만 공유 연결된다. 상기 구현예에서, 다른 5'/3' 리보뉴클레오티드는 닉에 의해 분리될 수 있다(즉, 5'/3' 리보뉴클레오티드 간 포스포디에스테르 결합이 없는 dsRNA 분자 내 불연속성). 상기 유형 배열의 하나의 구현예를 도 1b에 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 각각의 5'/3' 리보뉴클레오티드는 루프에 의해 분리될 수 있다. 5' 리더 및 3' 트레일러 서열의 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 구현예에 있어서, 5' 리더는 3' 트레일러 서열보다 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 50개, 100개, 200개, 500개 리보뉴클레오티드가 더 길 수 있거나 반대일 수 있다.

[0154] RNA 분자가 이중 헤어핀 구조를 갖는 구현예에서, 제2 헤어핀(제1 헤어핀 구조에 부가하여)은 표적 RNA 분자 영역 또는 그 상보체와 각각 서열이 실질적으로 동일한 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 동일한 표적 RNA 분자의 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오티드를 갖는다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오티드를 갖는다. 하나의 구현예에서, 각각의 헤어핀은 상이한 표적 RNA 분자 영역과 서열이 실질적으로 동일한 일련의 리보뉴클레오티드를 가지며, 즉 RNA 분자는 서열이 관련되지 않을 수 있는 2개의 표적 RNA 분자의 발현 및/또는 활성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0155] RNA 분자의 이중 헤어핀 구조의 각각의 헤어핀에서, 각각의 헤어핀에서의 센스 및 안티센스 RNA 서열의 순서는, 5'에서 3' 순서로, 독립적으로 센스에 이어서 안티센스, 또는 안티센스에 이어 센스일 수 있다. 바람직한 구현예에서, RNA 분자의 이중 헤어핀 구조에서 센스 및 안티센스 서열의 순서는 안티센스-센스-센스-안티센스로서, 2개의 센스 서열이 인접하거나(도 1a), 센스-안티센스-안티센스-센스로서, 2개의 안티센스 서열이 인접해 있다(도 1b).

[0156] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5'에서 3' 순서로, 5' 리더 서열, 제1 루프, 센스 RNA 서열, 제2 루프 및 3' 트레일러 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 5' 및 3' 리더 서열은 센스 가닥에 공유 결합하여 dsRNA 서열을 형성한다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 서로 공유 결합되지 않는다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 닉에 의해 분리된다. 하나의 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 함께 결찰되어 폐쇄된 구조를 갖는 RNA 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 5' 리더 및 3' 트레일러 서열은 루프에 의해 분리된다.

[0157] 용어 "루프"는 본 개시의 맥락에서 사용되어 일련의 비-상보적 리보뉴클레오티드에 의해 형성되는 본원에서 개시되는 RNA 분자에서의 루프 구조를 나타낸다. 루프는 일반적으로 제1 및 제2 RNA 성분 간에 일련의 염기쌍을 뒤따르거나 제1 및 제2 RNA 성분 중 하나 또는 둘 다에서 센스 RNA 서열 및 안티센스 RNA 서열을 연결한다. 하나의 구현예에서, 모든 루프 리보뉴클레오티드는 일반적으로 4개~10개 리보뉴클레오티드의 더 짧은 루프에 있어서, 비-상보적이다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 루프에서의 일부 리보뉴클레오티드는 이들 염기쌍이 루프 구조를 형성할 수 있도록 하는 한, 상보적이며 루프 서열 내에 염기쌍을 형성할 수 있다. 예를 들어, 적어도 5%, 적어도 10%, 또는 적어도 15%의 루프 리보뉴클레오티드는 상보적이다. 루프의 구현예에는 줄기 루프 또는 헤어핀, 슈도노트(pseudoknot) 및 테트라루프가 포함된다.

[0158] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 2개의 루프만을 포함하며, 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개 루프, 바람직하게는 최대 10개 루프를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 4개 루프를 포함할 수 있다.

[0159] 다양한 크기의 루프가 본 개시에 의해 고려된다. 예를 들어, 루프는 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 루프는 15개, 20개, 25개 또는 30개 뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 하나의 또는 모든 루프 서열은 20개 뉴클레오티드보다 길다. 다른 구현예에서, 루프는 더 크며, 예를 들어 50개, 100개, 150개, 200개 또는 300개 리보뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 루프는 160개 리보뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 덜 바람직하게는, 루프가 센스 및 안티센스 RNA 서열의 혼성화를 방해하지 않는 한, 루프는 200개, 500개, 700개 또는 1,000개 리보뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 각각의 루프는 동일한 수의 리보뉴클레오티드를 갖는다. 예를 들어, 루프는 100개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 600개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 4개 내지 1,000개 리보뉴클레오티드를 가질 수 있다. 예를 들어, 루프는 바람직하게는 4개 내지 50개 리보뉴클레오티드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 루프는 상이한 수의 리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0160] 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 루프는 RNA 분자에서 스플라이스되어 나올 수 있는 인트론을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인트론은 식물 유전자로부터 유래된다. 예시적인 인트론에는 옥수수 알코올 탈수소효소 1(Adh 1)의 인트론 3(GenBank: AF044293), 콩 베타-콘글리시닌 알파 서브유닛의 인트론 4(GenBank: AB051865); 리불로스-1,5-비스포스페이트 카복실라제(RBC) 소형 서브유닛에 대한 완두콩 rbcS-3A 유전자의 인트론 중 하나(GenBank: X04333)가 포함된다. 적합한 인트론의 다른 구현예는 문헌(McCullough and Schuler, 1997; Smith et al., 2000)에서 논의된다.

[0161] 다양한 구현예에서, 루프는 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 연속 염기쌍의 말단에 있을 수 있고, 이는 정규 염기쌍일 수 있거나 하나 이상의 비-정규 염기쌍이 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 덜 바람직하게는, 특히 척추동물 세포에 있어서, 루프는 적어도 20개, 30개, 50개, 100개, 200개, 또는 500개 이상의 연속 염기쌍의 말단에 있을 수 있다.

[0162] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 및 이와 전체적으로 염기쌍을 형성한 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이는 각각 표적 RNA 분자 영역과 서열이 동일하다. 예를 들어, RNA 분자는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 또는 12개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 및 이와 전체적으로 염기쌍을 형성한 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 이 센스 리보뉴클레오티드 서열은 각각 독립적으로 표적 RNA 분자 영역과 서열이 동일하다. 상기 구현예에서, 임의의 하나 이상의 또는 모든 서열은 연결 리보뉴클레오티드 서열(들)에 의해 분리될 수 있다. 상기 구현예에서, 임의의 하나 이상의 또는 모든 서열은 루프에 의해 분리될 수 있다.

[0163] 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과 서열이 동일하다. 예를 들어, 서열은 동일한 표적 분자의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개의 영역과 동일할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 서열이 동일하다. 하나의 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 동일한 표적 RNA 분자의 동일한 영역과 서열이 동일하다. 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 상이한 표적 RNA 분자와 서열이 동일하다. 구현예에 있어서, 서열은 상이한 표적 분자의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 영역과 동일할 수 있다.

[0164] 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열은 개입 루프(스페이서) 서열을 갖지 않는다.

[0165] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 5' 말단, 적어도 21개 뉴클레오티드 길이인 적어도 하나의 센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 21개의 인접한 뉴클레오티드에 걸쳐 각각의 센스 리보뉴클레오티드 서열과 전체적으로 염기쌍을 형성하는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열, 적어도 2개의 루프 서열 및 3' 말단을 갖는 단일 가닥의 리보뉴클레오티드를 갖는다. 상기 구현예에서, 5' 말단의 리보뉴클레오티드 및 3' 말단의 리보뉴클레오티드는 직접 공유 결합되지 않지만 염기쌍을 형성한 각각에 인접하여 배치된다.

[0166] 또 다른 구현예에서, RNA 성분의 연속 염기쌍에는 적어도 하나의 갭이 산재된다. 하나의 구현예에서, "갭"은 페어링되지 않은 리보뉴클레오티드에 의해 제공된다. 또 다른 구현예에서, "갭"은 결찰되지 않은 5' 리더 서열 및/또는 3' 트레일러 서열에 의해 제공된다. 상기 구현예에서, 갭은 "결찰되지 않은 갭"으로 언급될 수 있다. 미스매치 및 결찰되지 않은 갭(들)은 RNA 분자의 다양한 위치(들)에 배치될 수 있다. 구현예에 있어서, 결찰되지 않은 갭은 안티센스 서열을 바로 뒤따를 수 있다. 또 다른 구현예에서, 결찰되지 않은 갭은 RNA 분자의 루프에 가까울 수 있다. 또 다른 구현예에서, 결찰되지 않은 갭은 적어도 2개의 루프 사이에 거의 동일 거리에 배치된다.

[0167] 하나의 구현예에서, RNA 분자는 단일 가닥의 RNA로부터 생성된다. 하나의 구현예에서, 단일 가닥은 원형으로 폐쇄되지 않고, 예를 들어, 결찰되지 않은 갭을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 원형으로 폐쇄된 분자이다. 폐쇄된 분자는 결찰되지 않은 갭을 포함하는 상기 참조된 RNA 분자를, 예를 들어 RNA 리가제로 결찰시켜 생성될 수 있다.

[0168] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 5'-연장 서열 또는 3'-연장 서열, 또는 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다.

[0169] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열을 포함한다. 또 다른

구현예에서, RNA 분자는 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열을 포함한다.

[0170] 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0171] - 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열;

[0172] - 제2 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0173] - 제1 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제2 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0174] - 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열;

[0175] - 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열;

[0176] - 제2 5' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 5' 연장 서열 및 제1 3' 리보뉴클레오티드에 공유 연결되는 3' 연장 서열.

[0177] 비-정규 염기쌍 형성

[0178] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 서로 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는, 즉 정규 및 비-정규 염기쌍 형성의 조합을 갖는 이중 가닥(ds) RNA 영역을 형성할 수 있는 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 안티센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 각각 하나의(인접한) 안티센스 리보뉴클레오티드 서열 영역과 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 도 1b를 참고한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 각각 하나의(인접한) 센스 리보뉴클레오티드 서열 영역과 혼성화하여 일부 비-정규 염기쌍을 갖는 dsRNA 영역을 형성할 수 있는 2개 이상의 안티센스 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 도 1a를 참고한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 2개 이상의 안티센스 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 2개 이상의 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 각각의 안티센스 리보뉴클레오티드 서열은 안티센스 리보뉴클레오티드 서열과 혼성화하여 2개 이상의 dsRNA 영역을 형성할 수 있고, 하나 또는 둘 다는 일부 비-정규 염기쌍 형성을 포함한다.

[0179] 하기 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 전장 dsRNA 영역(즉, 전체 dsRNA 영역)은 하나의(인접한) dsRNA 영역만 존재하는 경우 그 특징에 대한, 또는 RNA 분자에 2개 이상의 dsRNA 영역이 존재하는 경우 RNA 분자의 각각의 dsRNA 영역에 대한 맥락으로서 간주된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 5%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 6%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 7%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 8%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 9% 또는 10%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 11% 또는 12%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 15% 또는 약 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 20% 또는 약 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 25% 또는 약 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 적어도 30% 또는 약 30%는 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 40%가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 35%가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍의 최대 30%가 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 덜 바람직하게는, dsRNA 영역에서 염기쌍의 약 35%가 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 보다 덜 바람직하게는, dsRNA 영역에서 염기쌍의 약 40%가 비-정규 염기쌍이다. 각각의 상기 구현예에서, dsRNA 영역은 센스 서열 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다에서, 하나 이상의 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드를 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있다.

[0180] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 40%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 35%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 10% 내지 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영

역에서 염기쌍의 15% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 15% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 15% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 30%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 25%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 20%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 15%는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 염기쌍의 5% 내지 10%는 비-정규 염기쌍이다. 각각의 상기 구현예에서, dsRNA 영역은 센스 서열 또는 안티센스 서열, 또는 둘 다에서, 하나 이상의 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드를 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있다.

[0181] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 20개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 20개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 20개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0182] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 21개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 21개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 21개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 21개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0183] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은

비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 22개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 22개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 22개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 22개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0184] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 23개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 23개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 23개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 23개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0185] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 하나의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 2개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 3개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 4개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 5개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 6개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 7개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 8개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 24개의 인접한 염기쌍을 포함하며, 여기서 24개의 인접한 염기쌍 중 적어도 9개의 염기쌍은 비-정규 염기쌍이다. 각각의 이들 구현예에서, dsRNA 영역에서 24개의 인접한 염기쌍 중 최대 10개가 비-정규 염기쌍인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 9개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 8개가 비-정규 염기쌍이고, 더욱 더 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 7개가 비-정규 염기쌍이고, 가장 바람직하게는 dsRNA 영역에서 염기쌍 중 최대 6개가 비-정규

염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예의 특징은 본 발명의 RNA 분자에 존재하는 각각의 모든 하나하나의 24개의 인접한 염기쌍에 적용된다.

[0186] 하기 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 전장 dsRNA 영역(즉, 전체 dsRNA 영역)은 하나의(인접한) dsRNA 영역만 존재하는 경우 그 특징에 대한, 또는 RNA 분자에 2개 이상의 dsRNA 영역이 존재하는 경우 RNA 분자의 각각의 dsRNA 영역에 대한 맥락으로서 간주된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않고, 즉 20개의 인접한 염기쌍의 모든 하위영역에는 적어도 하나의 비-정규 염기쌍, 바람직하게는 적어도 하나의 G:U 염기쌍이 포함된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 19개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 18개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 17개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 16개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 15개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 14개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 13개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 12개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 11개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 9개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 8개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 7개의 인접한 정규 염기쌍을 포함하지 않는다. 상기 구현예에서, RNA 분자의 dsRNA 영역에서 인접한 정규 염기쌍 형성의 가장 긴 하위영역, 또는 RNA 분자에서 각각의 모든 dsRNA 영역이 5개, 6개 또는 7개의 인접한 정규 염기쌍인 것이, 즉 언급된 더 짧은 길이를 향하는 것이 바람직하다. 상기 구현예의 각각의 특징은 바람직하게는 하기 특징을 가지며 RNA 분자에서 조합된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 바람직한 구현예에서, dsRNA 영역은 12개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 14개 내지 19개 또는 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 이러한 구현예에서, dsRNA 영역은 15개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 16개, 17개, 18개 또는 19개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 20개의 인접한 염기쌍을 포함한다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 인접한 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하는 적어도 하나의 비-정규 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 인접한 염기쌍 영역에서의 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다.

[0187] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 4개의 정규 염기쌍의 하위영역, 즉 4개의 정규 염기쌍의 각 말단에 인접한 적어도 1개의, 바람직하게는 1개 또는 2개의(2개 이하의) 비정규 염기쌍을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 3개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 4개 또는 5개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 6개 또는 7개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 8개 내지 10개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 11개 내지 15개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개 내지 50개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개 내지 40개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개 내지 30개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 4개 정규 염기쌍의 2개 내지 20개의 하위영역을 포함한다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 하위영역에서 인접한 정규 염기쌍이 측면에 있는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 상기 구현예의 변형에서, 일부 또는 모든 하위영역에 있어서, 측면에 있는 비-정규 염기쌍 중 하나 또는 둘 다는 센스 서열, 안티센스 서열 또는 두 서열 모두에서 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드로 대체된다. 상기 구현예에서, 하위영역의 최대 수는 RNA 분자에서 dsRNA 영역의 길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.

[0188] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 5개 정규 염기쌍의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 3개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 4개

또는 5개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 6개 또는 7개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 8개 내지 10개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 11개 내지 15개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 2개 내지 50개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 2개 내지 50개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 2개 내지 30개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 5개 정규 염기쌍의 2개 내지 20개의 하위영역을 포함한다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 하위영역에서 인접한 정규 염기쌍이 측면에 있는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 상기 구현예의 변형에서, 일부 또는 모든 하위영역에 있어서, 측면에 있는 비-정규 염기쌍 중 하나 또는 둘 다는 센스 서열, 안티센스 서열 또는 두 서열 모두에서 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드로 대체된다. 상기 구현예에서, 하위영역의 최대 수는 RNA 분자에서 dsRNA 영역의 길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.

[0189] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 6개 정규 염기쌍의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 3개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 4개 또는 5개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 6개 또는 7개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 8개 내지 10개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 11개 내지 16개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 2개 내지 60개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 2개 내지 60개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 2개 내지 30개의 하위영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 비-정규 염기쌍이 측면에 있는 각각의 6개 정규 염기쌍의 2개 내지 20개의 하위영역을 포함한다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 하위영역에서 인접한 정규 염기쌍이 측면에 있는 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 상기 구현예의 변형에서, 일부 또는 모든 하위영역에 있어서, 측면에 있는 비-정규 염기쌍 중 하나 또는 둘 다는 센스 서열, 안티센스 서열 또는 두 서열 모두에서 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드로 대체된다. 상기 구현예에서, 하위영역의 최대 수는 RNA 분자에서 dsRNA 영역의 길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.

[0190] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개의 인접한 염기쌍의 하위영역을 포함하며, 여기서 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 3개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 4개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 5개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 10개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각 15개의 인접한 염기쌍의 4개의 하위영역을 포함하며, 여기서 15개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 6개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 50개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 40개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 30개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 각각의 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 20개의 하위영역을 포함하며, 여기서 10개의 인접한 염기쌍의 2개 내지 4개는 비-정규 염기쌍이다. 바람직하게는, 상기 구현예에서, 비-정규 염기쌍은 적어도 하나의 G:U 염기쌍을 포함하며, 보다 바람직하게는 하위영역에서 모든 비-정규 염기쌍은 G:U 염기쌍이다. 상기 구

현예의 변형에서, 일부 또는 모든 하위영역에 있어서, 2개 내지 4개 또는 2개 내지 6개의 비-정규 염기쌍 중 하나 이상은 센스 서열, 안티센스 서열 또는 두 서열 모두에서 염기쌍을 형성하지 않은 리보뉴클레오티드로 대체된다. 상기 구현예에서, 하위영역의 최대 수는 RNA 분자에서 dsRNA 영역의 길이에 의해 결정됨이 쉽게 이해된다.

[0191] 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 2.5:1 내지 3.5:1, 예를 들어 약 3:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 3.5:1 내지 4.5:1, 예를 들어 약 4:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 4.5:1 내지 5.5:1, 예를 들어 약 5:1이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역에서 정규 염기쌍 대 비-정규 염기쌍의 비는 5.5:1 내지 6.5:1, 예를 들어 약 6:1이다. RNA 분자에서 상이한 dsRNA 영역은 상이한 비를 가질 수 있다.

[0192] 상기 구현예에서, RNA 분자의 dsRNA 영역(들)에서 비-정규 염기쌍은 바람직하게는 모두 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 99%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 98%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 97%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 95%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 적어도 90%는 G:U 염기쌍이다. 하나의 구현예에서, 비-정규 염기쌍의 90% 내지 95%는 G:U 염기쌍이다. 예를 들어, 10개의 비-정규 염기쌍이 존재하는 경우, 적어도 9개(90%)는 G:U 염기쌍이다.

[0193] 비-정규 염기쌍 형성(들)을 포함하는 dsRNA 영역은 안티센스 조절 요소로 작용하는 20개의 인접한 뉴클레오티드의 안티센스 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 안티센스 조절 요소는 진핵 세포에서 표적 RNA 분자와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 또는 가장 바람직하게는 100% 상보적이다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 동일한 표적 RNA 분자와(즉, 동일한 표적 RNA 분자의 상이한 영역과) 상보적이거나 상이한 표적 RNA 분자와 상보적인 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 안티센스 조절 요소를 포함한다.

[0194] 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드 또는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 리보뉴클레오티드, 또는 둘 다는 센스 및 안티센스 서열이 혼성화되는 경우 dsRNA 영역에서 염기쌍을 형성하지 않는다. 상기 구현예에서, dsRNA 영역에는 센스 및 안티센스 서열을 공유 결합시키는 임의의 루프 서열이 포함되지 않는다. dsRNA 영역 또는 하위영역의 하나 이상의 리보뉴클레오티드는 염기쌍을 형성하지 않을 수 있다. 따라서, 상기 구현예에서, dsRNA 영역의 센스 가닥은 그 대응하는 안티센스 가닥과 전체적으로 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0195] 또한, 하나의 구현예에서 그리고 선택적으로 상기 구현예의 임의의 특징과 조합되어, 센스 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수 및 안티센스 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수는 바람직하게는 동일하지만, 동일하지 않을 수 있다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역의 센스 리보뉴클레오티드 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수의 90% 내지 110%이다. 하나의 구현예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수는 안티센스 리보뉴클레오티드 서열(들)에서 리보뉴클레오티드의 총 수의 95% 내지 105%이다. 하나의 구현예에서, 본 개시의 키메라 RNA 분자는 하나 이상의 구조적 요소, 예컨대 내부 또는 말단부 볼록부 또는 루프를 포함할 수 있다. 볼록부 및 루프의 다양한 구현예는 위에서 논의된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 구조적 요소, 예컨대 볼록부 또는 루프에 의해 분리된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 개입(스페이서) 서열에 의해 분리된다. 스페이서 서열의 일부 리보뉴클레오티드는 mRNA 분자에서 다른 리보뉴클레오티드와, 예를 들어 스페이서 서열 내에서 다른 리보뉴클레오티드와 염기쌍을 형성할 수 있거나, 이들은 RNA 분자에서 염기쌍을 형성하지 않거나, 각각이 일부씩 있을 수 있다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 말단부 루프에 연결된다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 말단부 루프가 측면에 있다.

[0196] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자의 dsRNA 영역이 5개의 인접한 염기쌍의 임의의 하위영역에 적어도 3개의 비-정규 염기쌍을 갖는 경우, 비-정규 염기쌍은 인접하지 않고 하나 이상의 정규 염기쌍에 의해 분리되며, 즉 dsRNA 영역은 3개 이상의 인접한 비-정규 염기쌍을 갖지 않는다. 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 4개 이상의 인접한 비-정규 염기쌍을 갖지 않는다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, dsRNA 영역은 10개 염기쌍의 하위영역에 적어도 3개의 비-정규 염기쌍을 포함하며, 여기서 각각의 비-정규 염기쌍은 4개의 정규 염기쌍에 의해 분리된다.

[0197] 하나의 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 1개를 초과하는 dsRNA 영역을 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 dsRNA 영역을 포함한다. 상기 예에서, 하나 이상의 또는 모든 dsRNA 영역은 상기 예시된 특성, 예컨대 비-정규 염기쌍 형성 및/또는 안티센스 조절 요소의 수를 포함할

수 있다.

[0198] 침묵화 활성

[0199] 본 개시의 RNA 분자는 표적 RNA 분자의 영역과 본질적으로 상보적인 센스 리보뉴클레오티드 서열을 포함하는 한, 안티센스 활성을 갖는다. 예를 들어, 리보뉴클레오티드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 영역과 본질적으로 상보적이다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 박테리아 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포에 있을 수 있다. 본원에서 정의되는 RNA 분자의 이러한 성분은 "안티센스 조절 요소"로 언급될 수 있다. "본질적으로 상보적"이란 센스 리보뉴클레오티드 서열이 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 상보체와 대비되어 삽입, 결실 및 개별 점 돌연변이를 가질 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, 안티센스 활성을 갖는 센스 리보뉴클레오티드 서열 및 표적 RNA 분자 간에, 상동성은 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 100%이다. 예를 들어, 센스 리보뉴클레오티드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 동일한 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 또는 약 19개 이상의 인접한 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 센스 리보뉴클레오티드 서열은 진핵 세포에서 표적 RNA 분자의 제1 영역과 서열이 동일한 약 20개의 인접한 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0200] "안티센스 활성"은 본 개시의 맥락에서 사용되어 표적 RNA 분자의 발현을 조절하는(증가시키거나 감소시키는) 본원에서 정의되는 RNA 분자로부터의 안티센스 조절 요소를 나타낸다.

[0201] 다양한 예에서, 본 개시에 따른 안티센스 조절 요소는 연결기에 의해 함께 연결된 복수의 단량체 서브유닛을 포함할 수 있다. 예에는 프라이머, 탐침, 안티센스 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 외부 가이드 서열(EGS) 올리고뉴클레오티드, 대체 스플라이서, 갭머(gapmer), siRNA 및 마이크로RNA가 포함된다. 이와 같이, 본 개시에 따른 RNA 분자는 단일-가닥, 이중-가닥, 원형, 분기형 또는 헤어핀 구조를 갖는 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 서열은 구조적 요소, 예컨대 내부 또는 말단부 볼록부 또는 루프를 함유할 수 있다.

[0202] 하나의 예에서, 본 개시의 RNA 분자는 키메라 올리고머 성분, 예컨대 키메라 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, RNA 분자는 상이하게 변형된 뉴클레오티드, 혼합-골격 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 키메라 올리고머 화합물은 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 및/또는 표적 RNA 분자에 대해 증가된 결합 친화도를 부여하기 위해 변형된 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다.

[0203] 안티센스 조절 요소는 다양한 길이를 가질 수 있다. 다양한 예에 걸쳐, 본 개시는 X-Y 연결 염기로 구성되는 안티센스 조절 요소를 제공하며, 여기서 X 및 Y는 각각 독립적으로 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, 및 50으로부터 선택된다(단, X < Y). 예를 들어, 소정 구현예에서, 본 개시는 8~9개, 8~10개, 8~11개, 8~12개, 8~13개, 8~14개, 8~15개, 8~16개, 8~17개, 8~18개, 8~19개, 8~20개, 8~21개, 8~22개, 8~23개, 8~24개, 8~25개, 8~26개, 8~27개, 8~28개, 8~29개, 8~30개, 9~10개, 9~11개, 9~12개, 9~13개, 9~14개, 9~15개, 9~16개, 9~17개, 9~18개, 9~19개, 9~20개, 9~21개, 9~22개, 9~23개, 9~24개, 9~25개, 9~26개, 9~27개, 9~28개, 9~29개, 9~30개, 10~11개, 10~12개, 10~13개, 10~14개, 10~15개, 10~16개, 10~17개, 10~18개, 10~19개, 10~20개, 10~21개, 10~22개, 10~23개, 10~24개, 10~25개, 10~26개, 10~27개, 10~28개, 10~29개, 10~30개, 11~12개, 11~13개, 11~14개, 11~15개, 11~16개, 11~17개, 11~18개, 11~19개, 11~20개, 11~21개, 11~22개, 11~23개, 11~24개, 11~25개, 11~26개, 11~27개, 11~28개, 11~29개, 11~30개, 12~13개, 12~14개, 12~15개, 12~16개, 12~17개, 12~18개, 12~19개, 12~20개, 12~21개, 12~22개, 12~23개, 12~24개, 12~25개, 12~26개, 12~27개, 12~28개, 12~29개, 12~30개, 13~14개, 13~15개, 13~16개, 13~17개, 13~18개, 13~19개, 13~20개, 13~21개, 13~22개, 13~23개, 13~24개, 13~25개, 13~26개, 13~27개, 13~28개, 13~29개, 13~30개, 14~15개, 14~16개, 14~17개, 14~18개, 14~19개, 14~20개, 14~21개, 14~22개, 14~23개, 14~24개, 14~25개, 14~26개, 14~27개, 14~28개, 14~29개, 14~30개, 15~16개, 15~17개, 15~18개, 15~19개, 15~20개, 15~21개, 15~22개, 15~23개, 15~24개, 15~25개, 15~26개, 15~27개, 15~28개, 15~29개, 15~30개, 16~17개, 16~18개, 16~19개, 16~20개, 16~21개, 16~22개, 16~23개, 16~24개, 16~25개, 16~26개, 16~27개, 16~28개, 16~29개, 16~30개, 17~18개, 17~19개, 17~20개, 17~21개, 17~22개, 17~23개, 17~24개, 17~25개, 17~26개, 17~27개, 17~28개, 17~29개, 17~30개, 18~19개, 18~20개, 18~21개, 18~22개, 18~23개, 18~24개, 18~25개, 18~26개, 18~27개, 18~28개, 18~29개, 18~30개, 19~20개, 19~21개, 19~22개, 19~23개, 19~24개, 19~25개, 19~26개, 19~29개, 19~28개, 19~29개, 19~30개, 20~21개, 20~22개, 20~23개, 20개 내지 24개, 20~25개, 20~26개, 20~27

개, 20~28개, 20~29개, 20~30개, 21~22개, 21~23개, 21~24개, 21~25개, 21~26개, 21~27개, 21~28개, 21~29개, 21~30개, 22~23개, 22~24개, 22~25개, 22~26개, 22~27개, 22~28개, 22~29개, 22~30개, 23~24개, 23~25개, 23~26개, 23~27개, 23~28개, 23~29개, 23~30개, 24~25개, 24~26개, 24~27개, 24~28개, 24~29개, 24~30개, 25~26개, 25~27개, 25~28개, 25~29개, 25~30개, 26~27개, 26~28개, 26~29개, 26~30개, 27~28개, 27~29개, 27~30개, 28~29개, 28~30개, 또는 29~30개의 연결된 염기를 포함하는 안티센스 조절 요소를 제공한다.

[0204] 본 개시에 따른 RNA 분자는 여러 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 안티센스 조절 요소는 동일하다. 상기 예에서, RNA 분자는 적어도 2카피, 적어도 3카피, 적어도 4카피, 적어도 5카피, 적어도 6카피, 적어도 7카피, 적어도 8카피, 적어도 9카피, 적어도 10카피의 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 상이한 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 조절 요소는 경로, 예컨대 지질 생합성에서 여러 유전자를 표적화하기 위해 제공될 수 있다. 상기 예에서, RNA 분자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개의 상이한 안티센스 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0205] 본 개시에 따른 안티센스 조절 요소는 다양한 표적 RNA 분자의 발현 또는 양을 조절할(증가시키거나 감소시킬) 수 있다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 지방산 생합성 유전자이다. 이러한 유전자의 예에는 아세틸 트랜스아실라제, 아실 수송 단백질("아실 캐리어 단백질"), 탈포화효소, 예컨대 스테아릴 탈포화효소 또는 마이크로솜 D12-탈포화효소, 특히 Fad2-1 유전자, 말로닐 트랜스아실라제, -케토아실-ACP 합성효소, 3-케토-ACP 환원효소, 에노일-ACP 하이드롤라제, 티오에스터라제, 예컨대 아실-ACP 티오에스터라제, 에노일-ACP 환원효소를 인코딩하는 유전자가 포함된다. 하나의 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2 유전자(예를 들어 Genbank 접근 번호: AF124360(브라시카 카리나타(*Brassica carinata*)), AF042841(브라시카 라파(*Brassica rapa*)), L26296(아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)), A65102(코릴러스 아벨라나(*Corylus avellana*))으로 기재된 것들)이다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 FAD2.1 유전자일 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2.2 유전자일 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 FAD2.1 및 FAD2.2 유전자일 수 있다. 표적 RNA 분자일 수 있는 지질 조성의 변형에 관여되는 다른 유전자의 예는 당분야에 알려져 있다(Shure M et al. (1983) Cell 35:225-233; Preiss et al. (1987) Tailoring Genes for Crop Improvement (Bruening et al., eds.), Plenum Press, S.133-152; Gupta et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10:215-224; Olive et al. (1989) Plant Mol Biol 12:525-538; Bhattacharyya et al. (1990) Cell 60:155-122; Dunwell J M(2000) J Exp Botany 51Spec No:487-96; Brar D S et al. (1996) Biotech Genet. Eng Rev 13:167-79; Kishore G M and Somerville C R (1993) Curr Opin Biotech 4(2):152-8; US 5,530,192 및 WO 94/18337).

[0206] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 절지동물 유전자, 예컨대 곤충 유전자 전사체이다. 이러한 유전자의 예에는 키틴 신타아제 유전자, 예컨대 CHS1 및/또는 CHS2 또는 곤충 활성, 행동, 생식, 성장 및/또는 발생을 제어하는 다른 유전자가 포함된다. 다양한 병원체의 다양한 필수 유전자는 당업자에게 알려져 있다(예를 들어 선충 내성 유전자는 WO 93/10251, WO 94/17194에 요약되어 있음).

[0207] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 질병과 연관된다. 예를 들어, 표적 RNA 분자는 종양유전자 또는 종양 억제인자 유전자 전사체일 수 있다. 예시적인 종양유전자에는 ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, FGR, FOS, FYN, HRAS, JUN, LCK, LYN, MYB, MYC, NRAS, RET 또는 SRC가 포함된다. 예시적인 종양 억제인자 유전자에는 BRCA1 또는 BRCA2; 부착 분자; 사이클린 키나제 및 이의 억제제가 포함된다.

[0208] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 과실 성숙의 지연과 연관된다. 지연된 과실 성숙은, 예를 들어 폴리갈락투로나제, 펙틴 에스터라제, β-(1-4)글루카나제(셀룰라제), β-갈락타나제(β-갈락토시다제), 또는 에틸렌 생합성 유전자, 예컨대 1-아미노사이클로프로판-1-카복실레이트 신타아제, 카로티노이드 생합성 유전자, 예컨대, 프레피토엔 또는 피토엔 생합성 유전자, 예를 들어 피토엔 탈포화효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자의 유전자 발현을 감소시킴으로써 달성될 수 있다.

[0209] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 노화 증상의 지연과 연관된다. 적합한 표적 RNA 분자에는 신나모일-CoA:NADPH 환원효소 또는 신나모일 알코올 탈수소효소가 포함된다. 추가 표적 RNA 분자가 기재되어 있다(WO 1995/07993에).

[0210] 또 다른 예에서, 표적 RNA 분자는 식품, 바람직하게는 종자에서 섬유 함량의 변형과 연관된다. 예를 들어, RNA 분자는 코페산 O-메틸트랜스퍼라제 또는 신나모일 알코올 탈수소효소의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0211] RNA 분자를 인코딩하는 핵산

[0212] 당업자는 상기 기재로부터 본 개시가 또한 본원에서 개시된 RNA 분자를 인코딩하는 단리된 핵산 및 이의 성분 부분을 제공함을 이해할 것이다. 예를 들어, 핵산은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 중 임의의 하나 이상에 나타낸 서열을 포함한다. 핵산은 숙주 세포에서의 발현 후 부분적으로 정제될 수 있다. 용어 "부분적으로 정제된"은 일반적으로 지질, 핵산, 다른 펩타이드, 및 숙주 세포에서 연관되는 다른 오염 분자와 분리된 RNA 분자를 나타내기 위해 사용된다. 바람직하게는, 부분적으로 정제된 폴리뉴클레오티드는 연관되는 다른 성분이 적어도 60% 없고, 보다 바람직하게는 적어도 75% 없고, 보다 바람직하게는 적어도 90% 없다.

[0213] 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 폴리뉴클레오티드는 이종성 폴리뉴클레오티드이다. 용어 "이종성 폴리뉴클레오티드"는 당분야에서 잘 이해되며, 세포에 내인성이 아닌 폴리뉴클레오티드를 나타내거나, 천연 서열이 변경된 천연 폴리뉴클레오티드, 또는 그 발현이 재조합 DNA 기법에 의한 세포의 조작 결과 정량적으로 변경되는 천연 폴리펩타이드이다.

[0214] 또 다른 예에서, 본 개시에 따른 폴리뉴클레오티드는 합성 폴리뉴클레오티드이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 기존 핵산 서열을 필요로 하지 않는 기법, 예컨대 DNA 프린팅 및 올리고뉴클레오티드 합성을 사용하여 생성될 수 있다. 또 다른 예에서, 폴리뉴클레오티드는 이종(xeno) 핵산으로부터 생성된다.

[0215] 하나의 예에서, 본원에서 개시된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드의 전사 동안 스플라이스되어 나올 수 있는 적어도 하나의 루프 서열에 인트론을 포함하는 RNA 전구체 분자를 인코딩한다. 또 다른 예에서, 루프 서열은 2개, 3개, 4개, 또는 5개 이상의 인트론을 포함한다. 본 개시는 또한 발현 작제물, 예컨대 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 개시의 단리된 핵산을 포함하는 DNA 작제물을 제공한다. 하나의 예에서, 이러한 단리된 핵산 및/또는 발현 작제물은 세포 또는 비-인간 유기체에서 제공된다. 하나의 예에서 단리된 핵산은 세포 또는 비-인간 유기체의 게놈 내로 안정적으로 통합된다. 적합한 발현 작제물, 프로모터 및 이를 포함하는 세포의 다양한 예가 아래에서 논의된다.

[0216] 본 개시에 따른 RNA 분자의 합성은 당분야에 알려진 다양한 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 실시예 섹션은 시험관내 합성예를 제공한다. 상기 예에서, 본원에서 개시되는 RNA 분자를 포함하는 작제물은 3' 말단에서 제한효소로 절단되고, 침전되고, 정제되고, 정량된다. RNA 합성은 T7, IPTG 시스템을 사용하여 HT115 전기천공 적격 세포의 형질전환 및 RNA 합성의 유도 후 박테리아 배양에서 달성될 수 있다.

[0217] 재조합 벡터

[0218] 본 발명의 하나의 구현예에는 재조합 벡터가 포함되며, 이는 본원에서 정의되는 적어도 하나의 RNA 분자를 포함하며 RNA 분자를 숙주 세포 내로 전달할 수 있다. 재조합 벡터에는 발현 벡터가 포함된다. 재조합 벡터는 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 즉, 본원에서 정의되는 RNA 분자에 자연적으로 인접해서 확인되지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하며, 이는 바람직하게는 상이한 종으로부터 유래된다. 벡터는 RNA 또는 DNA일 수 있고, 전형적으로 바이러스로부터 유래되는 바이러스 벡터, 또는 플라스미드이다.

[0219] 다양한 바이러스 벡터가 본 개시에 따라 RNA 분자를 전달하고 발현을 매개하기 위해 사용될 수 있다. 바이러스 벡터의 선택은 일반적으로 다양한 파라미터, 예컨대 전달을 위해 표적화된 세포 또는 조직, 벡터의 형질도입 효율 및 병원성에 의존할 것이다. 하나의 예에서, 바이러스 벡터는 숙주 세포 염색질 내로 통합된다(예컨대 렌티바이러스). 또 다른 예에서, 바이러스 벡터는 우선적으로 염색체외 에피좀으로 세포 핵에서 지속된다(예컨대 아데노바이러스). 이들 유형의 바이러스 벡터의 예에는 종양레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노-연관 바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스 및 레트로바이러스가 포함된다.

[0220] 플라스미드 벡터에는 전형적으로 용이한 선택, 증폭, 및 원핵 세포에서 발현 카세트의 형질전환을 제공하는 추가적인 핵산 서열, 예컨대, pUC-유래 벡터, pGEM-유래 벡터 또는 하나 이상의 T-DNA 영역을 함유하는 이원성 벡터가 포함된다. 추가적인 핵산 서열에는 벡터의 자율 복제를 제공하기 위한 복제 기원, 바람직하게는 항생제 또는 제초제 내성을 인코딩하는, 선별 마커 유전자, 핵산 작제물에서 인코딩되는 핵산 서열 또는 유전자를 삽입하기 위한 여러 부위를 제공하는 고유한 다중 클로닝 부위, 및 원핵 및 진핵(특히 식물) 세포의 형질전환을 증강시키는 서열이 포함된다.

[0221] 본원에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 핵산(예컨대, DNA) 절편 간 기능적 상관관계를 나타낸다. 전형적으로, 이는 전사 조절 요소(프로모터)의 전사된 서열에 대한 기능적 상관관계를 나타낸다. 예를

들어, 프로모터는 이것이 적절한 세포에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우, 본원에서 정의되는 RNA 분자의 코딩 서열과 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 전사되는 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 전사 조절 요소는 전사되는 서열에 물리적으로 인접하며, 즉 이들은 시스 작용한다. 그러나, 일부 전사 조절 요소, 예컨대 인핸서는 이들이 전사를 증강시키는 코딩 서열에 물리적으로 인접하거나 가까운 인근에 배치될 필요는 없다.

[0222] 여러 프로모터가 존재하는 경우, 각각의 프로모터는 독립적으로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0223] 형질전환체의 확인을 촉진하기 위해, 재조합 벡터는 바람직하게는 선별 또는 스크리닝 가능한 마커 유전자를 포함한다. "마커 유전자"란 마커 유전자를 발현하는 세포에 독특한 표현형을 부여하며, 이에 따라 이러한 형질전환된 세포가 마커를 갖지 않는 세포와 구별될 수 있도록 하는 유전자를 의미한다. 선별 마커 유전자는 선택 제제(예컨대, 제초제, 항생제)에 대한 내성에 기반하여 "선택할" 수 있는 형질을 부여한다. 스크리닝 가능한 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 평가를 통해, 즉 "스크리닝"에 의해 확인할 수 있는 형질(예컨대, 형질전환되지 않은 세포에 존재하지 않는 β-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, GFP 또는 다른 효소 활성)을 부여한다. 식물 형질전환체의 선택을 위한 예시적인 선별 마커에는 비제한적으로 하이그로마이신 B 내성을 인코딩하는 *hyg* 유전자; 카나마이신, 파로모마이신에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(*nptII*) 유전자; 예를 들어, EP 256223에 기재된 바와 같이, 글루타치온 유래 제초제에 대한 내성을 부여하는 래트 간으로부터의 글루타치온-S-트랜스퍼라제 유전자; 예를 들어, WO 87/05327에 기재된 바와 같은, 과발현 시, 글루타민 합성효소 억제제, 예컨대 포스피노트리신에 대한 내성을 부여하는 글루타민 합성효소 유전자; 예를 들어, EP 275957에 기재된 바와 같은, 선택 제제 포스피노트리신에 대한 내성을 부여하는 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*)로부터의 아세틸트랜스퍼라제 유전자; 예를 들어, 문헌[Hinchee et al. (1988)]에 기재된 바와 같은, N-포스포노메틸글리신에 대한 내성을 부여하는 5-에놀시키메이트-3-포스페이트 신타아제(EPSPS)를 인코딩하는 유전자; 예를 들어, WO91/02071에 기재된 바와 같은 비알라포스에 대한 내성을 부여하는 *bar* 유전자; 니트릴라제 유전자, 예컨대 브로목시닐에 대한 내성을 부여하는 클레브시엘라 오재내(*Klebsiella ozaenae*)로부터의 *bxn*(Stalker et al., 1988); 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자(Thillet et al., 1988); 이미다졸리논, 설포닐우레아, 또는 다른 ALS-억제 화학물질에 대한 내성을 부여하는 돌연변이체 아세토락테이트 신타아제 유전자(ALS)(EP 154,204); 5-메틸 트립토판에 대한 내성을 부여하는 돌연변이된 안트라닐레이트 신타아제 유전자; 또는 제초제에 대한 내성을 부여하는 달라폰 데할로게나제 유전자가 포함된다.

[0224] 바람직하게는, 재조합 벡터는 세포, 예컨대 식물 세포의 게놈 내로 안정적으로 포함된다. 따라서, 재조합 벡터는 벡터가 게놈 내로, 또는 세포의 염색체 내로 포함될 수 있도록 하는 적절한 요소를 포함할 수 있다.

[0225] 발현 벡터

[0226] 본원에서 사용되는 "발현 벡터"는 숙주 세포를 형질전환하고 본원에서 정의되는 RNA 분자의 발현을 일으킬 수 있는 DNA 벡터이다. 본 발명의 발현 벡터는 조절 서열, 예컨대 전사 제어 서열, 번역 제어 서열, 복제 기원, 및 숙주 세포와 상용성이고 본 개시에 따른 RNA 분자의 발현을 제어하는 다른 조절 서열을 함유한다. 특히, 본 발명의 발현 벡터에는 전사 제어 서열이 포함된다. 전사 제어 서열은 전사의 개시, 신장, 및 종결을 제어하는 서열이다. 특히 중요한 전사 제어 서열은 전사 개시를 제어하는 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터 및 리프레서 서열이다. 사용되는 조절 서열의 선택은 표적 유기체, 예컨대 관심 식물 및/또는 표적 기관 또는 조직에 의존한다. 이러한 조절 서열은 임의의 진핵 유기체, 예컨대 식물 또는 식물 바이러스로부터 수득될 수 있거나, 화학적으로 합성될 수 있다.

[0227] 식물 세포의 안정한 전달감염에 또는 트랜스제닉 식물의 확립에 적합한 예시적인 벡터는, 예를 들어 문헌[Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989, 및 Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990]에 기재되었다. 전형적으로, 식물 발현 벡터에는, 예를 들어, 5' 및 3' 조절 서열의 전사 제어 하의 하나 이상의 클로닝된 식물 유전자 및 우성 선별 마커가 포함된다. 이러한 식물 발현 벡터는 또한 프로모터 조절 영역(예컨대, 유도성 또는 구성적, 환경적으로 또는 발생학적으로 조절되는, 또는 세포-특이적 또는 조직-특이적 발현을 제어하는 조절 영역), 전사 개시 시작 부위, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 부위, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다.

[0228] 본 발명의 벡터는 또한 무세포 발현 시스템에서 본원에서 정의되는 RNA 분자를 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이러한 시스템은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0229] 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 RNA 분자를 직접 발현할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 예에서, 프로모터는 시험관내에서 기능한다. 하나의 예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 프로모터이다. 예를 들어, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터일 수 있다. 또 다른 예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 II 프로모터일 수 있다. 그러나, 프로모터의 선택은 표적 유기체, 예컨대 관심 식물, 곤충 및/또는 표적 기관 또는 조직에 의존할 수 있다. 예시적인 포유류 프로모터에는 CMV, EF1a, SV40, PGK1, Ubc, 인간 베타 액틴, CAG, TRE, UAS, CaMKIIa, CAL1, 10, TEF1, GDS, ADH1, CaMV35S, Ubi, H1 및 U6이 포함된다. 예시적인 곤충 프로모터에는 Ac5 및 폴리헤드론이 포함된다. 식물 세포에서 활성이 있는 여러 구성적 프로모터가 또한 기재되었다. 식물에서의 구성적 발현에 적합한 프로모터에는 비제한적으로 컬리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 현삼(Figwort) 모자이크 바이러스(FMV) 35S, 리불로스-1,5-비스-포스페이트 카복실라제의 작은 서브유닛(SSU)으로부터의 광-유도성 프로모터, 쌀 세포질 트리오스포스페이트 이소머라제 프로모터, 아라비돕시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 프로모터, 쌀 액틴 1 유전자 프로모터, 만노핀 신타아제 및 옥토핀 신타아제 프로모터, Adh 프로모터, 수크로스 신타아제 프로모터, R 유전자 복합체 프로모터, 및 엽록소 α/β 결합 단백질 유전자 프로모터가 포함된다. 이들 프로모터는 식물에서 발현된 DNA 벡터를 생성하기 위해 사용되었으며, 예를 들어, WO 84/02913을 참고한다. 이들 프로모터는 모두 다양한 유형의 식물-발현 가능 재조합 DNA 벡터를 생성하기 위해 사용되었다.

[0230] 식물의 원천 조직, 예컨대, 잎, 종자, 뿌리 또는 줄기에서의 발현 목적을 위해, 본 발명에서 이용되는 프로모터가 이들 특정 조직에서 상대적으로 고발현되는 것이 바람직하다. 상기 목적을 위해, 조직 또는 세포에 특이적이거나 여기서 증강되는 발현을 갖는 유전자에 대한 여러 프로모터로부터 선택할 수 있다. 문헌에서 보고되는 이러한 프로모터의 예에는 완두콩으로부터의 엽록체 글루타민 합성효소 GS2 프로모터, 밀로부터의 엽록체 프룩토스-1,6-바이포스파타제 프로모터, 감자로부터의 핵 광합성 ST-LS1 프로모터, 아라비돕시스 탈리아나로부터의 세린/트레오닌 키나제 프로모터 및 글루코아밀라제(CHS) 프로모터가 포함된다. 동양 낙엽송(라릭스 라리시나(*Larix laricina*))으로부터의 리불로스-1,5-비스포스페이트 카복실라제 프로모터, Cab 유전자, 소나무로부터의 Cab6에 대한 프로모터, 밀로부터 Cab-1 유전자에 대한 프로모터, 시금치로부터 Cab-1 유전자에 대한 프로모터, 쌀로부터의 Cab 1R 유전자에 대한 프로모터, 옥수수(*Zea mays*)로부터의 피루베이트, 오르소포스페이트 디키나제(PPDK) 프로모터, 담배 Lhcb1*2 유전자에 대한 프로모터, 아라비돕시스 탈리아나 Suc2 수크로스-H^{30} 심포터 프로모터, 및 시금치로부터 틸라코이드 막 단백질 유전자(PsaD, PsaF, PsaE, PC, FNR, AtpC, AtpD, Cab, RbcS)에 대한 프로모터가 또한 광합성 활성 조직에서 활성이 있는 것으로 보고된다. 엽록소 α/β-결합 단백질에 대한 다른 프로모터, 예컨대 백겨자(시나피스 알바(*Sinapis alba*))로부터의 LhcB 유전자 및 PsbP 유전자에 대한 프로모터가 또한 본 발명에서 이용될 수 있다.

[0231] (1) 열, (2) 빛(예컨대, 완두콩 RbcS-3A 프로모터, 옥수수 RbcS 프로모터), (3) 호르몬, 예컨대 아브시스산, (4) 상처(예컨대, WunI), 또는 (5) 화학물질, 예컨대 메틸 자스모네이트, 살리실산, 스테로이드 호르몬, 알코올, 독성완화제(WO 97/06269)에 의해 조절되는 프로모터를 포함하는 환경, 호르몬, 화학물질, 및/또는 발생 신호에 반응하여 조절되는 다양한 식물 유전자 프로모터가 또한 식물 세포에서 RNA-결합 단백질 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있거나, 또한 유리하게는 (6) 기관-특이적 프로모터를 채택할 수 있다

[0232] 본원에서 사용되는 용어 "식물 저장 기관 특이적 프로모터"는 다른 식물 조직과 비교되는 경우, 우선적으로 식물의 저장 기관에서 유전자 전사를 유도하는 프로모터를 나타낸다. 식물의 싱크(sink) 조직, 예컨대 감자 식물의 덩이줄기, 토마토의 과실, 또는 대두, 유채, 목화, 옥수수, 밀, 쌀, 및 보리의 종자에서의 발현 목적을 위해, 본 발명에서 이용되는 프로모터가 이들 특정 조직에서 상대적으로 고발현되는 것이 바람직하다. β-콘글리시닌에 대한 프로모터 또는 다른 종자-특이적 프로모터, 예컨대 나핀, 제인, 리닌 및 파세올린 프로모터가 사용될 수 있다. 뿌리 특이적 프로모터가 또한 사용될 수 있다. 이러한 프로모터의 일례는 산 키티나제 유전자에 대한 프로모터이다. 뿌리 조직에서의 발현은 또한 확인된 CaMV 35S 프로모터의 뿌리 특이적 하위도메인을 이용하여 달성될 수 있었다.

[0233] 특히 바람직한 구현예에서, 프로모터는 지질 생합성이 일어나는 조직 및 기관에서의 발현을 유도한다. 이러한 프로모터는 종자에서 지질 조성의 변형에 적합한 시간에 종자 발생에서 작용할 수 있다. 종자-특이적 발현을 위해 바람직한 프로모터에는 1) 종자에서 지질 생합성 및 축적에 관여되는 효소, 예컨대 탈포화효소 및 신장효소를 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터, 2) 종자 저장 단백질을 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터, 및 3) 종자에서 탄수화물 생합성 및 축적에 관여되는 효소를 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터가 포함된다. 적합한 종자 특이적 프로모터는 지방종자 평지 나핀 유전자 프로모터(US 5,608,152), 비시아 파바(*Vicia faba*) USP 프로모터(Baumlein et al., 1991), 아라비돕시스 올레오신 프로모터(WO 98/45461), 파세올루스 불가리스

(*Phaseolus vulgaris*) 파세올린 프로모터(US 5,504,200), 브라시카(*Brassica*) Bce4 프로모터(WO 91/13980), 또는 레구민 B4 프로모터(Baumlein et al., 1992), 및 외떡잎 식물, 예컨대 옥수수, 보리, 밀, 호밀, 쌀 등에서 종자-특이적 발현을 야기하는 프로모터이다. 적합한 주목할만한 프로모터는 보리 lpt2 또는 lpt1 유전자 프로모터(WO 95/15389 및 WO 95/23230), 또는 WO 99/16890에 기재된 프로모터(보리 호르데인(hordein) 유전자, 쌀 글루텔린(glutelin) 유전자, 쌀 오리진(oryzin) 유전자, 쌀 프롤라민(prolamin) 유전자, 밀 글리아딘(gliadin) 유전자, 밀 글루텔린(glutelin) 유전자, 옥수수 제인(zein) 유전자, 귀리 글루텔린 유전자, 수수 카시린(kasirin) 유전자, 호밀 세칼린(secalin) 유전자로부터의 프로모터)이다. 다른 프로모터에는 문헌[Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004)], US 20070192902 및 US 20030159173에 기재된 것들이 포함된다. 하나의 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 종자의 정의된 부분, 예컨대 떡잎(들) 또는 배젖에서 우선적으로 발현된다. 떡잎 특이적 프로모터의 예에는 비제한적으로 FP1 프로모터(Ellerstrom et al., 1996), 완두콩 레구민 프로모터(Perrin et al., 2000), 및 콩 피토헤마글루티닌 프로모터(Perrin et al., 2000)가 포함된다. 배젖 특이적 프로모터의 예에는 비제한적으로 옥수수 제인-1 프로모터(Chikwamba et al., 2003), 쌀 글루텔린-1 프로모터(Yang et al., 2003), 보리 D-호르데인 프로모터(Horvath et al., 2000) 및 밀 HMW 글루테닌 프로모터(Alvarez et al., 2000)가 포함된다. 추가 구현예에서, 종자 특이적 프로모터는 배에서 및/또는 종자 발아 후 발현되지 않거나 저수준으로만 발현된다.

[0234] 또 다른 구현예에서, 식물 저장 기관 특이적 프로모터는 과실 특이적 프로모터이다. 예에는 비제한적으로 토마토 폴리갈락투로나제, E8 및 Pds 프로모터뿐만 아니라 사과 ACC 산화효소 프로모터(리뷰를 위해, 문헌[Potenza et al., 2004] 참고)가 포함된다. 바람직한 구현예에서, 프로모터는 과실의 식용 부분, 예를 들어 과실의 껍질 또는 과실 내 종자 대비 과실의 심(pith)에서의 발현을 우선적으로 유도한다.

[0235] 하나의 구현예에서, 유도성 프로모터는 아스페르길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) alc 시스템이다. 아스페르길러스 니둘란스 alc 시스템 대신 사용될 수 있는 유도성 발현 시스템의 예는 문헌[Padidam (2003) 그리고 Corrado and Karali (2009)의 리뷰에 기재되어 있다. 또 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 독성완화제 유도성 프로모터, 예컨대, 옥수수 *In2-1* 또는 *In2-2* 프로모터(Hershey and Stoner, 1991)이며, 독성완화제 유도성 프로모터는 옥수수 GST-27 프로모터(Jepson et al., 1994), 또는 대두 GH2/4 프로모터(Ulmasov et al., 1995)이다.

[0236] 또 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 노화 유도성 프로모터, 예컨대 아라비돕시스로부터의 노화-유도성 프로모터 SAG(노화 연관 유전자) 12 및 SAG 13(Gan, 1995; Gan and Amasino, 1995) 및 브라시카 나푸스로부터의 LSC54(Buchanan-Wollaston, 1994)이다. 이러한 프로모터는 특히 잎에서, 식물 조직의 노화 개시 근처에 증가된 발현을 나타낸다.

[0237] 무성 조직에서의 발현을 위해, 잎-특이적 프로모터, 예컨대 리불로스 바이포스페이트 카복실라제(RBCS) 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 토마토 RBCS1, RBCS2 및 RBCS3A 유전자는 잎 및 광 재배 묘목에서 발현된다(Meier et al., 1997). 문헌[Matsuoka et al. (1994)]에 기재된, 고 수준으로 잎파리 및 엽초의 엽육 세포에서 거의 전적으로 발현된 리불로스 비스포스페이트 카복실라제 프로모터가 사용될 수 있다. 또 다른 잎-특이적 프로모터는 집광 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자 프로모터이다(문헌[Shiina et al., 1997] 참고). 문헌[Li et al. (1996)]에 기재된 아라비돕시스 탈리아나 myb-관련 유전자 프로모터(Atmyb5)는 잎-특이적이다. Atmyb5 프로모터는 어린 로제트 및 경생 잎의 가장자리 상의 발생 중인 잎 모상체, 탁엽, 및 표피 세포에서, 그리고 미성숙 종자에서 발현된다. 문헌[Busk et al. (1997)]에 의해 옥수수에서 확인된 잎 프로모터도 사용될 수 있다.

[0238] 일부 경우에서, 예를 들어 LEC2 또는 BBM이 재조합적으로 발현되는 경우, 트랜스유전자가 고수준으로 발현되지 않는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에서 사용될 수 있는 프로모터의 일례는 종자-특이적 발현 패턴을 보유하지만 감소된 발현 수준을 갖는 절단된 나핀 A 프로모터이다(Tan et al., 2011).

[0239] 5' 비-번역 리더 서열은 본 개시의 RNA 분자의 이종성 유전자 서열을 발현하도록 선택된 프로모터로부터 유래될 수 있거나, 생성될 효소의 코딩 영역에 대해 이종성일 수 있고, mRNA의 번역을 증가시키기 위해 요망되는 경우 특이적으로 변형될 수 있다. 트랜스유전자의 발현 최적화를 위한 리뷰에 대해서는, 문헌[Koziel et al. (1996)]을 참고한다. 5' 비-번역 영역은 또한 식물 바이러스 RNA(특히 담배 모자이크 바이러스, 담배 부식(etch) 바이러스, 옥수수 난쟁이 모자이크 바이러스, 알팔파 모자이크 바이러스)로부터 적합한 진핵 유전자, 식물 유전자(밀 및 옥수수 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자 리더)로부터, 또는 합성 유전자 서열로부터 수득될 수 있다. 본 발명은 비-번역 영역이 프로모터 서열을 수반하는 5' 비번역 서열로부터 유래되는 작제물로 제한되지 않는다. 리더 서열은 또한 관련되지 않은 프로모터 또는 코딩 서열로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 유용한

리더 서열은 옥수수 Hsp70 리더(US 5,362,865 및 US 5,859,347), 및 TMV 오메가 요소를 포함한다.

[0240] 전사 종결은 관심 RNA 분자에 대해 발현 벡터에서 작동 가능하게 연결된 3' 비번역 DNA 서열에 의해 달성된다. 재조합 DNA 분자의 3' 비번역 영역은 RNA의 3' 말단으로 아데닐레이트 뉴클레오티드의 부가를 유도하도록 식물에서 기능하는 폴리아데닐화 신호를 함유한다. 3' 비번역 영역은 식물 세포에서 발현되는 다양한 유전자로부터 수득될 수 있다. 노팔린(nopaline) 신타아제 3' 비번역 영역, 완두콩 작은 서브유닛 루비스코(Rubisco) 유전자로부터의 3' 비번역 영역, 대두 7S 종자 저장 단백질 유전자로부터의 3' 비번역 영역이 상기 능력에서 일반적으로 사용된다. 아그로박테리움 종양-유도(Ti) 플라스미드 유전자의 폴리아데닐레이트 신호를 함유하는 3' 전사, 비번역 영역도 적합하다.

[0241] 전달 핵산

[0242] 전달 핵산은 세포에 외인성 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위해 사용될 수 있고 1개, 바람직하게는 2개의 경계(border) 서열 및 하나 이상의 관심 RNA 분자를 포함한다. 전달 핵산은 선별 마커를 인코딩할 수도 인코딩하지 않을 수도 있다. 바람직하게는, 전달 핵산은 박테리아에서 이원성 벡터의 일부를 형성하며, 여기서 이원성 벡터는 박테리아에서 벡터의 복제, 이원성 벡터를 함유하는 박테리아 세포의 선택, 또는 유지를 허용하는 요소를 추가로 포함한다. 진핵 세포로의 전달 시, 이원성 벡터의 전달 핵산 성분은 진핵 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 일시적 발현 연구를 위해, 단순히 세포에서 발현될 수 있다.

[0243] 본원에서 사용되는 용어 "염색체외 전달 핵산"은 진핵 세포, 예컨대 식물 잎 세포로 박테리아, 예컨대 아그로박테리움 종으로부터 전달될 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 염색체외 전달 핵산은 전달될 수 있는 요소로서 널리 알려진 유전 요소이며, 수신체 세포의 게놈 내로 그 경계 내에 함유된 뉴클레오티드 서열이 후속 통합된다. 이에 관하여, 전달 핵산에는 전형적으로, 2개의 "경계" 서열이 측면에 있지만, 일부 경우에는 하나의 말단에 있는 하나의 경계가 사용될 수 있고 전달되는 핵산의 제2 말단이 전달 공정에서 무작위로 생성된다. 관심 RNA 분자는 전형적으로 전달 핵산의 왼쪽 경계-유사 서열 및 오른쪽 경계-유사 서열 사이에 배치된다. 전달 핵산 내에 함유되는 RNA 분자는 그 발현, 즉 RNA 분자의 전사 및/또는 번역을 촉진하는 여러 상이한 프로모터 및 종결자 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 아그로박테리움 종, 예컨대 아그로박테리움 투메파시엔스 또는 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로부터의 전달 DNA(T-DNA), 및 이의 인공 변이체/돌연변이체가 아마도 전달 핵산의 가장 잘 특성규명된 예일 것이다. 또 다른 예는 식물로부터의 T-DNA 경계-유사 서열을 포함하는 P-DNA("식물-DNA")이다.

[0244] 본원에서 사용되는 "T-DNA"는 식물 세포 내로의 DNA 전달을 위해 기능하는 아그로박테리움 투메파시엔스 Ti 플라스미드 또는 아그로박테리움 리조게네스 Ri 플라스미드로부터의 T-DNA, 또는 이의 변이체를 나타낸다. T-DNA는 오른쪽 및 왼쪽 경계 서열을 둘 다 포함하는 전체 T-DNA를 포함할 수 있지만, 전달을 위해 시스로 요구되는 최소 서열, 즉 오른쪽 T-DNA 경계 서열을 포함하는 것만 요구된다. 본 발명의 T-DNA는 관심 RNA 분자의 오른쪽 및 왼쪽 경계 서열(존재하는 경우) 사이의 임의의 위치에서 내부에 삽입된다. 식물 세포 내로의 T-DNA의 전달을 위해 트랜스로 요구되는 인자를 인코딩하는 서열, 예컨대 vir 유전자가 T-DNA 내로 삽입될 수도 있고, T-DNA와 동일한 레플리콘 상에 존재할 수도 있고, 또는 바람직하게는 아그로박테리움 숙주에서 상용성 레플리콘 상에 트랜스로 존재한다. 이러한 "이원성 벡터 시스템"은 당분야에 잘 알려져 있다. 본원에서 사용되는 "P-DNA"는 식물 게놈으로부터 단리된 전달 핵산, 또는 이의 인공 변이체/돌연변이체를 나타내며, 각 말단에, 또는 하나의 말단에만 T-DNA 경계-유사 서열을 포함한다.

[0245] 본원에서 사용되는 전달 핵산의 "경계" 서열은 선택된 유기체, 예컨대 식물 또는 박테리아로부터 단리되거나, 이의 인공 변이체/돌연변이체일 수 있다. 경계 서열은 이것이 연결되는 RNA 분자의 전달을 도모하고 촉진하며 수신체 세포 게놈에서 그 통합을 촉진할 수 있다. 하나의 구현예에서, 경계-서열은 10 bp 내지 80 bp 길이이다. 아그로박테리움 종으로부터의 T-DNA로부터의 경계 서열은 당분야에 잘 알려져 있으며 문헌[Lacroix et al. (2008)]에 기재된 것들이 포함된다.

[0246] 전통적으로는 아그로박테리움 종만 식물 세포로 유전자를 전달하기 위해 사용되었던 반면, 현재는 아그로박테리움 종과 유사한 방식으로 작용하는 것으로 확인된/개발된 다수의 시스템이 존재한다. 몇몇 비-아그로박테리움 종은 현재 유전자 전달에 적격이 되도록 유전적으로 변형되었다(Chung et al., 2006; Broothaerts et al., 2005). 이들에는 리조비움(*Rhizobium*) 종 NGR234, 시노리조비움 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*) 및 메조리조비움 로티(*Mezorhizobium loti*)가 포함된다.

[0247] 박테리아로부터 진핵 숙주로의 진핵 발현 플라스미드의 직접적 전달은 포유류 세포 및 플라스미드-운반 대장균

(*Escherichia coli*)의 원형질체의 융합에 의해 수십년 전에 최초로 달성되었다(Schaffner, 1980). 그 이래로, 포유류 세포 내로 유전자를 전달할 수 있는 박테리아의 수는 계속 증가해왔으며(Weiss, 2003), 4개 그룹에 의해 독립적으로 발견되고 있다(Sizemore et al. 1995; Courvalin et al., 1995; Powell et al., 1996; Darji et al., 1997).

[0248] 본원에서 사용되는 용어 "전달감염", "형질전환" 및 이의 변형은 일반적으로 상호 교환적으로 사용된다. "전달감염된" 또는 "형질전환된" 세포는 관심 RNA 분자(들)를 도입하기 위해 조작되었을 수 있거나, 이로부터 유래된 자손 세포일 수 있다.

[0249] 재조합 세포

[0250] 본 발명은 또한 재조합 세포, 예를 들어, 재조합 박테리아 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포를 제공하며, 이는 하나 이상의 RNA 분자 또는 본원에서 정의되는 벡터, 또는 이의 조합으로 형질전환된 숙주 세포이다. 본 발명의 적합한 세포에는 본 개시에 따른 RNA 분자 또는 재조합 벡터로 형질전환될 수 있는 임의의 세포가 포함된다. 하나의 예에서, 형질전환된 숙주 세포는 죽은 세포이다.

[0251] 재조합 세포는 배양 중인 세포, 시험관내, 또는 유기체, 예컨대 식물 내, 또는 기관 내, 예컨대 종자 또는 잎 내의 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 식물 내, 보다 바람직하게는 식물의 종자 내에 있다. 하나의 구현예에서, 재조합 세포는 비-인간 세포이다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시는 본원에서 개시되는 하나 이상의 또는 모든 RNA 분자를 포함하는 비-인간 유기체에 관한 것이다.

[0252] 하나의 예에서, 세포는 곤충 세포이다. 하나의 예에서, 곤충 세포는 트리코플러시아(*Trichoplusia*)로부터 유래된다.

[0253] 적합한 숙주 세포의 또 다른 예는 전기천공 적격 HT115 세포이다.

[0254] RNA 분자(들)가 도입되는 숙주 세포는 형질전환되지 않은 세포 또는 적어도 하나의 핵산으로 이미 형질전환된 세포일 수 있다. 이러한 핵산은 지질 핵산에 관련될 수도 있고, 관련되지 않을 수도 있다. 본 발명의 숙주 세포는 내인성으로(즉, 자연적으로) 본원에서 정의되는 RNA 분자(들)를 발현할 수 있고, 이 경우 이로부터 유래되는 재조합 세포는 RNA 분자(들)를 생성할 능력이 증강되거나, 본원에서 정의되는 적어도 하나의 RNA 분자로 형질전환된 후에만 상기 RNA 분자(들)를 생성할 수 있다. 하나의 예에서, 세포는 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 세포이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 재조합 세포는 비극성 지질, 예컨대 TAG를 생성할 능력이 증강된다.

[0255] 본 개시의 숙주 세포는 본원에서 기재되는 적어도 하나의 RNA 분자를 발현할 수 있는 임의의 세포일 수 있고, 박테리아, 진균(효모 포함), 기생충, 절지동물, 동물 및 식물 세포가 포함된다. 숙주 세포의 예에는 살모넬라(Salmonella), 에스체리키아(Escherichia), 바실러스(Bacillus), 리스테리아(Listeria), 사카로마이세스(Saccharomyces), 스포돕테라(Spodoptera), 미코박테리아(Mycobacteria), 트리코플러시아(Trichoplusia), 아그로박테리움(Agrobacterium), BHK(베이비 햄스터 신장(baby hamster kidney)) 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, CV-1 세포, COS(예컨대, COS-7) 세포, 및 Vero 세포가 포함된다. 숙주 세포의 추가 예는 대장균 K-12 유도체를 포함하는 대장균; 살모넬라 타이피(Salmonella typhi); 약독화된 균주를 포함하는 살모넬라 타이피무리엄(Salmonella typhimurium); 스포돕테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda); 트리코플러시아 나이(Trichoplusia ni); 및 비-종양형성 마우스 근모세포 G8 세포(예컨대, ATCC CRL 1246)이다. 추가적인 적절한 포유류 세포 숙주에는 다른 신장 세포주, 다른 섬유아세포 세포주(예컨대, 인간, 쥣과 또는 닭 배아 섬유아세포 세포주), 골수종 세포주, 차이니즈 햄스터 난소 세포, 마우스 NIH/3T3 세포, LMTK 세포 및/또는 HeLa 세포가 포함된다.

[0256] 바람직한 구현예에서, 식물 세포는 종자 세포, 특히 종자의 떡잎 또는 배젖에서의 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 동물 세포이다. 동물 세포는 임의의 유형의 동물, 예컨대, 비-인간 동물 세포, 비-인간 척추동물 세포, 비-인간 포유류 세포, 또는 해양 동물, 예컨대 어류 또는 갑각류, 무척추동물, 곤충 등의 세포일 수 있다. 본 발명의 숙주 세포로서 유용한 조류 세포의 예에는, 예를 들어, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 종(예를 들어, 클라미도모나스 레인하르드티이(*Chlamydomonas reinhardtii*)), 두날리엘라(*Dunaliella*) 종, 해마토코커스(*Haematococcus*) 종, 클로렐라(*Chlorella*) 종, 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*) 종, 스키조키트리움(*Schizochytrium*) 종, 및 볼복스(*Volvox*) 종이 포함된다.

[0257] 트랜스제닉 식물

[0258] 본 발명은 또한 본원에서 정의되는 하나 이상의 외인성 RNA 분자, 본 개시에 따른 세포, 본 개시에 따른 벡터, 또는 이의 조합을 포함하는 식물을 제공한다. 명사로서 사용되는 경우 용어 "식물"은 전체 식물을 나타내는 반면, 용어 "이의 부분"은 식물 기관(예컨대, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 과실), 단일 세포(예컨대, 꽃가루), 종자, 종자 부분, 예컨대 배, 배젖, 배반 또는 종자 껍질, 식물 조직, 예컨대 맥관 조직, 식물 세포 및 이의 자손을 나타낸다. 본원에서 사용되는 식물 부분은 식물 세포를 포함한다.

[0259] 식물에 대한 변형의 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "식물에서(in a plant 및 in the plant)"는 변형이 식물 전체에 걸쳐 일어난 경우를 포함하여 변형이 식물의 적어도 하나의 부분에서 일어났음을 의미하며, 변형이 식물의 하나 이상뿐만 아니라 모든 부분에서 일어나는 경우를 배제하지 않는다. 예를 들어, 조직-특이적 프로모터는 이것이 식물의 소정 부분에서만 발현될 수 있더라도, "식물에서" 발현되는 것으로 언급된다. 유사하게, "식물에서 하나 이상의 해당 및/또는 지방산 생합성 유전자의 발현을 증가시키는 전사 인자 폴리펩타이드"는 증가된 발현이 식물의 적어도 부분에서 일어남을 의미한다.

[0260] 본원에서 사용되는 용어 "식물"은 식물계에서의 임의의 유기체를 포함하는, 그 가장 광의의 개념으로 사용된다. 여기에는 또한 적조류 및 갈조류뿐만 아니라 녹조류가 포함된다. 여기에는 비제한적으로 임의의 종의 개화 식물, 풀, 작물 또는 곡류(예컨대, 지방종자, 옥수수, 대두), 사료 또는 마초, 과실 또는 야채 식물, 허브 식물, 목재 식물 또는 나무가 포함된다. 식물을 임의의 특정 구조에 제한하려는 것은 아니다. 또한 단세포 식물(예컨대, 미세조류)을 나타낸다. 식물에 대한 용어 "이의 부분"은 식물 세포 및 이의 자손, 복수의 식물 세포, 식물 발생의 임의의 단계에 존재하는 구조, 또는 식물 조직을 나타낸다. 이러한 구조에는 비제한적으로 잎, 줄기, 꽃, 과실, 너트, 뿌리, 종자, 종자 껍질, 배가 포함된다. 용어 "식물 조직"에는 잎, 줄기, 꽃, 과실, 너트, 뿌리, 종자, 예를 들어, 배아 조직, 배젖, 진피 조직(예컨대, 표피, 바깥표피), 맥관 조직(예컨대, 목질부, 체관부), 또는 기저 조직(실질 조직, 후각 조직, 및/또는 후막 조직 세포 포함)에 존재하는 것들을 포함하는 식물의 분화 및 미분화 조직뿐만 아니라 배양 중인 세포(예컨대, 단일 세포, 원형질체, 유합 조직, 배 등)가 포함된다. 식물 조직은 식물에, 기관 배양에, 조직 배양에, 또는 세포 배양에 존재할 수 있다.

[0261] 상이한 양의 18:3 및 16:3 지방산이 상이한 식물 종의 당지질 내에서 확인된다. 이는 3개의 이중 결합을 갖는 지방산이 일반적으로 항상 C_{18} 원자 길이인 18:3 식물과 C_{16}-지방산 및 C_{18}-지방산을 모두 함유하는 16:3 식물을 구별하기 위해 사용된다. 18:3 엽록체에서, 포스파티데이트의 디아실글리세롤로의 전환 및 디아실글리세롤의 모노갈락토실 디아실글리세롤(MGD)로의 전환을 촉매하는 효소 활성은 16:3 엽록체에서보다 유의미하게 활성이 더 적다. 18:3 식물의 잎에서, 엽록체는 기질에서 스테아로일-ACP2를 합성하고, 제1 이중 결합을 포화 탄화수소쇄 내로 도입한 후, 티오에스테르를 가수분해한다. 방출된 올레에이트는 엽록체 외피를 통해 세포의 진핵 부분, 아마도 소포체의 막 내로 외수송되며, 여기서 PC 내로 포함된다. PC-연결된 올레오일기는 이들 막에서 탈포화된 후 엽록체 내로 다시 이동한다. MGD-연결된 아실기는 제3 이중 결합의 도입을 위한 기질로 2개의 리놀레노일 잔기를 갖는 MGD를 산출한다. 상기 갈락토지질은, 예를 들어 18:3 식물, 예컨대 국화과(Asteraceae) 및 콩과(Fabaceae)의 특징이다. 예를 들어, 미나리과(Apiaceae) 및 배추과(Brassicaceae)의 구성원으로 나타내는, 16:3 식물의 광합성 활성 세포에서, 2개 경로가 MGD와 함께 틸라코이드를 제공하도록 병렬적으로 작동한다. 협력적 '진핵' 서열은 '원핵' 경로에 의해 다양한 정도로 보충된다. 그 반응은 엽록체에 국한되며 아실기의 전형적 배열뿐만 아니라 이들이 MGD로 에스테르화되는 경우 이의 완전한 탈포화를 일으킨다. 원핵 DAG 골격은 C16:0 및 C-2에서의 그 탈포화 산물을 운반하며 이 위치로부터 C18:지방산이 배제된다. C-1 위치는 C18 지방산에 의해 그리고 적은 정도로 C16기에 의해 점유된다. 청녹조류로부터의 지질의 DAG 골격에서 16:3 식물에서 엽록체-확인된 경로에 의해 합성된 것들과의 유사성은 계통발생학적 관계를 제시하며 원핵이라는 용어를 합리화한다.

[0262] 본원에서 사용되는 용어 "무성 조직" 또는 "무성 식물 부분"은 식물의 유성 생식을 위한 기관이 아닌 임의의 식물 조직, 기관 또는 부분이다. 식물의 유성 생식을 위한 기관은 구체적으로 종자 보유 기관, 꽃, 꽃가루, 과실 및 종자이다. 무성 조직 및 부분에는 적어도 식물 잎, 줄기(다발 및 새싹을 포함하지만 결구는 제외함), 덩이줄기 및 뿌리가 포함되지만, 꽃, 꽃가루, 종자 껍질, 배 및 배젖을 포함하는 종자, 중과피 조직을 포함하는 과실, 종자-보유 꼬투리 및 종자-보유 결구는 배제된다. 하나의 구현예에서, 식물의 무성 부분은 기생(aerial) 식물 부분이다. 또 다른 또는 추가 구현예에서, 무성 식물 부분은 녹색 부분, 예컨대 잎 또는 줄기이다.

[0263] "트랜스제닉 식물" 또는 이의 변형은 동일한 종, 변종 또는 품종의 야생형 식물에서는 확인되지 않는 트랜스유전자를 함유하는 식물을 나타낸다. 본 발명의 맥락에서 정의되는 트랜스제닉 식물에는 요망되는 식물 또는 이의 부분에서 본원에서 정의되는 적어도 하나의 폴리펩타이드의 생성을 유도하는 재조합 기법을 사용하여 유전적으로 변형된 식물 및 이의 자손이 포함된다. 트랜스제닉 식물 부분은 대응하는 의미를 갖는다.

[0264] 용어 "종자" 및 "낟알"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. "낟알"은 성숙 낟알, 예컨대 수확 낟알 또는 여전히 식물 상에 있지만 수확할 준비가 된 낟알을 나타내지만, 또한 맥락에 따라, 흡수팽윤 또는 발아 후 낟알을 나타낼 수 있다. 성숙 낟알은 보통 약 18% 미만의 수분 함량을 갖는다. 바람직한 구현예에서, 낟알의 수분 함량은 일반적으로 저장을 위해 안전하게 간주되는 수준, 바람직하게는 5% 내지 15%, 6% 내지 8%, 8% 내지 10%, 또는 10% 내지 15%이다. 본원에서 사용되는 "발생 중인 종자"는 전형적으로 수정 또는 개화 후 식물의 생식 구조에서 확인되는 성숙 전 종자를 나타내지만, 식물로부터 단리되는 성숙 전의 이러한 종자를 나타낼 수도 있다. 성숙 종자는 보통 약 12% 미만의 수분 함량을 갖는다.

[0265] 본원에서 사용되는 용어 "식물 저장 기관"은 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지질의 형태로 에너지를 저장하기 위해 특화된 식물의 부분을 나타낸다. 식물 저장 기관의 예는 종자, 과실, 덩이줄기성 뿌리, 및 덩이줄기이다. 본 발명의 바람직한 식물 저장 기관은 종자이다.

[0266] 본원에서 사용되는 용어 "표현형이 정상인"이란 비변형 식물 또는 이의 부분과 비교되는 경우, 성장하고 번식하는 능력이 유의미하게 감소되지 않은 유전적으로 변형된 식물 또는 이의 부분, 예를 들어 트랜스제닉 식물, 또는 저장 기관, 예컨대 본 발명의 종자, 덩이줄기 또는 과실을 나타낸다. 바람직하게는, 바이오매스, 성장율, 발아율, 저장 기관 크기, 종자 크기 및/또는 생성되는 생활성 종자의 수는 동일한 조건 하에 성장시킨 경우 상기 재조합 폴리뉴클레오티드가 없는 식물의 90% 이상이다. 상기 용어는 야생형 식물과 상이할 수 있지만 상업적 목적을 위한 식물의 유용성에 영향을 미치지 않는 식물의 특징, 예컨대 묘목 잎의 발레리나 표현형은 포괄하지 않는다. 하나의 구현예에서, 표현형이 정상인 유전적으로 변형된 식물 또는 이의 부분은 식물 저장 기관 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결된 침묵화 억제인자를 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 대응하는 식물 또는 이의 부분과 본질적으로 동일한 성장 또는 번식 능력을 갖는다.

[0267] 본 발명의 실시에서의 사용을 위해 제공되거나 고려되는 식물에는 외떡잎식물 및 쌍떡잎식물이 모두 포함된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 식물은 작물 식물(예를 들어, 곡류 및 콩류, 옥수수, 밀, 감자, 쌀, 수수, 기장, 카사바, 보리) 또는 콩과식물, 예컨대 대두, 콩 또는 완두콩이다. 식물은 식용 뿌리, 덩이줄기, 잎, 줄기, 꽃 또는 과실의 생산을 위해 재배될 수 있다. 식물은 그 무성 부분이 식품으로 사용되는 야채 식물일 수 있다. 본 발명의 식물은 아크로코미아 아쿨레아타(*Acrocomia aculeata*)(매쿠버 야자), 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 아라시니스 하이포개아(*Aracinis hypogaea*)(땅콩), 앙스트로카리움 무루무루(*Astrocaryum murumuru*)(무루무루), 아스트로카리움 불가레(*Astrocaryum vulgare*)(투쿠마), 아탈레아 게랜시스(*Attalea geraensis*)(인다이아-라테이로), 아탈레아 휴밀리스(*Attalea humilis*)(미국 기름 야자), 아탈레아 올레이페라(*Attalea oleifera*)(안다이아), 아탈레아 팔레라타(*Attalea phalerata*)(우리쿠리), 아탈레아 스페시오사(*Attalea speciosa*)(바바수), 아베나 사티바(*Avena sativa*)(귀리), 베타 불가리스(*Beta vulgaris*)(사탕무), 브라시카 종, 예컨대 브라시카 카리나타(*Brassica carinata*), 브라시카 준세아(*Brassica juncea*), 브라시카 나포브라시카(*Brassica napobrassica*), 브라시카 나푸스(유채), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*)(거짓 아마), 칸나비스 사티바(*Cannabis sativa*)(대마), 카르타무스 팅크토리우스(*Carthamus tinctorius*)(잇꽃), 카리오카르 브라실리엔세(*Caryocar brasiliense*)(삐끼), 코코스 누시페라(*Cocos nucifera*)(코코넛), 크람베 애비시니카(*Crambe abyssinica*)(아비시니아 케일), 쿠쿠미스 멜로(*Cucumis melo*)(멜론), 엘래이스 귀닌시스(*Elaeis guineensis*)(아프리카 야자), 글리신 맥스(*Glycine max*)(대두), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*)(목화), 헬리안투스 종, 예컨대 헬리안투스 안누우스(*Helianthus annuus*)(해바라기), 호르데움 불가레(보리), 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*)(피지 너트), 요하네시아 프린셉스(*Joannesia princeps*)(아라라 너트-나무), 렘나 종(*Lemna sp.*)(개구리밥), 예컨대 렘나 애퀴녹티알리스(*Lemna aequinoctialis*), 렘나 디스페르마(*Lemna disperma*), 렘나 에콰도리엔시스(*Lemna ecuadoriensis*), 렘나 깁바(*Lemna gibba*)(통통한 좀개구리밥), 렘나 자포니카(*Lemna japonica*), 렘나 마이너(*Lemna minor*), 렘나 미누타(*Lemna minuta*), 렘나 옵스쿠라(*Lemna obscura*), 렘나 파우시코스타타(*Lemna paucicostata*), 렘나 페르푸실라(*Lemna perpusilla*), 렘나 테네라(*Lemna tenera*), 렘나 트리술카(*Lemna trisulca*), 렘나 투리오니페라(*Lemna turionifera*), 렘나 발디비아나(*Lemna valdiviana*), 렘나 영겐시스(*Lemna yungensis*), 리카니아 리기다(*Licania rigida*)(오이티시카), 리눔 우시타티시뭄(*Linum usitatissimum*)(아마), 루피누스 앵구스티폴리우스(루핀), 마우리티아 플렉수오사(*Mauritia flexuosa*)(부리티 야자), 맥시밀리아나 마리파(*Maximiliana maripa*)(이나자 야자), 미스칸서스 종, 예컨대 미스칸서스 x 기간테우스(*Miscanthus x giganteus*) 및 미스칸서스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*), 니코티아나 종(담배), 예컨대 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*) 또는 니코티아나 벤타미아나, 오에노카르푸스 바카바(*Oenocarpus bacaba*)(바카바-도-아제이트), 오에노카르푸스 바타우아(*Oenocarpus bataua*)(파타우아), 오에노카

르푸스 디스티쿠스(*Oenocarpus distichus*)(바카바-데-레쿠에), 오리자 종(쌀), 예컨대 오리자 사티바(*Oryza sativa*) 및 오리자 글라베리마(*Oryza glaberrima*), 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*)(스위치그래스), 파라쿠에이바 파랜시스(*Paraqueiba paraensis*)(마리화나), 페르세아 아멘카나(*Persea amencana*)(아보카도), 폰가미아 핀나타(*Pongamia pinnata*)(인디안 너도밤나무), 포풀러스 트리코카르파(*Populus trichocarpa*), 리시누스 콤뮤니스(*Ricinus communis*)(피마자), 사카룸 종(사탕수수), 세사뭄 인디쿰(*Sesamum indicum*)(참깨), 솔라눔 투베로섬(*Solanum tuberosum*)(감자), 소르검 종, 예컨대 소르검 바이칼라(*Sorghum bicolor*), 소르검 불가레(*Sorghum vulgare*), 테오브로마 그란디포룸(*Theobroma grandiforum*)(쿠푸아수), 트리폴리움 종, 트리트리낙스 브라실리엔시스(*Trithrinax brasiliensis*)(브라질 바늘 야자), 트리티쿰 종(밀), 예컨대 트리티쿰 애스티붐, 제아 매이스(옥수수), 알팔파(메디카고 사티바(*Medicago sativa*)), 호밀(세칼레 세랄레(*Secale cerale*)), 고구마(로프모에아 바타투스(*Lopmoea batatus*)), 카사바(마니호트 에스쿨렌타(*Manihot esculenta*)), 커피(코페아 속), 파인애플(아나나 코모수스(*Anana comosus*)), 시트러스 나무(시트러스 속), 코코아(테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*)), 차(카멜리아 세넨시스(*Camellia senensis*)), 바나나(무사 속), 아보카도(페르세아 아메리카나(*Persea americana*)), 무화과(피쿠스 카시카(*Ficus casica*)), 구아바(프시디움 구아자바(*Psidium guajava*)), 망고(망기퍼 인디카(*Mangifer indica*)), 올리브(올레아 유로패아(*Olea europaea*)), 파파야(카리카 파파야(*Carica papaya*)), 캐슈(아나카르디움 옥시덴탈레(*Anacardium occidentale*)), 마카다미아(마카다미아 인테르그리폴리아(*Macadamia intergrifolia*)) 및 아몬드(프루누스 아미그달루스(*Prunus amygdalus*))일 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 식물은 니코티아나 벤타미아나일 수 있다.

[0268] 다른 바람직한 식물에는 C4 풀, 예컨대, 상기 언급된 것들에 부가하여, 안드로포곤 게라르디(*Andropogon gerardi*), 보우텔로우아 쿠르티펜둘라(*Bouteloua curtipendula*), *B.* 그라실리스(*gracilis*), 부클로에 닥틸로이데스(*Buchloe dactyloides*), 시자키리움 스코파리움(*Schizachyrium scoparium*), 소르가스트럼 누탄스(*Sorghastrum nutans*), 스포로볼루스 크립탄드루스(*Sporobolus cryptandrus*); C3 풀, 예컨대 엘리무스 카나덴시스(*Elymus canadensis*), 콩과식물 레스페데자 카피타타(*Lespedeza capitata*) 및 페탈로스테뭄 빌로섬(*Petalostemum villosum*), 광엽초본 아스테르 아주레우스(*Aster azureus*); 및 목질 식물, 예컨대 쿠에르쿠스 엘립소이달리스(*Quercus ellipsoidalis*) 및 *Q.* 마크로카르파(*macrocarpa*)가 포함된다. 다른 바람직한 식물에는 C3 풀이 포함된다.

[0269] 바람직한 구현예에서, 식물은 속씨식물이다.

[0270] 하나의 구현예에서, 식물은 지방종자 식물, 바람직하게는 지방종자 작물 식물이다. 본원에서 사용되는, "지방종자 식물"은 식물의 종자로부터 지질의 상업적 생산을 위해 사용되는 식물 종이다. 지방종자 식물은, 예를 들어, 지방종자 평지(예컨대 유채), 옥수수, 해바라기, 잇꽃, 대두, 수수, 아마(아마인) 또는 사탕무일 수 있다. 또한, 지방종자 식물은 다른 십자화과 식물, 목화, 땅콩, 양귀비, 순무(rutabaga), 겨자, 피마자 콩, 참깨, 잇꽃, 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*) 또는 너트 생산 식물일 수 있다. 식물은 그 과실, 예컨대 올리브, 지방 야자 또는 코코넛에서 높은 수준의 지질을 생산할 수 있다. 본 발명이 적용될 수 있는 원예 식물은 상추, 치커리, 또는 양배추, 브로콜리, 또는 컬리플라워를 포함하는 야채 십자화과 식물이다. 본 발명은 담배, 표주박, 당근, 딸기, 토마토, 또는 후추에서 적용될 수 있다.

[0271] 바람직한 구현예에서, 트랜스제닉 식물은 도입된 각각의 모든 유전자(트랜스유전자)에 대해 동종접합성이어서 그 자손이 요망되는 표현형에 있어서 분리되지 않는다. 트랜스제닉 식물은 또한, 예를 들어 하이브리드 종자로부터 재배된 F1 자손에서, 도입된 트랜스유전자(들)에 대해 이종접합성일 수 있고, 바람직하게는 트랜스유전자에 대해 균일하게 이종접합성일 수 있다. 이러한 식물은 장점, 예컨대 당분야에 잘 알려진 잡종 강세를 제공할 수 있다.

[0272] *형질전환*

[0273] 본원에서 개시되는 RNA 분자는 상기 언급된 숙주 세포 및/또는 비-인간 유기체, 예컨대 식물에 안정적으로 도입될 수 있다. 의혹을 피하기 위해, 본 개시의 예는 본원에서 개시되는 RNA 분자로 안정적으로 형질전환된 상기 언급된 식물을 포괄한다. 본원에서 사용되는 용어 "안정적으로 형질전환하는", "안정적으로 형질전환된" 및 이의 변형은 RNA 분자 또는 이를 인코딩하는 핵산이 이의 존재에 대한 양성 선택을 필요로 하지 않고 세포 분열 동안 자손 세포로 전달되도록 하는 이들의 세포 게놈 내로의 통합을 나타낸다. 안정적인 형질전환체, 또는 이의 자손은 당분야에 알려진 임의의 수단, 예컨대 염색체 DNA 상의 서던 블롯, 또는 게놈 DNA의 원 위치 혼성화에 의해 확인되어 이의 선택을 구현할 수 있다.

[0274] 트랜스제닉 식물은 당분야에 알려진 기법, 예컨대 문헌[Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic

Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), 및 Christou and Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004)]에 일반적으로 기재된 것들을 사용하여 생산될 수 있다.

[0275] 하나의 구현예에서, 식물은 본 개시에 따른 RNA 분자를 식물 또는 이의 부분에 국소 적용함으로써 형질전환될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 식물 또는 이의 부분의 표면에 적합한 담체를 함유하는 제형물로서 제공되어 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시의 방법은 식물에 대한 본원에서 개시되는 RNA 분자의 도입을 포괄하며, 식물 또는 이의 부분에 RNA 분자를 포함하는 조성물을 국소 적용하는 단계를 포함한다.

[0276] 아그로박테리움-매개 전달은 DNA가 식물 세포 게놈에서 DNA의 일시적 발현을 위해 또는 안정적 통합을 위해, 전체 식물 조직, 식물 기관, 또는 조직 배양 중인 외식편 내로 도입될 수 있으므로, 유전자를 식물 세포 내로 도입하기 위해 널리 적용 가능한 시스템이다. 예를 들어, 플로랄-딥(식물 내) 방법이 사용될 수 있다. 식물 세포 내로 DNA를 도입하기 위한 아그로박테리움-매개 식물 통합 벡터의 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 전달될 DNA의 영역은 경계 서열에 의해 정의되며, 개입 DNA(T-DNA)는 보통 식물 게놈 내로 삽입된다. 이는 유전자 전달의 손쉽고 정의된 성질로 인해 선택되는 방법이다.

[0277] 사용될 수 있는 가속화 방법에는, 예를 들어 미세발사체 충격(microprojectile bombardment) 등이 포함된다. 형질전환 핵산 분자를 식물 세포로 전달하기 위한 방법의 일례는 미세발사체 충격이다. 상기 방법은 문헌[Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994)]에 의해 리뷰로 다뤄졌다. 비-생물학적 입자(미세발사체)은 핵산을 껍질로 하여, 추진력에 의해 세포, 예를 들어 미성숙 배의 세포 내로 전달될 수 있다. 예시적인 입자에는 텅스텐, 금, 백금 등으로 이루어진 것들이 포함된다.

[0278] 또 다른 방법에서, 원형자가 안정적으로 형질전환될 수 있다. 고등 식물에서 원형자 형질전환을 위해 개시된 방법에는 선별 마커를 함유하는 DNA의 입자 총 전달 및 상동성 재조합을 통한 원형자 게놈으로의 DNA 표적화가 포함된다(미국 제5,451,513호, 미국 제5,545,818호, 미국 제5,877,402호, 미국 제5,932,479호, 및 WO 99/05265). 세포 형질전환의 다른 방법이 또한 사용될 수 있으며 비제한적으로 꽃가루 내로의 직접적인 DNA 전달, 식물의 생식 기관 내로의 DNA의 직접 주사, 또는 미성숙 배의 세포 내로의 DNA의 직접 주사에 이어 건조된 배의 재수화에 의한 식물 내로의 DNA 도입이 포함된다.

[0279] 하나의 식물 원형질체 형질전환체로부터 또는 다양한 형질전환된 외식편으로부터의 식물 재생, 발생, 및 경작은 당분야에 잘 알려져 있다(Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). 상기 재생 및 성장 공정에는 전형적으로 형질전환된 세포의 선택 단계, 뿌리형성 묘목 단계를 통한 일반적인 배아 발생 단계를 통해 이들 개체화된 세포를 배양하는 단계가 포함된다. 트랜스제닉 배 및 종자는 유사하게 재생된다. 생성 트랜스제닉 뿌리형성 새싹은 이후 적절한 식물 성장 배지, 예컨대 토양에 식재된다.

[0280] 외래의, 외인성 유전자를 함유하는 식물의 발생 또는 재생은 당분야에 널리 알려져 있다. 바람직하게는, 재생된 식물은 자가-수분하여 동종접합성 트랜스제닉 식물을 제공한다. 다르게는, 재생된 식물로부터 수득되는 꽃가루가 농업적으로 중요한 라인의 종자-재배 식물과 교배된다. 반대로, 이들 중요한 라인의 식물로부터의 꽃가루가 재생된 식물을 수분시키는 데 사용된다. 요망되는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 본 발명의 트랜스제닉 식물은 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 배양된다.

[0281] 트랜스제닉 세포 및 식물에서 트랜스유전자의 존재를 확인하기 위해, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭 또는 서던 블롯 블롯이 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 트랜스유전자의 발현 산물은 산물의 성질에 따라, 임의의 다양한 방식으로 검출될 수 있으며, 노던 블롯 혼성화, 웨스턴 블롯 및 효소 검정이 포함된다. 트랜스제닉 식물이 수득되면, 이들은 재배되어 요망되는 표현형을 갖는 식물 조직 또는 부분을 생산할 수 있다. 식물 조직 또는 식물 부분이 수확되고/되거나 종자가 수집될 수 있다. 종자는 요망되는 특징을 갖는 조직 또는 부분을 갖는 추가적인 식물 재배용 원천으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 무성 식물 부분은 무극성 지질의 수율이 최고치인 시점에 수확된다. 하나의 구현예에서, 무성 식물 부분은 대략 개화 시나 개화가 개시된 후에 수확된다. 바람직하게는, 식물 부분은 보통 잎의 황색화 및 건조로 시사되는, 대략 노화가 시작되는 시기에 수확된다.

[0282] 아그로박테리움 또는 다른 형질전환 방법을 사용해서 형성되는 트랜스제닉 식물은 전형적으로 하나의 염색체 상에 단일 유전자 유전자위를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 식물은 부가된 유전자(들)에 대해 반접합성인 것으로 언급될 수 있다. 부가된 유전자(들)에 대해 동종접합성인 트랜스제닉 식물, 즉 2개의 부가된 유전자를

함유하며, 하나의 유전자가 염색체 쌍의 각 염색체 상에서 동일한 유전자위에 있는 트랜스제닉 식물이 보다 바람직하다. 동종접합성 트랜스제닉 식물은 반접합성 트랜스제닉 식물의 자가-수정, 생산된 일부 종자의 발아 및 관심 유전자에 대한 생성 식물의 분석에 의해 수득될 수 있다.

[0283] 또한 2개의 독립적으로 분리하는 외인성 유전자 또는 유전자위를 함유하는 2개의 상이한 트랜스제닉 식물이 또한 교배되어(짝짓기를 거쳐) 두 세트의 유전자 또는 유전자위를 모두 함유하는 자손을 생산할 수 있음이 이해되어야 한다. 적절한 F1 자손의 자가교배는 두 외인성 유전자 또는 유전자위 모두에 대해 동종접합성인 식물을 생산할 수 있다. 모체 식물과의 역교배 및 비-트랜스제닉 식물과의 비자가-교배도 무성 증식으로서 고려된다. 유사하게, 트랜스제닉 식물은 유전 변형, 예컨대 돌연변이체 유전자를 포함하는 제2 식물과 교배될 수 있고 자손은 트랜스유전자 및 확인된 유전 변형을 모두 함유한다. 상이한 형질 및 작물에 대해 일반적으로 사용되는 다른 육종 방법의 설명은 문헌[Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)]에서 확인될 수 있다.

[0284] 제형

[0285] 본 개시에 따른 RNA 분자는 다양한 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 고체, 연고, 겔, 크림, 분말, 페이스트, 현탁액, 콜로이드, 폼 또는 에어로졸의 형태일 수 있다. 고체 형태에는 분진, 분말, 과립, 펠렛, 알약, 향정, 정제, 충전 필름(종자 코팅 포함) 등이 포함될 수 있고, 이는 수분산성("습윤성")일 수 있다. 하나의 예에서, 조성물은 농축물 형태이다.

[0286] 하나의 예에서, RNA 분자는 국소 제형으로서 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 제형은 제형 내 및/또는 생체내 RNA 분자를 안정화한다. 예를 들어, RNA 분자는 지질 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들어, RNA 분자는 리포좀으로 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 제형은 전달감염 촉진제를 포함한다.

[0287] 하나의 예에서, RNA 분자는 현장으로의 적용에 적합한 제형 내로 포함될 수 있다. 하나의 예에서, 현장은 식물을 포함한다. 적합한 식물에는 작물 식물(예를 들어, 곡류 및 콩류, 옥수수, 밀, 감자, 타피오카, 쌀, 수수, 대두 밀렛, 카사바, 보리, 또는 완두콩), 또는 콩과식물이 포함된다. 식물은 식용 뿌리, 덩이줄기, 잎, 줄기, 꽃 또는 과실의 생산을 위해 재배될 수 있다. 하나의 예에서, 작물 식물은 곡류 식물이다. 곡류 식물의 예에는 비제한적으로 밀, 보리, 수수 귀리, 및 호밀이 포함된다. 이들 예에서, RNA 분자는 임의의 적합한 방식으로 식물, 또는 식물의 임의의 부분으로의 투여를 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 식물의 잎, 줄기, 뿌리, 과실 야채, 낟알 및/또는 콩류로의 투여를 위해 제형화될 수 있다. 하나의 예에서, RNA 분자는 식물의 잎으로의 투여를 위해 제형화되며, 식물의 잎 상으로 분무 가능하다.

[0288] 요망되는 제형에 따라, 본원에서 기재되는 RNA 분자는 다양한 다른 제제와 함께 제형화될 수 있다. 예시적인 제제는 현탁화제, 응집제, 염기, 완충액, 쓴맛 가미제, 향료, 보존제, 추진제, 틱소트로프제, 항응결제, 및 착색제 중 하나 이상을 포함한다.

[0289] 다른 예에서, RNA 분자 제형은 살충제, 살해충제, 살진균제, 항생제, 곤충 퇴치제, 항기생충 제제, 항바이러스 제제, 또는 살선충제를 포함할 수 있다.

[0290] 또 다른 예에서, RNA 분자는 약학 조성물 내로 포함될 수 있다. 이러한 조성물에는 전형적으로 본원에서 기재되는 RNA 분자 및 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함된다. 본원에서 사용되는 언어 "약학적으로 허용 가능한 담체"에는 약학 투여와 상용성인, 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 제제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 보충 활성 화합물도 조성물 내로 포함될 수 있다.

[0291] 약학 조성물은 그 의도되는 투여 경로와 상용성으로 제형화된다. 투여 경로의 예에는 비경구, 예컨대, 정맥내, 피내, 피하, 흡입, 경피(국소), 경점막, 경구 및 직장 투여가 포함된다.

[0292] 하나의 구현예에서, 활성 화합물은 화합물을 신체로부터의 신속한 제거에 대해 보호할 담체와 함께, 예컨대 임플란트 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형으로 제조된다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 예를 들어, 리포좀 현탁액이 또한 약학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진 방법, 예를 들어 미국 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0293] 본 개시에 따른 RNA 분자는 키트 또는 팩으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 개시되는 RNA 분자는 상기 언급된 세포 또는 유기체를 생산하기 위한 또는 상태를 치료하기 위한 서면 지침과 함께 적합한 용기에 패키징될 수 있다.

[0294] 비-인간 유기체를 제어하는 방법

[0295] 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 비-인간 유기체, 예컨대 곤충을 제어하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 사용에는 다양한 방법을 사용하여 본 개시에 따른 RNA 분자를 투여하는 단계가 관여된다. 하나의 예에서, 본 개시에 따른 RNA 분자는 곤충에 의한 섭취를 위한 곤충 미끼로서 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 필요에 따라 곤충 상으로 분무될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 식물 또는 작물을 곤충으로부터 보호하기 위해 상기 식물 또는 작물 상으로 분무될 수 있다. 예시적인 작물에는 목화, 옥수수, 토마토, 병아리콩, 비둘기콩, 알팔파, 쌀, 수수 및 동부가 포함된다.

[0296] 하나의 예에서, RNA 분자는 곤충 행동을 변형하기 위해 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 곤충을 사멸시키기 위해 제공될 수 있다. 또 다른 예에서, RNA 분자는 곤충 번식력을 감소시키기 위해 제공될 수 있다. 예시적인 곤충 표적에는 가정 곤충이 포함된다. 다른 예시적인 곤충 표적에는 수액 흡입 곤충, 예컨대 진디(예컨대 마이주스 페르시캐, 메토폴로피움 디르호둠(*Metopolophium dirhodum*), 로팔로시품 파디(*Rhopalosiphum padi*), 아피스 글리시네스(*Aphis glycines*), 아피스 파배(*Aphis fabae*))가 포함된다. 추가의 예시적인 곤충 표적에는 거미류, 모기, 외부-기생충, 파리, 거미 진드기, 삽주벌레, 진드기, 새진드기, 개미, 바퀴벌레, 흰개미, 가정-귀뚜라미를 포함하는 귀뚜라미, 좀벌레, 먼지다듬이, 딱정벌레, 집게벌레, 모기 및 벼룩이 포함된다. 다른 예시적인 곤충 표적에는 농업 해충이 포함된다. 예에는 수액 섭취곤충, 예컨대 노린재 및 진디, 섭식성(chewing) 곤충, 예컨대 애벌레, 딱정벌레, 벌레, 갈아먹는(rasping) 곤충, 예컨대 삽주벌레 및 민달팽이, 나방, 파리, 예컨대 초파리, 낟알 해충, 예컨대 낟알 구멍벌레(borer), 비구미, 및 낟알 나방이 포함된다.

[0297] 하나의 구현예에서, 곤충은 수액 흡입 곤충이다. 상기 예에서, RNA 분자는 MpCOO2 및/또는 MpRack-1에 대한 안티센스 활성을 가질 수 있다. 하나의 구현예에서, 수액 흡입 곤충은 진디이다. 또 다른 구현예에서, 진디는 마이주스 페르시캐이다.

[0298] 하나의 구현예에서, 곤충 표적은 개미(예컨대 리네피테마 휴밀레), 목화씨 벌레 또는 회색담배나비 유충(헬리코베르파 아르미게라) 또는 검정파리(예컨대 루실리아 쿠프리나)이다. 하나의 구현예에서, 표적 곤충은 헬리코베르파 아르미게라이며 RNA 분자는 ABC 트랜스포터 white 유전자(ABC white)에 대한 안티센스 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 표적 곤충은 리네피테마 휴밀레이며 RNA 분자는 페로몬 생합성 활성화 신경펩타이드(PBAN)에 대한 안티센스 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 표적 곤충은 루실리아 쿠프리나이며 RNA 분자는 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A, RN아제 1/2, 키틴 신타아제, 엑디손 수용체 및 감마-튜불린 1/1-유사로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 유전자에 대한 안티센스 활성을 갖는다.

[0299] 상기 구현예에서, 본원에서 개시되는 조성물 및 RNA 분자는 디스펜서에서 제공될 수 있다. 하나의 예에서, 디스펜서는 트랩(trap) 또는 루어(lure)이다. 하나의 구현예에서, 트랩 및/또는 루어는 본원에서 개시되는 RNA 분자(들)를 포함하는 미끼를 포함한다.

[0300] 하나의 구현예에서, 본 개시는 곤충 행동을 제어하는 방법을 포괄하며, 곤충에 본원에서 개시되는 RNA 분자를 분무하거나, 분진처리하거나, 달리 적용하는 단계를 포함한다. 상기 구현예에서, RNA 분자는 곤충에 직접 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, RNA 분자는 곤충 감염 전에 식물 또는 작물에 분무되거나, 분진처리되거나, 달리 적용될 수 있다.

[0301] 본 발명의 하나의 구현예에서, 곤충 또는 거미류는 하기 목: 진드기아목(Acari), 거미목(Arachnidaa), 이아목(Anoplura), 바퀴목(Blattodea), 딱정벌레목(Coleoptera), 톡토기목(Collembola), 집게벌레목(Dermaptera), 망시상목(Dictyoptera), 좀붙이목(Diplura), 파리목(Diptera), 흰개미붙이목(Embioptera), 하루살이목(Ephemeroptera), 귀뚜라미붙이목(Grylloblatodea), 노린재목(Hemiptera), 이시목(Heteroptera), 동시목(Homoptera), 벌목(Hymenoptera), 흰개미아목(Isoptera), 나비목(Lepidoptera), 새이아목(Mallophaga), 밑들이목(Mecoptera), 풀잠자리목(Neuroptera), 잠자리목(Odonata), 직시목(Orthoptera), 대벌레목(Phasmida), 이목(Phithiraptera), 강도래목(Plecoptera), 낫발이목(Protura), 다듬이벌레목(Psocoptera), 벼룩목(Siphonaptera), 이아목(Siphunculata), 좀목(Thysanura), 진딧물아목(Sternorrhyncha), 부채벌레목(Strepsiptera), 총채벌레목(Thysanoptera), 날도래목(Trichoptera), 민벌레목(Zoraptera) 및 좀목(Zygentoma)에 속할 수 있다.

[0302] 본 발명의 바람직한, 그러나 비제한적인 구현예에서, 곤충 또는 거미류는 (1) 진드기아목: 후기문진드기목(Ixodida)(진드기)을 포함하는 진드기 (2) 거미목: 거미목(Araneae)(거미) 및 통거미목(Opiliones)(장님거미), 예에는 라트로덱투스 막탄스(Latrodectus mactans)(검은과부거미) 및 록소셀레스 레클루세(Loxosceles

recluse)(갈색 은둔 거미)가 포함되고 (3) 이아목: 이, 예컨대 페디쿨러스 휴마누스(Pediculus humanus)(인체의 이) (4) 바퀴목: 독일 바퀴벌레(블라텔라 게르마니카(Blatella germanica)), 페리플라네타속의 미국 바퀴벌레(페리플라나타 아메리카나(Periplaneta americana)) 및 호주 바퀴벌레(페리플라나타 오스트랄리아시애(Periplaneta australiasiae)), 블라타속의 동양 바퀴벌레(블라타 오리엔탈리스(Blatta orientalis)) 및 수펠라 속의 갈색-밴드 바퀴벌레(수펠라 롱기팔파(Supella longipalpa))를 포함하는 바퀴벌레로 구성되는 군으로부터 선택된다. 가장 바람직한 표적은 독일 바퀴벌레(블라텔라 게르마니카)이다. (5) 딱정벌레목: 딱정벌레, 예에는 파우더포스트 딱정벌레과(개나무좀과(Bostrichoidea)); 덴드록토누스(Dendroctonus) 속(검은색 테레빈유 딱정벌레, 남부 소나무 딱정벌레, IPS 나무좀 딱정벌레); 카페트 딱정벌레(안트레누스(Anthrenus) 속, 아타게누스(Attagenus) 속); 구가 천공충(세람바이시대(Cerambycidae)과: 하일로트루페스 바줄루스(Hylotrupes bajulus)); 아노비움 펑타텀(Anobium punctatum); 트리볼리움(Tribolium) 속(밀가루 딱정벌레); 트로고데르마 그라나리움(Trogoderma granarium)(곡식수시렁이(Khapra Beetle)); 오리재필러스 사리나멘시스(Oryzaephilus sarinamensis)(저곡 딱정벌레) 등(책벌레)이 포함된다. (6) 집게벌레목: 집게벌레과 (7) 파리목: 모기(모기과(Culicidae)) 및 파리(브라키세라(Brachycera)), 예는 학질모기아과(Anophelinae), 예컨대 아노펠레스(Anopheles) 속 및 보통모기아과(Culicinae), 예컨대 애데스 풀부스(Aedes fulvus); 등에과(Tabanidae), 예컨대 타바누스 펑티페르(Tabanus punctifer)(집파리), 글로시나 모르시탄스 모르시탄스(Glossina morsitans morsitans)(체체 파리), 하수구 파리(나방파리과(Psychodidae)) 및 유판류아과(Calyptratae), 예컨대 무스카 도메스티카(Musca domestica)(집파리), 쉬파리(쉬파리과(Sarcophagidae)) 등이다. (8) 이시목: 벌레, 예컨대 시멕스 렉툴라리우스(Cimex lectularius)(빈대) (9) 벌목: 개미(개미상과(Formicoidea)), 벌(꿀벌상과(Apoidea))을 포함하는, 말벌(벌아목(Apocrita)): 셀레놉시스 인빅타(Solenopsis invicta)(붉은 불개미), 모노모리움 파라오니스(Monomorium pharaonis)(파라오 개미), 캄포노투스(Camponotus) 속(왕개미), 이아시우스 나이거(Iasius niger)(작은 검정 개미), 테트라모리움 캐스피툼(tetramorium caespitum)(주름 개미), 미르미카 루브라(Myrmica rubra)(빨간 개미), 포르미카(Formica) 속(유럽 불개미), 크레마토가스테르 리네올라타(Crematogaster lineolata)(잎꾼 개미), 이리도미르멕스 휴밀리스(Iridomyrmex humilis)(아르헨티나 개미), 페이돌(Pheidole) 속(큰머리 개미, 다시무틸라 옥시덴탈리스(Dasymutilla occidentalis)(벨벳 개미) 등 (10) 흰개미아목: 흰개미, 예에는 아미테르메스 플로리덴시스(Amitermes floridensis)(플로리다 짙은-날개 지하 흰개미), 동부 지하 흰개미(레티쿨리테르메스 플라비페스(Reticulitermes flavipes)), 레티쿨리테르메스 헤스페루스(R. hesperus)(서부 지하 흰개미), 콥토테르메스 포르모사누스(Coptotermes formosanus)(대만 지하 흰개미), 인시시테르메스 마이너(Incisitermes minor)(서부 건목재 흰개미), 네오테르메스 콘넥서스(Neotermes connexus)(숲나무 흰개미) 및 보통흰개미과(Termitidae)가 포함된다. (11) 나비목: 나방, 예에는 곡식좀나방과(Tineidae) & 원뿔나방과(Oecophoridae), 예컨대 티네올라 비셀리엘라(Tineola bisselliella)(옷좀나방), 및 명나방과(Pyralidae), 예컨대 피랄리스 파리날리스(Pyralis farinalis)(곡나방) 등이 포함된다. (12) 다듬이벌레목: 먼지다듬이(프소시드(Psocids)) (13) 벼룩목: 벼룩, 예컨대 풀렉스 이리탄스(Pulex irritans) (14) 진딧물아목: 진디(진딧물과(Aphididae)) (15) 좀목: 좀벌레, 예는 테르모비아 도메스티카(Thermobia domestica) 및 레피스마 사카리나(Lepisma saccharina)로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0303] 다른 표적 곤충 또는 거미류에는 공중 보건 및 위생에 관련된 가정 곤충, 외부-기생충 및 곤충 및/또는 거미류, 예컨대 비제한적으로, 파리, 거미 진드기, 삽주벌레, 진드기, 새진드기, 개미(예컨대, 표적화 PBAN에 의한), 바퀴벌레, 흰개미, 가정-귀뚜라미를 포함하는 귀뚜라미, 좀벌레, 먼지다듬이, 딱정벌레, 집게벌레, 모기 및 벼룩이 포함된다. 보다 바람직한 표적은 바퀴벌레(바퀴목), 예컨대 비제한적으로 블라텔라 속(예컨대 블라텔라 게르마니카(독일 바퀴벌레), 페리플라네타 속(예컨대 페리플라나타 아메리카나(미국 바퀴벌레)) 및 페리플라나타 오스트랄리아시애(호주 바퀴벌레)), 블라타 속(예컨대 블라타 오리엔탈리스(동양 바퀴벌레)) 및 수펠라 속(예컨대 수펠라 롱기팔파(갈색-밴드 바퀴벌레)); 개미(개미상과), 예컨대 비제한적으로 솔레놉시스 속(예컨대 솔레놉시스 인빅타(붉은 불개미)), 모노모리움 속(모노모리움 파라오니스(파라오 개미)), 캄포노투스 속(예컨대 캄포노투스 속(왕개미)), 라시우스(lasius) 속(라시우스 나이거(작은 검정 개미)), 테트라모리움 속(예컨대 테트라모리움 캐스피툼(주름 개미)), 미르미카 속(예컨대 미르미카 루브라(빨간 개미)), 포르미카 spp(유럽 불개미), 크레마토가스테르 속(예컨대 크레마토가스테르 리네올라타(잎꾼 개미)), 이리도미르멕스 속(예컨대 이리도미르멕스 휴밀리스(아르헨티나 개미)), 페이돌 속(큰머리 개미), 및 다시무틸라 속(예컨대 다시무틸라 옥시덴탈리스(벨벳 개미)); 흰개미(흰개미아목 및/또는 보통흰개미과), 예컨대 비제한적으로 아미테르메스 속(예컨대 아미테르메스 플로리덴시스(플로리다 짙은-날개 지하 흰개미)), 레티쿨리테르메스 속(예컨대 레티쿨리테르메스 플라비페스(동부 지하 흰개미), 레티쿨리테르메스 헤스페루스(서부 지하 흰개미)), 콥토테르메스 속(예컨대 콥토테르메스 포르모사누스(대만 지하 흰개미)), 인시시테르메스 속(예컨대 인시시테르메스 마이너(서부 건목재 흰개

미)), 네오테르메스 속(예컨대 네오테르메스 콘넥서스(숲나무 흰개미))이다.

[0304] 하나의 구현예에서, 표적 RNA는 곤충 악테오락테이트 신타아제를 인코딩한다.

[0305] 본 발명의 RNA 분자는 식물에서 전달되는/되거나 발현되는 경우, 예를 들어 작물 형질, 곤충 내성(예컨대 유전자, 예컨대 MpCO02, MpRack-1 및 ABC 트랜스포터 유전자의 표적화에 의해), 질병 내성(예컨대 유전자, 예컨대 LanR의 표적화에 의해), 제초제 내성, 불임, 낟알 특징 등에 영향을 미치는 광범위한 요망되는 특성을 가질 수 있다. 표적 RNA 분자는 오일, 전분, 탄수화물, 영양분 등의 대사에 관여될 수 있거나, 단백질, 펩타이드, 지방산, 지질의 합성, 재조합 빈도(유전자, 예컨대 DDM1 및 FANCM의 표적화에 의해), 왁스, 오일(유전자, 예컨대 TOR의 표적화에 의해), 전분, 당, 탄수화물, 풍미, 냄새, 독소, 카로티노이드, 호르몬(유전자, 예컨대 EIN2, NCED1 및 NCED2의 표적화에 의해), 중합체, 플라보노이드(유전자, 예컨대 칼콘 신타아제의 표적화에 의해), 저장 단백질, 페놀산, 알칼로이드, 리그닌, 탄닌, 셀룰로스, 당단백질, 당지질 등에 관여될 수 있다.

[0306] 특정 예에서, 식물은 식물, 예컨대 십자화과 식물, 예를 들어 지방종자 평지 또는 해바라기, 잇꽃, 아마, 목화, 대두 또는 옥수수에서 오일 생산을 위한 효소; 식물, 예컨대 감자, 옥수수, 및 곡류, 예컨대 밀 보리 또는 쌀에서 전분 합성에 관여되는 효소; 천연 약제, 예컨대 약학 제제 또는 수의학적 제품을 합성하는 효소, 또는 자체가 천연 약제, 예컨대 약학 제제 또는 수의학적 제품인 단백질을 증가된 수준으로 생산한다.

[0307] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 RNA 분자는 알테마리아(Altemaria) 속; 아르밀라리아 멜래(Armillaria mellae); 아르트로보트리스 올리고스포루스(Arthrobotrys oligosporus); 블루메리아 그라미니스(Blumeria graminis)(실시예 17에 기재된 바와 같은 RNA 분자를 사용하는 Mlo 유전자의 표적화에 의해), 볼레투스 그라눌라투스(Boletus granulatus); 보트리티스 시네레아(Botritis cinerea); 보트리티스 파배(Botrytis fabae); 칸디다 알비칸스(Candida albicans); 클라비셉스 푸르푸레아(Claviceps purpurea); 크로나르티움 리비콜라(Cronartium ribicola); 에피코쿰 푸르푸레센스(Epicoccum purpurescens); 에피데르모피톤 플로코섬(Epidermophyton floccosum); 포메스 안노수스(Fomes annosus); 푸사리움 옥시스포룸(Fusarium oxysporum); 개우만노마이세스 가르미니스 변종 트리티시(Gaeumannomyces graminis var. tritici); 글로메렐라 싱굴라타(Glomerella cingulata); 짐노스포랑지움 주니페리-비르기니아내(Gymnosporangium juniperi-virginianae); 마이크로스포룸 카니스(Microsporum canis); 모닐리니아 프룩티콜라(Monilinia fructicola); 피소데르마 알팔패(Physoderma alfalfae); 피토프테라 인페스탄스(Phytopthera infestans); 피티로스포룸 오르비쿨라레(Pityrosporum orbiculare(말라세지아 푸르푸르(Malassezia furfur))); 폴리포러스 설푸레우스(Polyporus sulphureus); 푸치니아(Puccinia) 속; 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae); 셉토리아 아피이콜라(Septoria apiicola); 트리코피톤 루브럼(Trichophyton rubrum); 트리코피톤 멘타그로피테스(T. mentagrophytes); 우스틸라고(Ustilago) 속; 벤투리아 이내쿠알리스(Venturia inaequalis); 및 베르티실리움 다흘리애(Verticillium dahliae)로 구성되는 군으로부터 선택되는 진균 병원체에 의한 감염의 예방적 또는 치료적 처치에 대한 것이다.

[0308] 치료받을 예시적인 병태

[0309] 본 개시에 따른 RNA 분자는 다양한 병태의 방법에서 사용될 수 있다. 일부 예에서, 본 개시는 본원에서 개시되는 RNA 분자를 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 용어 "암"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유류에서의 생리적 병태를 나타내거나 설명한다. 암의 예에는 비제한적으로 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프구 종양이 포함된다. 이러한 암의 보다 구체적인 예에는 비제한적으로 편평상피세포암(예컨대, 상피 편평상피세포암), 소세포 폐암, 비-소세포폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평상피암종을 포함하는 폐암, 복강암, 간세포암, 위장관암 및 위장관 기저암을 포함하는 위의 암 또는 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암 또는 신암, 전립샘암, 외음부암, 갑상샘암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 표재 확산 흑색종, 악성 흑색종, 말단부 흑자 흑색종, 결절 흑색종, 다발 골수종 및 B-세포 림프종(저등급/여포성 비-호지킨 림프종(NHL); 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증 포함); 만성 림프구 백혈병(CLL); 급성 림프모구 백혈병(ALL); 털세포 백혈병; 만성 골수모구 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD)뿐만 아니라 모반증과 연관된 비정상 맥관 증식, 부종(예컨대 뇌 종양과 연관된 부종), 메이그 증후군, 뇌암뿐만 아니라 두부경부암, 및 연관된 전이가 포함된다. 따라서 하나의 예에서, 본 개시는 유방암, 난소암, 결장암, 전립샘암, 폐암, 뇌암, 피부암, 간암, 위암, 췌장암 또는 혈액 기반 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0310] 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 BRCA1, BRCA2, PALB2, 또는 RAD51B, RAD51C, RAD51D 또는 관련 유전자에

서의 돌연변이에 연관된 암을 치료하기 위해 사용된다. 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 DNA 미스매치 보수와 연관된 유전자, 예컨대 MSH2, MLH1, PMS2, 및 관련 유전자에서의 돌연변이에 연관된 암을 치료하기 위해 사용된다. 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 침묵화된 DNA 보수 유전자, 예컨대 BRCA1, MLH1, 또는 RAD51B, RAD51C, 또는 RAD51D를 갖는 암을 치료하기 위해 사용된다.

[0311] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 DNA 보수 공정이 손상된 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예를 들어, DNA 보수가 손상된 세포는 DNA 보수, DNA 합성, 또는 상동성 재조합에 관여되는 유전자를 비정상적으로 발현할 수 있다. 예시적인 유전자에는 XRCC1, ADPRT(PARP-1), ADPRTL2, (PARP-2), 폴리머라제 BETA, CTPS, MLH1, MSH2, FANCD2, PMS2, p53, p21, PTEN, RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCCR, XRCC3, BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD52, RAD54, RAD50, MREU, NB51, WRN, BLM, KU70, KU80, ATM, ATR CPIK1, CHK2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, 및 RAD9가 포함된다. 하나의 예에서, 본원에 기재되는 방법은 돌연변이체 종양 억제인자 유전자를 갖는 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예를 들어, 세포는 BRCA1 또는 BRCA2에 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0312] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 바이러스로 암화된 세포를 치료하기 위해 사용된다. 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 잠복 바이러스로 암화된 세포를 사멸시키기 위해 사용된다. 예시적인 잠복 바이러스에는 CMV, EBV, 단순 헤르페스 바이러스(1형 및 2형), 및 바리셀라 조스터 바이러스가 포함된다. 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 암, 면역결핍, 간염, 뇌염, 폐렴 또는 호흡기 질병을 일으키는 바이러스로 인한 활성 바이러스 감염을 치료하기 위해 사용된다. 예시적인 바이러스에는 파르보바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 바이러스가 포함된다.

[0313] 본 개시의 다른 예에서, 본원에 기재되는 방법은 지카 바이러스, 콜로라도 진드기열(RNA 바이러스, 콜티바이러스에 의해 유도됨), 웨스트 나일 열(주로 중동 및 아프리카에서 발생하는 플라비바이러스에 의해 유도되는, 뇌염), 황열, 광견병(랩도바이러스과의 여러 상이한 균주의 신경친화성 바이러스에 의해 유도됨), 바이러스성 간염, 노르워크 및 노르워크-유사 바이러스, 로타바이러스, 칼리시바이러스, 및 아스트로바이러스에 의해 유도되는 위장염(바이러스성)-급성 바이러스성 위장염, 회색질척수염, 빈번한 항원 변이를 거칠 수 있는 오르소믹소바이러스에 의해 유도되는 인플루엔자(독감), 홍엽(루베올라), 파라믹소비리대, 볼거리, 바이러스성 폐렴 및 급성 호흡기 바이러스로 총칭되는 다양한 바이러스에 의해 유도되는 크루프를 포함하는 급성 호흡기 증후군을 포함하는 호흡기 증후군, 및 호흡기 융합 바이러스에 의해 유도되는 호흡기 질병을 치료하기 위해 사용된다.

[0314] **실시예**

[0315] **실시예 1. 물질 및 방법**

[0316] 유전 작제물의 합성

[0317] 전형적인 ledRNA 작제물을 설계하기 위해, 약 100개 내지 1000개 뉴클레오티드, 전형적으로 400개 내지 600개 뉴클레오티드 길이의 표적 RNA 영역을 확인하였다. 하나의 예에서, 서열의 5' 절반 및 대략 130 nt의 측면 영역 그리고 유사하게 3' 절반 및 130 nt의 측면 영역을 프로모터 대비 안티센스 배향으로 배치하였다. 이들 서열을 400개 내지 600개 뉴클레오티드 센스 표적 서열로 단속하였다(도 1a). 생성 작제물의 5' 말단에는 프로모터, 예컨대 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터가 선행되었고 3' 말단은 시험관내 전사 종결을 허용하기 위해 제한 효소 절단 부위를 포함하도록 조작하였다.

[0318] 세포, 예컨대 박테리아 세포에서의 전사를 위해, 프로모터 및 종결자 서열을, 예를 들어 유도성 프로모터를 사용하여, 트랜스유전자로서의 발현을 촉진하기 위해 포함시켰다. 이중-가닥 영역 및 루프 서열 길이는 변화될 수 있다. 작제물은 표준 클로닝 방법을 사용해서 제조하거나 상업적 서비스 제공업체로부터 주문하였다.

[0319] RNA의 합성

[0320] 3' 말단에서 DNA를 선형화하기 위해 제한 효소로의 소화 후, RNA 폴리머라제를 사용하는 전사로 중심 표적 서열에 어닐링하는 ledRNAi 전사체의 5' 및 3' 암을 생성하였고, 분자는 단일 닉(nick) 및 말단부 루프를 갖는 이중-가닥 영역 또는 중심 줄기를 포함하였다. 중심 서열은 프로모터에 대해 센스 또는 안티센스 배향으로 배치할 수 있다(각각 도 1a, 1b).

[0321] 시험관내 합성을 위해, 작제물의 DNA를 적절한 제한 효소를 사용하여 3' 제한 부위에서 소화시키고, 침전시키고, 정제하고, 정량하였다. RNA 합성은 제조업체의 지침에 따라 RNA 폴리머라제를 사용하여

달성하였다. ledRNA는 임의의 미량의 RN아제를 불활성화하기 위해 DEPC-처리수를 사용하여 어닐링 완충액(25 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$) 중에 재현탁하였다. 상기 방법에 의해 생성되는 RNA의 수율 및 온전성은 각각 나노-드롭 분석 및 겔 전기영동에 의해 결정하였다(도 2).

[0322] ledRNA의 합성은 대장균 균주 HT115 내로 작제물을 도입하여 박테리아 세포에서 달성하였다. 형질전환된 세포 배양을 IPTG(0.4 mM)로 유도하여 T7 RNA 폴리머라제를 발현하고, ledRNA 작제물의 전사를 제공하였다. 박테리아 세포로부터의 RNA 추출 및 정제는 본질적으로 문헌[Timmons et al. (2001)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0323] Cy3 표지화로의 RNA 전사를 위해, 리보뉴클레오티드(rNTP) 혼합물은 각각 10 mM의 ATP, GTP, CTP, 1.625 mM UTP 및 8.74 mM Cy3-UTP를 함유하였다. 전사 반응을 2.5시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 전사 반응(160 ㎕)을 에펜도르프 튜브로 옮기고, 17.7 ㎕ 터보 DN아제 완충액 및 1 ㎕ 터보 DNA를 첨가하고, 10분 동안 37℃에서 인큐베이션하여 DNA를 소화시켰다. 이어서, 17.7 ㎕ 터보 DN아제 불활성화 용액을 첨가하고, 혼합하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 2분 동안 원심분리하고 상청액을 새로운 RN아제 비함유 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 1.5 ㎕의 각각의 전사 반응의 샘플을 겔 상에서 전기영동하여 RNA 산물의 품질을 평가하였다. 일반적으로, 작제물에 따라 500 bp 내지 1000 bp 크기에서 하나의 RNA 밴드가 관찰되었다. 88.5 ㎕ 7.5 M 암모늄 아세테이트 및 665 ㎕ 저온 100% 에탄올을 각각의 튜브에 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 튜브를 수 시간 또는 하룻밤 동안 -20℃로 냉각한 후, 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 RNA 펠렛을 -20℃에서 1 ㎖의 70% 에탄올(뉴클레아제 비함유수로 제조)로 세척하고 원심분리하였다. 펠렛을 건조하고 정제된 RNA를 50 ㎕ 1x RNAi 어닐링 완충액 중에 재현탁하였다. RNA 농도를 나노드롭 방법을 사용하여 측정하고 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0324] **실시예 2. ledRNA의 설계**

[0325] 도 1a에 도식적으로 나타낸 바와 같이, 전형적인 ledRNA 분자는 공유 연결되고 표적 RNA와 동일성을 갖는 2개의 인접한 센스 서열로 간주될 수 있는 센스 서열, 센스 서열과 상보적이고 2개 영역으로 구분되는 안티센스 서열, 및 센스 서열을 안티센스 서열과 분리하는 2개의 루프를 포함한다. 따라서 상기 형태의 ledRNA를 인코딩하는 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, ledRNA 코딩 영역의 전사를 위한 프로모터, 표적 RNA의 5' 말단을 향한 영역과 상보성을 갖는 제1 안티센스 영역, 제1 루프 서열, 센스 서열, 제2 루프 서열, 이어서 표적 RNA의 3' 말단을 향한 영역과 상보성을 갖는 제2 안티센스 영역, 및 마지막으로 전사를 종결시키기 위한 수단을 포함한다. 상기 배열에서, 2개의 안티센스 서열이 센스 서열 및 루프 서열의 측면에 있었다. 전사되는 경우, 안티센스 서열의 2개 영역은 센스 서열과 어닐링하여, 측면에 있는 2개의 루프를 갖는 dsRNA 줄기를 형성한다.

[0326] 또 다른, 그러나 관련된 형태의 ledRNA에서, 센스 서열은 2개 영역으로 분할되는 반면, 2개의 안티센스 영역은 하나의 서열로 유지된다(도 1b). 따라서 상기 제2 형태의 ledRNA를 인코딩하는 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, ledRNA 코딩 영역의 전사를 위한 프로모터, 표적 RNA의 3' 말단을 향한 영역과 동일성을 갖는 제1 센스 영역, 제1 루프 서열, 안티센스 서열, 제2 루프 서열, 이어서 표적 RNA의 5' 말단을 향해 동일성을 갖는 제2 센스 영역, 및 마지막으로 전사를 종결시키기 위한 수단을 포함한다. 상기 배열에서, 2개의 센스 서열은 안티센스 서열 및 루프 서열의 측면에 있었다.

[0327] 이론에 의해 제한받고자 하지 않고, 각 말단에서의 폐쇄된 루프로 인해, 이들 ledRNA 구조는 단일-가닥 센스 및 안티센스 RNA 간에 형성되고 루프를 갖지 않는 개방-말단 dsRNA보다, 그리고 또한 하나의 루프만을 갖는 헤어핀 RNA에 비해 엑소뉴클레아제에 대해 더 내성이 있을 것이다. 또한, 본 발명자들은 dsRNA 줄기의 두 말단에서의 루프가 다이서로 하여금 두 말단에 효율적으로 접근할 수 있도록 함으로써 dsRNA의 sRNA로의 가공 및 침묵화 효율을 증강시킬 것으로 구상하였다.

[0328] 제1 예로서, 유전 작제물을 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사를 위해 제조하여 GFP 또는 GUS를 인코딩하는 유전자를 표적화하는 ledRNA를 형성하였다. ledGFP 작제물은 순서대로 하기 영역: GFP 코딩 서열(CDS)(SEQ ID NO:7)의 뉴클레오티드 358 내지 131에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반, GFP CDS의 뉴클레오티드 130 내지 1에 대응하는 제1 안티센스 루프, GFP CDS의 뉴클레오티드 131 내지 591에 대응하는 센스 서열, GFP CDS의 뉴클레오티드 731 내지 592에 대응하는 제2 안티센스 루프, 및 GFP CDS의 뉴클레오티드 591 내지 359에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

[0329] ledGUS 작제물은 순서대로 하기 영역: GUS CDS(SEQ ID NO:8)의 뉴클레오티드 609 내지 357에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반; GUS CDS의 뉴클레오티드 356 내지 197에 대응하는 제1 안티센스 루프, GUS CDS의 뉴클레오티드 357 내지 860에 대응하는 센스 서열, GUS CDS의 뉴클레오티드 1029 내지 861에 대응하는 제2 안티센스 루프;

및 GUS CDS의 뉴클레오티드 861 내지 610에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

[0330] 별도 가닥의 센스/안티센스 GUS dsRNA(통상적 dsRNA)를 제조하기 위해, GUS CDS의 뉴클레오티드 357 내지 860에 대응하는 동일한 표적 서열을 pGEM-T Easy 벡터에서 T7 및 SP6 프로모터 간에 결찰하였다. 센스 및 안티센스 가닥을 각각 T7 또는 SP6 폴리머라제로 별도 전사하고, 전사체의 혼합 및 RNA 가닥을 변성시키기 위한 혼합물의 가열 후 어닐링 완충액 중에 어닐링하였다.

[0331] **실시예 3. ledRNA의 안정성**

[0332] ledRNA가 dsRNA 구조를 형성하는 능력을 개방-말단 dsRNA(즉, 별도의 단일-가닥 센스 및 안티센스 RNA의 어닐링에 의해 형성되며, 루프 비함유) 및 긴 hpRNA와 비교하였다. ledRNA, 긴 hpRNA, 그리고 센스 및 안티센스 RNA의 혼합물을 가열에 의해 변성시키고 어닐링 완충액(250 mM Tris-HCL, pH 8.0 및 100 mM MgCl2) 중에 어닐링하도록 둔 후 비변성 조건 하에 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

[0333] 도 2에 나타낸 바와 같이, GUS ledRNA 및 GFP ledRNA는 둘 다 이중-가닥 분자에 대해 예상되는 이동성을 갖는 우세한 RNA 밴드를 제공하여, 예측되는 ledRNA 구조의 형성을 시사하였다. 이는 dsRNA에 대한 약한 밴드만을 나타낸 센스 및 안티센스 RNA의 혼합물과는 대조적이어서, 대부분의 센스 및 안티센스 RNA가 dsRNA를 형성하기 위해 서로 쉽게 어닐링되지 않음을 시사하였다. 헤어핀 RNA 샘플은 2개의 뚜렷한 밴드를 제공하여, 전사체의 일부만 예측되는 헤어핀 RNA 구조를 형성함을 시사하였다. 따라서, ledRNA가 예측되는 dsRNA 구조의 형성에 있어서 가장 효율적이었다.

[0334] ledRNA가 잎 표면 상에 남아서 확산되는 능력을 또한 dsRNA와 비교하였다. GUS ledRNA(ledGUS)는 담배 잎 표면의 하부 부분에 적용하는 경우, 24시간 후 잎의 미처리 상부 부분에서 쉽게 검출할 수 있었다(도 3). 그러나, 별도 가닥의 GUS dsRNA(dsGUS)는 잎의 미처리 상부 부분에서 검출할 수 없었다(도 3). 상기 결과는 ledRNA가 dsRNA보다 분해에 더 내성이 있고 이에 따라 식물 잎 조직 내부에서 확산될 수 있음을 시사한다.

[0335] **실시예 4. 국소 전달에 의한 ledRNA의 평가**

[0336] 국소 전달 후 ledRNA가 RNAi를 유도하는 능력을 각각 GFP 또는 GUS 리포터 유전자를 발현하는 니코티아나 벤타미아나 및 니코티아나 타바쿰 식물에서 평가하였다. GFP 및 GUS 표적 서열 및 ledRNA 인코딩 작제물의 서열을 각각 SEQ ID NO: 7, 8, 4 및 5에 나타낸다. 인코딩되는 RNA 분자의 리보뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO 1(GFP ledRNA) 및 2(GUS ledRNA)로 제공한다.

[0337] 잎 표면 상으로의 ledRNA의 재현성 있고 균일한 적용을 촉진하기 위해, 25 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ 및 Silwet 77(0.05%) 중 75 ㎍/㎖ 내지 100 ㎍/㎖ 농도의 ledRNA를 소프트 페인트 브러시를 사용하여 잎의 향축 표면으로 적용하였다. ledRNA 적용 후 6시간 및 3일차에, 잎 샘플을 표적화된 유전자 침묵화의 분석을 위해 채취하였다.

[0338] 니코티아나 벤타미아나 잎에서 GFP에 대한 그리고 니코티아나 타바쿰 잎에서 GUS에 대한 ledRNA의 적용은 처리 후 6시간째에 mRNA(GFP) 또는 단백질 활성(GUS) 수준에서 각각의 표적 유전자 활성의 20% 내지 40% 및 40% 내지 50%의 뚜렷한 감소를 일으켰다. 그러나, 상기 실험에서 처리 후 3일째에는 감소가 지속되지 않았다. 본 발명자들은 3일째의 관찰이 dsRNA 처리에 대한 트랜스유전자의 일부 비특이적인 반응 또는 분산된 양의 ledRNA에 기인할 수 있는 것으로 간주하였다. 그러나, 별도의 실험에서, GUS 침묵화가 ledRNA 처리 후 24시간째에 처리 및 원위 미처리 잎 영역 모두에서 검출되었다(도 4).

[0339] **실시예 5. 내인성 표적 유전자의 ledRNA-유도 침묵화**

[0340] 추가 실시예에서, ledRNA를 내인성 유전자, 즉 니코티아나 벤타미아나의 FAD2.1 유전자에 의해 인코딩되는 mRNA를 표적화하도록 설계하였다. 표적 FAD2.1 mRNA 및 ledFAD2.1 인코딩 작제물의 서열을 각각 SEQ ID NO: 9 및 6에 나타낸다. 인코딩되는 RNA 분자의 리보뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO: 3(니코티아나 벤타미아나 FAD2.1 ledRNA)으로 제공한다.

[0341] FAD2.1 ledRNA 작제물은 하기: FAD2.1 CDS(Niben101Scf09417g01008.1)의 뉴클레오티드 678 내지 379에 대응하는 안티센스 서열의 제1 절반; FAD2.1 CDS의 nt. 378 내지 242에 대응하는 제1 안티센스 루프; nt. 379 내지 979에 대응하는 센스 서열; nt 1115 내지 980에 대응하는 제2 안티센스 루프; 및 FAD2.1 CDS의 nt 979 내지 nt 679에 대응하는 안티센스 서열의 제2 절반으로 이루어졌다.

[0342] 앞 실시예로부터의 ledGUS RNA를 음성 대조군으로서 병렬로 사용하였다. 제1 실험에서, 표적 유전자 침묵화를

FAD2.1 mRNA 및 축적 C18:1 지방산 수준 모두에 대해 검정하였다(도 5). 관련 유전자, FAD2.2의 활성 수준을 또한 검정하였다. 각각의 샘플에 있어서, 대략 3 ㎍의 총 RNA를 DN아제 처리하고 올리고 dT 프라이머를 사용하여 50분 동안 50℃에서 역전사하였다. 반응을 5분 동안 85℃에서 종료시키고 물로 120 ㎕까지 희석하였다. 로터 유전자 PCR 기계를 사용하여, 각 샘플 5 ㎕를 3개씩, 하우스 키핑 유전자 액틴에 대한 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 FAD 2.1 및 FAD 2.2 mRNA의 상대 발현에 대해 분석하였다. 후속 실험에서, 노던 블롯 혼성화를 또한 국소 적용된 ledFAD2.1 RNA에 의한 FAD2.1 유전자의 침묵화를 확인하기 위해 사용하였다(도 6).

[0343] FAD2.1 mRNA는 2시간, 4시간 및 10시간 시점에 ledRNA로 처리된 잎 조직에서 거의 검출 불가능한 수준으로 유의미하게 감소되었다(도 5). 상기 실험에서, FAD2.1 mRNA의 수준이 6시간 시점에서만큼 감소되지 않은 이유가 명확하지 않았다. 도 6에 나타낸 반복 실험에서, 6시간 및 24시간에 모두, 특히 24시간 시점에, 강력한 FAD2.1 하향조절이 일어났다. FAD2.1과 서열 상동성을 갖는 관련 FAD2.2 유전자도 ledRNA에 의해 2시간 및 4시간 시점에 하향조절을 나타내었다(도 5).

[0344] FAD2.1 및 FAD2.2는 올레산을 리놀레산으로 탈포화시키는 지방산 Δ12 탈포화효소를 인코딩하므로, 이들 지방산의 수준을 ledRNA로 처리된 잎 조직에서 검정하였다. 2시간, 4시간 및 6시간 시점에 ledRNA-처리 잎 조직에서 올레산(18:1) 축적이 명확히 증가했고, 이는 감소된 양의 FAD2 효소를 시사하였다(도 5). 따라서, qRT-PCR 및 지방산 조성 검정은 둘 다 FAD2.1 유전자의 ledRNA 유도 침묵화를 나타내었다.

[0345] **실시예 6. G:U 염기쌍 또는 미스매치된 뉴클레오티드를 포함하는 헤어핀 RNA의 설계 및 평가**

[0346] GUS RNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA

[0347] 리포터 유전자, 예컨대 효소 β-글루쿠로니다제(GUS)를 인코딩하는 유전자는 식물 세포를 포함하는 진핵 세포에서 유전자 침묵화 효율을 측정하기 위해 사용될 수 있는 단순하고 편리한 검정 시스템을 제공한다(Jefferson et al., 1987). 따라서 본 발명자들은 일부 변형 헤어핀 RNA를 설계하고, 생성하고, 유전자-전달 접근을 사용하여 세포에 헤어핀 RNA를 제공하는 표적 유전자로서 GUS 유전자의 발현을 감소시키는 이의 능력에 대해 평가하고, 변형 헤어핀을 통상적 헤어핀 RNA와 비교하였다. 실험에서 대조군으로 사용된 통상적 헤어핀 RNA는 모든 염기쌍이 정규 염기쌍, 즉 임의의 G:U 염기쌍이 없는 G:C 및 A:U 염기쌍이고, 이중-가닥 영역에서 염기쌍을 형성하지 않은 임의의 뉴클레오티드(미스매치)를 갖지 않고, 변형 헤어핀 RNA와 동일한 200 nt 영역의 GUS mRNA 분자를 표적화하는, 200개의 인접한 염기쌍 길이의 이중-가닥 영역을 가졌다. 이중-가닥 영역을 형성한 센스 및 안티센스 서열은 PDK 인트론을 포함하는 스페이서 서열에 의해 공유 연결되어(Helliwell et al., 2005; Smith et al., 2000), 일차 전사체로부터 인트론의 스플라이싱 후 39개 또는 45개 뉴클레오티드(사용된 클로닝 전략에 따라) 길이의 RNA 루프를 제공하였다. 안티센스 서열을 위해 사용된 DNA 단편에는 발현 카세트 내로의 용이한 클로닝을 위해 5' 말단에 *Xho*I-*Bam*HI 제한 부위 및 3' 말단에 *Hin*dIII-*Kpn*I 제한 부위가 측면에 있었고, 각각의 센스 서열에는 *Xho*I 및 *Kpn*I 제한 부위가 측면에 있었다. 대조군 헤어핀 및 변형 헤어핀 모두에 있어서, 각각의 헤어핀 RNA의 200 bp dsRNA 영역에는 단백질 코딩 영역 내로부터의 야생형 GUS 서열과 전체적으로 상보적인 200개 뉴클레오티드의 안티센스 서열이 포함되었다. SEQ ID NO:10의 뉴클레오티드 13~212에 대응하는 상기 안티센스 서열은 GUS 개방 해독틀(ORF)(SEQ ID NO:8로 제공되는 cDNA 서열)의 뉴클레오티드 804~1003의 상보체였다. 따라서 *GUS* 표적 mRNA는 1900 nt보다 길었다. 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 DNA 단편의 합성을 위해 합리적으로 편리하도록 충분히 작게, 그러나 다이서에 의한 가공 시 여러 sRNA 분자를 제공하도록 충분히 길게, 센스 및 안티센스 서열에 대해 200개 뉴클레오티드 길이를 선택하였다. ORF의 일부로서, 서열은 잠재 스플라이스 부위 또는 전사 종료 부위를 함유하지 않을 것으로 생각되었다.

[0348] 유전 작제물의 제조

[0349] 200 bp GUS ORF 서열을 각각 *Xho*I 및 *Bam*HI 부위 또는 *Hin*dIII 및 *Kpn*I 부위를 함유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍 GUS-WT-F(SEQ ID NO:52) 및 GUS-WT-R(SEQ ID NO:53)을 사용해서 PCR-증폭하여 GUS 서열의 5' 및 3'에 이들 제한 효소 부위를 도입하였다. 증폭된 단편을 벡터 pGEM-T Easy 내로 삽입하고, 정확한 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다. GUS 단편을 *Bam*HI 및 *Hin*dIII로의 소화에 의해 절제하여 pKannibal(Helliwell and Waterhouse, 2005)의 *Bam*HI/*Hin*dIII 부위 내로 삽입하고, 이를 작동 가능하게 연결된 CaMV e35S 프로모터(Grave, 1992) 및 *ocs* 유전자 폴리아데닐화/전사 종결자(Ocs-T) 대비 안티센스 배향으로 GUS 서열에 삽입하였다. 생성 벡터를 pMBW606으로 명명하였고, 이는 5'에서 3'으로 35S::PDK 인트론::안티센스 GUS::Ocs-T 발현 카세트를 함유하였다. 상기 벡터가 4개의 hpRNA 작제물을 조립하기 위한 기본 벡터로서 사용된 중간체 벡터였다.

[0350] *정규 염기쌍만 갖는 작제물 hpGUS[wt]*

[0351] 정규 염기쌍만 갖는, 실험에서 대조군으로서 사용되는 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 hpGUS[wt]로 명명된 벡터를 제조하기 위해, 200 bp GUS PCR 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고, pMBW606에서 35S 프로모터 및 PDK 인트론 간 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 35S::센스 GUS[wt]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T 발현 카세트를 함유하는, pMBW607로 명명된 벡터를 생성하였다. 상기 카세트를 *Not*I로의 소화에 의해 절제하고, pART27(Gleave, 1992)의 *Not*I 부위 내로 삽입하여, GUS mRNA를 표적화하는 정규 염기쌍 형성 헤어핀 RNA를 인코딩하는, hpGUS[wt]로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0352] 200 nt 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 상기 헤어핀은 GUS 서열에 대응하는 200개 연속 염기쌍의 이중-가닥 영역을 가졌다. 발현 카세트에서의 센스 및 안티센스 서열에는 GUS 센스 서열 대비 5' 및 3' 말단에 각각 존재하는 *Bam*HI 및 *Hin*dIII 제한 부위가 각 측면에 있었다. 전사되는 경우, 이들 부위에 대응하는 뉴클레오티드는 또한 혼성화하여, 각 말단에서 6 bp만큼 이중-가닥 영역을 연장할 수 있었다. 발현 카세트의 전사 및 PDK 인트론의 일차 전사체로부터의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 39개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 RNA 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:15로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -471.73 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다. 자유 에너지는 PDK 인트론 서열의 스플라이싱 제거 후 뉴클레오티드 서열에 기반하여 "RNAfold"(http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)를 사용하여 계산하였다.

[0353] 35S 프로모터 및 OCS-T 종결자를 갖는 발현 카세트로부터 전사되는 경우, 생성 헤어핀 RNA를 5' 말단에 부가된 8개 뉴클레오티드 및 3' 말단에서의 임의의 폴리-A 테일의 부가는 고려하지 않고, 3' 말단에 부가된 대략 178개의 뉴클레오티드를 갖는 더 큰 RNA 분자에 포매하였다. 동일한 프로모터-종결자 설계를 변형 헤어핀 RNA에 대해 사용하였으므로, 이들 분자도 5' 및 3' 말단에 이러한 연장을 가졌다. 따라서 PDH 인트론의 스플라이싱 후 헤어핀 RNA 분자의 길이는 대략 630개 뉴클레오티드였다.

[0354] *G:U 염기쌍을 포함하는 작제물 hpGUS[G:U]*

[0355] 동일한 200개 뉴클레오티드의 센스 서열을 포함하지만, 대응하는 야생형 GUS 영역의 모든 52개 시티딘 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 치환된 DNA 단편을 중복 올리고뉴클레오티드 GUS-GU-F(SEQ ID NO:54) 및 GUS-GU-R(SEQ ID NO:55)의 어닐링 및 고-정확도 LongAmp Taq 폴리머라제(New England Biolabs, catalogue number M0323)를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:11)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[G:U]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW608로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *Not*I 소화로 절제하고 pART27의 *Not*I 부위 내로 삽입하여, G:U 염기쌍 형성 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, hpGUS[G:U]로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0356] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하는 헤어핀 RNA를 인코딩하였고, 200 nt 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 52개의 G:U 염기쌍(hpGUS[wt]에서의 G:C 염기쌍 대신) 및 148개의 정규 염기쌍을 가졌다, 즉, 이중-가닥 영역의 뉴클레오티드의 26%가 G:U 염기쌍에 관여되었다. hpGUS[G:U]에서의 148개의 정규 염기쌍은 49개의 U:A 염기쌍, 45개의 A:U 염기쌍 및 54개의 G:C 염기를 포함하여, 대응하는 위치에서 대조군 헤어핀 RNA에서와 동일하였다. 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 9개 염기쌍이었다. 이에 의해 hpGUS[G:U]의 안티센스 뉴클레오티드 서열은 대조군 헤어핀 RNA hpGUS[wt]의 안티센스 서열과 길이(200 nt) 및 서열이 동일하였다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:16으로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -331.73 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 hpGUS[wt]에 대한 것과 마찬가지로, 개별적으로 hpGUS[wt]에서의 G:C 염기쌍에 비해 훨씬 더 약한 52개의 G:U 염기쌍에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0357] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:11의 뉴클레오티드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 7에 나타낸다.

[0358] *4번째 뉴클레오티드마다 미스매치된 뉴클레오티드를 포함하는 작제물 hpGUS[1:4]*

[0359] 동일한 200 bp 센스 서열을 포함하지만 대응하는 야생형 GUS 서열의 4번째 뉴클레오티드마다 치환된 DNA 단편을 설계하고 조립하였다. 4개 뉴클레오티드의 각 블록에서의 모든 4번째 뉴클레오티드(위치 4, 8, 12, 16, 20 등에서의 뉴클레오티드)는 C를 G로, G를 C로, A를 T로, 및 T를 A로 변화시켜 치환하였고, 다른 뉴클레오티드는 변화시키지 않고 놔두었다. 이들 치환은 모두 변위 치환이었고, 전이 치환에 비해 생성 헤어핀 RNA 구조에 대해 더 큰 탈안정화 효과를 가질 것으로 예상되었다. 중복 올리고뉴클레오티드 GUS-4M-F(SEQ ID NO:56) 및 GUS-4M-R(SEQ ID NO:57)의 어닐링 및 LognAmp Taq 폴리머라제를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 DNA 단편을 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:12)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[1:4]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW609로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *Not*I 소화로 절제하고, pART27의 *Not*I 부위 내로 삽입하여, 1:4 미스매치 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, hpGUS[1:4]로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0360] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하며, 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 위치 200에서의 뉴클레오티드에 대한 미스매치를 포함하여, 200 nt 안티센스 서열의 50개 뉴클레오티드에 대한 미스매치를 가진 헤어핀 RNA를 인코딩하였다. 위치 200을 제외하고, 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역은 199 nt 센스 및 안티센스 서열 길이에 걸쳐 150개의 정규 염기쌍 및 49개의 미스매치 뉴클레오티드쌍을 가졌다, 즉 이중-가닥 영역 뉴클레오티드의 24.6%가 미스매치될(염기쌍에 관여되지 않을) 것으로 예측되었다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:17로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -214.05 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 hpGUS[wt]에 대한 것과 마찬가지로, 미스매치 뉴클레오티드에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0361] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:12의 뉴클레오티드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 8에 나타낸다.

[0362] *10개의 뉴클레오티드 중 뉴클레오티드 9 및 10이 미스매치된 작제물 hpGUS[2:10]*

[0363] 동일한 200 bp 센스 서열을 포함하지만 대응하는 야생형 GUS 서열의 9번째 및 10번째 뉴클레오티드마다 치환된 DNA 단편을 설계하고 조립하였다. 10개 뉴클레오티드의 각 블록에서의 모든 9번째 및 10번째 뉴클레오티드(위치 9, 10, 19, 20, 29, 30 등에서의 뉴클레오티드)는 C를 G로, G를 C로, A를 T로, 및 T를 A로 변화시켜 치환하였고, 다른 뉴클레오티드를 변화시키지 않고 놔두었다. 중복 올리고뉴클레오티드 GUS-10M-F(SEQ ID NO:58) 및 GUS-10M-R(SEQ ID NO:59)의 어닐링 및 LognAmp Taq 폴리머라제를 사용하는 3' 말단의 PCR 연장에 의해 DNA 단편을 조립하였다. 증폭된 DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 삽입하고 정확한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:13)을 서열분석에 의해 확인하였다. 이어서 변형된 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I로의 소화에 의해 절제하고 기본 벡터 pMBW606의 *Xho*I/*Kpn*I 부위 내로 삽입하였다. 이는 발현 카세트 35S::센스 GUS[2:10]::PDK 인트론::안티센스 GUS::OCS-T를 함유하는, pMBW610으로 명명된 작제물을 생성하였다. 상기 발현 카세트를 *Not*I 소화로 절제하고, pART27의 *Not*I 부위 내로 삽입하여, 2:10 미스매치 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는, hpGUS[2:10]으로 명명된 벡터를 생성하였다.

[0364] 상기 카세트는 GUS mRNA를 표적화하며, 센스 및 안티센스 서열의 혼성화에 의해 자가-어닐링되는 경우, 위치 199 및 200에서의 뉴클레오티드에 대한 미스매치를 포함하여, 200 nt 안티센스 서열의 50개 뉴클레오티드에 대한 미스매치를 가진 헤어핀 RNA를 인코딩하였다. 위치 199 및 200을 제외하고, 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역은 198 nt 센스 및 안티센스 서열 길이에 걸쳐 160개의 정규 염기쌍 및 19개의 디-뉴클레오티드 미스매치를 가졌다, 즉 이중-가닥 영역 뉴클레오티드의 19.2%가 미스매치될(염기쌍에 관여되지 않을) 것으로 예측되었다. 41개의 U:A 염기쌍, 34개의 A:U 염기쌍, 42개의 G:C 및 43개의 C:G 염기쌍을 포함하는 hpGUS[2:10]에서의 160개의 염기쌍은 대응하는 위치에서 대조군 헤어핀 RNA에서와 동일하였다. 발현 카세트의 전사 및 일차 전사체로부터 PDK 인트론의 스플라이싱 후, 다이서 또는 다른 RN아제에 의한 임의의 가공 전 헤어핀 RNA 구조는 45개 뉴클레오티드의 루프 구조를 가질 것으로 예측되었다. 그 루프를 포함하는 헤어핀 구조의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:18로 제공하며, 폴딩의 자유 에너지는 -302.78 kcal/mol로 예측되었다. 따라서 hpGUS[wt]에 대한 것과 마찬가지로, 헤어핀 구조의 줄기 밖에서 볼록부로 돌출할 것으로 예상되는 미스매치 뉴클레오티드에도 불구하고, 이는 에너지적으로 안정한 헤어핀 구조였다.

[0365] 변형된 GUS 센스 서열(SEQ ID NO:13의 뉴클레오티드 9~208)과 GUS 표적 유전자(SEQ ID NO:14)의 대응하는 영역의 정렬을 도 9에 나타낸다.

[0366] 대조군 및 변형 헤어핀 RNA의 발현을 위한 4개의 유전 작제물을 도 10에 도식적으로 나타낸다.

[0367] **실시예 7. 트랜스제닉 식물에서 변형 헤어핀 RNA의 평가**

[0368] GUS 표적 유전자로 형질전환된 니코티아나 타바쿰(담배) 종 식물을 사용하여 상술된 4개의 헤어핀 RNA 작제물의 효능을 평가하였다. 구체적으로, 표적 식물은 각각 도 11에 도식적으로 나타내는 벡터 pWBPPGH로부터의 GUS 트랜스유전자의 단일-카피 삽입을 함유하는, 2개의 동종접합성, 독립적 트랜스제닉 라인인 PPGH11 및 PPGH24로부터 유래되었다. pWBPPGH의 T-DNA에서의 GUS 유전자는 쿠쿠르비타 페포(*Cucurbita pepo*) L. cv. Autumn Gold(Wang et al., 1994; Wang, 1994)로부터의 체관부 단백질 2(PP2) 유전자의 1.3 kb 길이 프로모터에 작동가능하게 연결된 GUS 코딩 영역(SEQ ID NO:8의 뉴클레오티드 7~1812)을 가졌다. PP2 프로모터와 5' UTR 및 람다 게놈 클론 CPP1.3(Wang, 1994)으로부터, PP2의 처음 18개 아미노산을 인코딩하는 PP2 단백질 코딩 영역의 54개 뉴클레오티드를 절제하고, 상기 단편을 GUS의 세 번째 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오티드로 시작하는 GUS 코딩 서열과 융합하여, GUS 활성을 갖는 N-말단부 융합 폴리펩타이드를 생성함으로써 작제물 pWBPPGH를 제조하였다. pPP2::GUS:Nos-T 카세트를 pWBVec2a(Wang et al., 1998) 내로 삽입하여 pWBPPGH를 생성하고, 이를 사용해서 아그로박테리움 투메파시엔스-매개 잎 디스크 형질전환(Ellis et al., 1987)을 사용하여 니코티아나 타바쿰 cv. Wisconsin 38 식물을 형질전환하고, 하이그로마이신에 대한 내성에 대해 선택하였다. 2개의 트랜스제닉 라인 PPGH11 및 PPGH24의 동종접합성 자손 식물에서의 GUS 활성은 유사하였다. 두 트랜스제닉 식물 모두에서 GUS 발현은 체관부로 제한되지 않았고 식물의 대부분의 조직에 존재하였다. 따라서 이들 식물에서 PP2 프로모터로부터의 GUS 발현은 구성적인 것으로 나타났다. 평가 식물로서 PP2-GUS 식물을 선택한 데에는 2가지 이유가 있었다: i) 이들은 35S-GUS 식물과 거의 동일한 구성적으로 높은 수준의 GUS 발현을 제공하며; ii) PP2 프로모터는 hpRNA 트랜스유전자의 발현을 유도하기 위해 사용되는 35S 프로모터와 상이한 서열을 갖는 쿠쿠르비타 페포로부터 유래되는 내인성 PP2 유전자 프로모터이고, 이에 따라 도입 35S 프로모터에 의한 전사 공동억제를 거치지 않을 것이다.

[0369] 모든 4개의 헤어핀 RNA 작제물(실시예 6)을 사용하여 아그로박테리움-매개 잎-디스크 방법(Ellis et al., 1987)을 사용하고 선택 제제로서 50 mg/ℓ 카나마이신을 사용하여 PPGH11 및 PPGH24 식물을 형질전환시켰다. pWBPPGH의 T-DNA를 도입하기 위해 사용된 이전에 사용된 하이그로마이신과는 상이한 제제인 카나마이신을 이용한 상기 선택 시스템은 형질전환된 식물만을 산출하는 것으로 관찰되었고, 형질전환되지 않은 식물은 재생되지 않았다. hpGUS 작제물로부터의 T-DNA를 함유하는 재생된 트랜스제닉 식물을 온실에서의 성장을 위해 토양으로 옮겨 약 4주 동안 유지한 후 GUS 활성을 검정하였다. 검정되었을 때, 트랜스제닉 식물은 건강하고, 잘 자라고 있었으며, 외관에 있어서 형질전환되지 않은 대조군 식물 그리고 모체 PPGH11 및 PPGH24 식물과 동일하였다. 전체적으로, hpGUS[wt]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 59개의 트랜스제닉 식물을 수득하였고, hpGUS[G:U]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 74개의 식물을 수득하였고, hpGUS[1:4]를 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 33개의 식물을 수득하였고, hpGUS[2:10]을 인코딩하는 T-DNA로 형질전환된 41개의 식물을 수득하였다.

[0370] 형광계측 4-메틸움벨리페릴 β-D-글루쿠로니드(MUG) 검정(Jefferson et al., 1987)에 이어 문헌[Chen et al. (2005)]에 기재된 변형된 역학적 방법을 사용하여 GUS 발현 수준을 측정하였다. 잘 퍼지고, 건강하고, 녹색인 잎을 골라, 각 식물에서 3개의 상이한 잎으로부터 약 1 ㎝ 지름의 잎 샘플을 채취하여 식물을 검정하였다. 평가 식물이 대조군 식물과 동일한 성장 및 발달 단계에 있도록 주의하였다. 각 검정에서는 잎 샘플 당 5 ㎍ 추출 단백질을 사용하였고, 문헌[Chen et al. (2005)]에 기재된 바와 같이 MUG의 절단율을 측정하였다.

[0371] 각각의 독립적인 트랜스제닉 식물에 대해 GUS 활성(검정에서 MUG 단위)을 나타내는, 대표 데이터를 도 12에 나타낸다. hpGUS[wt] 작제물로부터의 데이터는 일부 식물이 적어도 90% 활성 감소를 갖는 강력한 침묵화를 나타내고, 다른 것은 더 약한 침묵화를 나타냄을 보였으므로, 상기 맥락에서 식물을 2개 분류로 분류하고 상이한 작제물을 비교하는 활성 수준으로 대조군 식물 대비 10% GUS 활성을 선택하였다.

[0372] 정규 염기쌍을 형성한 hpGUS[wt]를 인코딩하는 유전 작제물은 강력한 침묵화에 대한 벤치마크로서 10% 활성 수준을 사용하여 평가된 59개의 트랜스제닉 식물 중 32개(54.2%)에서 강력한 GUS 침묵화를 유도하였다. 다른 27개 식물은 모두 감소된 GUS 활성을 나타내었으나 대조군 식물 대비 10% 초과 효소 활성을 보유하였고, 이에 따라 상기 맥락에서 약한 침묵화를 나타내는 것으로 간주되었다. 상기 작제물을 이용한 트랜스제닉 식물은 통상적 헤어핀 설계에 있어서 전형적인(Smith et al., 2000) 1% 미만부터 약 80% 활성 잔여까지 광범위한 정도의 *GUS* 유

전자 침묵화를 나타내었다(도 12).

[0373] 명확히 대비되어, hpGUS[G:U] 작제물은 독립적인 트랜스제닉 라인에 걸쳐 일관되고 균일한 침묵화를 유도하였고, 평가된 74개 식물 중 71개(95.9%)가 강력한 GUS 침묵화를 나타내었다. 또 다시 상이하게, 평가된 모든 33개의 hpGUS[1:4] 식물은 감소된 수준의 GUS 활성을 나타내었고, 8개(24%)만 대조군 식물 대비 10% 미만의 GUS 활성을 산출하였고, 다른 25개는 더 약한 침묵화를 갖는 것으로 분류되었다. 이들 결과는 상기 작제물이 트랜스제닉 라인에 걸쳐 더 약하지만 더 균일한 수준의 GUS 하향조절을 유도함을 시사하였다. hpGUS[2:10] 작제물은 hpGUS[wt] 작제물과 더 유사하게 작용하여, 일부 라인(41개 중 28개, 또는 68.3%)에서 우수한 수준의 침묵화를 유도하였고, 나머지 13개 식물에서는 GUS 침묵화를 거의 또는 전혀 일으키지 않았다.

[0374] 침묵화된 라인(10% 미만 잔여 활성)만을 비교를 위해 사용하여 평균 GUS 활성을 계산한 경우, hpGUS[wt] 식물이 가장 높은 평균 침묵화 정도를 나타내었고, 그 다음은 hpGUS[G:U] 식물 그리고 hpGUS[2:10] 식물 순서였다(도 13). hpGUS[1:4] 식물은 GUS 활성의 가장 적은 평균 감소를 나타내었다. GUS 침묵화 정도는 4개의 상이한 hpRNA 작제물로부터 유래되는 예측되는 hpRNA 구조의 열역학적 안정성과 우수한 상관관계를 나타내었다(실시예 6).

[0375] 그 차이가 자손 식물에서 지속될지 여부를 평가하기 위해, 동종접합성인 두 표적 GUS 유전자를 모두 함유하는 대표 트랜스제닉 식물, 및 hpGUS 트랜스유전자(반접합성)를 자가-수정시켰다. hpGUS 라인으로부터의 카나마이신-내성 자손 식물을 선택하여, hpGUS 트랜스유전자가 없는 모든 무(null) 분리물을 폐기하였다. 이로써 hpGUS 트랜스유전자가 동종접합성 또는 이종접합성 상태로, 모든 자손에 확실히 존재하도록 하였다. 자손 식물을 GUS 활성에 대해 검정하였고, 대표 데이터를 도 14에 나타낸다. hpGUS[wt] 트랜스유전자를 함유하는 자손은 확실히 2개 분류에, 즉 강한 GUS 침묵화를 갖는 것들 및 약한 침묵화를 나타내거나 침묵화를 나타내지 않는 것들에 속했다. 이들 클래스는 이전 세대의 표현형과 잘 연관되어, 표적 유전자 침묵화 정도가 유전 가능함을 나타내었다. 평가된 hpGUS[G:U] 라인의 모든 식물은 일관되게 강력한 침묵화를 나타낸 반면, hpGUS[1:4] 라인의 식물은 일관되게 더 약한 침묵화를 나타내었다. 본 발명자들은 모체 세대에서 관찰된 표현형이 자손 식물에서 일반적으로 유지된다고 결론지었다.

[0376] 형질전환된 식물에 대한 서던 블롯 혼성화 실험

[0377] hpGUS[G:U] 작제물로 생성된 다수의 독립적 트랜스제닉 식물에서 관찰된 강력한 유전자 침묵화의 균일성은 엄청난 것일뿐 아니라 놀랍고 예상치 못한 것이었다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] RNA에 의해 유도된 효과가 아닌 임의의 설명이 침묵화의 균일성을 유도하고 있는지 여부를 확립하고자 했다. 여러 트랜스제닉 식물이 의도한 바와 같이 독립적 형질전환 이벤트로부터 생성되었는지 여부를 평가하기 위해, hpGUS[G:U] 작제물을 함유하는 18개의 대표 트랜스제닉 식물로부터 단리된 DNA 상에서 서던 블롯 혼성화 실험을 수행하였다. 문헌[Wang et al. (2008)]에 의해 기재된 고온-페놀 방법을 사용하여 잎 조직으로부터 DNA를 단리하였다. 서던 블롯 혼성화를 위해, 각 식물 샘플로부터 대략 10 μg의 DNA를 *Hin*dIII 효소로 소화시키고, TBE 완충액 중 1% 아가로스 겔에서 겔 전기영동에 의해 분리하고, 모세관 방법을 사용하여 Hybond-N+ 막 상으로 블로팅하였다(Sambrook et al., 1989). 막을 OCS-T 종결자 영역으로부터의 ^{32}P-표지 DNA 단편과 42℃에서 하룻밤 동안 혼성화하였다. 상기 탐침은 hpGUS[G:U] 트랜스유전자에 혼성화하지만 OCS-T 종결자 서열을 갖지 않는 GUS 표적 유전자에는 혼성화하지 않으므로, 이를 선택하였다. 막을 고엄격성으로 세척하고 보유된 탐침을 PhosphoImager로 가시화하였다.

[0378] 혼성화된 블롯의 자가방사선촬영을 도 15에 나타낸다. 각각의 레인은 1개 내지 5개 또는 6개의 혼성화 밴드를 나타내었다. 동일한 패턴을 나타내는 2개 레인은 없었다, 즉 자가방사선촬영은 16개의 대표 hpGUS[G:U] 식물이 각각 혼성화된 상이한 패턴의 *Hin*dIII 단편을 가지고 이에 따라 상이한 트랜스유전자 삽입으로부터 얻어짐을 나타내었다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] 라인에 대해 관찰된 균일한 GUS 침묵화가 식물에서의 유사한 트랜스유전자 삽입 패턴에 기인하지 않으며, 침묵화의 균일성은 hpGUS[G:U] RNA의 구조에 의해 유도된다고 결론지었다. 본 발명자들은 또한 강력한 유전자 침묵화를 수득하기 위해 여러 카피의 hpGUS[G:U] 트랜스유전자가 요구되지 않으며; 단일 카피의 트랜스유전자가 충분한 것으로 결론지었다.

[0379] 형질전환된 식물에 대한 노던 블롯 혼성화 실험

[0380] hpGUS[G:U] RNA가 트랜스제닉 식물에서 대조군 헤어핀 RNA와 동일한 방식으로 가공되었는지 여부를 결정하기 위해, 트랜스제닉 식물의 잎으로부터 단리된 RNA 상에서 노던 블롯 혼성화 실험을 수행하였다. 노던 블롯 실험을 수행하여 헤어핀 RNA의 다이서-가공으로 생성된 더 짧은 RNA(sRNA, 대략 21개 내지 24개 뉴클레오티드 길이)를 검출하였다. (센스) mRNA로 발현되는 GUS 표적 유전자를 또한 함유하는 트랜스제닉 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U] 식물로부터 단리된 작은 RNA 상에서 실험을 수행하였다. 각각의 작제물에 대해 9개 식물을 sRNA 분석을 위해 선택

하였다. hpGUS[wt] 트랜스제닉 집단에 있어서, 약한 GUS 침묵화를 나타내는 식물뿐만 아니라 강력한 GUS 침묵화를 나타내는 것들도 포함시켰다. 고온-페놀 방법(Wang et al., 2008)을 사용하여 작은 RNA 샘플을 단리하고, 문헌[Wang et al. (2008)]에 따라 노던 블롯 혼성화를 수행하고, RNA 샘플의 겔 전기영동을 변성 조건 하에 수행하였다. 사용된 탐침은 SEQ ID NO:8의 뉴클레오티드 804~1003에 대응하는 센스 서열 또는 안티센스 서열에 대응하는 32P-표지 RNA였다.

[0381] 헤어핀 RNA로부터 유래된 센스 sRNA 분자를 검출하기 위해 안티센스 탐침과 혼성화되거나(상부 패널), 안티센스 sRNA를 검출하기 위해 센스 탐침과 혼성화된(하부 패널), 노던 블롯의 자가방사선촬영을 도 16에 나타낸다. 하부에서, 도면은 hpGUS 작제물이 없는 대조군 식물 대비 GUS 발현 수준에 대한 정량적 스코어를 나타낸다. 다른 실험에서 알려진 길이의 RNA 대비 sRNA의 이동성에 기반하여, 약 20개 내지 25개 뉴클레오티드의 작은 RNA에 대한 혼성화가 관찰되었다. hpGUS[wt] 라인은 sRNA 축적량에서 다양한 변이를 나타내었다. 이는 센스 및 안티센스 sRNA 모두에 대해 관찰되었으나, 안티센스 sRNA 밴드는 센스 밴드만큼 명확하지 않았다. hpGUS[wt] 식물이 200 nt 표적 영역에 대응하는 센스 및 안티센스 서열을 모두 발현하는 hpGUS 트랜스유전자, 및 전장 센스 유전자를 발현하는 GUS 표적 유전자를 모두 함유하므로, 센스 sRNA는 헤어핀 RNA 또는 표적 mRNA로부터 생성되었을 수 있다. sRNA 수준 및 hpGUS[wt] 식물에서의 GUS 침묵화 정도 간에 음의 상관관계가 있는 것으로 드러났다. 예를 들어, 레인 4 및 5에 나타낸 2개의 식물은 상대적으로 더 많은 sRNA를 축적하였으나 중등도 정도의 GUS 하향조절만을 나타내었다. 대조적으로, 레인 7 및 8에 나타낸 2개 식물은 강력한 GUS 침묵화를 가졌으나, 상대적으로 낮은 수준의 sRNA를 축적하였다.

[0382] hpGUS[wt] 식물과는 대조적으로 그리고 hpGUS[G:U] 작제물에 의한 상대적으로 균일한 정도의 침묵화와 일관되게, hpGUS[G:U] 식물은 라인에 걸쳐 균일한 양의 안티센스 sRNA를 축적하였다. 또한, GUS 침묵화 정도는 안티센스 sRNA의 양과 우수한 상관관계를 나타내는 것으로 드러났다. 이들 식물에서 센스 sRNA는 거의 검출되지 않았다. 노던 블롯 혼성화에서 사용된 RNA 탐침이 야생형 GUS 서열로부터 전사되고 이에 따라 모든 C 뉴클레오티드가 U 뉴클레오티드로 대체되어 hpGUS[G:U]로부터의 센스 sRNA와 낮은 수준의 상보성을 가져서 저엄격성 혼성화만을 허용하므로, 이것이 예상되었다. 그러나, 상기 실험은 hpGUS[G:U] RNA가 더 적은 센스 sRNA를 생성하도록 가공되거나 이들이 더 빨리 분해될 가능성을 배제하지 않았다.

[0383] 노던 블롯 혼성화 실험을 반복하되, 이번에는 안티센스 sRNA를 검출하기 위해 센스 탐침만을 사용하였다; 자가방사선촬영을 도 17에 나타낸다. 또 다시, hpGUS[wt] 작제물로부터의 안티센스 sRNA의 생성은 GUS 활성과 음으로 연관되었다(도 17의 상부 패널). 강력하게 침묵화된 식물은 높은 수준의 안티센스 sRNA를 산출한 반면(레인 1, 3, 5, 8 및 10) 약한 침묵화만 나타내거나 침묵화를 나타내지 않은 식물은 본 실험에서 혼성화 신호를 생성하지 않았다(레인 2, 4, 6, 7 및 9). 매우 명확히 대조되어, hpGUS[G:U]를 발현하는 식물은 훨씬 더 낮은, 그러나 일관된 양의 안티센스 sRNA를 생성하였다. hpGUS[G:U]를 발현하는 강력히 침묵화된 식물이 hpGUS[wt]를 발현하는 강력히 침묵화된 식물보다 훨씬 더 낮은 수준의 sRNA를 축적했다는 관찰은 흥미로운 것이었고 본 발명자들에게 hpGUS[wt]가 식물에서 상이한 기전에 의해 가공되지만 대략 hpGUS[wt] 작제물만큼 여전히 효과적임을 제시하였다. 본 실험에서의 추가 관찰은 hpGUS[G:U] 식물에 대한 2개의, 상대적으로 희미한 안티센스 밴드가 hpGUS[wt]로부터의 안티센스 sRNA 밴드에 대해 관찰된 제2 및 제4 밴드에서와 동일한 이동성을 갖는 것으로 드러난다는 실마리를 제공하였다. 이는 후술되는 추가 실험에서 확인되었다. 본 발명자들은 hpGUS[wt]로부터의 sRNA에 대한 4개 밴드가 24-머, 22-머, 21-머 및 20-머를 나타내며, hpGUS[G:U] RNA가 일차적으로 22-머 및 20-머 안티센스 sRNA를 생성하도록 가공된다고 가정하였다.

[0384] 상술된 데이터로부터의 중요하고 확정적인 결론은 hpGUS[G:U] RNA 분자가 sRNA를 생성하기 위해, 특히 다양한 단백질, 예컨대 Argonaute의 존재 하에 RNA 간섭의 매개체로 여겨지는 안티센스 sRNA의 생성을 위해, 하나 이상의 다이서 효소에 의해 가공된다는 것이었다. 관찰된 안티센스 sRNA의 생성은 센스 sRNA가 또한 생성됨을 시사하였지만, 실험은 센스 sRNA의 분해/불안정성 또는 사용된 탐침과의 불충분한 혼성화로 인한 센스 sRNA의 검출 부재 간을 구별하지 않았다. 이들 실험으로부터, 본 발명자들은 또한 이의 가공에 있어서 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U] RNA 분자 간에 명확한 차이가 존재하는 것으로 결론지었다. 이는 분자들이 하나 이상의 다이서에 의해 상이하게 인식됨을 시사하였다.

[0385] **실시예 8. 변형 헤어핀 RNA를 발현하는 트랜스제닉 식물로부터의 sRNA의 분석**

[0386] 또 다른 노던 블롯 혼성화 실험을 수행하여 hpGUS[G:U] 식물로부터의 안티센스 sRNA를 검출하고 이의 크기를 hpGUS[wt]로부터 생성된 것들의 크기와 비교하였다. 자가방사선촬영을 도 18에 나타낸다. 이 때, hpGUS[wt]로부터의 2개의 주요 밴드에 비해 hpGUS[G:U]로부터의 2개의 안티센스 sRNA 밴드의 크기 차이가 보다 뚜렷하였다.

이는 도 18의 인접한 레인 9 및 10에서 밴드의 이동성을 비교함으로써 가장 잘 나타났다. 상기 결과는 2개의 헤어핀 RNA가 식물에서 하나 이상의 다이서에 의해 상이하게 가공됨을 확인시켜주었다.

[0387] 이를 추가 조사하기 위해, hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U]로부터의 작은 RNA 집단을 식물로부터 단리된 전체, 링커-증폭 가능한 sRNA의 심층 서열분석에 의해 분석하였다. 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에 맵핑된 sRNA의 빈도를 결정하였다. 또한 이러한 sRNA의 길이 분포를 결정하였다. 이 결과는 hpGUS[wt] 작제물 대비 hpGUS[G:U] 작제물로부터의 22-머 안티센스 RNA의 빈도가 증가함을 나타내었다. 길이 22 nt의 sRNA의 비율 증가는 hpGUS[wt] 대비 다이서-2에 의한 hpGUS[G:U] 헤어핀 가공에서의 변화를 시사하였다.

[0388] **실시예 9. 식물에서 트랜스유전자의 DNA 메틸화 분석**

[0389] hpGUS[wt]에 의해 부여되는 GUS 침묵화 정도의 변동성 및 안티센스 24-머 sRNA가 hpGUS[wt] 식물에서 검출되었지만 hpGUS[G:U] 식물에서는 뚜렷하게 검출되지 않았다는 관찰은 본 발명자들로 하여금 2개 식물 집단이 표적 GUS 유전자의 DNA 메틸화의 수준에 있어서 상이했는지 여부를 질문하게 만들었다. 서열-특이적 24-머 sRNA는 식물에서의 역방위 반복 구조의 DNA 메틸화 촉진에 관여되는 것으로 여겨진다(Dong et al., 2011). 따라서 본 발명자들은 hpGUS 식물에서의 GUS 트랜스유전자, 특히 헤어핀 인코딩 유전자(침묵화 유전자)의 35S 프로모터 영역의 DNA 메틸화 수준을 평가하였다.

[0390] 이를 수행하기 위해, DNA-메틸화 의존적 엔도뉴클레아제 McrBC를 사용하였다. McrBC는 이중-가닥 DNA의 하나 또는 두 가닥 모두에서 메틸시토신(^{m}C) 염기를 함유하는 DNA를 절단하는 상업적으로 이용 가능한 엔도뉴클레아제이다(Stewart et al., 2000). McrBC는 형태 5' (G 또는 A)^{m}C 3', 바람직하게는 G^{m}C의 2개의 절반-부위로 구성되는 DNA 상의 부위를 인식한다. 이들 절반-부위는 수 백개의 염기쌍에 의해 분리될 수 있지만, 최적 분리는 55 bp 내지 약 100 bp이다. 두 가닥 상에 모두 이러한 연결된 G^{m}C 디뉴클레오티드를 갖는 이중-가닥 DNA가 최적 기질로서 작용한다. McrBC 활성은 메틸화되는 GC 디뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 다에 의존한다. 식물 DNA는 CG, CHG 또는 CHH 서열에서의 C에서 메틸화될 수 있으므로(여기서 H는 A, C 또는 T를 나타냄)(Zhang et al., 2018), 유전자-특이적 서열의 후속 PCR 증폭으로 McrBC를 사용하는 DNA의 소화를 사용하여 식물 게놈에서의 특정 DNA 서열에서 ^{m}C의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 상기 검정에서, 메틸화된 McrBC-소화 게놈 DNA의 PCR 증폭은 메틸화되지 않은 DNA 대비 감소된 양의 증폭 산물을 산출하지만, DNA가 메틸화되지 않은 경우 미처리 DNA와 동일한 양의 PCR 산물을 산출할 것이다.

[0391] 게놈 DNA를 표적 GUS 유전자에 부가하여 hpGUS[wt], hpGUS[G:U] 또는 hpGUS[1:4] 작제물을 함유하는 식물로부터 표준 방법에 의해 단리하였다(Draper and Scott, 1988). 정제된 DNA 샘플을 엔도뉴클레아제 활성을 위해 요구되는 Mg^{2+} 이온 및 GTP의 존재를 포함하여, 제조업체의 지침에 따라 McrBC(카탈로그 번호 M0272; New England Biolabs, Massachusetts)로 처리하였다. 요약하면, 대략 1 ㎍의 게놈 DNA를 30 ㎕ 반응 부피에서 하룻밤 동안 McrBC로 소화시켰다. 소화된 DNA 샘플을 100 ㎕로 희석하고, 관심 영역을 하기와 같이 PCR-증폭하였다.

[0392] 처리 DNA 샘플을 하기 프라이머를 사용하여 PCR 반응에서 사용하였다. hpGUS[wt]에 대한 35S-GUS 접합 서열에 있어서: 순방향 프라이머(35S-F3), 5'-TGGCTCCTACAAATGCCATC-3'(SEQ ID NO:60); 역방향 프라이머(GUSwt-R2), 5'-CARRAACTRTTCRCCCTTCAC-3'(SEQ ID NO:61). hpGUS[G:U]에 대한 35S-GUS 접합 서열에 있어서: 순방향 프라이머(GUSgu-R2), 5'-CAAAAACTATTCACCCTTCAC-3'(SEQ ID NO:62); 역방향 프라이머(GUS4m-R2), CACRAARTRTACRCRCTTRAC(SEQ ID NO:63). 두 작제물 모두에 대한 35S 프로모터 서열에 있어서: 순방향 프라이머(35S-F2), 5'-GAGGATCTAACAGAACTCGC-3'(SEQ ID NO:64); 역방향 프라이머(35S-R1), 5'-CTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3'(SEQ ID NO:65). 각각의 경우, R=A 또는 G, Y=C 또는 T. PCR 반응을 하기 사이클링 조건: 94℃에서 1분 동안, 94℃에서 30초 동안, 55℃ 어닐링을 45초 동안, 68℃ 연장을 1분 동안 35사이클, 그리고 68℃에서 5분 동안 최종 연장으로 수행하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동하고 밴드의 세기를 정량하였다.

[0393] 대표 결과를 도 19 및 20에 나타낸다. 전사 시작 부위를 포함하여 200 bp의 35S 프로모터 서열을 포함하는 35S-GUS 접합 영역에 있어서, 대부분의 hpGUS[wt] 식물은 유의미한 수준의 DNA 메틸화를 나타내었다. hpGUS[wt] 식물 집단 내에서, 더 높은 수준의 GUS 활성, 즉 더 적은 침묵화를 보유하는 개체 식물은 프로모터-GUS 센스 접합 영역의 더 많은 메틸화를 갖는 것으로 드러났다. 결과는 35S 프로모터 영역에 대한 것과 유사하였다. 대조적으로, 대부분의 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 식물은 35S-GUS 접합부에서 더 약한 DNA 메틸화를 나타내었다. 본 발명자들은 상기 근위 프로모터 서열이 트랜스유전자의 발현을 위해 중요하며 상기 영역에서의 메틸화가 트랜스유전자의 전사 유전자 침묵화(TGS)를 통해 침묵화 작제물의 발현을 감소시킬 수 있을 것으로 고려하였다. 이는 "

자가-침묵화"로 명명된다.

[0394] 실시예 6 내지 9에 관한 일반 논의

[0395] *트랜스유전자에서 역방위 반복 DNA 구조의 손상이 그 안정성을 증강시킴*

[0396] hpGUS[wt] 및 hpGUS[2:10] 트랜스제닉 식물 집단은 둘 다 광범위한 표적 유전자 침묵화 정도를 나타내었다. 대조적으로, hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 식물을 함유하는 두 집단은 모두 여러 독립적 라인에서 상대적으로 균일한 GUS 침묵화를 나타내었고, 전자의 작제물에 의해서는 강력한 침묵화가 관찰되었고 후자의 작제물에 의해서는 상대적으로 더 약하지만 유전자 활성의 여전히 상당한 감소가 관찰되었다. [G:U] 및 [1:4] 작제물로부터의 헤어핀 RNA에서, 센스 및 안티센스 서열에서 약 25%의 뉴클레오티드는 200개의 뉴클레오티드 센스/안티센스 서열에 걸쳐 균일하게 분포된 G:U 염기쌍에 또는 서열 미스매치에 관여되었다. 센스 및 안티센스 서열 간 서열 일탈로 인해, 센스 및 안티센스 "암" 간 DNA 작제물에서의 미스매치 또는 역방위 요청 구조는 그 역방위-반복 DNA 구조를 유의미하게 손상시키는 것으로 여겨졌다. 반복 DNA 구조는 다양한 유기체에서 DNA 메틸화 및 침묵화를 유인할 수 있다(Hsieh and Fire, 2000). hpGUS[2:10] 작제물은 또한 센스 및 안티센스 영역 간 미스매치로 이루어졌으나, 센스 및 안티센스 서열 간 각각의 2 bp 미스매치에는 8-bp 연속 매치가 측면에 있어서, 미스매치가 [G:U] 및 [1:4] 트랜스유전자에서만큼 크게 역방위 반복 DNA 구조를 손상시키지 못할 수 있다. 따라서 hpGUS[G:U] 및 hpRNA[1:4]에 의해 유도되는 GUS 침묵화의 균일성은 적어도 부분적으로 더 적은 메틸화를 일으키고 이에 따라 2개의 트랜스유전자의 자가-침묵화를 감소시키는 역방위-반복 DNA 구조의 손상에 기인했었을 수 있다. 센스 및 안티센스 DNA 영역 간 미스매치의 또 다른 이점은 박테리아가 완벽한 역방위 반복부를 결실시키거나 재배열하는 경향이 있으므로, 대장균에서의 역방위 반복부의 클로닝이 보조된다는 것이었다.

[0397] *hpRNA의 열역학적 안정성이 표적 유전자 침묵화 정도에 있어서 중요함*

[0398] 강력히 침묵화된 트랜스제닉 라인만 비교되는 경우, hpGUS[wt] 식물이 가장 큰 정도의 표적 유전자 하향조절을 가지며, 그 뒤는 hpGUS[G:U], hpGUS[2:10] 및 hpGUS[1:4] 순서였다. RNA배율 분석은 hpGUS[wt] 헤어핀 RNA 구조가 가장 낮은 자유 에너지, 즉 가장 큰 안정성을 가지며, hpGUS[G:U], hpGUS[2:10] 및 hpGUS[1:4] 헤어핀이 순서일 것으로 예측하였다. 본 발명자들은 헤어핀 RNA 구조가 안정할수록 유도할 수 있는 표적 유전자 침묵화 정도가 큰 것으로 간주하였다. 이는 또한 더 짧은 구조보다 더 긴 이중-가닥 RNA 구조를 선호하였다. 안정한 이중-가닥 RNA 형성은 효율적인 다이서 가공을 위해 필요한 것으로 여겨졌다. 여기 기재된 실험 결과는 가장 간단한 미스매치 뉴클레오티드를 포함하는 작제물, 예컨대 hpGUS[1:4]에 비해 G:U 염기쌍 형성 작제물의 또 다른 중요한 장점을 시사하였다: 두 유형의 작제물은 모두 자가-침묵화를 감소시키는 손상된 역방위 반복 DNA 구조를 가졌지만, RNA 수준에서 G 및 U가 염기쌍을 형성하는 능력으로 인해 hpGUS[G:U] RNA가 더 안정하였다. 이중-가닥 RNA 구조에 G:U 염기쌍 및 일부 미스매치 뉴클레오티드를 모두 포함하지만 미스매치에서에 비해 G:U 염기쌍에 관여되는 뉴클레오티드가 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배만큼 상대적으로 더 적은, 2개 유형 변형의 조합도 유익한 것으로 간주된다.

[0399] *hpGUS[G:U] RNA가 다이서에 의해 효율적으로 가공되었음*

[0400] 이들 실험에서 답을 얻은 하나의 중요한 질문은 미스매치 또는 G:U 염기쌍 형성 hpRNA가 다이서에 의해 작은 RNA(sRNA)로 가공될 수 있는지 여부였다. hpGUS[G:U] 식물에서의 그리고 1:4 및 2:10 미스매치 hpRNA 식물에서의 강력한 침묵화는 이들 헤어핀 RNA 구조가 다이서에 의해 가공됨을 시사하였다. 이는 sRNA 노던 블롯 혼성화에 의해 [G:U] 분자에 대해 확인되었고, 이는 안티센스 sRNA를 쉽게 검출하였다. 또한, hpGUS[G:U] 식물에서의 GUS 침묵화 정도는 축적된 안티센스 sRNA의 양과 우수한 상관관계를 나타내었다. 각각으로부터 2개의(hpGUS[wt]에 대해서는 하나만) 선택된 라인의 작은 RNA 심층 서열분석은 hpGUS[G:U] 식물이 hpGUS[wt] 식물과 유사하게 풍부한 sRNA를 생성한 반면, hpGUS[1:4] 식물도 sRNA를, 그러나 훨씬 더 낮은 존재비로 생성함을 확인시켜주었다(도 21). hpGUS[1:4] 식물로부터의 더 낮은 수준의 sRNA는 상대적으로 낮은 효율의 GUS 침묵화와 일치하며 hpGUS[1:4] RNA에서의 dsRNA 줄기의 낮은 열역학적 안정성이 다이서 가공 효율을 감소시킴을 제시하였다. GUS 침묵화 정도가 hpGUS[wt] 작제물에 있어서 sRNA의 수준과 상대적으로 낮은 상관관계를 나타냄이 주지되었고, 일부 강력히 침묵화된 라인은 상대적으로 낮은 양의 sRNA를 함유하였다. 이는 일부 hpGUS[wt] 라인에서의 GUS 침묵화가 적어도 부분적으로 sRNA-유도 PTGS보다는 전사 침묵화에 기인함을 제시하였다. 본 발명자들은 유전자 서열, 예컨대 프로모터 영역의 메틸화에 관여되는 헤어핀-인코딩 유전자의 자가 침묵화가 변형 헤어핀 RNA 작제물, 특히 G:U 작제물을 사용하여 경감됨을 인식하였다.

[0401] *G:U 및 1:4 hpRNA 트랜스유전자가 근위 35S 프로모터 영역에서 감소된 DNA 메틸화를 나타냄*

[0402] McrBC 소화-PCR 분석은 전사 시작 부위(TSS) 근처의 240 bp 35S 서열에서의 DNA 메틸화 수준이 hpGUS[wt] 집단 대비 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 트랜스제닉 집단에서 감소됨을 나타내었다. 상기 결과는 본 발명자들에게, 센스 서열에서의 C에서 T로의 변형(hpGUS[G:U]에서) 또는 25% 뉴클레오티드 미스매치(hpGUS[1:4]에서)로 인한, 완벽한 역방위 반복 구조의 손상이 hpRNA 트랜스유전자의 전사 자가-침묵화를 최소화함을 시사하였다. 이는 hpGUS[wt] 집단 대비 hpGUS[G:U] 및 hpGUS[1:4] 집단에서 관찰된 GUS 유전자 침묵화의 균일성과 일치하였다. 본 발명자들은 hpGUS[G:U] 작제물이 적어도 센스 서열에서 감소된 수의 시토신 뉴클레오티드를 갖거나 심지어 이를 갖지 않으므로, 프로모터 메틸화, 이에 따른 전사-자가 침묵화의 감소에서 hpGUS[1:4] 작제물보다 더 이상적이었으며, 이에 따라 프로모터로 확산될 수 있는 DNA 메틸화를 유인하지 않음을 인식하였다.

[0403] **실시예 10. 내인성 유전자를 표적화하는 G:U 염기쌍을 포함하는 헤어핀 RNA의 설계 및 평가**

[0404] EIN2 및 CHS RNA를 표적화하는 변형 헤어핀 RNA

[0405] G:U 변형 헤어핀 RNA가 상술된 바와 같이 통상적 헤어핀 RNA 대비 표적 유전자의 보다 일관되고 균일한 침묵화를 유도하는 것으로 드러났으므로, 본 발명자들은 개선된 설계가 내인성 유전자의 발현도 감소시킬지 여부를 평가하기를 원했다. 따라서 본 발명자들은 시도되는 침묵화를 위해 예시적인 표적 유전자로서 선택된 아라비돕시스 탈리아나에서의 내인성 유전자인, *EIN2* 또는 *CHS* 유전자, 또는 둘 다를 표적화하는 몇몇 [G:U]-변형 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고, 생성하고, 평가하였다. *EIN2* 유전자(SEQ ID NO:19)는 식물 신호전달 분자 에틸렌에 의해 조절되는 신호전달 경로에서의 중심 인자, 즉 조절 단백질인 에틸렌-비민감성 단백질 2(EIN2)를 인코딩하며, CHS 유전자(SEQ ID NO:20)는 아라비돕시스 탈리아나에서의 종자껍질에서 안토시아닌 생성에 관여되는 효소 칼콘 신타아제(CHS)를 인코딩한다. *EIN2* 및 *CHS* 유전자를 모두 동시에 표적화하는 또 다른 G:U 변형 작제물을 생성하였고, 여기서는 EIN2 및 CHS 서열을 전사 융합시켜 단일 헤어핀 RNA를 생성하였다. 또한, *EIN2*, *CHS* 또는 *EIN2* 및 *CHS* 둘 다를 표적화하는 3개의 추가적인 작제물을 제조하였고 여기서 *GUS*를 표적화하는 변형 헤어핀에 대해 수행된 바와 같이 센스 서열에서만이 아니라 센스 및 안티센스 서열 둘 다에서의 시티딘 염기를 티미딘 염기로 대체하였다(본원에서 G:U/U:G 작제물로 명명됨). 변형 헤어핀 RNA 작제물을 세포에 헤어핀 RNA를 제공하기 위해 유전자-전달 접근을 사용하여 내인성 *EIN2* 유전자 또는 *EIN2* 및 *CHS* 유전자의 발현을 감소시키는 이의 능력에 대해 평가하였다. 실험에서 대조군으로 사용된 통상적 헤어핀 RNA는 단독으로 *EIN2* 또는 *CHS* mRNA를 표적화하는 200개 염기쌍 길이의 이중-가닥 RNA 영역, 또는 단일 헤어핀 분자로서 함께 융합된 각각의 *EIN2* 및 *CHS* 유전자로부터의 200개 염기쌍을 포함하는 키메라 이중-가닥 RNA 영역을 가졌다. 융합된 RNA에서, EIN2 이중-가닥 부분은 헤어핀의 루프에 인접하였고 CHS 영역은 루프에 대해 원위에 있었다. 대조군 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에서의 모든 염기쌍은 정규 염기쌍이었다.

[0406] *작제물 제조*

[0407] 야생형 EIN2(SEQ ID NO:19) 및 CHS cDNA(SEQ ID NO:20)의 200 bp 영역에 걸친 DNA 단편을 각각 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍 EIN2wt-F(SEQ ID NO:66) 및 EIN2wt-R(SEQ ID NO:67) 또는 CHSwt-F(SEQ ID NO:68) 및 CHSwt-R(SEQ ID NO:69)을 사용하여 아라비돕시스 탈리아나 Col-0 cDNA로부터 PCR-증폭하였다. 단편을 GUS 헤어핀 작제물에 대해서와 마찬가지로 pGEMT-Easy 내로 삽입하였다(실시예 6). 각각 제한 효소 부위가 측면에 있는 200 bp 변형 센스 EIN2[G:U](SEQ ID NO:22) 및 CHS[G:U](SEQ ID NO:24) 단편 또는 200 bp 변형 안티센스 EIN2[G:U](SEQ ID NO:25) 및 변형 안티센스 CHS[G:U](SEQ ID NO:26) 단편을 포함하는 DNA 단편을 각각의 올리고뉴클레오티드쌍, EIN2gu-F + EIN2gu-R, CHSgu-F + CHSgu-R, asEIN2gu-F + asEIN2gu-R, 및 asCHSgu-F + asCHSgu-R(SEQ ID NO:70~77)의 어닐링에 이어 LongAmp Taq 폴리머라제를 사용하여 3' 말단의 PCR 연장에 의해 조립하였다. 모든 G:U-변형 PCR 단편을 pGEM-T Easy 벡터 내로 클로닝하고 의도한 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다. CHS[wt]::EIN2[wt], CHS[G:U]:EIN2[G:U], 및 asCHS[G:U]::asEIN2[G:U] 융합 단편을 pGEM-T Easy 플라스미드에서의 공통 *Xba*I 부위에서 적절한 CHS 및 EIN2 DNA 단편의 결찰에 의해 제조하였다.

[0408] 35S::센스 단편::PDK 인트론::안티센스 단편::OCS-T 카세트를 hpGUS 작제물에 대해서와 유사한 방식으로 제조하였다. 본질적으로, 안티센스 단편을 *Hin*dIII 및 *Bam*HI로의 소화에 의해 각각의 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고, *Bam*HI 및 *Hin*dIII 부위 간에 pKannibal 내로 삽입하여 이들이 35S 프로모터에 대해 안티센스 배향이 되도록 했다. 이어서 센스 단편을 *Xho*I 및 *Kpn*I을 사용하여 각각의 pGEM-T Easy 플라스미드로부터 절제하고 적절한 안티센스-함유 클론의 동일한 부위 내로 삽입하였다. 그 후, pGEM-T Easy 플라스미드에서의 모든 카세트를 *Not*I로 절제하고 pART27 내로 삽입하여 식물 형질전환을 위한 최종 이원성 벡터를 형성하였다.

[0409] 치환된 뉴클레오티드의 위치를 나타내는, 변형 센스[G:U] 및 안티센스[G:U] 뉴클레오티드 서열과 대응하는 야생형 서열의 정렬을 도 22 내지 25에 나타낸다. 헤어핀 RNA에 대한 발현 카세트의 설계를 도 26에 도식적으로 나

타낸다.

[0410] 헤어핀 RNA 형성의 예측된 자유 에너지를 FOLD 프로그램을 사용하여 추정하였다. 이들은 (kcal/mol) 기준으로, hpEIN2[wt], -453.5; hpEIN2[G:U], -328.1; hpCHS[wt], -507.7; hpCHS[G:U] -328.5; hpEIN2[G:U/U:G], -173.5; hpCHS[G:Y/U:G], -186.0; hpCHS::EIN2[wt], -916.4; hpCHS::EIN2[G:U], -630.9; hpCHS::EIN2[G:U/U:G), -333.8로 계산되었다.

[0411] 식물 형질전환

[0412] 모든 EIN2, CHS 및 키메라 EIN2/CHS 작제물을 사용해서 플로랄 딥 방법(Clough and Bent, 1998)을 사용하여 아라비돕시스 탈리아나 품종 Col-0 식물을 형질전환하였다. 트랜스제닉 식물을 선택하기 위해, 아그로박테리움-침지 꽃으로부터 수집한 종자를 염소 기체로 멸균화하고 50 mg/ℓ 카나마이신을 함유하는 MS 배지 상에 접종하였다. 모든 9개 작제물에 대해 여러 트랜스제닉 라인을 수득하였다(표 1). 이들 일차 형질전환체(T1 세대)를 토양으로 옮기고, 자가-수정시키고, 성숙하도록 성장시켰다. 이들 식물로부터 수집된 종자(T2 종자)를 사용해서 T2 식물을 확립하고 트랜스유전자에 대해 동종접합성인 라인에 대해 스크리닝하였다. 이들을 EIN2 및 CHS 침묵화 분석을 위해 사용하였다.

[0413] [표 1]

[0414] Col-0 배경에서 수득된 트랜스제닉 식물의 요약

[0415]

작제물	수득된 트랜스제닉 라인의 수
hpEIN2[wt]	46
hpCHS[wt]	34
hpEIN2[G:U]	23
hpCHS[G:U]	32
hpEIN2[G:U/U:G]	52
hpCHS[G:U/U:G]	13
hpCHS::EIN2[wt]	28
hpCHS::EIN2[G:U]	26
hpCHS::EIN2[G:U/U:G]	20

[0416] EIN2 침묵화 정도 분석

[0417] *EIN2*는 에틸렌 감지에 관여되는 수용체 단백질을 인코딩하는 아라비돕시스 탈리아나에서의 유전자이다. 이 유전자는 종자의 발아 직후 묘목에서뿐만 아니라 이후 식물 성장 및 발생에서 발현된다. *EIN2* 돌연변이체 묘목은 식물에서 에틸렌 합성의 중간체인 1-아미노사이클로프로판-1-카복실산(ACC)의 존재 하에 암소에서 발아되는 경우, 동종 야생형 묘목 대비 하배축 신장을 나타낸다. 따라서 트랜스제닉 식물에서의 *EIN2* 유전자 발현 및 침묵화 정도를 완전 암소에서 50 μg/ℓ의 ACC를 함유하는 MS 배지 상에서의 종자 발아 및 야생형 묘목 대비 이의 하배축 길이 측정에 의해 검정하였다. 하배축 길이는 측정하기 용이한 표현형이었고 *EIN2* 유전자 발현의 감소 정도의 우수한 표시인자여서, 상이한 수준의 *EIN2* 침묵화를 시사하였다. *EIN2* 유전자 발현이 침묵화된 식물은 야생형 묘목(짧은 하배축) 내지 무-돌연변이체 묘목(긴 하배축) 범위의 어느 위치에서, EIN2 침묵화 수준에 따라 다양한 정도의 하배축 신장을 가질 것으로 예상되었다. 각각의 작제물에 있어서 20개의 무작위 선택되고, 독립적으로 형질전환된 식물로부터의 종자를 검정하였다. hpCHS::EIN2[G:U] 작제물을 함유하는 20개 중 1개의 식물로부터의 종자는 발아하지 않았다. 하배축 길이에 대한 데이터를 도 27에 나타낸다.

[0418] hpEIN2[wt] 라인은 상당한 범위의 *EIN2* 침묵화 정도를 나타내었고, 7개 라인(도 27에서의 식물 라인 2, 5, 9, 10, 12, 14, 16)은 명확히 야생형 대비 낮은 수준의 침묵화 또는 동일한 하배축 길이를 나타내며, 다른 13개 라인은 중등도 내지 강력한 *EIN2* 침묵화를 가졌다. 각각의 독립적 라인 내의 개체 식물은 하배축 길이의 차이에 의해 시사되는 바와 같이, 광범위한 EIN2 침묵화 정도를 나타내는 경향이 있었다. 대조적으로, hpEIN2[G:U] 작제물을 포함하는 2개 라인(도 27에서 식물 라인 5, 18)만 약한 *EIN2* 침묵화를 나타내었고, 나머지 18개는 균일하고, 강력한 *EIN2* 침묵화를 나타내었다. 또한, 각각의 18개 라인 내의 개체 식물은 hpEIN2[wt] 작제물로 형질전환된 식물에 비해 상대적으로 균일한 *EIN2* 침묵화를 갖는 것으로 드러났다. 본 발명자들은 G:U 변형 헤어핀 RNA 작제물이 내인성 RNA의 동일한 영역을 표적화하는 통상적 헤어핀 RNA에 비해 더 균일하고 더 예측 가능한, 내인성 유전자의 보다 일관되고 덜 가변적인 유전자 침묵화를 부여할 수 있는 것으로 결론지었다.

[0419] 트랜스제닉 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U] 집단은 또한 *EIN2* 침묵화 정도 및 트랜스유전자 카피수 간 상관관계가 상이하였다. 트랜스유전자 카피수는 자손 식물에서의 카나마이신 내성 마커 유전자에 대한 분리 비 - 3:1 비의 내성:감수성 묘목에 의해 시사되어 단일 유전자위 삽입을 시사한 반면, 훨씬 더 높은 비는 다중-유전자위 트랜스유전자 삽입을 시사하였다. hpEIN2[wt] 작제물로 형질전환된 몇몇 다중 카피수 라인은 낮은 수준의 *EIN2* 침묵화를 나타낸 반면, 이는 단일-카피 및 다중-카피 유전자위 라인이 모두 강력한 *EIN2* 침묵화를 나타낸 hpEIN2[G:U] 라인에 있어서는 해당되지 않았다.

[0420] *EIN2* 유전자는 또한 CHS::EIN2 융합 헤어핀 RNA로 형질전환된 묘목에서 침묵화되었다. 단일 hpEIN2[G:U] 작제물을 함유하는 식물과 유사하게, hpCHS::EIN2[G:U] 묘목은 hpCHS::EIN2[wt] 묘목에 비해 독립적 라인에 걸쳐 보다 균일한 *EIN2* 침묵화를 나타내었다. 독립적 라인 내의 개체 식물 간 침묵화도 hpCHS::EIN2[wt] 라인에 비해 hpCHS::EIN2[G:U] 라인에 있어서 보다 균일한 것으로 드러났다. 동시에, *EIN2* 침묵화 정도는 hpGUS[wt] 및 hpGUS[G:U]로 형질전환된 식물 간 비교와 유사하게, hpCHS::EIN2[G:U] 식물에서보다 고도로 침묵화된 hpCHS::EIN2[wt] 식물에서 약간 더 강력하였다. 침묵화 정도의 비교는 융합 작제물이 단일 hpEIN2[G:U] 작제물보다 강력한 *EIN2* 침묵화를 유도하지 않음을 시사하였고, 실제로 융합 G:U 헤어핀 작제물이 단일 유전자-표적화 hpEIN2[G:U] 작제물에 비해 약간 더 약한 *EIN2* 침묵화를 유도하는 것으로 드러났다.

[0421] G:U/U:G 작제물로 형질전환된 식물을 조사할 때, 센스 및 안티센스 서열 둘 다의 시티딘(C) 뉴클레오티드가 티미딘(T) 뉴클레오티드로 변형된 경우, 야생형 식물 대비 분석된 모든 20개의 독립적 라인에 있어서 하배축 길이의 증가는 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다. 이는 hpEIN2[G:U/U:G] 및 hpCHS::EIN2[G:U/U:G] 작제물 모두에 있어서 관찰되었다. 이들 결과는 본 발명자들에게 약 46% 치환을 갖는 G:U/U:G 염기쌍 형성 헤어핀 RNA 작제물이 아마도 헤어핀 RNA의 염기쌍형성이 너무 많이 탈안정화되었기 때문에, 표적 유전자 침묵화의 유도에서 효과적이 아니었음을 시사하였다. 본 발명자들은 가능한 두 이유가 비효과에 기여했을 수 있는 것으로 고려하였다. 첫 번째로, 헤어핀 RNA의 EIN2 이중-가닥 영역은 센스 및 안티센스 서열 사이에 가능한 200개의 염기쌍 중 92개의 G:U 염기쌍을 가졌다. 두 번째로, 변형 안티센스 서열과 야생형 센스 서열 상보체의 정렬은 안티센스 서열에서 49개의 C에서 T로의 대체가 *EIN2* mRNA를 표적화하는 안티센스 서열의 효과를 감소시켰을 수 있음을 나타내었다. 본 발명자들은 상기 실험으로부터, 적어도 *EIN2* 표적 유전자에 있어서, 헤어핀 RNA에서 잘 관용되고 침묵화를 위해 여전히 충분한 효과를 유지할 수 있는 뉴클레오티드 치환의 수에 대한 상한이 존재한다고 결론지었다. 예를 들어, 92/200=46% 치환은 너무 높은 백분율이었을 수 있다.

[0422] CHS 침묵화 정도의 분석

[0423] 트랜스제닉 식물을 조직 배양 배지 상에서 시험관내 성장시킨 전체 식물로부터 추출된 RNA 상에서 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)에 의해 CHS 유전자 발현 수준에 대해 검정하였다. CHS mRNA에 대해 사용된 프라이머는 순방향 프라이머(CHS-200-F2), 5'-GACATGCCTGGTGCTGACTA-3'(SEQ ID NO:78); 역방향 프라이머(CHS-200-R2) 5'-CCTTAGCGATACGGAGGACA-3'(SEQ ID NO:79)이었다. 표준으로 사용된 참조 유전자 액틴2에 대해 사용된 프라이머는 순방향 프라이머(액틴2-For) 5'-TCCCTCAGCACATTCCAGCA-3'(SEQ ID NO:80) 및 역방향 프라이머(액틴2-Rev) 5'-GATCCCATTCATAAAACCCCAG-3'(SEQ ID NO:81)이었다.

[0424] 데이터는 *액틴2* 유전자에 대한 참조 mRNA 대비 식물에서 축적된 CHS mRNA의 수준이 50% 내지 96% 범위로 감소함을 나타내었다(도 28).

[0425] CHS 활성이 완전히 부재한 아라비돕시스 탈리아나 종자는 야생형 종자의 갈색 색상 대비 흐린 종자 껍질 색상을 갖는다. 따라서, 트랜스제닉 식물의 종자를 이의 종자껍질 색상에 대해 시각적으로 검사하였다. 종자 껍질 색상의 명백한 감소가 몇몇 식물로부터의 종자에서 관찰되었으나, 다른 식물에서는 이들 식물의 잎에서 CHS mRNA의 감소에도 불구하고 관찰되지 않았다. 그러나, 종자 껍질 색상 표현형은 CHS 활성이 식물의 성장 동안 발생 중인 종자 껍질에서 거의 완전히 제거되었을 때에만 나타나는 것으로 간주되었다. 또한, 35S 프로모터는 발생 중인 종자 껍질에서, 무 돌연변이체에서 나타난 흐린 종자 표현형을 제공하기 위한 수준의 CHS 활성 감소를 제공하기에 충분히 활성이 있지 않았을 수 있다. 시각적 종자 껍질 색상 표현형의 개선은 종자의 종자 껍질에서 더 활성이 있는 프로모터를 사용하여 획득될 수 있었다.

[0426] **실시예 11. 헤어핀 RNA 작제물로부터의 sRNA 분석**

[0427] RNA 샘플 상에서 노던 블롯 혼성화를 수행하여 hpEIN2[G:U] 식물로부터 안티센스 sRNA를 검출하고, 이의 양 및 크기를 hpEIN2[wt]로부터 생성된 sRNA와 비교하였다. 탐침은 hpEIN2[wt] 작제물에서 200개 뉴클레오티드 센스 서열에 대응하는 ^{32}P-표지 RNA 탐침이었고 저엄격성 조건 하에 혼성화를 수행하여 더 짧은(20개 내지 24개 뉴클

레오티드) 서열의 검출을 허용하였다. 탐침분석된 노던 블롯으로부터의 자가방사선촬영을 도 29에 나타낸다. 상기 실험은 hpEIN2[G:U] 헤어핀 RNA가 sRNA로 가공되며 축적 수준이 hpEIN2[wt] 라인의 수준에 비해 분석된 9개의 독립적으로 형질전환된 hpEIN2[G:U] 식물에 걸쳐 상대적으로 균일함을 나타내었다. GUS 헤어핀 RNA에 대한 비슷한 실험과 유사하게, hpEIN2[wt]로부터의 2개의 주요 밴드 대비 hpEIN2[G:U]로부터의 2개의 안티센스 sRNA 밴드의 크기 차이가 상당히 뚜렷했다. 이는 도 28의 인접한 레인 10 및 11에서의 밴드 이동성을 비교하여 가장 잘 나타났다.

[0428] 이를 추가 조사하기 위해, hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]로부터의 작은 RNA 집단을 전체 식물로부터 단리된 총 sRNA 집단의 심층 서열분석에 의해 분석한다. hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]의 이중-가닥 영역에 맵핑된 각 집단의 비율을 결정하였다. 각 집단에서 약 1600만개의 판독으로부터, 약 50,000개 sRNA가 hpEIN2[wt] 이중-가닥 영역에 맵핑된 반면, 약 700개만 hpEIN2[G:U]에 맵핑되었다. 이는 훨씬 더 적은 수의 sRNA가 [G:U] 헤어핀으로부터 생성됨을 시사하였다. *EIN2*-특이적 22-머의 비율 증가도 관찰되었다.

[0429] **실시예 12. *EIN2* 침묵화된 식물의 DNA 메틸화 분석**

[0430] GUS 및 EIN2 침묵화 결과는 모두 변형되지 않은 센스 서열을 갖는 hpRNA 작제물이 G:U 염기쌍을 제공하는 변형 센스 서열을 갖는 작제물에 비해 고도로 가변적인 수준의 표적 유전자 침묵화를 유도함을 시사하였다. 상술된 바와 같이, hpGUS[G:U] 작제물의 프로모터 영역은 hpGUS[wt] 작제물에 비해 더 적은 메틸화를 갖는 것으로 드러났다. DNA 메틸화를 평가하고 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U] 트랜스제닉 식물을 비교하기 위해, 각 집단으로부터의 12개 식물을 McrBC 방법을 사용하여 35S 프로모터 및 35S-프로모터-센스 EIN2 접합 영역에서 DNA 메틸화에 대해 분석하였다. 35S 프로모터 영역에 대해 사용된 프라이머: 순방향 프라이머(Top-35S-F2), 5'-AGAAAATYTTYGTYAAYATGGTGG-3'(SEQ ID NO:82), 역방향 프라이머(Top-35S-R2), 5'-TCARTRRARATRTCACATCAATCC-3'(SEQ ID NO:83). 35S 프로모터-센스 EIN2 접합 영역에 대해 사용된 프라이머: 순방향 프라이머(Link-35S-F2), 5'-YYATYATTGYGATAAAGGAAAGG-3'(SEQ ID NO:84) 및 역방향 프라이머(Link-EIN2-R2), 5'-TAATTRCCACCAARTCATACCC-3'(SEQ ID NO:85). 각각의 이들 프라이머 서열에서, Y=C 또는 T 및 R=A 또는 G이다.

[0431] DNA 메틸화 정도의 정량은 실시간 PCR 검정을 수행하여 결정하였다. 각각의 식물에 있어서, McrBC로의 게놈 DNA 처리 후 DNA 단편의 증폭율/McrBC로 게놈 DNA를 처리하지 않은 DNA 단편의 증폭율의 몫을 계산하였다.

[0432] 거의 모든 hpEIN2[wt] 식물은 35S 프로모터, 특히 35S-EIN2 접합부에서 상당한 수준의 DNA 메틸화를 나타내었지만, 일부는 다른 것보다 더 나타내었다. 도 30 및 31에 나타낸 바와 같이, 레인 1, 4, 7, 9, 11 및 12에 나타낸 식물 라인은 모두 더 긴 하배축 길이에 의해 나타낸 바와 같이 강력한 EIN2 침묵화를 나타내었다. 대조적으로, 레인 2, 3, 5, 6, 8, 및 10에 나타낸 다른 6개 라인은 상대적으로 약한 EIN2 침묵화를 나타내어, 더 짧은 하배축을 생성하였다. 이들 더 약한-침묵화된 라인은 게놈 DNA가 McrBC로 사전-소화된 경우 훨씬 더 낮은 PCR 밴드 세기로 나타낸 바와 같이 프로모터 및 접합 서열에서 더 많은 DNA 메틸화를 나타내었다. 정량적 실시간 PCR(qPCR) 검정은 이들 관찰을 확인시켜주었다(도 31). 모든 12개의 평가 라인은 35S 프로모터 영역 및 35S-센스 접합 영역("접합부")에서 모두 어느 정도의 DNA 메틸화를 나타내었다. 가장 큰 메틸화 정도, 즉 qPCR 검정에서 가장 낮은 몫은 hpEIN2[wt] 라인 2, 3, 5, 6, 8 및 10에 대한 것이었고, 하배축 길이로 측정된 바와 같은 침묵화의 감소된 정도와 완벽하게 연관되었다. 이들 결과는 일부 hpEIN2[wt] 라인에서 감소된 EIN2 침묵화가 증가된 프로모터 메틸화와 연관됨을 확인시켜주었다. EIN2에 대해 침묵화된 hpEIN2[wt] 식물 라인에서도, 특히 35S-센스 EIN2 접합 단편 영역에서, 여전히 상당한 수준의 DNA 메틸화가 존재하였다. 프로모터가 메틸화되는 경우, 이는 전사 침묵화를 유도하는 것으로 여겨진다. 여기에서와 같이, 침묵화 작제물의 경우, 이는 "자가-침묵화"의 한 형태이다.

[0433] hpEIN2[wt] 라인과는 대조적으로, hpEIN2[G:U] 라인은 35S 프로모터 및 35S-EIN2 접합부 모두에서 더 적은 DNA 메틸화를 나타내었다. 실제로 도 30에서 레인 1, 2, 3 및 7(도 31에서 레인 13, 14, 15 및 20)에 대응하는 이들 12개의 G:U 라인 중 4개는 McrBC-처리 및 미처리 샘플 간에 동일한 강도의 PCR 밴드로 나타내는 바와 같이 뚜렷한 DNA 메틸화를 갖지 않았다. 이들 증폭을 qPCR에 의해 정량하는 경우, 12개 라인 중 6개가 McrBC 처리로부터 단편의 감소를 거의 또는 전혀 나타내지 않았고 이에 따라 DNA 메틸화를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다 - 도 31의 하부 패널, 라인 13, 14, 15, 18, 19 및 20을 참고한다. 이들 결과는 적어도 일부 라인에서, hpEIN2[G:U] 작제물에 의한 상대적으로 균일한 *EIN2* 침묵화가 hpEIN2[wt] 대비 유의미하게 더 적은 프로모터 메틸화, 그리고 이에 따라 더 적은 전사 자가-침묵화에 기인함을 시사하였다.

[0434] 이들 결론을 바이설파이트 서열분석을 이용한 트랜스제닉 식물 라인으로부터의 게놈 DNA의 분석에 의해 추가 확인하였다. 상기 검정은 바이설파이트로의 DNA 처리가 DNA 내의 메틸화되지 않은 시토신 염기를 우라실(U)로 전

환시키지만, 5-메틸시토신 염기(^{m}C)는 영향받지 않는다는 점을 이용하였다. 바이설파이트 처리 후, 관심 DNA의 정의된 절편을 처리 DNA의 센스 가닥만 증폭되도록 하는 방식으로 PCR 반응에서 증폭하였다. 이어서 PCR 산물로 벌크 서열분석을 거쳐, DNA 절편에서 개별 시토신 염기의 메틸화 위치 및 정도를 드러내었다. 따라서, 검정은 DNA 절편의 메틸화 상태에 관한 단일-뉴클레오티드 분해 정보를 산출하였다.

[0435] 도 31에서 hpEIN2[wt] 라인 1, 7 및 9 및 hpEIN2[G:U] 라인 13, 15 및 18에 대응하는, 각각의 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]에 있어서 가장 강한 수준의 EIN2 침묵화를 나타내는 3개의 식물 라인을 바이설파이트 서열분석에 의해 분석하였다. 이들 식물 라인은 가장 긴 하배축 길이를 나타내었고, 이에 따라 각 작제물에 있어서 20개 라인 중 가장 낮은 수준의 DNA 메틸화를 가질 것으로 예상되었다. 결과를 각각 hpEIN2[wt] 및 hpEIN2[G:U]에 대해 도 32 및 33에 나타낸다. 비교되는 경우, hpEIN2[wt] 식물의 35S 프로모터 영역 및 EIN2 센스 영역에서의 여러 시토신이 광범위하게 메틸화됨이 명확하였다. 뚜렷하게 대조되어, 3개의 hpEIN2[G:U] 식물 라인은 35S 프로모터 영역에서 훨씬 더 낮은 수준의 시토신 메틸화를 나타내었다.

[0436] **실시예 13. hpGUS[1:4] 작제물의 프로모터에서의 DNA 메틸화 수준**

[0437] hpGUS[1:4] 식물로부터 단리된 게놈 DNA를 상술된 바와 같은 McrBC 및 바이설파이트 방법을 사용하여 DNA 메틸화에 대해 분석한 경우, hpGUS[wt] 식물 대비 35S 프로모터 및 35S 프로모터-GUS 센스 서열 영역에 시토신 염기의 메틸화가 더 적다는 것이 유사하게 관찰되었다.

[0438] 실시예 10 내지 13에 관한 일반 논의

[0439] *G:U 염기쌍을 갖는 이중-가닥 RNA가 통상적 dsRNA보다 균일한 유전자 침묵화를 유도함*

[0440] GUS 작제물과 유사하게, hpEIN2[G:U] 및 hpCHS:EIN2[G:U]는 둘 다 통상적 헤어핀 RNA를 인코딩하는 각각의 hpRNA[wt] 작제물보다 일관되고 균일한 EIN2 침묵화를 유도하였다. 균일성은 여러 독립적 트랜스제닉 라인에 걸쳐서 뿐만 아니라 각각 동일한 트랜스제닉 삽입을 가진 트랜스제닉 라인 내의 동배 식물에 걸쳐서도 일어났다. 균일성에 부가하여, hpEIN2[G:U]에 의해 유도된 EIN2 침묵화 정도는 강력히 침묵화된 hpEIN2[wt] 라인의 침묵화 정도에 가까웠다. *CHS* 유전자 침묵화 분석은 hpCHS[G:U] 작제물이 CHS mRNA 수준을 50% 내지 97%만큼 감소시키는 데 효과적이었지만 매우 소수의 식물이 감소된 종자 껍질 색상에서 명확히 가시적인 표현형을 나타냄을 시사하였다. 종자 껍질 색상에서 더욱 가시적인 표현형을 보지 못하는 것에 대한 가능한 설명은 낮은 수준의 CHS 활성이라도 플라보노이드 색소를 생성하기 충분할 수 있다는 것이었다. 다른 가능한 설명은 35S 프로모터가 표현형을 생성하는 데 있어서 발생 중인 종자껍질에서 충분히 활성이 있지 않았다거나 hpCHS[G:U] 작제물 서열이 EIN2 서열에 대해서는 43개(21.5%) 및 GUS 서열에 대해 52개(26%)의 시토신 치환만을 함유한 것에 비해, 65개의 시토신 치환(32.5%)을 함유했다는 것이었다. 또한, CHS 서열 내의 여러 이러한 시토신 염기는 2개 또는 3개 연속 시토신 세트로 일어나서, 이들 모두가 치환될 필요가 없다. 센스 가닥의 모든 시토신이 치환된 경우, 이는 hpEIN2[G:U] 및 hpGUS[G:U] RNA에서에 비해 hpCHS[G:U] RNA에서 더 많은 G:U 염기쌍을, 아마도 최적보다 많이 생성하였다. 이를 확인하기 위해, 약 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 시토신 염기가 치환되는, 다양한 시토신 치환을 함유하는 서열을 사용하여 또 다른 세트의 CHS 작제물을 제조한다. 이들 작제물을 평가하고 최적 수준을 결정한다.

[0441] *hpEIN2[G:U] 라인이 보다 균일한 수준의 siRNA를 발현함*

[0442] 상대적으로 균일한 EIN2 유전자 침묵화와 일관되게, hpEIN2[G:U] 라인은 독립적인 라인에 걸쳐 보다 균일한 수준으로 sRNA를 축적하였다. 이는 hpGUS 작제물을 이용하여 [G:U] 변형 hpRNA가 다이서에 의해 효율적으로 가공되고 효과적인 표적 유전자 침묵화를 유도할 수 있다는 결론을 확인시켜주었다.

[0443] *융합 작제물이 유전자 침묵화도 제공함*

[0444] 실험에 CHS:EIN2 융합 작제물을 포함시킨 목적은 2개의 표적 유전자가 단일 헤어핀-인코딩 작제물로 침묵화될 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다. GUS 실험은 자유 에너지 그리고 이에 따른 헤어핀 RNA의 안정성이 표적 유전자 침묵화 정도와 양의 연관성을 가짐을 제시하였다. 결과는 CHS:EIN2 융합 작제물이 두 유전자 모두의 침묵화를 일으키며 - CHS에 있어서는 적어도 mRNA 수준에서 일으킴을 나타내었다.

[0445] 센스 및 안티센스 서열이 모두 C에서 T로 변형되어 염기쌍의 46%가 정규 염기쌍으로부터 G:U 염기쌍으로 전환된 2개의 hpRNA 작제물, hpEIN2[G:U/U:G] 및 hpCHS:EIN2[G:U/U:G]는 대부분의 트랜스제닉 식물에서 EIN2 침묵화를 약하게만 유도하거나 유도하지 않았다. 가능한 설명에는 i) 비효율적인 다이서 가공을 일으키는 너무 많은 G:U 염기쌍이 존재했거나, ii) 너무 많은 G:U 염기쌍을 포함하는 표적 mRNA에 대한 sRNA 결합이 효율적인 mRNA 절단

을 일으키지 못했거나, 이들의 조합이 포함된다.

[0446] *G:U 염기쌍 형성 작제물에 의한 표적 유전자 침묵화의 균일성 증가가 프로모터 메틸화 감소와 연관됨*

[0447] McrBC-소화 PCR 및 바이설파이트 서열분석을 모두 사용하는 DNA 메틸화 분석은 모든 hpEIN2[wt] 식물 라인이 프로모터 영역에서 DNA 메틸화를 나타내며, 메틸화 정도가 EIN2 침묵화 수준과 음의 연관성을 가짐을 나타내었다. McrBC-소화 PCR에 의해 판단된 바와 같이, 3개의 가장 덜 메틸화된 라인조차도 모든 시토신이 메틸화된 것에 비해, 35S 프로모터에서 약 40% DNA 메틸화 수준을 나타내었다. 널리 퍼져있는 프로모터 메틸화는 인접한 프로모터 영역으로 퍼진 EIN2 반복 서열에서의 sRNA-유도 DNA 메틸화에 기인하는 것으로 여겨졌다. hpRNA[wt] 식물 라인과는 대조적으로, 여러 hpEIN2[G:U] 라인은 프로모터 메틸화를 거의 내지 전혀 나타내지 않았고, 분석된 대부분의 식물은 메틸화가 더 적은 시토신을 나타내었다. hpGUS 라인에 대해 논의된 바와 같이, 몇몇 요인이 감소된 메틸화에 기여할 수 있다: i) 역방위-반복 DNA 구조가 센스 서열에서 C 염기를 T 염기로 변화시킴으로써 손상되었고, ii) 센스 EIN2 서열에 시토신이 없어서 sRNA-유도 DNA 메틸화에 의해 메틸화될 수 없었고, iii) G:U 염기쌍을 가지는 dsRNA 영역의 구조 변화로 인한 24-머 RNA 생성 수준 감소가 일부 다이서에 의한 인식에 변화를 일으켜서 다이서 3 및/또는 다이서 4 활성 감소 및 상대적으로 더 큰 다이서 2 활성을 일으켰다. 따라서, hpEIN2[G:U] 트랜스유전자는 정상, 비-RNAi 트랜스유전자(예컨대 과발현 트랜스유전자)와 유사하게 거동할 수 있고, 일부 라인에서 관찰된 프로모터 메틸화는 hpRNA 트랜스유전자의 내재적인 역방위-반복 DNA 구조보다는 T-DNA 삽입 패턴에 기인하였다.

[0448] **실시예 14. 또 다른 내인성 유전자의 발현을 감소시키기 위한 변형 헤어핀**

[0449] 다른 내인성 유전자를 표적화하는, 헤어핀 RNA 또는 ledRNA에 대한 변형 침묵화 RNA의 생성을 위한 유전 작제물을 설계하고 합성하였다. 이들에는 하기가 포함되었다.

[0450] 아라비돕시스 탈리아나 및 브라시카 나푸스에서의 FANCM 유전자는 DEAD/DEAH 박스 RNA 헬리카제 단백질, 접근 번호 및 NM_001333162 및 XM_018659358인, 판코니 빈혈 상보 그룹 M(Fanconi Anemia Complementation Group M (FANCM)) 단백질을 인코딩한다. 아라비돕시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자에 대응하는 cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:31에 제공하며, 브라시카 나푸스에 대한 서열을 SEQ ID NO:32에 제공한다.

[0451] C가 T로 치환된 또는 치환되지 않은 헤어핀 RNA 그리고 아라비돕시스 탈리아나 및 브라시카 나푸스에서 *FANCM* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 발현하기 위한 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 아라비돕시스 탈리아나 유전자에서의 표적 영역을 SEQ ID NO:31의 뉴클레오티드 675~1174(500개 뉴클레오티드)로 선택하였다. 브라시카 나푸스 유전자에서의 표적 영역을 SEQ ID NO:32의 뉴클레오티드 896~1395(500 bp)로 선택하였다. 야생형 센스 서열 또는 변형(G:U) 센스 서열을 사용하여, 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물을 설계하고 조립하였다. hpFANCM-At[wt], hpFANCM-At[G:U], hpFANCM-Bn[wt] 및 hpFANCM-Bn[G:U] 작제물의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:33~36에 제공한다. G:U 작제물을 제조하기 위해, 센스 서열의 모든 시토신 염기를 티민 염기로 대체하였다 - 아라비돕시스 탈리아나 작제물에서 102/500(20.4% G:U 염기쌍 제공) 및 브라시카 나푸스 작제물에서 109/500(21.8% G:U 염기쌍). 브라시카 나푸스 G:U 변형 헤어핀의 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 17개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 16개의 인접한 염기쌍이었다.

[0452] 브라시카 나푸스에서의 *DDM1* 유전자는 DNA에서 시토신 염기를 메틸화하는 메틸트랜스퍼라제를 인코딩한다(Zhang et al., 2018). cDNA의 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:37에서 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자에 대응한다.

[0453] C가 T로 치환된 또는 치환되지 않은 헤어핀 RNA 그리고 브라시카 나푸스에서 *DDM1* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 발현하기 위한 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 브라시카 나푸스 유전자의 2개의 인접하지 않은 표적 영역 SEQ ID NO:37의 뉴클레오티드 504~815 및 1885~2074를 선택하였고, 직접 연결하여 키메라 센스 서열을 제조하였다. 따라서 센스 서열의 총 길이는 502개 뉴클레오티드였다. 야생형 센스 서열 또는 변형(G:U) 센스 서열을 사용하여, 헤어핀 RNA를 인코딩하는 작제물을 설계하고 조립하였다. hpDDM1-Bn[wt] 및 hpDDM1-Bn[G:U] 작제물의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:38~39에 제공한다. G:U 작제물을 제조하기 위해, 센스 서열의 시토신을 티민으로 대체하였다 - 브라시카 나푸스 작제물에서 106/502(21.1% G:U 염기쌍). G:U 변형 헤어핀의 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 20개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 15개의 인접한 염기쌍이었다.

[0454] 내인성 유전자를 표적화하는 또 다른 작제물에 있어서, 350개 뉴클레오티드의 센스 서열 중 104개의 C 가운데 센스 서열에서 95개의 C가 T로 치환되어 헤어핀 RNA이 이중-가닥 영역에서 95/350=27.1% G:U 염기쌍을

제공하는, 헤어핀 RNA를 발현하도록 유전 작제물을 설계하였다. 즉, 센스 서열의 모든 C를 T로 대체하지는 않았다. 특히, 3개, 4개 또는 5개의 인접한 C가 센스 서열에서 연속으로 발생한 경우, 3개의 C 중 1개 또는 2개만, 또는 4개의 C 중 2개 또는 3개만, 또는 5개의 인접한 C 중 2개, 3개 또는 4개만 T로 대체하였다. 이는 이중-가닥 RNA 영역에서 보다 균일한 G:U 염기쌍 분포를 제공하였다. 이중-가닥 영역에서 인접한 정규 염기쌍을 형성하는 가장 긴 신장부는 15개 염기쌍이었고, 두 번째로 긴 신장부는 13개의 인접한 염기쌍이었다.

[0455] 4개, 5개, 6개 또는 7개 뉴클레오티드의 모든 블록에서 1개 또는 2개의 염기쌍이 C에서 T 치환으로 또는 A에서 G 치환으로 변형된 추가 작제물을 설계하였다. 야생형 센스 서열이 T 또는 G로 구성되는 8개 이상의 뉴클레오티드 신장부를 가진 경우, 하나 이상의 뉴클레오티드를 센스 가닥에서 치환하여 블록 내에 미스매치 뉴클레오티드를 생성하거나 C에서 T로 또는 A에서 G로의 치환을 안티센스 가닥에서 제조하여 작제물로부터 전사되는 생성 헤어핀 RNA의 이중-가닥 영역에서 8개 이상의 인접한 정규 염기쌍의 이중-가닥 신장부를 배제하였다.

[0456] **실시예 15. 동물 세포에서 유전자 발현을 감소시키기 위한 변형 헤어핀**

[0457] G:U 염기쌍 형성 형태, ledRNA 형태 또는 두 변형의 조합의, 동물 세포에서의 변형 침묵화 RNA를 평가하기 위해, 증강된 녹색 형광 단백질(EGFP)을 인코딩하는 유전자를 모델 표적 유전자로서 하기 실험에서 사용하였다. EGFP에 대한 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:40에 나타낸다. SEQ ID NO:40의 뉴클레오티드 131~591에 대응하는, 460개 뉴클레오티드의 표적 영역을 선택하였다.

[0458] 발현을 위한 프로모터에 대해 5'에서 3' 순서로, EGFP 코딩 영역의 대응하는 영역(뉴클레오티드 131~590)과 전체적으로 상보적인 460개 뉴클레오티드의 안티센스 EGFP 서열, 부분적으로 GUS 코딩 영역으로부터 유래되는 312개 뉴클레오티드(GUS ORF의 뉴클레오티드 802~1042에 대응함)의 루프 서열, 및 EGFP 코딩 영역의 뉴클레오티드 131~590과 서열이 동일한 460개 뉴클레오티드의 센스 EGFP 서열을 포함하는 헤어핀 RNA를 발현하는, hpEGFP[wt]로 명명된 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 헤어핀 RNA hpEGFP[wt]를 인코딩하는 DNA 서열(SEQ ID NO:41)에는 벡터 pCI(Promega Corporation) 내로의 클로닝을 위해 제공하는 5' 말단의 *Nhe*I 제한 효소 부위 및 3' 말단의 *Sal*I 부위가 포함되었다. 상기 벡터는 포유류 세포 전달감염 실험에 적합하였으며 강력한 CMV 프로모터/인핸서로부터의 발현을 제공할 것이다. 작제물은 또한 *Nhe*I 부위 및 시험관내 전사를 제공하기 위한 안티센스 서열의 시작부 사이에 삽입된 T7 프로모터 서열을 가져서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 헤어핀 RNA를 생성하였다. 헤어핀 인코딩 카세트를 발현 벡터 pCI에서 *Nhe*I에서 *Sal*I 부위 내로 삽입함으로써 RNA 코딩 영역을 CMV 프로모터 및 SV40-후기 폴리아데닐화/전사 종결 영역에 작동 가능하게 연결하였다.

[0459] 센스 서열에 157개의 C에서 T로의 치환을 가지고 안티센스 서열에 치환이 없는 대응하는 헤어핀 작제물을 설계하고 제조하여, hpEGFP[G:U]로 명명하였다(SEQ ID NO:42). EGFP 코딩 영역에서의 표적 영역은 뉴클레오티드 131~590이었다. C에서 T로의 치환 백분율 그리고 이에 따른 헤어핀 RNA의 줄기에서의 G:U 염기쌍은 157/460 = 34.1%였다. 센스 및 안티센스 서열은 460개 뉴클레오티드로 길이가 동일하였다. 유전자 침묵화 분야에서, 긴 이중-가닥 RNA는 인터페론 활성화를 포함하는 세포 반응의 활성화 가능성으로 인해 일반적으로 배제된다.

[0460] 발현을 위한 프로모터에 대해 5'에서 3'으로, EGFP 코딩 서열의 뉴클레오티드 131~358과 전체적으로 상보적인 228개 뉴클레오티드의 안티센스 EGFP 서열, 150개 뉴클레오티드의 루프 서열, EGFP 코딩 영역(SEQ ID NO:40)의 뉴클레오티드 131~590과 서열이 동일한 460개 뉴클레오티드의 센스 EGFP 서열, 144개 뉴클레오티드의 루프 서열, 및 *Nhe*I 및 *Sal*I 제한 부위가 측면에 있는, EGFP 코딩 서열의 뉴클레오티드 359~590과 전체적으로 상보적인 232개 뉴클레오티드의 안티센스 서열을 포함하는 ledRNA(SEQ ID NO:43)를 발현하는, ledEGFP[wt]로 명명된 ledRNA 작제물을 설계하고 제조하였다. 따라서 인코딩된 ledRNA는 도 1a에 나타낸 유형이었다. 하나의 센스 서열 및 2개의 안티센스 서열 간 염기쌍 형성에 의해 자가-어닐링되는 경우, ledRNA 구조는 EGFP 표적 영역에 대응하는 460개 염기쌍의 이중-가닥 영역을 가졌으며, 2개의 안티센스 서열은 서로 직접 공유 연결되지 않지만 뉴클레오티드 358 및 359에 대응하는 말단 간에 "갭" 또는 "닉"을 가졌다. ledRNA 구조를 CMV 프로모터에서의 서열로부터 유래되는 5'-영역 및 3'-영역 그리고 SV40-후기 폴리아데닐화/전사 종결 영역을 포함하는 더 큰 RNA 전사체에 포매하였다.

[0461] ledEGFP[G:U](SEQ ID NO:44)로 명명된, 센스 서열에 162개의 C에서 T로의 치환을 가지며 안티센스 서열에는 치환을 갖지 않는 대응하는 ledRNA 작제물을 또한 설계하고 제조하였다. 각각의 경우에서, EGFP 코딩 영역에서의 표적 영역은 ATG 시작 코돈으로 시작되는 단백질 코딩 영역(SEQ ID NO:40) 대비 뉴클레오티드 131~590이었다. C에서 T로의 치환 백분율, 그리고 이에 따른 ledRNA 줄기에서의 G:U 염기쌍은 162/460 = 35.2%였다.

[0462] hpEGFP[wt], hpEGFP[G:U], ledEGFP[wt] 및 ledEGFP[G:U] 침묵화 RNA를 인코딩하는 플라스미드를 세포 내로의

벡터의 전달감염에 의해 CHO, HeLa 및 VERO 세포에서 유전자 침묵화 활성에 대해 평가하였다. 평가 플라스미드의 GFP 발현 플라스미드와의 공동-전달감염에 의해 검정을 수행하였다. 모든 검정을 3회씩 수행하였다. CHO 세포(차이니즈 햄스터 난소 세포) 및 VERO 세포(아프리카 녹색 원숭이 신장 세포)를 웰 당 1×10^5개 세포의 밀도로 24웰 플레이트 내로 씨드접종하였다. CHO 세포는 변형 MEMα(Sigma, USA) 중에 성장시키고, HeLa 세포 및 VERO 세포는 DMEM(Invitrogen, USA) 중에 성장시켰다. 두 기본 배지에 모두 10% 우태 혈청, 2 mM 글루타민, 10 mM Hepes, 1.5 g/ℓ 나트륨 바이카보네이트, 0.01% 페니실린 및 0.01% 스트렙토마이신을 보충하였다. 세포를 5% CO_2로 37℃에서 성장시켰다. 이어서 세포를 리포펙타민 2000을 사용하여, 플라스미드 DNA, 또는 EGFP 침묵화에 대한 대조군으로서 siRNA로 웰 당 1 ㎍으로 전달감염시켰다. 간략하게, 평가 siRNA 또는 플라스미드를 GFP 리포터 플라스미드(pGFP N1)와 조합한 후 1 ㎕의 리포펙타민 2000과 혼합하였고, 둘 다 50 ㎕ OPTI-MEM(Invitrogen, USA) 중에 희석하고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서 복합체를 세포에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 배지를 교체하고 세포를 72시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로 세포를 유세포 측정하여 GFP 침묵화를 측정하였다. 간략하게, 분석할 세포를 트립신처리하고, PBSA 중에 세척하고, 200 ㎕의 0.01% 나트륨 아지드 및 PBSA 중 2% FCS 중에 재현탁하고, FACScalibur(Becton Dickinson) 유세포 측정계를 사용하여 분석하였다. 데이터 분석을 CELLQuest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 수행하고 평균 형광 세기(MFI)를 리포터 및 무관한(음성 대조군) shRNA를 갖는 대조군 세포의 백분율로서 보고하였다.

[0463] si22로 언급되는 항-GFP siRNA는 Qiagen(USA)에서 입수하였다. si22의 항-GFP siRNA 서열은 센스 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3' (SEQ ID NO:86) 및 안티센스 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3' (SEQ ID NO:87)이었다. pshGFP로 명명된 양성 대조군 유전 작제물을 주형으로서 마우스 U6 서열을 사용하여 1단계 PCR 반응을 통해 생성하였다. 순방향 프라이머는 5'-TTTTAGTATATGTGCTGCCG-3' (SEQ ID NO:88)이었고 역방향 프라이머는 5'-CTCGAGTTCCAAAAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCTCTTGAAGATGAACTTCAGGGTCAGCCAAACAAGGCTTTTCTCCAA-3' (SEQ ID NO:89)이었다. 전장 발현 카세트를 포함하는 증폭 산물을 pGEM-T Easy 내로 결찰하였다. 무관한 shRNA 대조군 플라스미드를 또한 동일한 PCR 방법을 통해 작제하였다. 그 작제를 위해, 순방향 프라이머는 5'-TTTTAGTATATGTGCTGCCG-3' (SEQ ID NO:90)이었고, 역방향 프라이머는 5'-ctcgagttccaaaaaaataagtcgcagcagtacaatctcttgaattgtactgctgcgacttatgaataccgcttcctcctgag-3' (SEQ ID NO:91)이었다.

[0464] 하나의 실험으로부터의 생성 데이터를 도 34에 나타낸다. EGFP 활성의 명확한 감소(RNA 침묵화)가 무관한 shRNA 대조군과 비교되는 경우 si22 및 pshGFP 양성 대조군 모두에 대해 VERO 세포 및 CHO 세포에서 모두 관찰되었다. 이들 양성 대조군은 잘 검증되어 있는 작은 dsRNA 분자(si22)이거나 포유류 세포에서 매우 강력한 침묵화 활성을 갖는 것으로 알려진 shRNA(pshGFP)를 인코딩하였다. 대조군 RNA 분자는 이중-가닥 영역에서 임의의 미스매치 뉴클레오티드 없이 정규 염기쌍만을 사용하여, 그리고 포유류 세포에 대해 일반적으로 사용되는 20개 내지 30개 염기쌍 길이 범위 내인, 각각 20개의 인접한 염기쌍 및 21개의 인접한 염기쌍의 이중-가닥 영역을 갖는다. 대조적으로, hpRNA 및 ledRNA 작제물은 긴 dsRNA 영역을 갖는 분자를 발현한다. 모든 4개의 작제물이 두 세포 유형에서 모두 상당한 정도까지 EGFP 발현을 특이적으로 침묵화하는 것으로 관찰되었다(도 34). G:U 치환의 포함은 CHO 세포에서 두 작제물 모두에 대한 침묵화의 현저한 개선을 제공하였다. VERO 세포에서, 침묵화의 현저한 개선은 ledEGFP[wt] 대비 ledEGFP[G:U] 작제물로만 관찰되었다.

[0465] HeLa(인간) 세포를 사용하여 전달감염 48시간 후 EGFP 활성을 검정하는 제2 실험에서, 유사한 결과가 수득되었다(도 35).

[0466] hpRNA 및 ledRNA 효과기 분자가 통상적인 20 bp 내지 30 bp 크기 범위보다 긴 이중-가닥 영역을 가졌으므로, 이들을 사용하여 포유류 세포에서 유전자 침묵화가 관찰됨을 주지하는 것이 중요하였다. 또한 G:U 염기쌍을 생성하기 위해 뉴클레오티드를 치환하는 변형은 이들 더 긴 dsRNA 분자의 유전자 침묵화 효과를 유의미하게 증강시킴이 또한 명확하였다. 상기 효과는 이들 구조가 진핵 세포에서 관찰되는 miRNA의 전구체인 내인성 priRNA에 더 가깝게 유사하고, 이에 따라 더 긴 dsRNA를 RNA 유도 침묵화 복합체(RISC) 효과기 단백질 내로의 로딩을 위한 가공을 개선한다는 데 기인할 수 있다.

[0467] **실시예 16. 식물에서 *DDM1* 및 *FANCM* 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0468] 본 발명자들은 신규한 유전 프로필 및 다양성(유전적 획득)을 생성하고 식물에서 요망되는 수행능력 형질에 대해 탐색할 수 있는 속도를 증가시키기 위한 방식을 고려하였다. 고려한 하나의 방식은 식물의 유성 생식 동안 일어나는 재조합율을 증가시키는 방식을 찾는 것이었다. 식물 재배자는 수행능력 획득과 연관된 요망되는 유전 프로필에 대해 탐색할 수 있는 상이한 유전(대립유전자) 조합을 생성하기 위해 재조합 이벤트에 의존한다. 그러

나, 각 재배 단계에서 재조합 이벤트의 수는 탐색할 수 있는 가능한 유전 프로필의 수에 비해 극히 적다. 또한, 이들 이벤트가 게놈에서 일어나는 경우 제어하는 요소가 잘 이해되어 있지 않다. 따라서 본 발명자들은 트랜스제닉 접근을 통해 내인적으로 또는 외인적으로 전달되는 ledRNA가 식물에서 사용되어 재조합율을 변형하여 유전적 다양성의 신속한 증가를 허용하고 재배 집단 내에서 가능한 더 빠른 유전적 획득을 일으킬 수 있도록 할 수 있는지 여부를 고려하였다.

[0469] 식물의 에피게놈은 게놈을 조직화하고, 패키징하고, 안정화하는 연관 단백질 및 DNA에 대한 여러 상이한 화학적 변형에 의해 영향받는다. 이들 변형은 또한 재조합이 일어나는 위치를 조절하며, 조밀한 게놈 패키징은 재조합의 강력한 억제제이다(Yelina et al, 2012; Melamed-Bessudo et al., 2012). DDM1(DECREASED DNA METHYLEATION 1)은 DNA의 메틸화 및 게놈 패키징을 조절하는 효소이다. 상기 유전자의 돌연변이는 재조합 이벤트의 위치를 변경할 수 있다(Yelina et al, 2012; Melamed-Bessudo et al., 2012).

[0470] 감수분열 동안 재조합 이벤트는 철저히 조절되며, 중기 1에서의 적절한 염색체 분리를 보장하기 위해 각 염색체 상에서는 1회 내지 2회 이벤트만 일어난다. 재조합 이벤트는 효소 SPO11을 통해 DNA의 이중 가닥 절단(DSB)을 통해 개시된다(Wijnker et al, 2008). 이는 염색체에 따라 수백 개의 DSB를 생성한다. 소수의 이러한 DSB는 교차를 일으키는 반면, 대부분은 재조합 이벤트가 일어날 수 있기 전에 DNA 보수 효소에 의해 보수된다. 또한 DSB가 교차로 발생하는 것을 억제하는 여러 음성적 조절인자가 존재한다. 본 발명자들에 의해 고려된 최초 접근에서, ledRNA 분자 또는 대조로서 통상적 헤어핀 RNA 분자를 인코딩하는 유전 작제물을 잠재적으로 재조합율에 영향을 미칠 수 있는 단백질 인자, 예컨대 FANCM(FANCONI ANEMIA COMPLEMENTATION GROUP M)을 인코딩하는 유전자를 표적화하는, 아라비돕시스 탈리아나 식물 내로 도입하였다.

[0471] 아라비돕시스 탈리아나의 *DDM1* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 AF143940으로 제공한다(Jeddeloh et al., 1999). *DDM1* 유전자 발현 감소는 DNA 메틸화를 감소시키고 아라비돕시스 탈리아나에서의 교차 이벤트의 수 및 위치를 증가시키는 것으로 나타났다(Melamed-Bessudo and Levy, 2012).

[0472] 브라시카 나푸스는 이질사배체 종이며 염색체 A7, A9, C7 및 C9 상에서 각각의 A 및 C 서브게놈 상에 2개의 *DDM1* 유전자를 가지고, 이에 따라 총 4개의 *DDM1* 유전자를 갖는다. 이들 유전자는 BnaA07g37430D-1, BnaC07g16550D-1, BnaA09g52610D-1 및 BnaC09g07810D-1로 명명된다. 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자 BnaA07g37430D-1의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 XR_001278527로 제공한다(SEQ ID NO:93). SEQ ID NO:93의 뉴클레오티드 650~959 및 2029~2218에 대응하는, 4개 유전자의 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고 제조하였다. hpRNA 및 ledRNA 작제물을 설계하기 위해 사용된 뉴클레오티드 영역은 유전자 간의 서열 보존에 기반하여, 브라시카 나푸스에 존재하는 모든 4개의 *DDM1* 유전자 BnaA07g37430D-1, BnaC07g16550D-1, BnaA09g52610D-1 및 BnaC09g07810D-1을 표적화하였다. hpRNA 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:94로 제공한다.

[0473] 동일한 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하고 센스 서열의 97개 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 구조를 가지는 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링된 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역 내 뉴클레오티드의 97/500 = 19.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:95로 제공한다. 또한, 브라시카 나푸스의 *DDM1* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. ledRNA를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:96으로 제공한다.

[0474] 시험관내 전사에 의한 RNA의 생성을 위해, DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤를 절단하는 제한 효소 *Hinc*II로 절단하고, RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. LedRNA를 사용하여 브라시카 나푸스(유채) 떡잎에서 내인성 *DDM1* 전사체를 표적화하였다. 조직 배양 배지 상에서 무균 상태로 성장시킨 5일령 묘목의 떡잎을 조심스럽게 절제하고 2%(w/v) 수크로스를 포함하는 2 ㎖ MS 액체 배지를 함유하는 페트리 디쉬에 배치하고, 113 ㎍의 ledRNA 또는 100 ㎕의 수성 완충 용액을 대조군으로 하였다. 처리를 위해 사용된 MS 액체 배지는 계면활성제 Silwett-77(60 ㎖ 중 0.5 ㎕)을 함유하였다. 페트리 디쉬를 온건히 진탕하며 진탕장치 상에서 인큐베이션하여, 떡잎을 ledRNA를 함유하는 용액 중에 침지시켰다. 샘플을 ledRNA의 적용 5시간 및 7시간 후에 수확하였다. 병렬 실험에서, 떡잎의 상부 표면을 10 ㎍의 ledRNA 또는 완충 용액으로 코팅하고 습식 조직 페이퍼 상에서 인큐베이션하였다. 샘플을 ledRNA 적용 7시간 후에 수집하였다.

[0475] 또한, 브라시카 나푸스의 생식 조직에서 *DDM1* 내인성 전사체를 표적화하기 위해, 유채꽃봉오리를 아그로박테리

움 투마페시안스 균주 AGL1 세포 현탁액, 즉 살아있는 AGL1 세포의 분취물의 존재 하에 또는 부재 하에 ledRNA에 노출시켰다. AGL1 세포를 포함하는 또는 포함하지 않는 수성 완충 용액이 각각의 대조군으로 작용하였다. AGL1을 28℃에서 2일 동안 25 mg/㎖ 리팜피신을 함유하는 10 ㎖의 LB 액체 배지 중에 성장시켰다. 세포를 5분 동안 3000 rpm에서 원심분리에 의해 수확하였다. 세포 펠렛을 세척하고, 세포를 2 ㎖ 액체 MS 배지 중에 재현탁하였다. 꽃봉오리를 62 ㎍의 ledRNA 또는 62 ㎍ + 50 ㎕의 AGL1 배양과 함께, 50 ㎖의 MS 액체 배지 중 0.5 ㎕의 Silwett-77을 포함하는 2 ㎖의 MS 액체 배지를 함유하는 페트리 디쉬에서 인큐베이션하였다. 대조군으로서, 50 ㎕의 완충 용액 또는 50 ㎕의 완충 용액 + 50 ㎕의 AGL1 배양을 사용하였다. 샘플을 7시간 동안 온건히 진탕하며 진탕장치 상에서 인큐베이션하였다. 각 처리를 위해 3개의 생물학적 반복물을 사용하였다.

[0476] 처리 및 대조군 떡잎 및 꽃봉오리를 멸균 증류수 중에 2회 세척하고, 조직 페이퍼를 사용해서 표면의 물을 제거하고 액체 질소로 급속 냉동하였다. RNA를 처리군 및 대조군 조직으로부터 단리하고, DN아제로 처리하여 게놈 DNA를 제거하여 정량하였다. ledRNA-처리 샘플 및 이의 각각의 대조군으로부터의 동량의 총 RNA를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 사용해서 *DDM1*의 발현을 분석하였다.

[0477] ledRNA로 침지된 처리 떡잎에서, *DDM1* 전사체 존재비는 5시간째에 대략 83% 내지 86%만큼 감소하였고, 대조군 대비 7시간째에 91%가 감소하며 추가 감소하였다. 유사하게, 대조군 대비 *DDM1* mRNA 수준의 대략 78% 내지 85% 감소가 ledRNA로 코팅된 떡잎에서 관찰되었다. 아그로박테리움 세포의 부재 하 대조군 대비 ledRNA로 처리된 꽃봉오리에서는 *DDM1* mRNA 존재비의 차이가 검출되지 않았다. 그러나, *DDM1* 전사체 수준의 대략 60% 내지 75% 감소가 각각의 대조군 대비 아그로박테리움의 존재 하에 ledRNA로 처리된 꽃봉오리에서 관찰되었다. 아그로박테리움이 없는 대조군을 아그로박테리움을 가진 대조군과 비교한 경우 *DDM1* 전사체 수준에서 유의차가 검출되지 않아 아그로박테리움 세포 자체가 *DDM1* 전사체의 감소를 유도하지 않음을 나타내었다. 종합하면, 이들 결과는 ledRNA가 떡잎 및 꽃봉오리에서 모두 내인성 *DDM1* 전사체 수준을 감소시킬 수 있는 반면, 살아있는 아그로박테리움 세포는 꽃봉오리로의 ledRNA의 진입을 촉진하는 것으로 드러남을 시사하였다. ledRNA의 이러한 접근 가능성은 또한 물리적 수단, 예컨대 꽃봉오리 외층의 피어싱, 원심분리 또는 진공 여과, 또는 이러한 방법의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0478] 소정 아라비돕시스 탈리아나 돌연변이체, 예컨대 *zip4* 돌연변이체에는 감수분열 교차가 없어서, 염색체 상동체의 분리-오류를 유도하고 이에 따라 번식력을 감소시키며 야생형과 시각적으로 구별될 수 있는 더 짧은 장각(과실)을 야기하였다. *zip4* 돌연변이체의 표현형은 *FANCM* 유전자 발현을 감소시켜 역전될 수 있다.

[0479] 아라비돕시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 NM_001333162(SEQ ID NO:97)로 제공하였다. SEQ ID NO:97의 뉴클레오티드 853~1352에 대응하는, 유전자의 500개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA 작제물을 설계하고 제조하였다. 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:98로 제공한다. 센스 서열의 102개의 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 500개의 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 유사한 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 생성 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링한 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역에서의 뉴클레오티드 102/500 = 20.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:99로 제공한다. 또한, 아라비돕시스 탈리아나의 *FANCM* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. ledRNA를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:100으로 제공한다.

[0480] 브라시카 나푸스는 BnaA05g18180D-1 및 BnaC05g27760D-1로 명명되는, 그 A 및 C 서브게놈 각각에 1개의 *FANCM* 유전자를 갖는다. 브라시카 나푸스의 하나의 *FANCM* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 접근 번호 XM_022719486.1; SEQ ID NO:101)로 제공한다. SEQ ID NO:101의 뉴클레오티드 2847~3349에 대응하는, 유전자의 503개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 설계하고 제조하였다. 작제물에서 요소의 순서는 Hellsgate 벡터로부터의 인트론-안티센스 서열-전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 포함하는 프로모터-센스 서열-루프 서열이었다. hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:102로 제공한다. 센스 서열의 107개의 시토신 뉴클레오티드(C)가 티미딘 뉴클레오티드(T)로 대체된 것을 제외하고 동일한 503개의 뉴클레오티드 영역을 표적화하는 유사한 헤어핀 RNA를 인코딩하는 제2 헤어핀 RNA 작제물을 제조하였다. 키메라 DNA가 전사되고 G:U 치환 hpRNA가 자가-어닐링한 경우, 이는 G:U 염기쌍으로 염기쌍을 형성한 dsRNA 영역에서의 뉴클레오티드 107/500 = 21.4%를 제공하였다. G:U-변형 hpRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:103으로 제공한다. 또한, 브라시카 나푸스의 *FANCM* 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. ledRNA를 인코딩하는 상기 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:104로

제공한다.

[0481] 시험관내 전사에 의한 RNA의 생성을 위해, DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤를 절단하는 제한 효소 *Hinc*II로 절단하고, RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. LedRNA를 아그로박테리움 투메파시엔스 AGL1과 함께 사용하여 아라비돕시스 탈리아나의 *zip4* 돌연변이체의 감수분열-전 싹에서 *FANCM* 전사체를 표적화하였다. *zip4* 돌연변이체의 장각은 약화된 교차 형성으로 인해 야생형 장각에 비해 더 짧았고, 시각적으로 쉽게 관찰되며, 이에 따라 감소된 번식력을 유도하였다. *zip4* 돌연변이체에서의 *FANCM* 억제는 번식력을 복원하고 장각 길이를 복원하는 것으로 나타났다.

[0482] 감수분열 전 싹을 함유하는 아라비돕시스 탈리아나 *zip4* 개화를 각각의 경우, 계면활성제, 이 경우에는 Silwett-77의 존재 하에, AGL1 또는 대조군으로서 AGL1과 완충 용액을 함께 *FANCM*을 표적화하는 ledRNA와 접촉시켰다. 일단 종자 설정이 완료되면, 감수분열 전 싹으로부터 발달한 장각을 절제하여 종자 수를 결정하였다. ledRNA-처리 샘플로부터의 15개 장각 중에서, 2개의 장각은 10개 종자를 나타내었고, 1개의 장각은 9개 종자를 가진 반면, 대조군 장각에서의 종자 수는 3개 내지 6개 범위였다. 이들 결과는 종자 수에서 관찰된 증가가 ledRNA에 의한 *FANCM* 전사체 수준의 억제에 기인하며, 이에 따라 감수분열 교차 수를 증가시키고 번식력을 증가시킴을 시사하였다.

[0483] **실시예 17. 진균 질병에 대한 내성을 위한 RNA 작제물**

[0484] 보리 및 밀의 Mlo 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0485] 곡류 식물의 진균 질병인 밀두균병은 보리에서 자낭균류 블루메리아 그라미니스 f. sp. 호르데이(*hordei*) 그리고 밀에서 관련 블루메리아 그라미니스 f. sp. 트리티시(*tritici*)에 의해 유도된다. 블루메리아 그라미니스는 진균이 식물로부터 영양분을 획득하기 위해 진균 및 숙주 세포 간 밀접한 상호작용이 관여되는, 번식을 위해 식물 숙주를 필요로 하는 흰가루병균목(Erysiphales)의 절대 생체영양성 진균 병원체이다(Glawe, 2008). 진균 자낭홀씨 또는 소병자홀씨가 표면과 접촉한 후, 진균은 처음에 잎, 엽초 또는 잎 이삭의 표피층을 감염시킨다. 감염 후 일정 시간 동안 잎은 초록색이고 활성이 있는 채 유지된 후, 분말성, 균사형 물질이 자라고 잎은 점차적으로 백화되어 죽어나간다. 질병이 진행됨에 따라, 진균 균사체는 진균의 유성 자실체인 작은 검은색 점들로 덮일 수 있다. 밀두균병 질병은 세계적으로 분포되어 있으며 저온, 다습 기후에서 가장 큰 손상을 일으킨다. 이 질병은 주로 결구의 수를 감소시킬 뿐만 아니라 속씨 크기 및 중량을 감소시켜 낟알 수율에 영향을 미친다. 현재, 질병 제어는 조건이 저온이고 습한 경우 빈번하게 적용되어야 하며 고가인 살진균제를 작물에 분무하거나, 내성 품종을 성장시키는 것에 의한다. 또한, 호주에서의 밀에서 밀두균병에 대해 살진균제 내성이 출현하였다.

[0486] 보리 및 밀의 *Mlo* 유전자는 알려지지 않은 기전에 의해 블루메리아 그라미니스에 대한 감수성을 부여하는 Mlo 폴리펩타이드를 인코딩한다. 식물에 고유한 *Mlo* 유전자 패밀리에 의해 인코딩되는 여러, 밀접하게 관련된 MLO 단백질이 존재한다. 각각의 유전자는 형질막에 편재된 알려지지 않은 생화학적 활성을 갖는 7개의 막통과 도메인 단백질을 인코딩한다. 특히, 패밀리 내의 유일한 특이적 *Mlo* 유전자는 밀두균병 감수성 유전자로 작용할 수 있고 이들은 Mlo 단백질의 세포질 C-말단부 도메인 내에 보존된 모티프를 갖는 폴리펩타이드를 인코딩한다. Mlo 폴리펩타이드가 밀두균병 감수성 인자로 작용하는 기전은 알려지지 않았다. 천연 밀 *mlo* 돌연변이체의 발생은, 아마도 밀의 다배수체 성질로 인해, 보고된 바 없었다. 그러나, 인공적으로 생성된 *mlo* 돌연변이체는 질병에 대해 일부 내성을 나타내지만 종종 상당히 감소된 낟알 수율 또는 조기 잎 노화를 나타낸다(Wang et al., 2014; Acevedo-Garcia et al., 2017).

[0487] 6배수체 밀은 각각 염색체 5AL, 4BL 및 4DL 상에 위치하는 *TaMlo-A1*, *TaMlo-B1* 및 *TaMlo-D1*로 명명된 Mlo 유전자의 3개 상동체를 갖는다(Elliott et al., 2002). 유전자에 대응하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 접근 번호: *TaMlo-A1*, AF361933 및 AX063298; *TaMlo-B1*, AF361932, AX063294 및 AF384145; 및 *TaMlo-D1*, AX063296으로 이용 가능하다. A, B 및 D 게놈 상 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 인코딩되는 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 각각 대략 95% 내지 97% 및 98% 동일하다. 모든 3개의 유전자는 식물이 성장하고 성숙함에 따라 발현 수준이 증가하며 식물의 잎에서 발현된다. 따라서 본 발명자들은 모든 3개 유전자의 발현을 감소시키고, 유전자 간의 서열 동일성 정도를 이용하고, 고도의 서열 보존을 갖는 유전자 영역을 표적화할 수 있는 ledRNA 작제물을 설계하고 제조하였다.

[0488] 모든 3개의 *TaMlo-A1*, *TaMlo-B1* 및 *TaMlo-D1* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a).

[0489] SEQ ID NO:136의 1403~1569에 융합된 뉴클레오티드 916~1248에 대응하는, *TaMlo* 표적 유전자의 500 bp 뉴클레오티드 서열을 선택하였다. 각각의 ledRNA의 dsRNA 영역은 500 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:136의 1403~1569에 융합된 뉴클레오티드 916~1248에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:137로 제공한다.

[0490] ledRNA를 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 제조하고, 정제하고, 완충액 중에 재현탁하였다. 잎 당 10 ㎍의 ledRNA를 Zadoks 23 성장 단계에서 밀 식물에서의 잎 구역에 페인트 브러시를 사용해서 적용하였다. 대조군으로서, 일부 잎은 완충액만을 사용해서 모의-처리하였다. 처리 및 대조군 잎 샘플을 수확하고 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 상의 QPCR 검정은 3개 TaMlo mRNA의 조합인 *TaMlo* mRNA 수준이 95.7%만큼 감소됨을 나타내었다. Z73 성장 단계의 식물을 또한 처리하고 검정하였다. 이들은 대조군 잎 샘플 대비 QPCR에 의해 *TaMlo* 유전자 발현의 91% 감소를 나타내었다. 처리 잎 영역에서 관찰된 *TaMlo* 유전자 발현의 감소는 처리 구역에 특이적이었다 - 잎의 원위, 미처리 부분에서는 *TaMlo* mRNA 수준의 감소가 없었다.

[0491] 보리 *mlo* 돌연변이체에서, 질병 방어-관련 유전자 변종의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다. 따라서, ledRNA-처리 밀 잎을 PR4, PR10, β-1,3-글루카나제, 키티나제, 게르민(germin) 및 ADP-리보실화 인자를 인코딩하는 방어 관련 유전자 수준에 대해 QPCR에 의해 검정하였다. 이들 유전자 중 어느 것도 대조군 잎 영역 대비 처리 잎 영역에서 발현 수준이 유의미하게 변경되지 않았다.

[0492] *Mlo* 유전자 발현을 감소시켜 질병 내성을 증가시키는 ledRNA의 능력을 평가하기 위해, 밀두균병 진균의 포자를 잎의 처리 및 미처리 구역으로 적용한다. 잎을 밀 식물로부터 떼고, 이전과 같이 ledRNA로 처리하고, 배지(물 1 ℓ 당 50 mg 벤즈이미다졸 및 10 g 한천) 상에서 유지하여 빛 아래에서 잎의 노화를 방지하였다. 24시간 후, 잎에 밀두균병 포자를 접종하고 질병 진행을 5일 내지 24일 동안 추적하였다. 처리 잎은 백화 구역에 의해 둘러싸인 광범위한 균사체 성장을 나타낸, ledRNA를 수여받지 않은 대조군 잎에 비해, 진균 균사체 성장을 거의 내지 전혀 나타내지 않았고 잎 백화를 나타내지 않았다.

[0493] 추가 실험에서, 더 낮은 수준의 ledRNA를 적용하여 효과적인 ledRNA의 최소 수준을 확인한다. 또한, 잎에 ledRNA 처리 2일, 4일, 또는 7일 이상 후 접종하여 보호 효과가 얼마나 지속되는지를 확인한다. 전체 식물에 ledRNA 제조물을 또한 분무하고, 진균 질병 제제를 접종한 후 질병 내성에 대해 평가할 것이다.

[0494] 비티스 비니페라(*Vitis vinifera*)의 VvMLO 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0495] 비티스 비니페라 및 비티스 슈도레티쿨라타의 *MLO* 유전자는 자낭균류 진균인 에리시페 네카토르(*Erysiphe necator*)에 의해 유도되는 진균 질병 밀두균병에 대한 감수성을 부여하는 MLO 폴리펩타이드를 인코딩한다. 에리시페 네카토르는 진균이 식물로부터 영양분을 획득하기 위해 진균 및 숙주 세포 간 밀접한 상호작용이 관여되는, 번식을 위해 식물 숙주를 필요로 하는 절대 생체영양성 진균 병원체이다. 그 전부가 식물에 고유하며 형질막에 편재된 알려지지 않은 생화학적 활성을 갖는 7개의 막통과 도메인 단백질을 인코딩하는 유전자 패밀리에 의해 인코딩되는 여러, 밀접하게 관련된 MLO 단백질이 존재한다. 특히, 패밀리 내의 유일한 특이적 *Mlo* 유전자는 밀두균병 감수성 유전자로 작용할 수 있고 이들은 Mlo 단백질의 세포질 C-말단부 도메인 내에 보존된 모티프를 갖는 폴리펩타이드를 인코딩한다. MLO 폴리펩타이드가 밀두균병 감수성 인자로 작용하는 기전은 알려지지 않았다.

[0496] 비티스 종의 3개의 상이한, 그러나 관련된 MLO 유전자, 즉 *VvMLO6*, *VvMLO11* 및 *VvMLO15*를 표적화하는 LedRNA 작제물을 설계하고 하기와 같이 제조하였다. 첫 번째 작제물에 있어서, 예를 들어, SEQ ID NO:138의 뉴클레오티드 556~1155에 대응하는 *VvMLO6* 표적 유전자의 600개 뉴클레오티드 서열을 선택하였다. *VvMLO6*, *VvMLO7* 및 *VvMLO11* 유전자를 표적화하는 3개의 ledRNA 작제물을 인코딩하는 키메라 DNA를 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). 각각의 ledRNA의 dsRNA 영역은 600 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, 예를 들어 SEQ ID NO:138의 뉴클레오티드 556~1155에 대응하였다. ledRNA 중 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:139로 제공한다.

[0497] ledRNA를 시험관내 전사에 의해 제조하고, 별도로 또는 모든 3개의 혼합물로서, 비티스 잎에 적용한다. 이후, 밀두균병 진균의 포자를 잎의 처리 및 미처리 구역에 적용한다. 표적 mRNA의 하향조절을 QPCR을 사용하여 관찰하고 질병 진행을 경시적으로 추적한다.

[0498] **실시예 18. 식물에서 다른 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0499] 아라비돕시스 탈리아나 및 니코티아나 벤타미아나의 Tor 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0500] 라파마이신 표적(*TOR*) 유전자는 진핵 세포에서 여러 세포 기능, 예를 들어 다양한 호르몬, 스트레스 및 영양분 이용 가능성에 대한 반응을 제어하는 세린-트레오닌 단백질 키나제 폴리펩타이드를 인코딩한다. 이는 성장을 위한 세포 자원을 최적화하기 위해 번역 기구를 조절하는 마스터 조절인자로 알려져 있다(Abraham, 2002). 적어도 동물 및 효모에서, TOR 폴리펩타이드는 항진균제 라파마이신에 의해 불활성화되어, 라파마이신 표적(Target of Rapamycin)이라는 그 명명이 얻어진다. 식물에서, TOR은 *TOR*에서 동종접합성 돌연변이체의 치사성에 의해 나타난 바와 같이, 발생 중인 종자에서의 배아 발생을 위해 필수적일 뿐만 아니라(Mahfouz et al., 2006), 세포 대사에 대한 성장 신호의 커플링에 관여된다. *TOR* 유전자 발현의 하향조절은 지방산 합성 증가를 일으켜서 식물 조직에서 증가된 지질 함량을 생성하는 것으로 여겨졌다.

[0501] cDNA 단백질 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열이 SEQ ID NO:105로 제공되는, 니코티아나 벤타미아나의 *TOR* 유전자를 표적화하는 LedRNA 작제물을 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 설계하고 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). SEQ ID NO:105의 뉴클레오티드 2595~3197에 대응하는 표적 영역은 603 bp 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 603 bp 길이였다; dsRNA 영역의 안티센스 서열은 단속되지 않았고, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:105의 뉴클레오티드 2595~3197의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:106으로 제공한다. ledRNA 작제물을 인코딩하는 유전 작제물의 DNA 제조물을 코딩 영역 바로 뒤의 DNA를 절단하는 제한 효소 *MlyI*로 절단하고, RNA 폴리머라제 SP6으로 시험관내 전사하고, RNA를 정제한 후 수성 완충 용액 중에 농축하였다. ledRNA의 샘플을 니코티아나 벤타미아나 잎의 상부 표면으로 적용하였다. 2일 및 4일 후, 처리 잎 샘플을 수확하고, 건조하고, 총 지방산 함량을 정량적 기체 크로마토그래피(GC)에 의해 측정하였다. TOR ledRNA로 처리된 잎 샘플은 대조군(미처리) 샘플에서 관찰되는 2.5% 내지 3.0%(TFA 중량/건조 중량)의 총 지방산(TFA) 함량에서 ledRNA 처리 샘플에 있어서 3.5% 내지 4.0%로의 증가를 나타내었다. 이는 대조군 대비 TFA 함량의 17% 내지 60% 증가를 나타내어, *TOR* 유전자 발현이 ledRNA 처리 조직에서 감소되었음을 시사하였다.

[0502] 호르데움 불가레의 *ALS* 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0503] 아세토락테이트 신타아제(*ALS*) 유전자는 분기쇄 아미노산 류신, 발린 및 이소류신의 합성에서 첫 단계를 촉매하는, 식물 및 미생물에서 확인되는 효소(EC 2.2.1.6)를 인코딩한다. ALS 효소는 피루베이트의 아세토락테이트의 전환을 촉매한 후 다른 효소에 의해 분기쇄 아미노산으로 추가 전환시킨다. ALS의 억제제가 제초제, 예컨대 설포닐우레아, 이미다졸리논, 트리아졸로피리미딘, 피리미디닐 옥시벤조에이트 및 설포닐아미노 카보닐 트리아졸리논 클래스의 제초제로 사용된다.

[0504] ledRNA가 식물로의 RNA의 외인성 전달에 의해 *ALS* 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지 여부를 평가하기 위해, 보리, 호르데움 불가레에서 *ALS* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. 호르데움 불가레 *ALS* 유전자 서열을 본원에서 SEQ ID NO:107(접근 번호 LT601589)로 제공한다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). SEQ ID NO:107의 뉴클레오티드 1333~1938에 대응하는 표적 영역은 606개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 606 bp 길이였다; dsRNA 영역의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:107의 뉴클레오티드 1333~1938의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 본원에서 SEQ ID NO:108로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0505] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역 하류를 절단하는 제한 효소 *MlyI*로 절단하고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 SP6으로 시험관내 전사하였다. RNA를 보리 식물의 잎의 상부 표면 상에 적용하였다. RNA를 처리 잎 샘플로부터(24시간 후) 추출하였다. 정량적 역전사-PCR(QPCR) 검정을 RNA 샘플 상에서 수행하였다. 검정은 ALS mRNA 수준이 ledRNA 처리 조직에서 감소됨을 나타내었다. (총 RNA를 처리 및 미처리 식물에 대해 추출하고, DN아제 처리하고, 정량하고, 2 ㎍을 프라이머 CTTGCCAATCTCAGCTGGATC를 사용하여 역전사하였다. cDNA를 순방향 프라이머 TAAGGCTGACCTGTTGCTTGC 및 역방향 프라이머 CTTGCCAATCTCAGCTGGATC를 사용하여 정량적 PCR에 대한 주형으로 사용하였다. ALS mRNA 발현을 호렌데움 칠렌세(Horendeum chilense) 단리물 H1 라이코펜-사이클라제 유전자에 대해 정상화하였다. ALS 발현은 LED 처리 식물에서 82%만큼 감소하였다.

[0506] 밀 및 보리의 *NCED1* 및 *NCED2* 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0507] 식물에서, 식물 호르몬 아브시스산(ABA)은 9-시스 크산토필을 크산톡신으로 절단하는 효소 9-시스 에폭시-카로

티노이드 디옥시게나제(NCED)에 의해 촉매되는 합성 경로에서의 제1 전용 단계로 카로티노이드 전구체로부터 합성된다(Schwartz et al., 1997). 호르몬 ABA는 종자에서 휴지기를 촉진할 뿐만 아니라(Millar et al., 2006) 다른 공정, 예컨대 스트레스 반응에도 관여되는 것으로 알려져 있다. NCED 유전자의 발현 증가는 ABA 농도를 증가시키며 이에 따라 휴지기를 촉진하는 것으로 여겨졌다. 곡류, 예컨대 밀 및 보리에는, 별도의 상동성 유전자에 의해 인코딩되는, NCED1 및 NCED2로 명명된 2개의 NCED 동종효소가 존재한다.

[0508] ABA의 분해를 위해, 효소 ABA-8-하이드록실라제(ABA8OH-2, CYP707A2로도 알려져 있음)는 그 대사에서 하나의 단계로서 ABA를 하이드록실화하여 휴지기 파괴 및 종자 발아를 일으킨다.

[0509] 보리 호르데움 불가레에서 HvNCED1(접근 번호 AK361999, SEQ ID NO:109) 또는 HvNCED2(접근 번호 AB239298; SEQ ID NO:110)를 인코딩하는 유전자 및 밀에서 대응하는 상동성 유전자를 표적화하는 LedRNA 작제물을 보리 및 밀 식물에서의 트랜스제닉 발현을 위해 설계하였다. 이들 작제물은 밀 및 보리 *NCED1* 및 *NCED2* 유전자의 고도 보존 영역을 사용하였고, 밀 및 보리 뉴클레오티드 서열은 보존된 영역에서 약 97% 동일하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). SEQ ID NO:109의 뉴클레오티드 435~1035에 대응하는 표적 영역은 602개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 602 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이고, SEQ ID NO:110의 뉴클레오티드 435~1035에 대응한다. NCED1 및 NCED2 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:111 및 112로 제공한다.

[0510] 유사한 방식으로, 밀 트리티쿰 애스티붐 및 보리 호르데움 불가레의 ABA-OH-2 유전자(접근 번호 DQ145933, SEQ ID NO:113)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 제조하였다. SEQ ID NO:113의 뉴클레오티드 639~1238에 대응하는 표적 영역은 600개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 600 bp 길이였다; dsRNA 영역의 센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:113의 뉴클레오티드 639~1238에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:114로 제공한다.

[0511] ledRNA를 인코딩하는 키메라 DNA를 발생 중인 종자에서를 포함하여 대부분의 조직에서 구성적으로 발현되는 *Ubi* 유전자 프로모터의 제어 하에 발현 벡터 내로 삽입하였다. 발현 카세트를 절제하고 이원성 벡터 내로 삽입하였다. 이들을 사용하여 형질전환된 밀 식물을 생성하였다.

[0512] 트랜스제닉 밀 식물을 성숙하도록 성장시키고, 이들로부터 종자를 수득하여 *NCED* 또는 *ABA-OH-2* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 감소된 유전자 발현에 대응하는 낟알 휴지기에 있어서의 효과에 대해 분석한다. 변경된 휴지기 정도에 있어서 다양한 표현형이 예상된다. 변경된 표현형 정도를 조정하기 위해, 이중-가닥 RNA 영역에 G:U 염기쌍을 갖는 ledRNA, 특히 이중-가닥 영역에서 뉴클레오티드의 총수의 백분율로서, ledRNA의 이중-가닥 영역 뉴클레오티드의 15% 내지 25%가 G:U 염기쌍에 관여되는 ledRNA의 발현을 위해 변형 유전 작제물을 생성하였다.

[0513] 아라비돕시스 탈리아나의 EIN2 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0514] 실시예 10에 기재된 바와 같이, 아라비돕시스 탈리아나의 *EIN2* 유전자는 에틸렌 인지에 관여되는 수용체 단백질을 인코딩한다. *EIN2* 돌연변이체 묘목은 ACC 상에서 발아된 경우, 야생형 묘목 대비 하배축 신장을 나타낸다. 유전자가 종자 발아 직후 묘목에서 발현되는 경우, 트랜스제닉 수단에 의한 ledRNA의 전달은 사전형성된 RNA의 외인성 전달 대비, *EIN2*의 하향조절 정도의 평가를 위해 가장 적합한 접근으로 간주되었다.

[0515] 표적 유전자 mRNA의 400개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는, 아라비돕시스 탈리아나의 *EIN2* 유전자를 표적화하는 ledRNA 작제물(SEQ ID NO:115)을 설계하였다. 아라비돕시스 탈리아나 식물에서 ledRNA를 발현하기 위해 35S 프로모터를 포함하는 벡터 내로 ledRNA를 인코딩하는 서열(SEQ ID NO:116)을 삽입하여 작제물을 제조한다. QPCR에 의한 *EIN2* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 ACC의 존재 하에 하배축 길이 검정을 위해 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 식물을 생성하고 평가한다. *EIN2* 발현 수준의 감소 및 하배축 길이의 증가가 일부 트랜스제닉 라인 식물에서 관찰된다.

[0516] 아라비돕시스 탈리아나의 CHS 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0517] 식물에서 칼콘 신타아제(CHS) 유전자는 플라보노이드 생합성에서 첫 번째 전용 효소인, 4-쿠마로일-CoA 및 말로닐-CoA의 나링게닌 칼콘으로의 전환을 촉매하는 효소를 인코딩한다. 클라보노이드는 방어 기전 및 스트레스 관용성에 관여되는, 식물에서 주로 확인되는 유기 화합물의 하나의 클래스이다.

[0518] 표적 유전자 mRNA의 338개 뉴클레오티드 영역을 표적화하는, 아라비돕시스 탈리아나의 *CHS* 유전자(SEQ ID

NO:117)를 표적화하는 ledRNA 작제물을 설계하였다. 아라비돕시스 탈리아나 식물에서 ledRNA를 발현하기 위해 35S 프로모터를 포함하는 벡터 내로 ledRNA를 인코딩하는 DNA 서열(SEQ ID NO:118)을 삽입하여 작제물을 제조한다. 트랜스제닉 아라비돕시스 탈리아나 식물을 이원성 벡터에서 유전 작제물로의 형질전환에 의해 생성하고 QPCR에 의해 *CHS* 유전자의 발현 감소에 대해 그리고 플라보노이드 생성 감소에 대해 평가한다. *CHS* 발현 수준의 감소 및 플라보노이드의 수준 감소가 일부 트랜스제닉 라인 식물에서, 예를 들어 트랜스제닉 종자의 종자 껍질에서 관찰된다.

[0519] 루피누스 앵구스티폴리우스의 LanR 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0520] 좁은-잎을 가진 루핀인 루피누스 앵구스티폴리우스 L.의 *LanR* 유전자는 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 의해 유도되는 바이러스 질병에 대한 내성을 부여하는, 담배 *N* 유전자와 서열이 관련되는 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0521] 루피누스 앵구스티폴리우스의 *LanR* 유전자(접근 번호 XM_019604347, SEQ ID NO:119)를 표적화하는 ledRNA 분자를 생성하기 위한 키메라 DNA를 설계하고 제조하였다. 상술된 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 안티센스 서열이었고, 인접한 서열은 센스 서열이었다(도 1a). ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:120으로 제공한다. ledRNA를 시험관내 전사에 의해 생성하고, 정제하고, 농축하였고, RNA의 분취물을 *LanR* 유전자를 함유하는 루피누스 앵구스티폴리우스 식물의 잎에 적용한다. 바이러스 샘플을 처리 및 미처리 식물에 적용하고, 질병 증상을 수일 후 비교하였다.

[0522] **실시예 19. 곤충 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0523] *도입*

[0524] 진디는 식물 수액의 섭취를 통해 직접적으로 그리고 일부 경우에서는 식물에서 질병을 유도하는 다양한 바이러스 전파를 통해 간접적으로 식물에 실질적인 그리고 때때로 중증의 손상을 유도하는 수액-흡입 곤충이다. 일부 경우에서 Bt 독소가 섭식성 곤충으로부터 작물 식물을 보호하는 데 효과적이었던 반면, 이는 일반적으로 수액-흡입 곤충에 대해서는 효과적이 아니었다. 내성 유전자를 함유하는 식물 품종은 진디를 제어하는 데 효과적인 방식일 수 있지만, 대부분의 내성 유전자가 소정 진디 종 또는 생물형에 고도로 특이적이고 유전적 또는 후생적 변화를 통한 새로운 생물형의 신속한 진화에 기인하여 내성이 빈번하게 극복된다. 또한, 내성 유전자는 여러 작물에서 이용 불가능하거나 소정의 일반 진디 종, 예컨대 광범위한 숙주 종을 감염시키는 복숭아혹 진디에 대해서는 존재하지 않을 수 있다. 진디는 현재 주로 살충제의 빈번한 적용을 통해 제어되며 이는 진디에서의 살충제 내성을 야기했다. 예를 들어, 모든 다른 등록 살충제에 대한 내성을 획득하게 되었으므로, 작용 그룹의 하나의 살충 방식만 호주에서 복숭아혹 진디에 대해 효과적으로 남아있다.

[0525] RNAi-매개 유전자 침묵화는 소수의 연구에서 여러 진디 종에서 연구 도구로서 유용한 것으로 나타났으나(리뷰를 위해서는 문헌[Scott et al., 2013; Yu et al., 2016]을 참고), 식물을 진디 공격으로부터 효과적으로 보호하는 것으로 나타나지 않았다. 이들 연구에서, 진디 성장 및 발생, 감염 또는 섭취 공정에 관여되는 핵심 유전자를 표적화하는 dsRNA를 진디로의 직접적 주사를 통해 또는 dsRNA를 함유하는 인공 식이에 대한 진디의 섭취에 의해 전달하였다.

[0526] 변형 RNAi 분자, 예컨대 본원에서 기재되는 ledRNA 분자의 수액-흡입 곤충의 제어에 대한 가능성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 몇몇 이유로, 모델 수액-흡입 곤충으로서 복숭아혹 진디(마이주스 페르시캐)를 선택하였다. 먼저, 복숭아혹 진디는 세계적으로 주요 낟알 및 원예 작물을 포함하는 광범위한 숙주 식물 종을 감염시키는 잡식성 곤충이다. 두번째로, 복숭아혹 진디는 일부 강력한 바이러스, 예컨대 일부 유채 성장 지역에 고도로 손상을 입혀왔던 서부 사탕무 황화 바이러스(Beet Western Yellow Virus)의 전파에 관여된다. 상기 연구를 위해 2개의 진디 유전자를 하향조절을 위한 표적 유전자로 선택하였으며, 하나는 핵심 효과기 단백질(C002)을 인코딩하고 제2 유전자는 활성화 단백질 키나제 C의 수용체(Rack-1)를 인코딩한다. C002 단백질은 그 숙주 식물 상에서 진디 섭취를 위해 필수적인 진디 침샘 단백질이다(Mutti et al., 2006; Mutti et al., 2008). Rack1은 신호 전달 캐스케이드에 주로 관여되는 효소인 활성화된 단백질 키나제 C에 결합하는 세포내 수용체이다(McCahill et al., 2002; Seddas et al., 2004). MpC002는 진디 침샘에서 우선적으로 발현되며 MpRack1은 내장에서 우선적으로 발현된다. 이전 연구에서, 직접적 주사 또는 인공 식이 섭취를 통한 RNAi의 사용은 평가된 몇몇 진디 종의 사멸을 야기하였다(Pitino et al., 2011; Pitino and Hogenhout, 2012; Yu et al., 2016).

[0527] *물질 및 방법: 진디 배양 및 식물 물질*

[0528] 복숭아혹 진디(마이주스 페르시캐)를 서호주에서 수집하였다. 각각의 실험 전에, 진디를 곤충실에서 주변 광 하에 무 식물(라파누스 사티부스(*Raphanus sativus*) L.) 상에서 키웠다. 진디를 미세한 페인트브러시로 실험 인공

식이 우리로 옮겼다.

[0529] 진디 섭취를 위한 인공 식이 성분은 문헌[Dadd and Mittler (1966)]에 기재된 바와 동일하였다. 진디 인공 식이를 위해 사용된 장치는 1 ㎝ 지름 및 1 ㎝ 높이를 갖는 플라스틱 튜브를 사용하였다. ledRNA를 포함하거나 포함하지 않는 인공 진디 식이 100 ㎕를 2층의 파라필름 사이에 밀봉하여 식이 사체트를 생성하였다. 그 사체트 상부에, 연신된 파라필름의 상층을 통해 스타일렛으로 구멍을 뚫어 진디가 주변으로 이동하고 식이를 섭취할 수 있도록 챔버를 놓았다. 미세한 페인트 브러시를 사용해서 8마리의 제1령 또는 제2령 약충을 진디 챔버로 온건하게 옮겼다. 실험은 20℃의 성장 캐비넷에서 수행하였다.

[0530] 하나의 실험에서 사용된 담배 잎을 22℃에서 16시간 명/8시간 암 주기 하에 토양에서 성장시킨 식물로부터 수집하였다.

[0531] *MpC002 및 MpRack-1 유전자 및 LedRNA 작제물*

[0532] 표적 유전자로 평가된 복숭아혹 진디 *MpC002* 및 *MpRack-1* 유전자는 문헌[Pitino et al. (2011; 2012)]에 기재된 바와 동일하였다. 두 유전자의 DNA 서열을 NCBI 웹사이트, MpC002(>MYZPE13164_0_v1.0_000024990.1 | 894 nt) 및 MpRack-1(>MYZPE13164_0_v1.0_000198310.1 | 960 nt)로부터 입수하였다. 두 유전자의 cDNA 서열을 본원에서 SEQ ID NO: 123 및 124로 제공한다. LedRNA 작제물을 이전 실시예에 기재된 바와 동일한 방식으로 설계하였다. 본원에서 SEQ ID NO:125 및 126으로 제공하는 ledRNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 전사 주형으로 사용하여 ledRNA를 합성하였다. *MpC002* 및 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 ledRNA 분자를 인코딩하는 벡터 DNA를 시험관내 RNA 전사를 위한 플라스미드 DNA의 제조를 위해 대장균 균주 DH5a 내로, 그리고 생체내(박테리아 내) 전사를 위해 대장균 균주 HT115 내로 도입하였다.

[0533] *진디 수행능력 감소에 대한 ledRNA 분자의 효능*

[0534] *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 ledRNA가 진디 수행능력에 영향을 미쳤는지 여부를 조사하기 위해, 각각의 ledRNA를 실시예 1에 기재된 바와 같은 인공 식이 방식을 통해 진디에 전달하였다. 각각의 실험에서 10개의 생물학적 반복물을 설정하였다; 각각의 생물학적 반복물은 복숭아혹 진디의 8마리 제1령 내지 제2령 약충을 가졌다. 각 실험에서의 대조군은 동등한 농도의 무관한 ledRNA, 즉 ledGFP를 사용하였다.

[0535] 더 낮은 농도인 50 ng/㎕의 각각의 ledRNA 분자로, MpC002 또는 MpRack-1 ledRNA를 함유하는 인공 식이로부터의 섭취 후 진디 생존은 대조군 ledGFP와 유의미하게 상이하지 않았다. 그러나, *MpC002* 유전자를 표적화하는 ledRNA는 복숭아혹 진디의 번식률을 유의미하게($P<0.05$) 감소시켰다(도 37a). 성체 진디 당 생성된 약충의 평균 수는 대조군 ledRNA를 갖는 대조군 식이 상에서 유지된 성체로부터 생성된 약충의 수에 비해 약 75%만큼 감소하였다. 더 높은 농도인 200 ng/㎕에서, *MpC002* 또는 *MpRack*-1을 표적화하는 ledRNA는 성체 진디 사망률을 증가시켰다(도 37b). MpC002 또는 MpRack-1 ledRNA를 포함하는 식이 상에서 진디 생존 감소가 또한 24시간 후 관찰되었고, 5일의 실험 기간에 걸쳐 계속되었다. 결과는 필수 진디 유전자를 표적화하는 ledRNA의 사용이 진디의 사망을 유도하고 진디 번식을 감소시킬 수 있음을 시사하였다. 각각의 ledRNA의 효능을 표적 유전자의 동일한 영역을 표적화하는 헤어핀 RNA 분자(hpRNAi)와 비교한다.

[0536] *진디에 의한 ledRNA 분자의 흡수*

[0537] 진디 내부에서의 ledRNA의 흡수 및 분포를 추적하기 위해, *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 실시예 1에 기재된 합성 공정 동안 Cy3(시아닌-염료 표지 뉴클레오티드 트리포스페이트)로 표지하였다. Cy3 표지화는 통상적인 dsRNA 분자의 생물학적 기능에 대해 효과를 갖지 않음이 보고되었고 이에 따라 형광에 의한 검출용 표지로서 사용될 수 있었다. 표지된 ledRNA를 섭취한 진디를 Leica EL 6000 마이크로시스템 기구를 사용하여 공초점 현미경을 사용해서 조사하였다. *MpC002* 또는 *MpRack-1*을 표적화하는 Cy3-표지 ledRNA는 인공 식이에 대한 섭취 수 시간 내에 진디 내장에서, 이후 생식계에서, 심지어 섭취 성체의 자손인 신생 약충에서도 검출 가능하였다. 결과는 소화계 기능 또는 생식을 위해 중추적인 진디 유전자가 섭취를 통해 ledRNA 분자에 대한 효과적인 표적일 수 있음을 시사하였다.

[0538] *LedRNA 안정성*

[0539] 식이에서 그리고 섭취 진디로부터 회수된 ledRNA의 안정성을 조사하기 위해, 표지된 ledRNA 분자를 함유하는 식이에 대한 섭취 후 인공 식이로부터 및 진디 단물로부터 RNA를 회수하였다. RNA 샘플을 겔 상에서 전기영동하고 형광 검출에 의해 조사하였다. 섭취 전 ledMpC002 RNA는 아가로스 겔 상에서 약 700 bp의 단일 산물을 명확히 나타내었다. 인공 식이로부터 회수된 RNA는 100 bp 내지 700 bp 크기의 RNA 도말을 나타내어, 25일 동안 실온에

서 식이에 노출된 후 일부 분해를 시사하였으나, 여전히 대부분 온전하였다. 진디 단물로부터 회수된 RNA는 350 bp 내지 700 bp의 RNA 범위에서 형광을 나타내었고, 역시 대부분 온전하였다. 일부 ledRNA의 분해에도 불구하고, 상당 비율의 ledRNA 분자가 상당한 시기 동안 인공 식이에서 그리고 또한 진디 단물에서 온전하게 유지될 수 있었다. ledRNA 분자의 이러한 안정성 정도는 ledRNA가 외인적으로 적용될 때 활성이 있도록 하고 활성을 유지할 수 있도록 할 것이다.

[0540] *식물 잎에 의한 표지 ledRNA의 흡광도*

[0541] Cy3-표지 ledMpC002 RNA가 잎 조직을 침투할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 이를 담배 잎의 상부 표면 상에 페인팅하였다. 10마이크로리터의 Cy3-표지 ledMpC002(1 ㎍/㎕ 농도)를 2 ㎝ 지름의 원으로 페인팅하고 적용 영역을 검은색 마커 펜으로 표시하였다. 525 ㎚의 여기에서 잎 형광 이미지를 Leica EL 6000 마이크로시스템 기기를 사용하여 5시간의 기간에 걸쳐 포착하고, 페인팅된 조직을 페인팅되지 않은 조직과 비교하였다. Cy3 표지는 적용 1시간 이내에 엽육 조직에서 명확히 검출 가능하였고, 이에 따라 잎 표면 상의 왁스성 큐티클층을 통해 명확히 침투하였다. 2시간째에 형광 수준이 증가하였고 5시간 시점까지 유지되었다. ledRNA 분자가 세포 내로 또는 세포의 핵 내로 들어갔는지 여부는 명확하지 않았다. 그러나, 수액-흡입 곤충이 식물 잎 및 줄기의 체관부 체 요소로부터 특이적으로 영양을 섭취하므로, 진디 유전자의 침묵화를 위해 식물 세포 내로의 RNA 수송이 요구되지는 않았다. 실험은 ledRNA 분자가 국소 적용을 통해 식물 조직에서 확인됨을 시사하였다.

[0542] *결론*

[0543] 본 연구의 목표는 전세계에 걸친 문제인 수액-흡입 곤충 해충의 주요 그룹인 진디의 제어를 위해 ledRNA 설계를 사용하는 외인성 RNAi의 적용을 평가하는 것이었다. 진디는 외인성 RNA를 가공하는 RNAi 기구를 보유하는 것으로 알려져 있다(Scott et al., 2013; Yu et al., 2016). 여기서는, *MpC002* 또는 *MpRack-1* 유전자를 표적화하는 ledRNA 분자를 함유하는 인공 식이를 통한 경구 전달이 진디 사망률을 유도하고 진디의 번식을 감소시킬 수 있었다. 분자를 하나의 유전자는 효과기 단백질 C002를 인코딩하며 다른 하나의 유전자는 복숭아혹 진디(마이주스 페르시캐)의 섭취 및 발생을 위해 필수적인, 활성화 단백질 키나제 수용체(Rack-1)를 인코딩하는 2개의 상이한 표적 유전자에 대해 평가하였다. 50 ng/㎕만큼 낮은 농도로 인공 식이에 첨가되는 경우, 이들 유전자를 표적화하는 ledRNA 분자는 진디 번식을 유의미하게 감소시켰다. 더 높은 농도인 200 ng/㎕에서, ledRNA는 또한 진디 사망률을 증가시켰다. ledRNA 흡수를 Cy3 표지화를 사용하여 연구했을 때, ledRNA 분자는 인공 식이에 대한 흡수 수 시간 내에 진디 내장에서, 그리고 이후 생식계에서, 심지어 섭취 성체의 자손인 신생 약충에서 관찰되었다.

[0544] 또한 ledRNA 분자가 적어도 3.5주 동안 인공 식이에서 대부분 온전하게 유지되는 것으로 나타났다. 대부분 온전한 ledRNA 분자는 진디의 배출 산물인 진디 단물에서도 확인되었다. 표지 ledRNA를 식물 잎 상으로 적용한 경우, 이는 진디가 영양을 섭취받는 체관부 내로 들어갈 수 있었다. 이들 결과는 함께, ledRNA가 식이를 통한 외인성 전달에 의한 것을 포함하여, 진디 및 다른 수액-흡입 곤충의 제어를 위해 사용될 가능성이 높음을 시사하여, 진디 및 다른 수액-흡입 곤충의 관리를 위한 실제적인 접근을 제공하였다. 이들 RNA 분자는 또한 진디 및 다른 수액-흡입 곤충을 제어하기 위해, 체관부 조직에서 RNA의 합성을 선호하는 프로모터를 사용하여, 트랜스제닉 식물에서 발현될 수 있다.

[0545] **실시예 20. 다른 곤충 유전자를 표적화하는 RNA 작제물**

[0546] 곤충 해충의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0547] 헬리코베르파 아르미게라는 목화씨 유충(cotton bollworm) 또는 옥수수 귀벌레(corn earworm)로도 알려져 있는, 나비목의 곤충 해충이다. 헬리코베르파 아르미게라의 유충은 여러 중요한 경작 작물을 포함하는 광범위한 식물 상에서 영양을 섭취하고 매년 수십 억 달러에 해당하는 상당한 작물 손상을 유도한다. 유충은 목화, 옥수수, 토마토, 병아리콩, 비둘기콩, 알팔파, 쌀, 수수 및 동부를 포함하는 광범위한 식물 종 상에서 영양을 섭취할 수 있는 다식성의 보편적 해충이다.

[0548] 헬리코베르파 아르미게라 ABC 트랜스포터 white 유전자(ABCwhite)를 곤충 유충에서 ledRNA 및 ledRNA(G:U) 작제물을 평가하기 위해 쉽게 검출되는 표현형을 가지는 표적 유전자로서 선택하였다. ABC 트랜스포터는 ATP 결합 카세트(ATP Binding Cassette) 트랜스포터 수퍼패밀리에 속한다 - 예를 들어, 54개의 상이한 ABC 트랜스포터 유전자가 헬리코베르파 게놈에서 확인되었다. ABC 트랜스포터는 막을 통해 임의의 하나 이상의 광범위한 분자를 운반하는 막-결합 단백질을 인코딩한다. 이 단백질은 막을 통해 분자를 수송하기 위해 ATP 가수분해에 의해 방출되는 에너지를 사용한다. 일부 ABC 트랜스포터는 목화씨 유충, 헬리코베르파 아르미게라에서의 식물 이차 대

사물질의 분해에 연루되었다(Khan et al., 2017). ABCwhite 단백질은 눈에서 오모발색단 및 프테리딘 경로 전구체를 색소 과립 내로 수송하며 녹아웃 돌연변이체는 흰색 눈을 나타낸다.

[0549] *ABCwhite* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:127(접근 번호 KU754476)로 제공한다. ledRNA가 유충 식이에서 RNA의 외인성 전달에 의해 *ABCwhite* 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지를 평가하기 위해, 이 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 표적 영역은 SEQ ID NO:127의 뉴클레오티드 496~1097에 대응하는 603개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 603 bp길이였다; dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:127의 뉴클레오티드 496~1097의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:128로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0550] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역의 하류를 절단하는 제한 효소 *Sna*BI로 소화시키고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하였다. RNA를 인공 식이에 첨가하고, 헬리코베르파 아르미게라 유충에 제공한다.

[0551] 이중-가닥 줄기에 G:U 염기쌍을 갖는 대응하는 ledRNA 작제물을 제조하고 정규로 염기쌍을 형성한 ledRNA와 비교한다.

[0552] 개미에서의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0553] 일반적으로 아르헨티나 개미로 알려져 있는 리네피테마 휴밀레는 몇몇 대륙에 널리 퍼져있는 곤충 해충이다. 페로몬 생합성 활성화 뉴로펩타이드(PBAN) 뉴로펩타이드-유사(LOC105673224)를 인코딩하는 리네피테마 휴밀레 유전자를 페로몬에 의한 곤충 간 커뮤니케이션에 관여되는, 표적 유전자로서 선택하였다.

[0554] *PBAN* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 SEQ ID NO:129(접근 번호 XM_012368710)로 제공한다. ledRNA가 미끼 형태로 식이에서 RNA의 외인성 전달에 의해 *PBAN* 유전자 발현을 감소시킬 수 있었는지 여부를 평가하기 위해, 이 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 설계하고 제조하였다. ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 유전 작제물을 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 표적 영역은 SEQ ID NO:129의 뉴클레오티드 136~675에 대응하는 540개 뉴클레오티드 길이였다. ledRNA의 dsRNA 영역은 540 bp길이였다; dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었고, SEQ ID NO:129의 뉴클레오티드 136~675의 상보체에 대응하였다. ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:130으로 제공한다. 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0555] ledRNA를 인코딩하는 유전 작제물을 ledRNA 코딩 영역의 하류를 절단하는 제한 효소 *Sna*BI로 소화시키고, 전사 키트를 이용해서 지침에 따라 RNA 폴리머라제 T7로 시험관내 전사하였다. RNA를 리네피테마 휴밀레 개미 내로의 경구 전달을 위해 옥수수 분말 상에 코팅한다.

[0556] 루실리아 쿠프리나의 유전자를 표적화하는 LedRNA

[0557] 루실리아 쿠프리나는 보다 일반적으로 호주 양 금파리로 알려져 있는 곤충 해충이다. 이는 금파리과(Calliphoridae)에 속하며, 곤충 쌍시목의 구성원이다. 5개의 표적 유전자, 즉 루실리아 쿠프리나의 V-유형 양성자 ATP아제 촉매성 서브유닛 A(접근 번호 XM_023443547), RN아제 1/2(접근 번호 XM_023448015), 키틴 신타아제(접근 번호 XM_023449557), 엑디손 수용체(EcR; 접근 번호 U75355) 및 감마-튜불린 1/1-유사(접근 번호 XM_023449717)를 인코딩하는 유전자를 ledRNA 작제물로의 평가를 위해 선택하였다. 각각의 유전 작제물을 ledRNA에 대한 설계 원리를 사용하여 제조하였고, 분할 서열은 센스 서열이었고 인접한 서열은 안티센스 서열이었다(도 1b). 각각의 경우에서, 표적 영역은 약 600개 뉴클레오티드 길이였고 dsRNA 영역에서의 안티센스 서열은 단속되지 않은, 인접한 서열이었다. *ATP아제-A* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:131로 제공한다. RN아제 *1/2* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:132로 제공한다. 키틴 신타아제 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:133으로 제공한다. *EcR* 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:134로 제공한다. 감마-튜불린 1/1-유사 유전자를 표적화하는 ledRNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본원에서 SEQ ID NO:135로 제공한다. 각각의 작제물에서, 코딩 영역은 시험관내 전사를 위해 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0558] 당업자에게는 수많은 변이 및/또는 변형이 광의적으로 기재된 본 발명의 정신 또는 범위에서 벗어나지 않고 구체적 구현예에 나타낸 바와 같은 발명에 따라 제조될 수 있음이 이해될 것이다. 따라서 본 발명의 구현예는 제

한적이 아니라 모든 측면에서 예시적인 것으로 간주되어야 한다.

[0559] 본 출원은 그 개시가 본원에 참조로 포함되는, 2017년 9월 15일에 출원된 AU 2017903773, 2018년 8월 3일에 출원된 AU 2018902840 및 2018년 8월 8일에 출원된 AU 2018902896을 우선권으로 청구한다.

[0560] 본원에서 논의되는/되거나 참조되는 모든 간행물은 이의 전문이 본원에 포함된다.

[0561] 본 명세서에 포함된 문헌, 법령, 자료, 장치, 기사 등의 모든 논의는 단순히 본 발명의 맥락을 제공하려는 목적을 위한 것이다. 이것이 이들의 임의의 것 또는 전부가 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재한 본 발명에 관련된 분야에서의 공통 일반 지식이었다는 인정으로 간주되어서는 안 된다.

[0562] **참고문헌**

Abraham (2002). Cell 111:9-12.
Acevedo-Garcia et al., (2017). Plant Biotechnology Journal 15:367–378.
Alvarez et al., (2000). Theor Appl Genet 100:319-327.
Baumlein et al., (1991). Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
Baumlein et al., (1992). Plant J. 2:233-239.
Bhattacharyya et al., (1990) Cell 60:155-122.
Brar et al., (1996) Biotech Genet. Eng Rev 13:167-79.
Broothaerts et al., (2005). Nature 433:629-633.
Broun et al., (1998). Plant J. 13:201-210.
Busk et al., (1997). Plant J. 11:1285-1295.
Chen et al., (2005). Functional Plant Biology 32:671-681.
Chikwamba et al., (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11127-11132.
Christou and Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004).
Chung et al., (2006). BMC Genomics 7:120.
Clough and Bent (1998). Plant J. 16:735–743.
Corrado and Karali (2009). Biotechnol. Adv. 27:733-743.
Courvalin et al., (1995). Life Sci. 318:1209-1212.
Dadd and Mittler (1966). Experientia 22:832-833.
Darji et al., (1997). Cell 91:765-775.
Dong et al., (2011) Plant J. 68:633-45.
Draper and Scott (1988). In: J. Draper et al., (Eds.), Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual, Alden Press, Oxford, pp. 199–236.
Dunwell (2000). J Exp Botany 51Spec No:487-496.
Ellerstrom et al., (1996). Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
Elliott et al., (2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15:1069–1077.
Ellis et al., (1987). EMBO J 6:11–16.
Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).
Gan (1995). Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. PhD thesis. University of Wisconsin, Madison.
Gan and Amasino (1995). Science 270:1986-1988.
Glawe (2008). Ann. Rev. Phytopathol. 46:27–51.
Gleave (1992). Plant Mol Biol 20: 1203-1207.
Gupta et al., (1988) Plant Mol. Biol. 10:215-224.

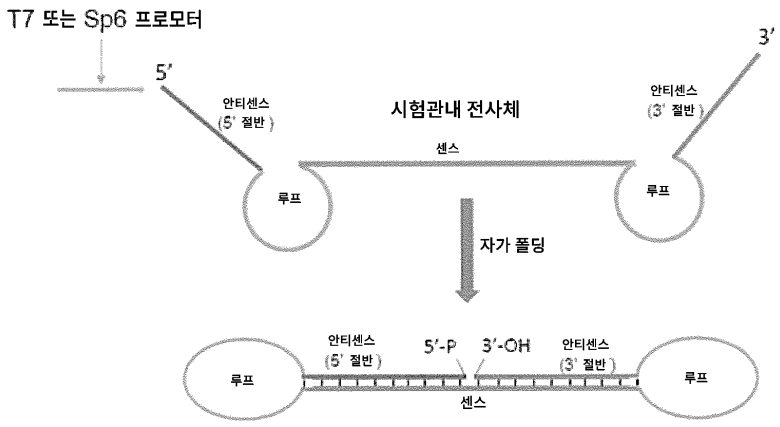
[0563] Helliwell and Waterhouse (2005). Methods in Enzymology 392:24-35.

Hinchee et al., (1988). Biotechnology 6:915-922.
Horvath et al., (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1914-1919.
Hsieh and Fire (2000) Annu Rev Genet 14:187-204.
Jeddeloh,et al., (1999). Nat. Genet. 22:94-97.
Jefferson et al., (1987). EMBO J 6:3901–3907.
Jepson et al., (1994). Plant Mol. Biol. 26:1855-1866.
Khan (2017). Sci Rep 7, 40025
Kishore and Somerville (1993). Curr Opin Biotechnol. 4:152-158.
Koziel et al., (1996). Plant Mol. Biol. 32:393-405.
Lacroix et al., (2008). Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 105: 15429-15434.
Li et al., (1996). FEBS Lett. 379:117-121.
McCahill et al., (2002). Molecular Pharmacology 62:1261-1273.
McCullough and Schuler (1997). Nucl Acids Res. 25:1071-1077.
Mahfouz et al., (2006). Plant Cell 18:477-490.
Matsuoka et al., (1994). Plant J. 6:311-319.
Meier et al., (1997). FEBS Lett. 415:91-95.
Melamed-Bessudo et al., (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(16):e981-988.
Millar et al., (2006). Plant J. 45:942-954.
Mutti et al., (2006). J Insect Sci 6:38.
Mutti et al., (2008). Proceedings of the National Academy of Sciences 105:9965-9969.
Olive et al., (1989) Plant Mol Biol 12:525-538.
Padidam (2003). Transgenic Res. 12:101-109.
Perrin et al., (2000). Mol Breed 6:345-352.
Pitino et al., (2011). PLoS ONE 6, e25709.
Pitino and Hogenhout (2012). Molecular Plant-Microbe Interactions 26:130-139.
Potenza et al., (2004). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 40:1-22.
Powell et al., (1996). Vaccines 183, Abstract.
Preiss et al., (1987). In: Tailoring Genes for Crop Improvement (Bruening et al., eds.), Plenum Press, S.133-152.
Sambrook et al., (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
Schaffner (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:2163-2167.
Schwartz et al., (1997). Science 276:1872-1874.
Scott et al., (2013). Journal of Insect Physiology 59:1212-1221.
Seddas et al., (2004). Virology 325:399-412.
[0564] Shiina et al., (1997). Plant Physiol. 115:477-483.

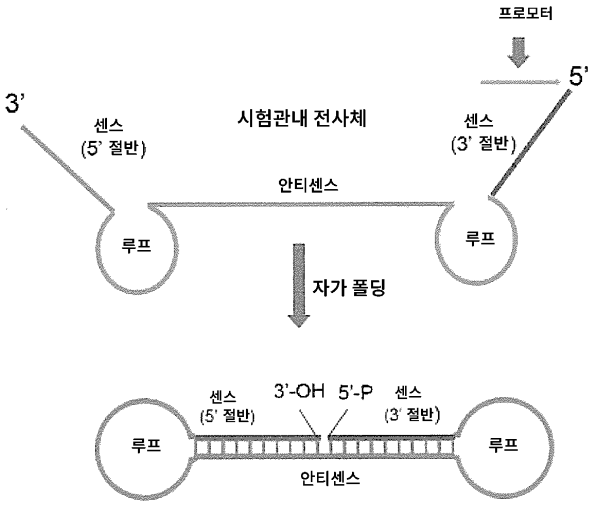
Shure et al., (1983). Cell 35:225-233.
Sizemore et al., (1995). Science 270:299-302.
Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003).
Smith et al., (2000). Nature 407:319-320.
Stalker et al., (1988). Science 242: 419-423.
Stewart et al., (2000). J Mol Biol 298:611-622.
Tan et al., (2011). Plant Physiol. 156:1577-1588.
Thillet et al., (1988). J. Biol. Chem 263:12500-12508.
Timmons et al., (2001). Gen 263:103-112.
Ulmasov et al., (1995). Plant Physiol. 108:919-927.
Wang MB. Isolation of phloem specific gene promoters for use in genetic engineering of insect resistance in rice. PhD thesis, University of Durham, UK.
Wang et al., (1994) Plant Molecular Biology 24:159-170.
Wang et al., (1998) Acta Horticulturae 461:401-407.
Wang et al., (2008) RNA 14**:** 903-913.Wang et al., (2013). PLoS Genet 9, e1003865.
Wang et al., (2014). Nature Biotechnology 32:9.
Weiss (2003). Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106.
Weissbach et al., (1988). In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif.
Wijnker et al., (2008). Trends in Plant Science 13:640-646.
Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994).
Yang et al., (2003). Planta 216:597-603.
Yelina et al., (2012). PLoS Genetics 8(8):e1002844. doi:10.1371/journal.pgen.1002844
Yu et al., (2016). Pest Management Science 72:1090-1098.
[0565] Zhang et al., (2018). Nat Rev Mol Cell Biol. 19:489-506.

도면

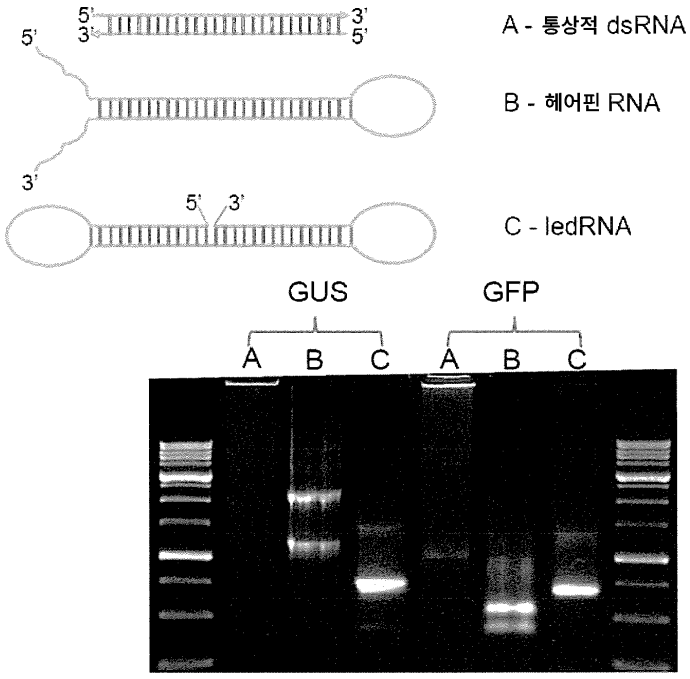
도면1a



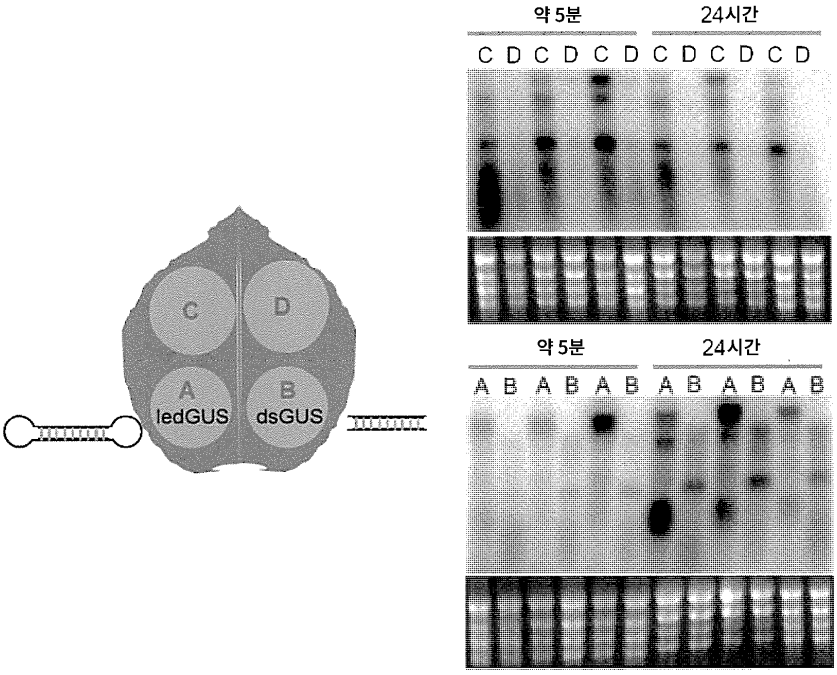
도면1b


프로모터
5'
3'
센스
(5' 절반)
시험관내 전사체
센스
(3' 절반)
안티센스
루프
루프
자가 폴딩
센스
(5' 절반)
3'-OH
5'-P
센스
(3' 절반)
루프
루프
안티센스

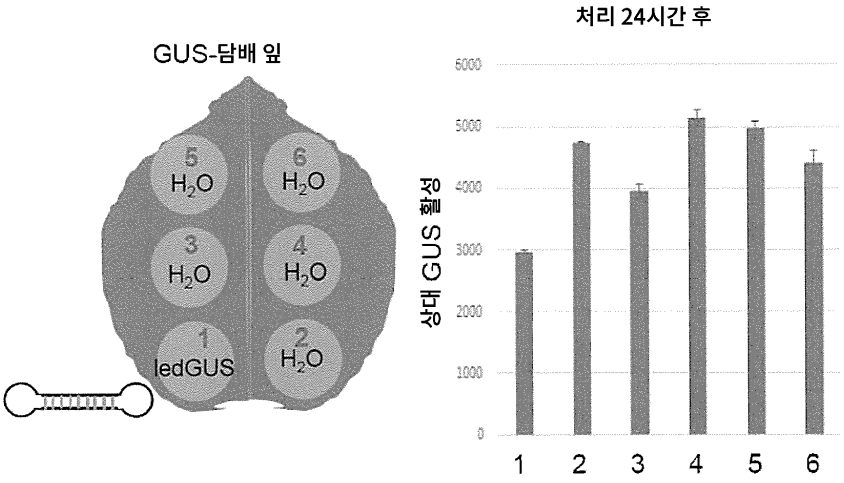
도면2


5'
3'
3'
5'
5'
3'
3'
5'
A - 통상적 dsRNA
B - 헤어핀 RNA
C - ledRNA
GUS
GFP
A
B
C
A
B
C

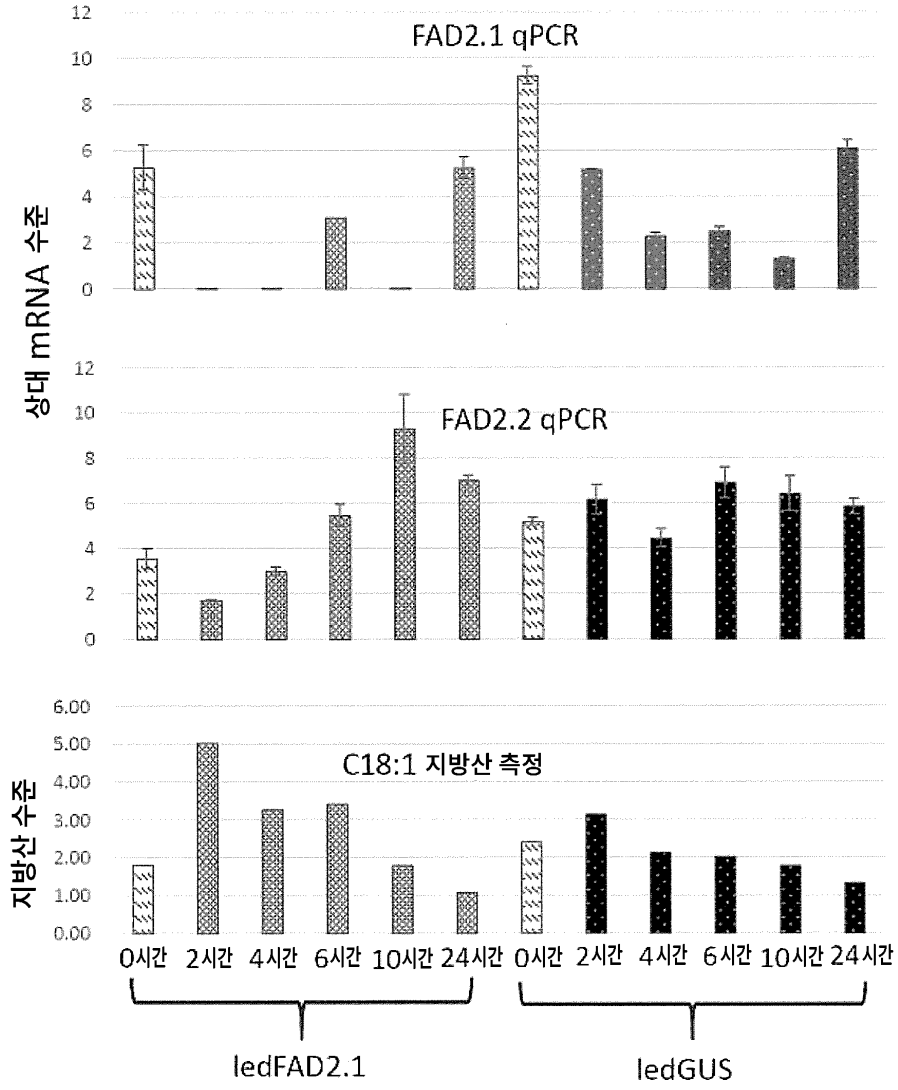
도면3


약 5분
24시간
C D C D C D C D C D C D
A B A B A B A B A B A B
C
D
A
ledGUS
B
dsGUS

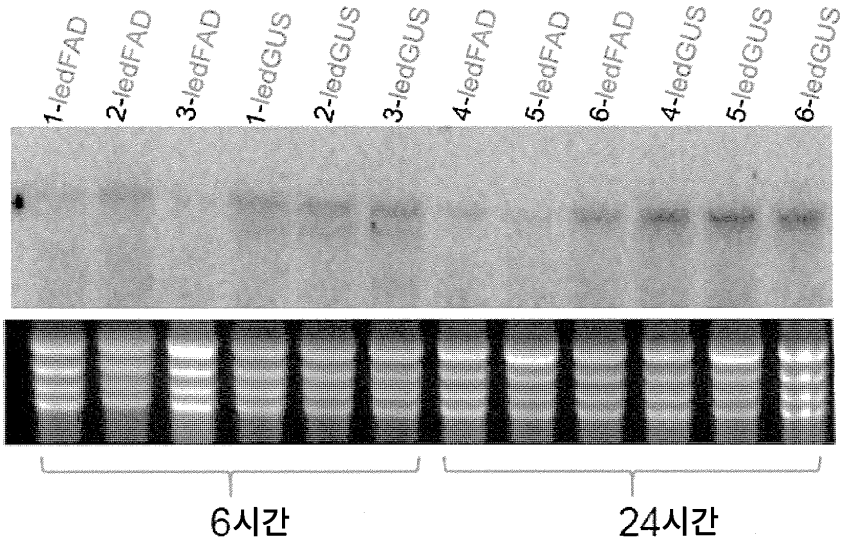
도면4


GUS-담배 잎
처리 24시간 후
상대 GUS 활성
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
6
5 H2O
6 H2O
3 H2O
4 H2O
1 ledGUS
2 H2O

도면5


FAD2.1 qPCR
FAD2.2 qPCR
상대 mRNA 수준
C18:1 지방산 측정
지방산 수준
0시간 2시간 4시간 6시간 10시간 24시간 0시간 2시간 4시간 6시간 10시간 24시간
ledFAD2.1
ledGUS

도면6


1-ledFAD
2-ledFAD
3-ledFAD
1-ledGUS
2-ledGUS
3-ledGUS
4-ledFAD
5-ledFAD
6-ledFAD
4-ledGUS
5-ledGUS
6-ledGUS
6시간
24시간

도면7

WT GUS ORF와 정렬

```
GUS             GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-GU          --------------------TTGTGTTGGTATTTGGTTAGTGGTAGTGAAGGGTGAATAG 40
                                    * * ** ** **  *** ***** ********* *** **

GUS             TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-GU          TTTTTGATTAATTATAAATTGTTTTATTTTATTGGTTTTGGTTGTTATGAAGATGTGGAT 100
                **  *******  * ***  *** ** **** *** ****** ** ********* ***

GUS             TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-GU          TTGTGTGGTAAAGGATTTGATAATGTGTTGATGGTGTATGATTATGTATTAATGGATTGG 160
                *** **** ******** ***** *** ******** * **  * * ********* ***

GUS             ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-GU          ATTGGGGTTAATTTTTATTGTATTTTGTATTATTTTTATG-------------------- 200
                *******  ** *  **  ***  * * ****   *** *
```

도면8

```
GUS             GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-4M          --------------------TCGGGTCCGCAACCGCTCACTGGGAGTCAAGCGCGTACAC 40
                                    *** *** ***:*** *** *** *** *** ***:***

GUS             TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-4M          TTCGTGAATAAGCACTAACGGTTGTACATTAGTGGGTTTCGTCCTCAAGAACATGGGGAG 100
                *** ***:*** ***:*** *** ***:*** *** *** *** ***:*** *** ***

GUS             TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-4M          TTGGGTGCCAATGGAATCGTTAAGGTGGTGAAGGTCCACCACCTCGCTTTATTGGTCTGC 160
                *** *** ***:***:***:*** *** ***:*** *** ***:***:***:***:***

GUS             ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-4M          ATTCGGGGCAAGTCCAACCCTACGTCGGATTTCCCATACC-------------------- 200
                *** *** *** ***:*** *** *** ***:***:***
```

도면9

WT GUS ORF와 정렬

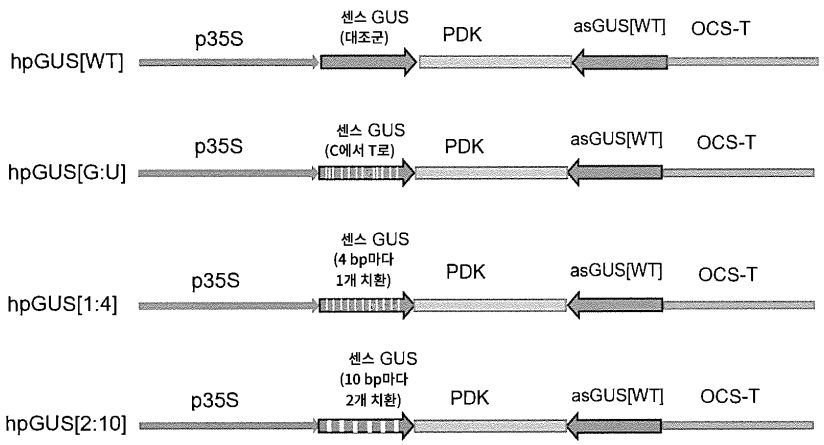
```
GUS             GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG 840
GUS-10M         --------------------TCGCGTCGCGATCCGGTCTCTGGCAGTGTTGGGCGAACTC 40
                                    ********  ********: ********::********:

GUS             TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC 900
GUS-10M         TTCCTGATATACCACAAAGGGTTCTACTAAACTGGCTTACGTCGTCATCTAGATGCGGTG 100
                ********::********  ********::********: ******** :********:

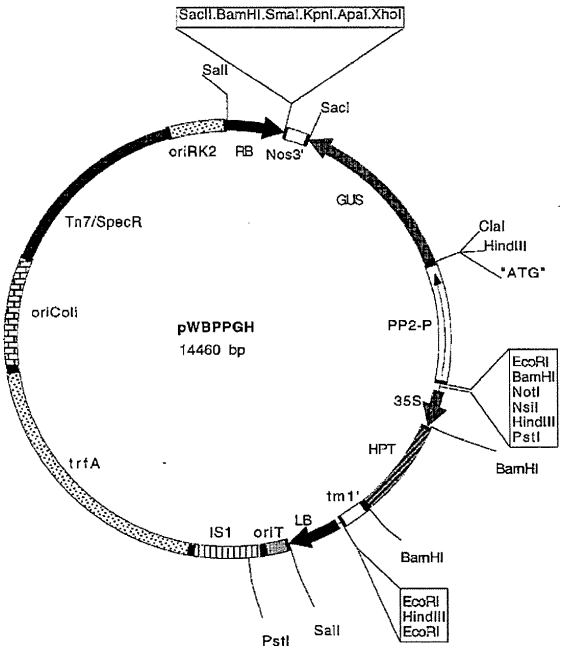
GUS             TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG 960
GUS-10M         TTGCGTGGGTAAGGATTCCTTAACGTGCACATGGTGCAGCACCACGCAAAAATGGACTCC 160
                ******** :******** :********: ********  ********::********

GUS             ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG 1020
GUS-10M         ATTGGGGCGTACTCCTACGCTACCTCGCTATACCCTTAGC-------------------- 200
                ******** :********  ********::********
```

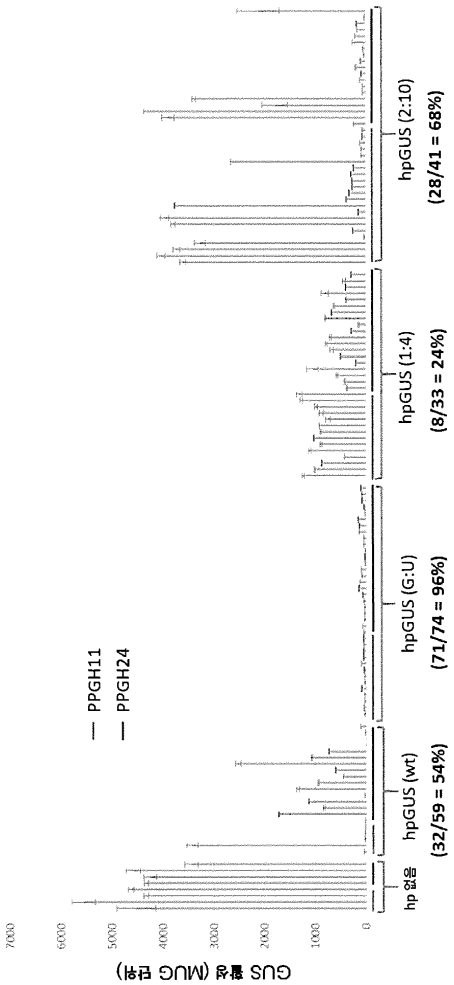
도면10



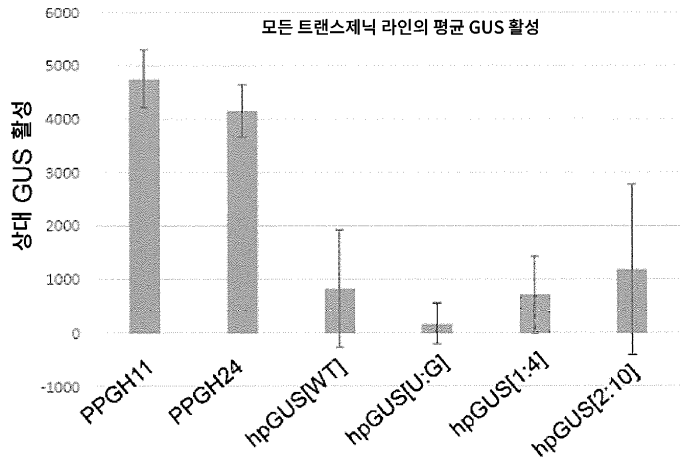
도면11


SacII.BamHI.SmaI.KpnI.ApaI.XhoI
SalI
SacI
oriRK2
RB
Nos3'
GUS
Tn7/SpecR
ClaI
HindIII
"ATG"
oriColi
pWBPPGH
14460 bp
PP2-P
EcoRI
BamHI
NotI
NsiI
HindIII
PstI
35S
HPT
BamHI
trfA
tm1'
IS1
oriT
LB
BamHI
EcoRI
HindIII
EcoRI
PstI
SalI

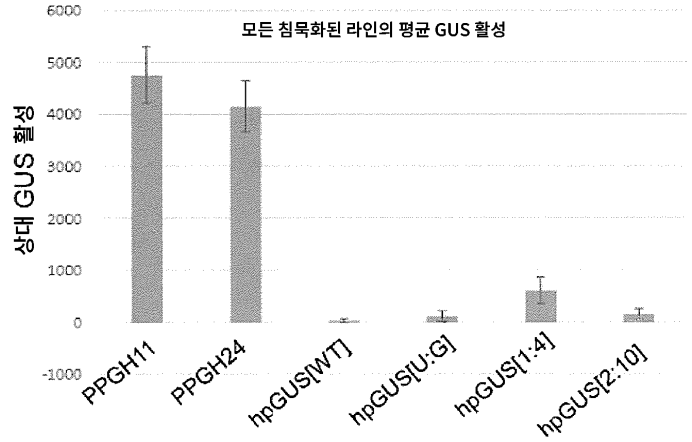
도면12


PPGH11
PPGH24
hp 없음
hpGUS (wt)
(32/59 = 54%)
hpGUS (G:U)
(71/74 = 96%)
hpGUS (1:4)
(8/33 = 24%)
hpGUS (2:10)
(28/41 = 68%)
GUS 활성 (MUG 단위)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

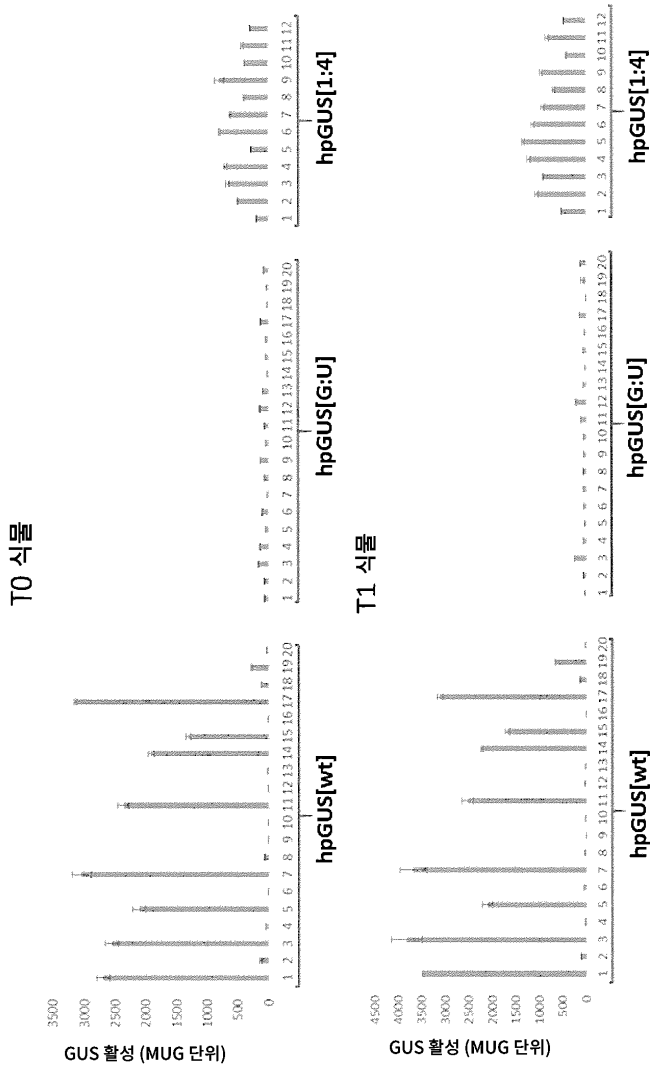
도면13a


모든 트랜스제닉 라인의 평균 GUS 활성
상대 GUS 활성
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
PPGH11
PPGH24
hpGUS[WT]
hpGUS[U:G]
hpGUS[1:4]
hpGUS[2:10]

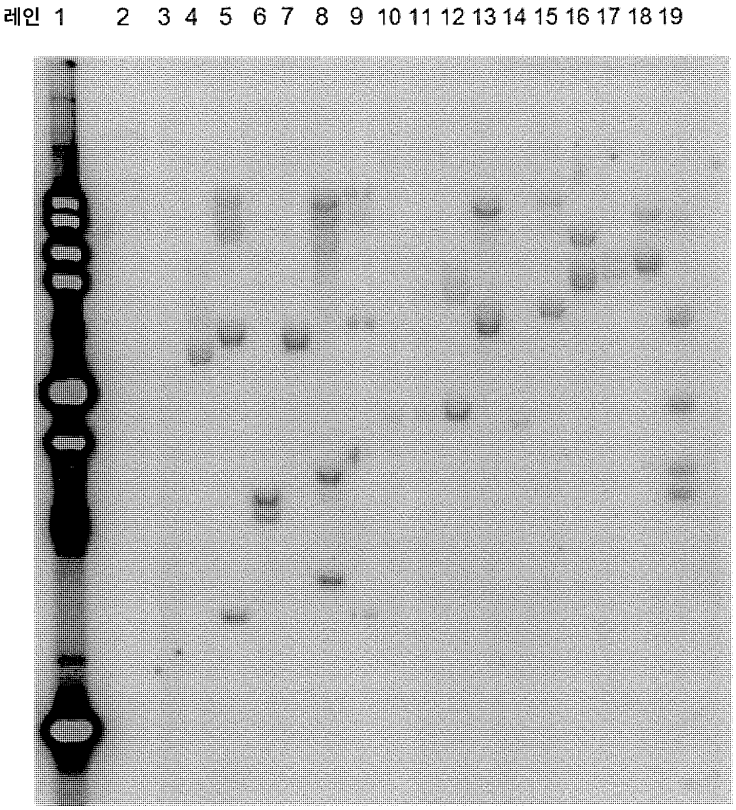
도면13b


모든 침묵화된 라인의 평균 GUS 활성
상대 GUS 활성
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
PPGH11
PPGH24
hpGUS[WT]
hpGUS[U:G]
hpGUS[1:4]
hpGUS[2:10]

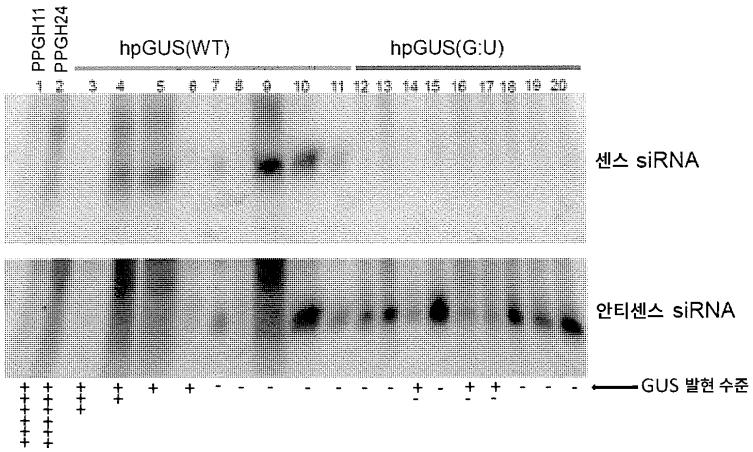
도면14



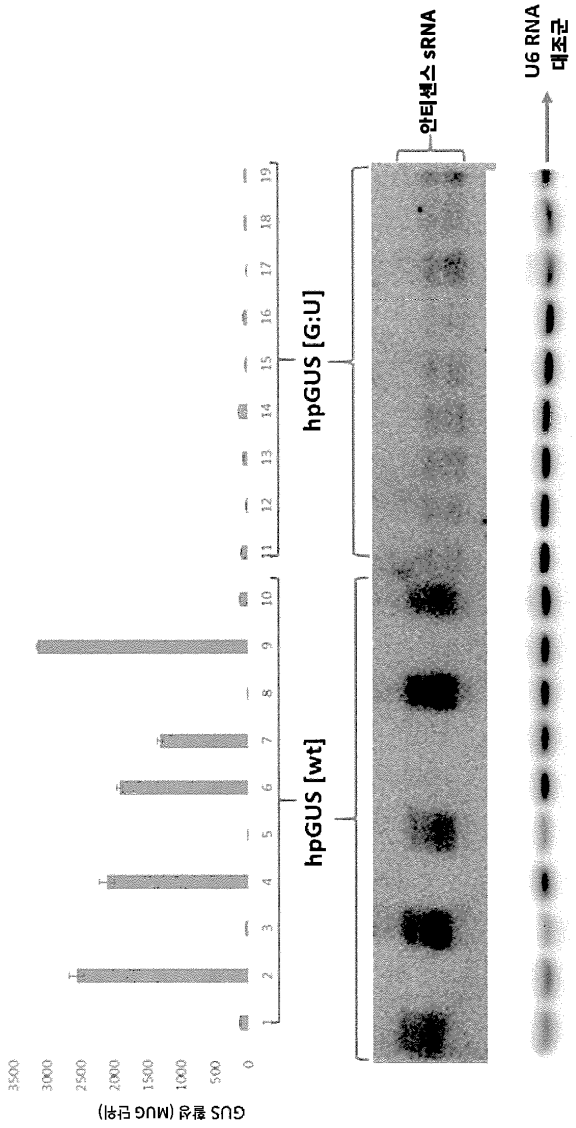
도면15


레인 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

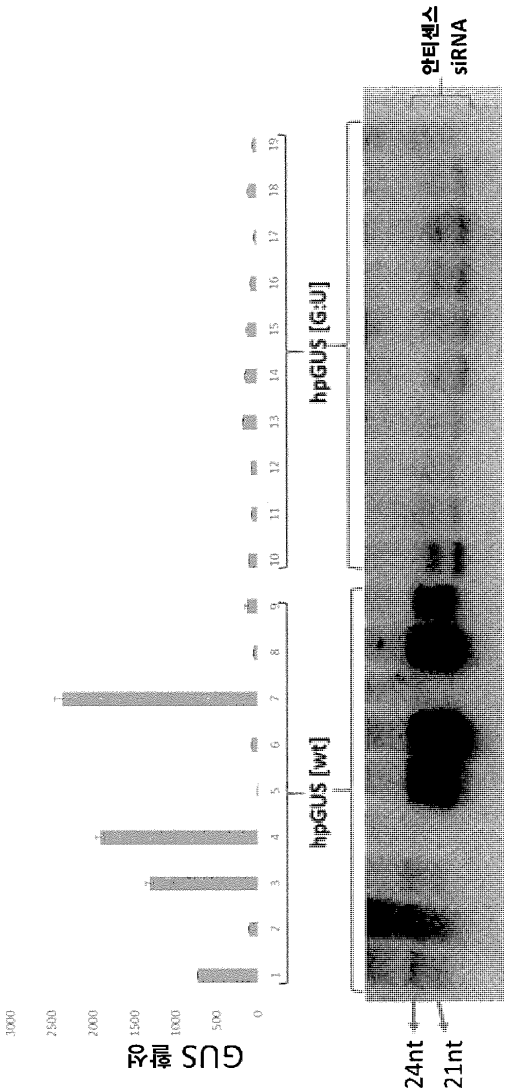
도면16


PPGH11
PPGH24
hpGUS(WT)
hpGUS(G:U)
센스 siRNA
안티센스 siRNA
GUS 발현 수준

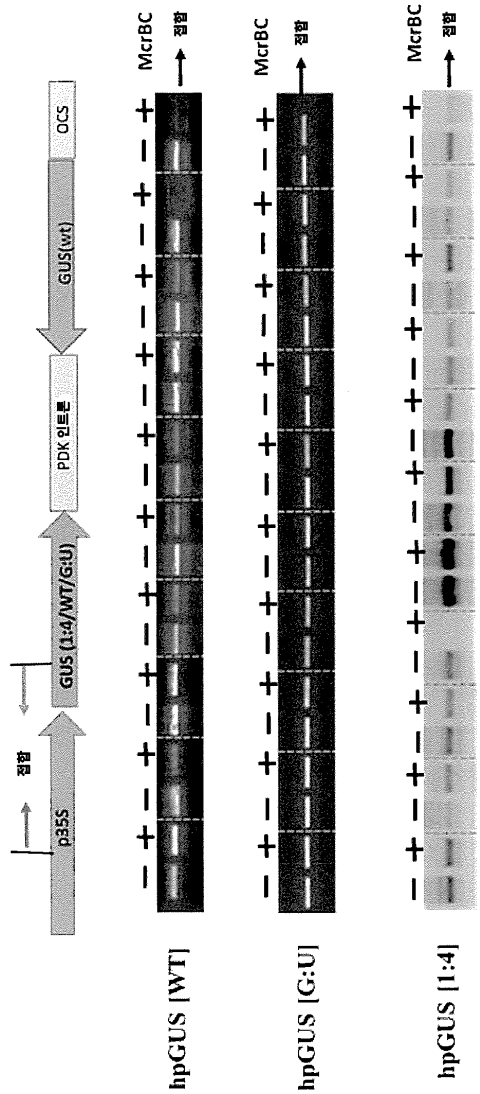
도면17


GUS 활성 (MUG 단위)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
hpGUS [wt]
hpGUS [G:U]
안티센스 sRNA
U6 RNA
대조군

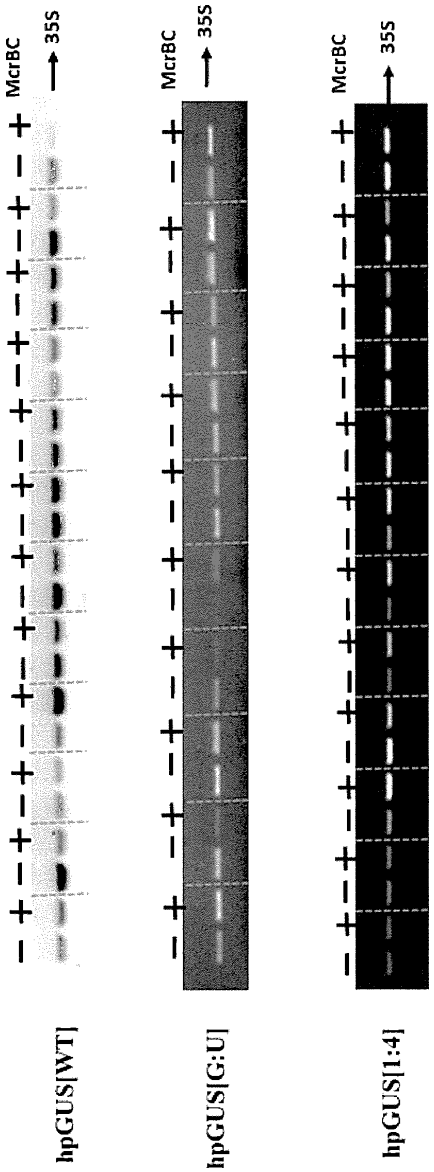
도면18



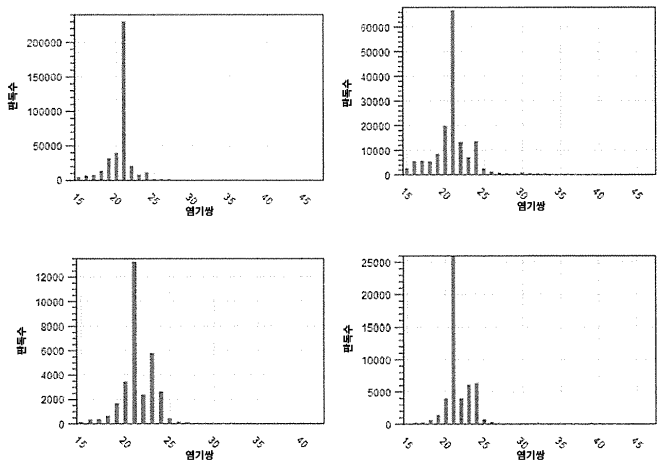
도면19


OCS
GUS(wt)
PDK 인트론
GUS (1:4/WT/G:U)
p35S
정합
McrBC
hpGUS [WT]
hpGUS [G:U]
hpGUS [1:4]

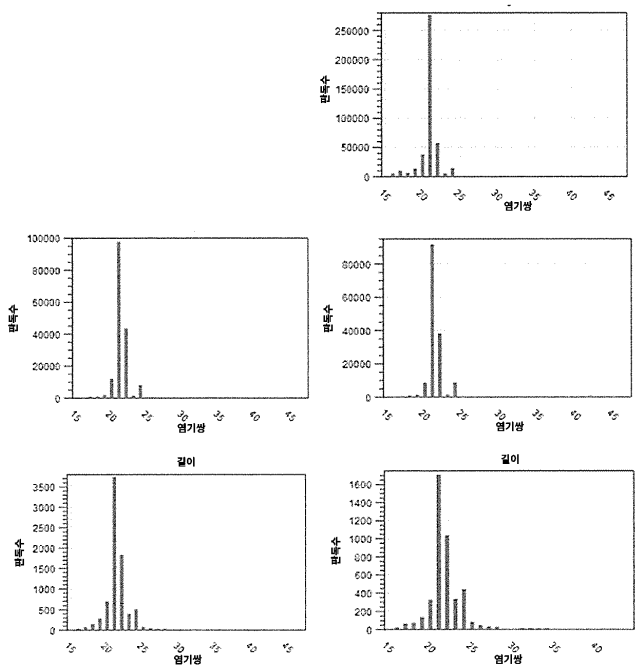
도면20



도면21a



도면21b



도면22

```
EIN2-GU         ----------------------------------------------------------GATTTTA
EIN2-cDNA       AGTAATTATATTATCAGATAGATTTAGGATGGAAGCTGAAATTGTGAATGTGAGACCTCA
                                                                        **  * *

EIN2-GU         GTTAGGGTTTATTTAGAGAATGGTTTTTGTTTTATTTTTTGTTTTTTTGGTTTTTGTTGG
EIN2-cDNA       GCTAGGGTTTATCCAGAGAATGGTTCCTGCTCTACTTCCTGTCCTTTTGGTTTCTGTCGG
                * **********  ***********  ** * ** **  ***  ********* *** **

EIN2-GU         ATATATTGATTTTGGGAAATGGGTTGTAAATATTGAAGGAGGTGTTTGTTTTGGGTATGA
EIN2-cDNA       ATATATTGATCCCGGGAAATGGGTTGCAAATATCGAAGGAGGTGCTCGTTTCGGGTATGA
                **********   ************** ****** ********** * **** ********

EIN2-GU         TTTGGTGGTAATTATTTTGTTTTTTAATTTTGTTGTTATTTTATGTTAATATGTTGTAGT
EIN2-cDNA       CTTGGTGGCAATTACTCTGCTTTTCAATTTTGCCGCCATCTTATGCCAATATGTTGCAGC
                 ******* ***** * ** **** *******  *  ** *****  ********* **

EIN2-GU         TTGTATAAGTGTT-----------------------------------------------
EIN2-cDNA       TCGCATAAGCGTTGTGACTGGTAAACACTTGGCTCAGATCTGCAATGAAGAATATGACAA
                * * ***** ***
```

도면23

```
CHS-GU          ----------------------------------------------------GTTGTTTGTT
CHS-cDNA        TCCGTATCGCTAAGGATCTCGCCGAGAACAATCGTGGAGCACGTGTCCTCGTTGTCTGCT
                                                                   ***** ** *

CHS-GU          TTGAGATTATAGTTGTTATTTTTTGTGGTTTTTTTGATATTTATTTTGATTTTTTTGTTG
CHS-cDNA        CTGAGATCACAGCCGTTACCTTCCGTGGTCCCTCTGACACCCACCTTGACTCCCTCGTCG
                 ****** * **  ****  **  *****   * *** *   *  **** *   * ** *

CHS-GU          GTTAGGTTTTTTTTAGTGATGGTGTTGTTGTATTTATTGTGGGGTTGGATTTTGATATAT
CHS-cDNA        GTCAGGCTCTTTTCAGTGATGGCGCCGCCGCACTCATTGTGGGGTCGGACCCTGACACAT
                ** *** * **** ******** *  *  * * * ********** ***   *** * **

CHS-GU          TTGTTGGAGAGAAATTTATTTTTGAGATGGTGTTTGTTGTTTAGATTATTTTTTTAGATT
CHS-cDNA        CTGTCGGAGAGAAACCCATCTTTGAGATGGTGTCTGCCGCTCAGACCATCCTTCCAGACT
                 *** *********   ** ************** **  * * ***  **  **  *** *

CHS-GU          TTGATGGTGT----------------------------------------------------
CHS-cDNA        CTGATGGTGCCATAGACGGACATTTGAGGGAAGTTGGTCTCACCTTCCATCTCCTCAAGG
                 ********
```

도면24

안티센스 EIN2 cDNA와 안티센스 EIN2-GU 정렬

```
As-EIN2-GU      ----------------------------------------AATGTTTATGTGAGTTGTAATA
asEIN2-cDNA     TCTTCATTGCAGATCTGAGCCAAGTGTTTACCAGTCACAACGCTTATGCGAGCTGCAACA
                                                        ** * ***** *** ** ** *

As-EIN2-GU      TATTGGTATAAGATGGTGGTAAAATTGAAAAGTAGAGTAATTGTTATTAAGTTATATTTG
asEIN2-cDNA     TATTGGCATAAGATGGCGGCAAAATTGAAAAGCAGAGTAATTGCCACCAAGTCATACCCG
                ****** ********** ** ************ **********  *  **** ***   *

As-EIN2-GU      AAATGAGTATTTTTTTTGATATTTGTAATTTATTTTTTGGGATTAATATATTTGATAGAA
asEIN2-cDNA     AAACGAGCACCTCCTTCGATATTTGCAACCCATTTCCCGGGATCAATATATCCGACAGAA
                *** *** *  *  ** ******** **    ****   ***** *******  ** ****

As-EIN2-GU      ATTAAAAGGATAGGAAGTAGAGTAGGAATTATTTTTTGGATAAATTTTAGTTGAGGTT--
asEIN2-cDNA     ACCAAAAGGACAGGAAGTAGAGCAGGAACCATTCTCTGGATAAACCCTAGCTGAGGTCTC
                *  ******* *********** *****  *** * ********   *** ******
```

도면25

안티센스 CHS cDNA와 안티센스 CHS-GU 정렬

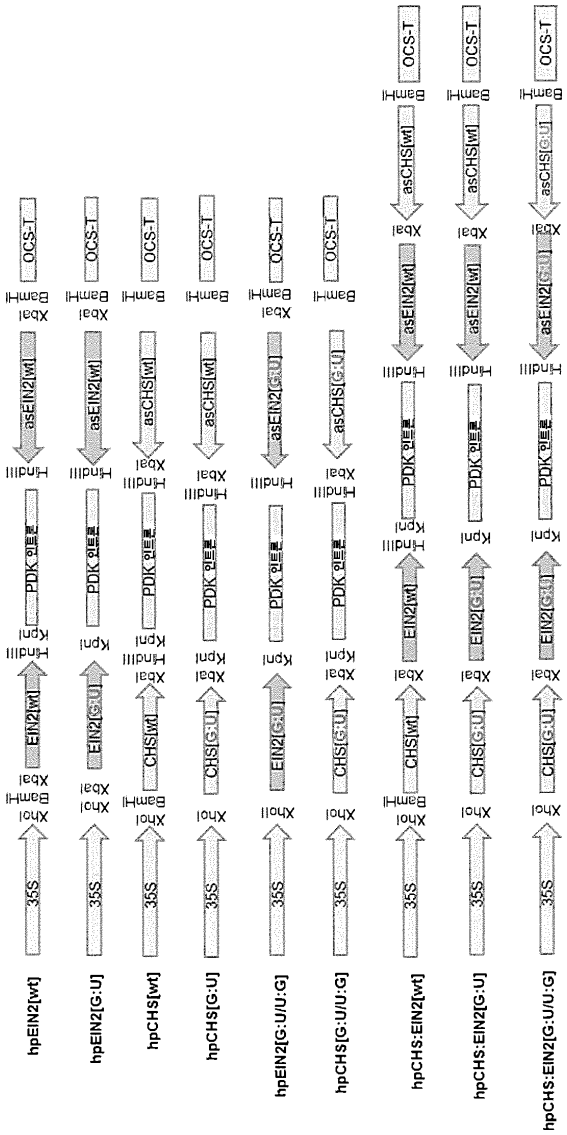
```
As-CHS-GU       ------------------------------------------GTATTATTAGAGTTTGGAA
asCHS-cDNA      GATGGAAGGTGAGACCAACTTCCCTCAAATGTCCGTCTATGGCACCATCAGAGTCTGGAA
                                                         * *  ** ***** *****

As-CHS-GU       GGATGGTTTGAGTGGTAGATATTATTTTAAAGATGGGTTTTTTTTTGATAGATGTGTTAG
asCHS-cDNA      GGATGGTCTGAGCGGCAGACACCATCTCAAAGATGGGTTTCTCTCCGACAGATGTGTCAG
                ******* **** ** *** *  ** * ************ * *  ** ******** **

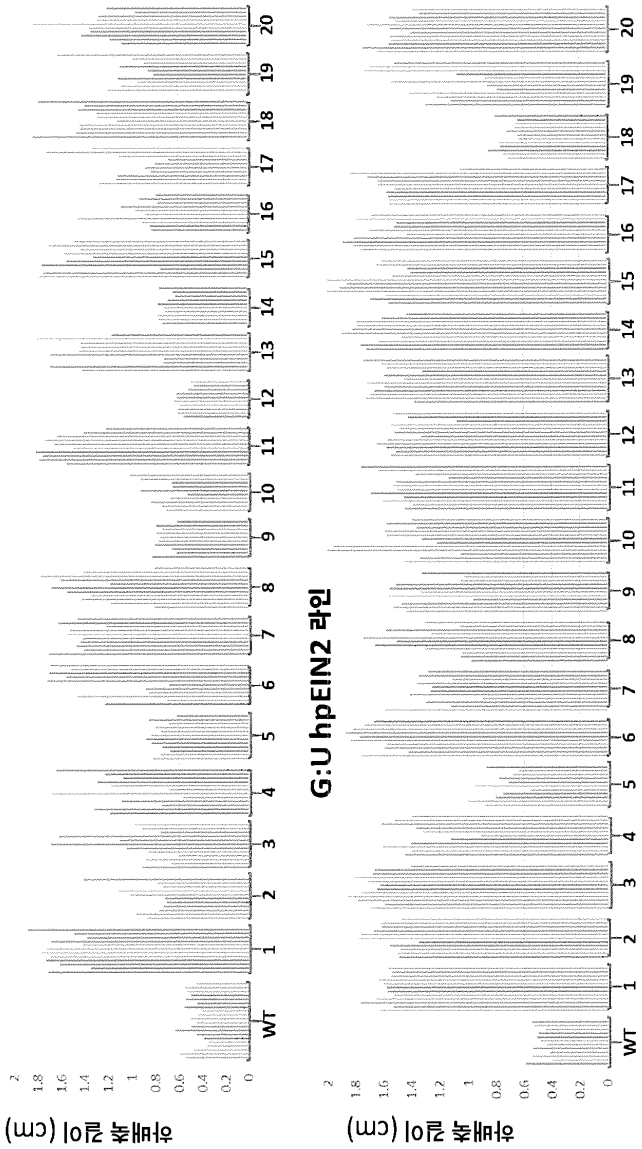
As-CHS-GU       GGTTTGATTTTATAATGAGTGTGGTGGTGTTATTATTGAAAAGAGTTTGATTGATGAGGG
asCHS-cDNA      GGTCCGACCCCACAATGAGTGCGGCGGCGCCATCACTGAAAAGAGCCTGACCGACGAGGG
                ***  **    * ******** ** ** *  ** * *********  ***  ** *****

As-CHS-GU       AGTTAAGGTGGGTGTTAGAGGGATTATGGAAGGTAATGGTTGTGATTTTAGAGTAGATAA
asCHS-cDNA      AGTCAAGGTGGGTGTCAGAGGGACCACGGAAGGTAACGGCTGTGATCTCAGAGCAGACAA
                *** *********** *******  * ********** ** ****** * **** *** **
```

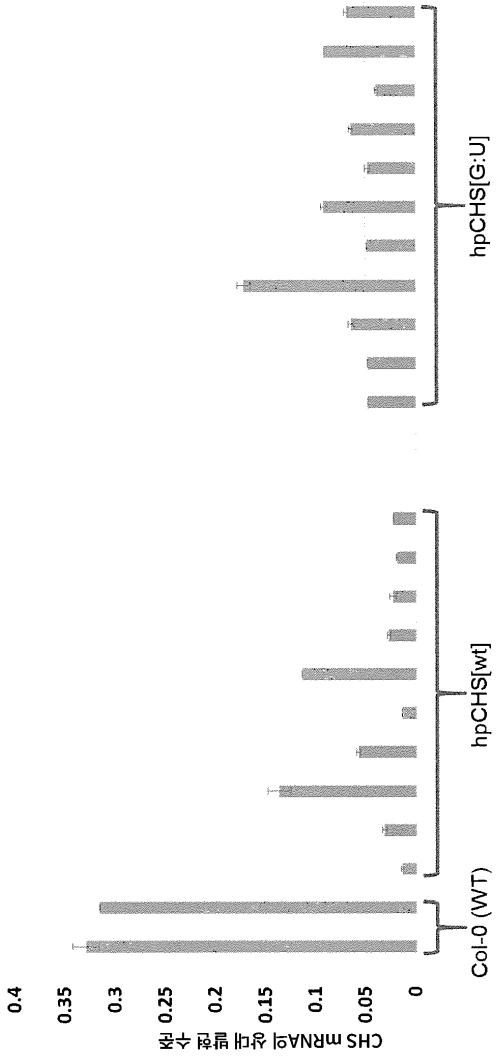
도면26


hpEIN2[wt]
hpEIN2[G:U]
hpCHS[wt]
hpCHS[G:U]
hpEIN2[G:U/U:G]
hpCHS[G:U/U:G]
hpCHS:EIN2[wt]
hpCHS:EIN2[G:U]
hpCHS:EIN2[G:U/U:G]
35S
XhoI
BamHI
XbaI
EIN2[wt]
EIN2[G:U]
CHS[wt]
CHS[G:U]
KpnI
HindIII
PDK 인트론
asEIN2[wt]
asCHS[wt]
asEIN2[G:U]
asCHS[G:U]
OCS-T

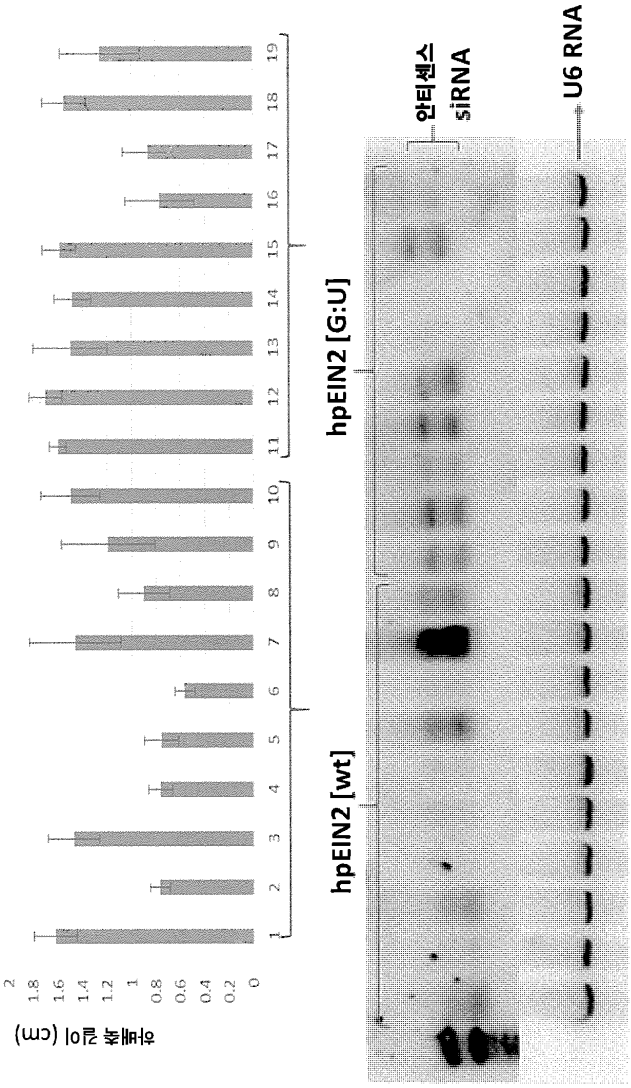
도면27


hpEIN2[wt] 라인
G:U hpEIN2 라인
하배축 길이 (cm)
하배축 길이 (cm)
WT
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2

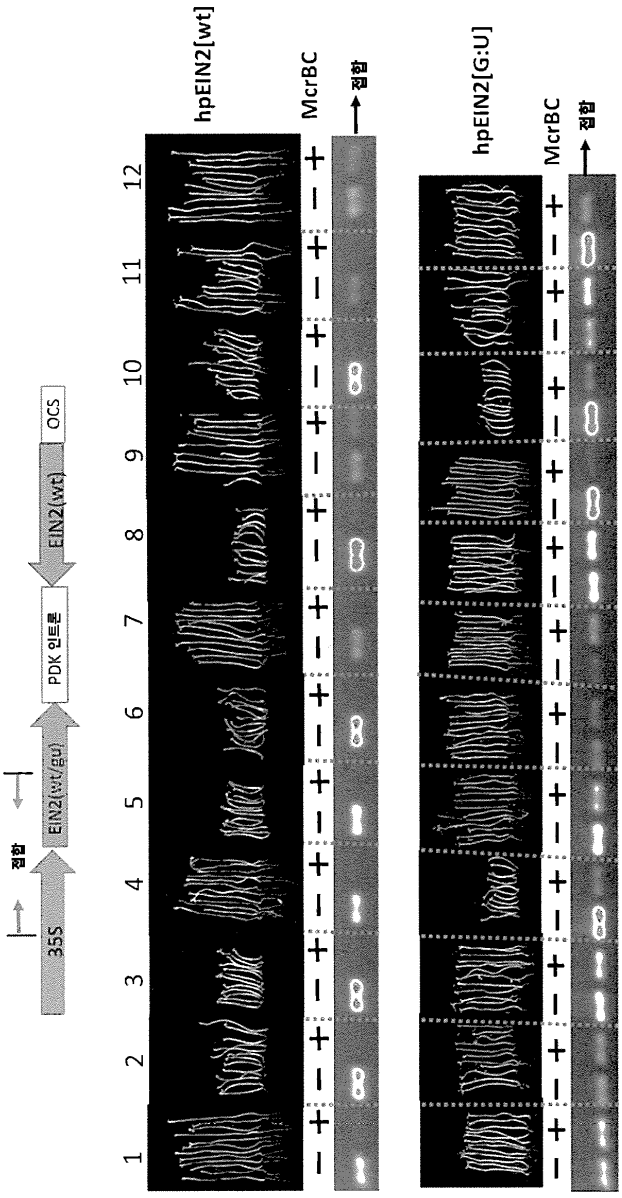
도면28


CHS mRNA의 상대 발현 수준
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Col-0 (WT)
hpCHS[wt]
hpCHS[G:U]

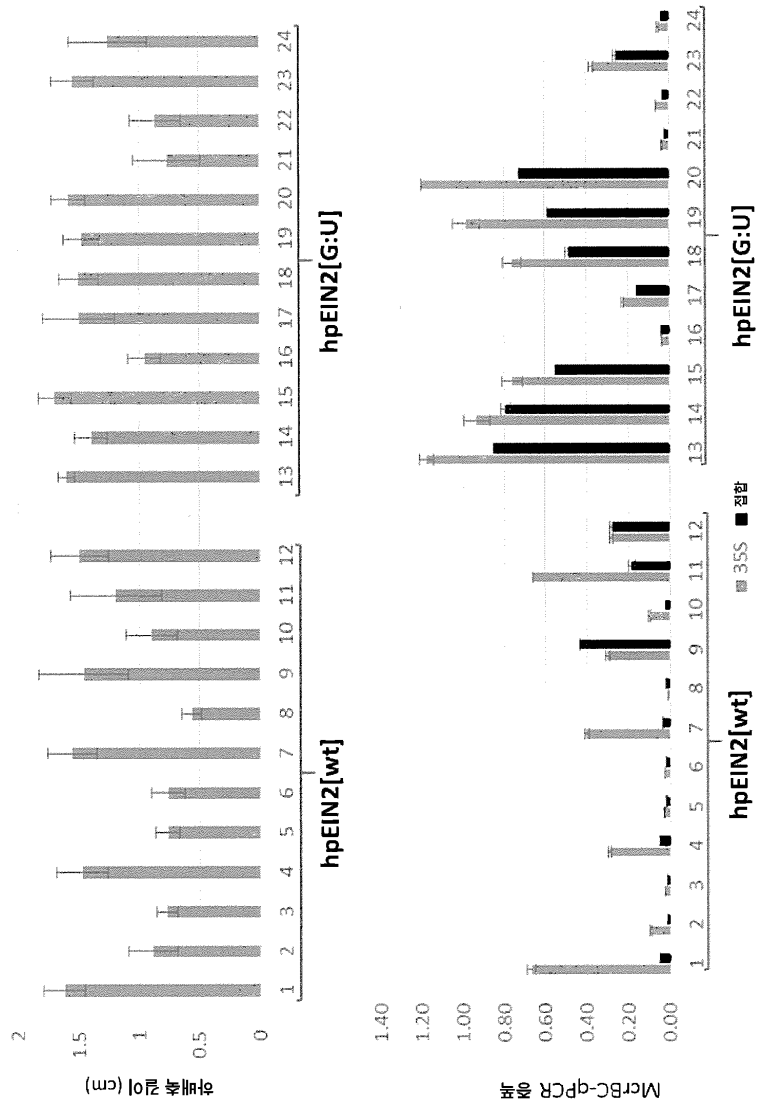
도면29


하배축 길이 (cm)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
hpEIN2 [wt]
hpEIN2 [G:U]
안티센스
siRNA
U6 RNA

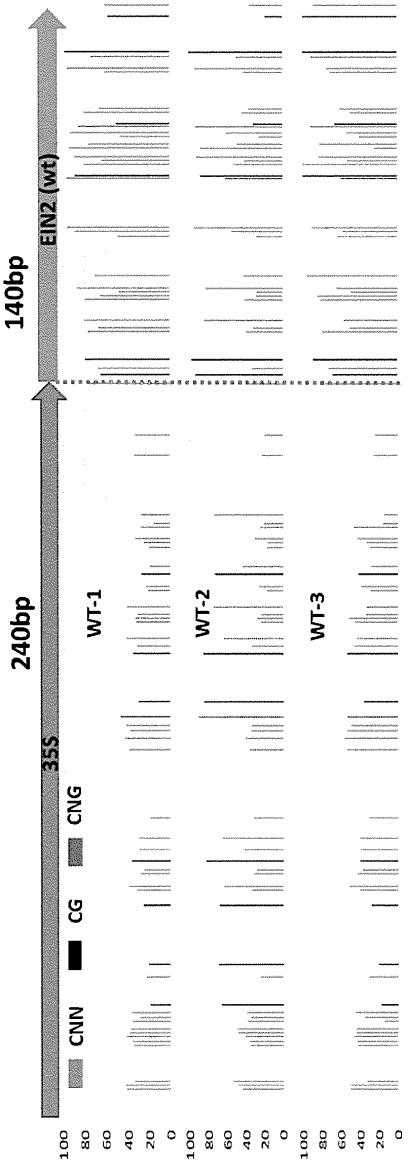
도면30


35S
절합
EIN2(wt/gu)
PDK 인트론
EIN2(wt)
OCS
hpEIN2[wt]
McrBC
절합
hpEIN2[G:U]
McrBC
절합
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

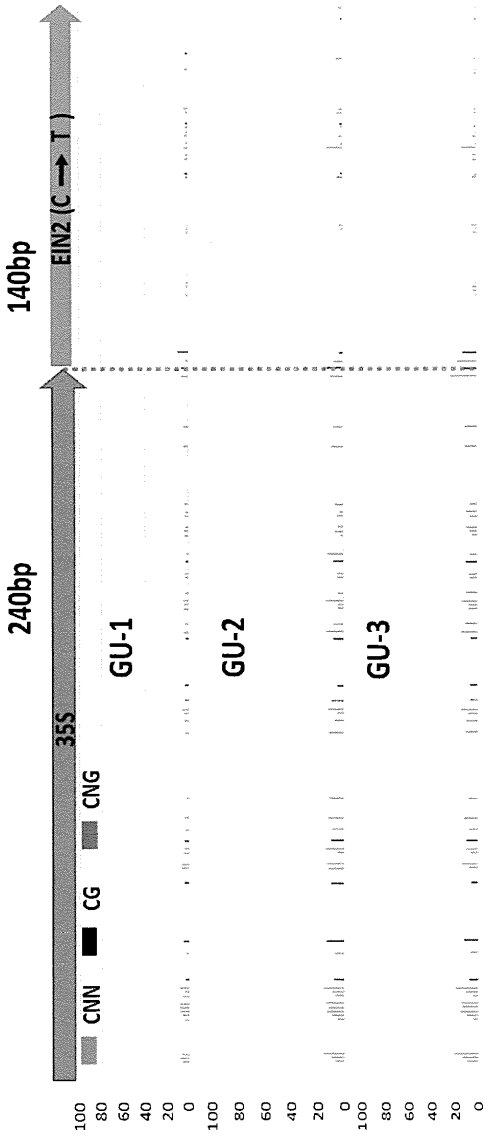
도면31


하배축 길이 (cm)
0
0.5
1
1.5
2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
hpEIN2[wt]
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
hpEIN2[G:U]
McrBC-qPCR 증폭
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
35S
접합
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
hpEIN2[wt]
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
hpEIN2[G:U]

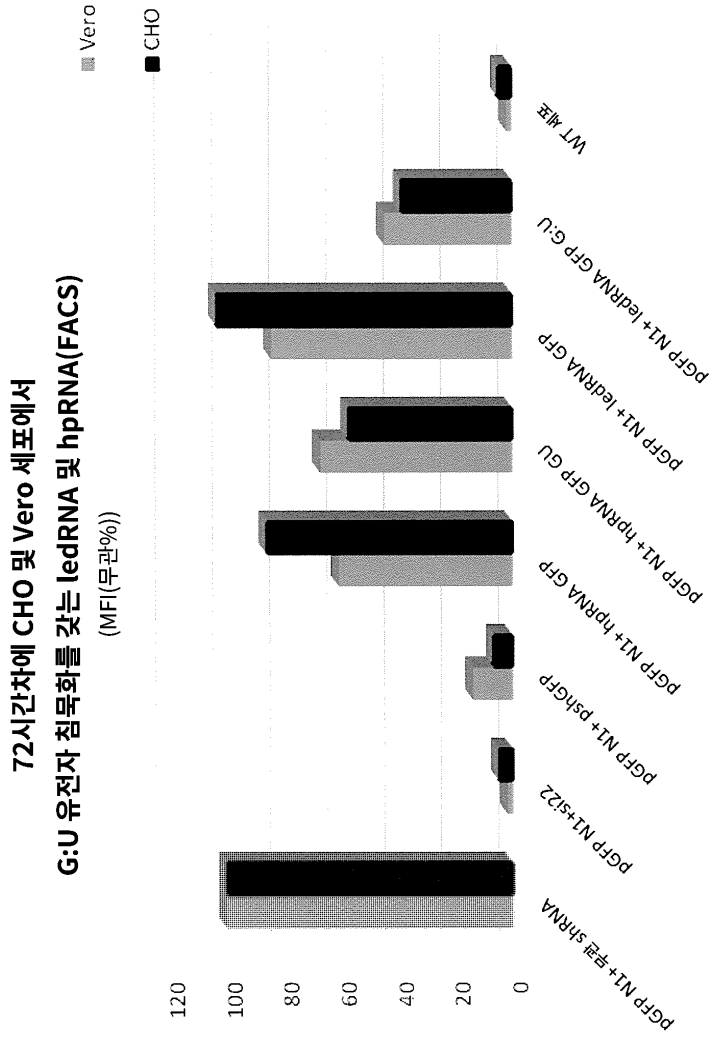
도면32



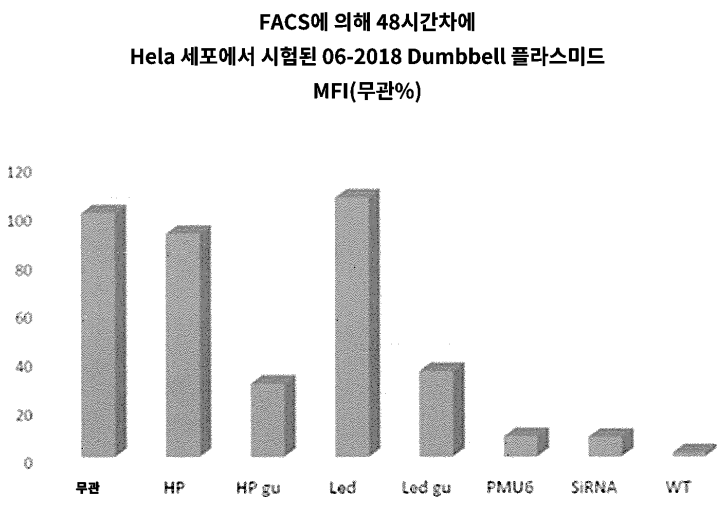
도면33



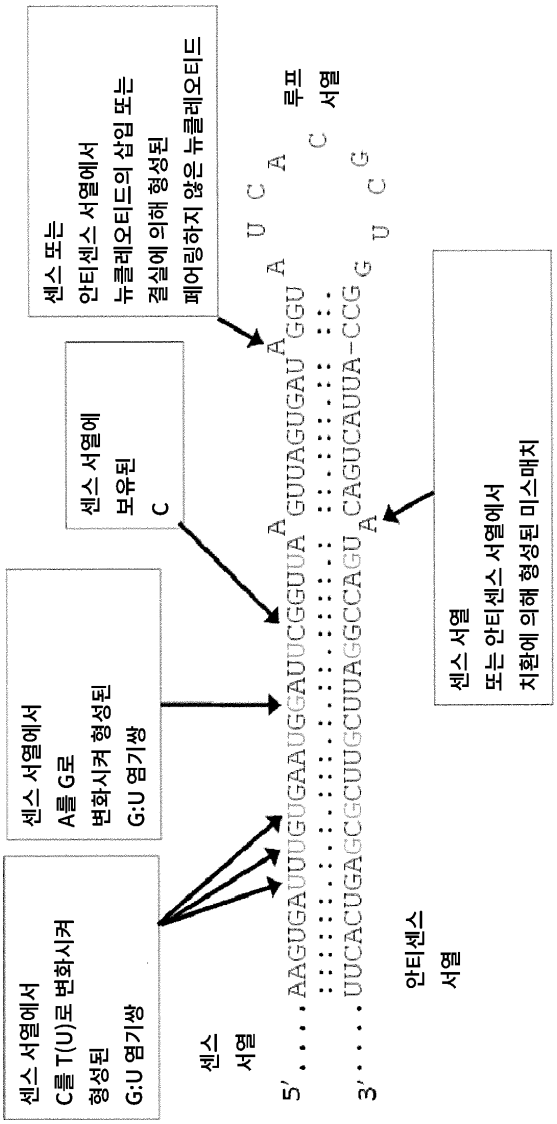
도면34


72시간차에 CHO 및 Vero 세포에서
G:U 유전자 침묵화를 갖는 ledRNA 및 hpRNA(FACS)
(MFI(무관%))
Vero
CHO
WT 세포
pGFP N1+ ledRNA GFP G:U
pGFP N1+ ledRNA GFP
pGFP N1+ hpRNA GFP GU
pGFP N1+ hpRNA GFP
pGFP N1+ pshGFP
pGFP N1+si22
pGFP N1+ 음성 shRNA
120
100
80
60
40
20
0

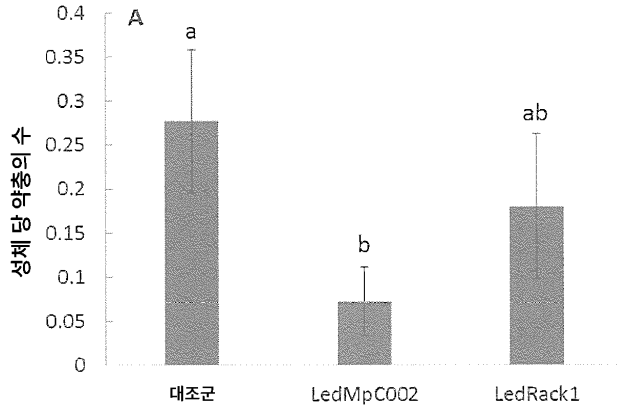
도면35


FACS에 의해 48시간차에
Hela 세포에서 시험된 06-2018 Dumbbell 플라스미드
MFI(무관%)
120
100
80
60
40
20
0
무관
HP
HP gu
Led
Led gu
PMU6
SiRNA
WT

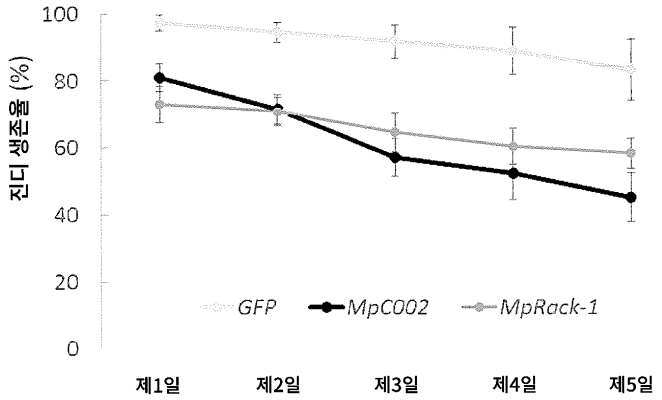
도면36


센스 서열에서
C를 T(U)로 변화시켜
형성된
G:U 염기쌍
센스 서열에서
A를 G로
변화시켜 형성된
G:U 염기쌍
센스 서열에
보유된
C
센스 또는
안티센스 서열에서
뉴클레오티드의 삽입 또는
결실에 의해 형성된
페어링하지 않은 뉴클레오티드
센스 서열
또는 안티센스 서열에서
치환에 의해 형성된 미스매치
루프
서열
센스
서열
안티센스
서열
5′
3′

도면37a


A
성체 당 약충의 수
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
a
b
ab
대조군
LedMpC002
LedRack1

도면37b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> RNA Molecules

<130> 525258PCT

<150> 2018902896

<151> 2018-08-08

<150> 2018902840

<151> 2018-08-03

<150> 2017903773

<151> 2017-09-15

<160> 139

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1229

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP ledRNA

<400> 1

gggugucgcc cucgaacuuc accucggcgc gggucuugua guugccgucg uccuugaaga 60

agauggugcg cuccuggacg uagccuucgg gcauggcgga cuugaagaag ucgugcugcu 120

ucaugugguc gggguagcgg cugaagcacu gcacgccgua ggugaaggug gucacgaggg 180

ugggccaggg cacgggcagc uugccggugg ugcagaugaa cuucaggguc agcuugccgu 240

agguggcauc gcccucgccc ucgccggaca cgcugaacuu guggccguuu acgucgccgu 300

ccagcucgac caggaugggc accaccccgg ugaacagcuc cucgcccuug cucacuaugg 360

aucaacuagg gaucccccug aaguucaucu gcaccaccgg caagcugccc gugcccuggc 420

ccacccucgu gaccaccuuc accuacggcg ugcagugcuu cagccgcuac cccgaccaca 480

ugaagcagca cgacuucuuc aaguccgcca ugcccgaagg cuacguccag gagcgcacca 540

ucuucuucaa ggacgacggc aacuacaaga cccgcgccga ggugaaguuc gagggcgaca 600

cccuggugaa ccgcaucgag cugaagggca ucgacuucaa ggaggacggc aacauccugg 660

ggcacaagcu ggaguacaac uacaacagcc acaacgucua uaucauggcc gacaagcaga 720

agaacggcau caaggugaac uucaagaucc gccacaacau cgaggacggc agcgugcagc 780

ucgccgacca cuaccagcag aacaccccca ucggcgacgg ccccgugcug cugccaagcu 840

uuaggugauc caagcuugau ccgggcuuua cuuguacagc ucguccaugc cgagagugau 900

cccggcggcg gucacgaacu ccagcaggac caugugaucg cgcuucucgu uggggucuuu 960

gcucagggcg gacugggugc ucagguagug guugucgggc agcagcacgg ggccgucgcc 1020

gaugggggug uucugcuggu aguggucggc gagcugcacg cugccguccu cgauguugug 1080

gcggaucuug aaguucaccu ugaugccguu cuucugcuug ucggccauga uauagacguu 1140

guggcuguug uaguuguacu ccagcuugug ccccaggaug uugccguccu ccuugaaguc 1200

gaugcccuuc agcucgaugc gguucacca 1229

<210> 2

<211> 1326

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS ledRNA

<400> 2

gggaacagac gcgugguuac agucuugcgc gacaugcguc accacgguga uaucguccac 60

ccagguguuc ggcguggugu agagcauuac gcugcgaugg auuccggcau aguuaaagaa 120

aucauggaag uaagacugcu uuuucuugcc guuuucgucg guaaucacca uucccggcgg 180

gauagucugc caguucaguu cguuguucac acaaacggug auacguacac uuuucccggc 240

aauaacauac ggcgugacau cggcuucaaa uggcguauag ccgcccugau gcuccaucac 300

uuccugauua uugacccaca cuuugccgua augagugacc gcaucgaaac gcagcacgau 360

acgcuggccu gcccaaccuu ucgguauaaa gacuucgcgc ugauaccaga cgugccguau 420

guuauugccg ggaaaagugu acguaucacc guuuguguga acaacgaacu gaacuggcag 480

acuaucccgc cgggaauggu gauuaccgac gaaaacggca agaaaaagca gucuuacuuc 540

caugauuucu uuaacuaugc cggaauccau cgcagcguaa ugcucuacac cacgccgaac 600

accugggugg acgauaucac cguggugacg caugucgcgc aagacuguaa ccacgcgucu 660

guucccgacu ggcagguggu ggccaauggu gaugucagcg uugaacugcg ugaugcggau 720

caacaggugg uugcaacugg acaaggcacu agcgggacuu ugcaaguggu gaauccgcac 780

cucuggcaac cgggugaagg uuaucucuau gaacugugcg ucacagccaa aagccagaca 840

gagugugaua ucuacccgcu ucgcgucggc auccggucag uggcagugaa gggccaacag 900

uuccugauua accacaaacc guucuacuuu acuggcuuug gucgucauga agaugcggac 960

uuacguggca aaggauucga uaacgugcug auggugcacg accacgcauu aauggacugg 1020

auuggggcca acuccuaccg uaccucgcau uacccuuacg cugaagagau gcucgaugug 1080

guuaaucagg aacuguuggc ccuucacugc cacugaccgg augccgacgc gaagcgggua 1140

gauaucacac ucugucuggc uuuuggcugu gacgcacagu ucauagagau aaccuucacc 1200

cgguugccag aggugcggau ucaccacuug caaagucccg cuagugccuu guccaguugc 1260

aaccaccugu ugauccgcau cacgcaguuc aacgcugaca ucaccauugg ccaccaccug 1320

ccaguc 1326

<210> 3

<211> 1485

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAD2.1 ledRNA

<400> 3

gaagaucugu agccucucgc ggucauugua gauugggccg uaagggucau agugacaugc 60

aaagcgauca uaaugucggc cagaaacauu gaaagccaag uacaaaggcc agccaagagu 120

aagggugauc guaagugaaa uaacccggcc ugguggauug uucaaguacu uggaauacca 180

uccgaguugu gauuucggcu uaggcacaaa aaccucaucg cgcucgagug agccaguguu 240

ggaguggugg cgacgaugac uauauuucca agagaaguag ggcaccauca gagcagagug 300

gaggauaagc ccgacagugu caucaaccca cugguaguca cuaaaggcau gguggccaca 360

uucgugcgca auaacccaaa uaccagugca aacacaaccc ugacaaaucc aguaaauagg 420

ccaugcaagg uagcaauccu aggcacucug cucugauggu gcccuacuuc ucuuggaaau 480

auagucaucg ucgccaccac uccaacacug gcucacucga gcgcgaugag guuuuugugc 540

cuaagccgaa aucacaacuc ggaugguauu ccaaguacuu gaacaaucca ccaggccggg 600

uuauuucacu uacgaucacc cuuacucuug gcuggccuuu guacuuggcu uucaauguuu 660

cuggccgaca uuaugaucgc uuugcauguc acuaugaccc uuacggccca aucuacaaug 720

accgcgagag gcuacagauc uuccuuucug augcuggagu uauuggagcu gguuaucuac 780

uauaucguau ugccuuggua aaagggcuag cuuggcucgu guguauguau ggcguaccac 840

uccuaaucgu gaacggcuuc cuugucuuga ucacuuauuu gcagcacacu cacccgucau 900

ugccucacua cgauucaucc gaaugggauu ggcuaagggg agcuuuggca accgucgaca 960

gagacuaugg cauucuaaac aaggucuucc acaacaucac cgauacucac guaguccacc 1020

aucuguucuc gaccaugcca cacucuagag ugaugcuuca ucuuucucca cauagauaca 1080

cucuuuugcu ucccuccaca uugccuugaa aaccgggguu ccgucaaauu gguaguaguc 1140

uccgaguaau ggcuugacug cuuuuguugc cuccauugca uuguagugug gcauggucga 1200

gaacagaugg uggacuacgu gaguaucggu gauguugugg aagaccuugu uuagaaugcc 1260

auagucucug ucgacgguug ccaaagcucc ccuuagccaa ucccauucgg augaaucgua 1320

gugaggcaau gacgggugag ugugcugcaa auaagugauc aagacaagga agccguucac 1380

gauuaggagu gguacgccau acauacacac gagccaagcu agcccuuuua ccaaggcaau 1440

acgauauagu agauaaccag cuccaauaac uccagcauca gaaag 1485

<210> 4

<211> 1258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding GFP ledRNA

<400> 4

taatacgact cactataggg tgtcgccctc gaacttcacc tcggcgcggg tcttgtagtt 60

gccgtcgtcc ttgaagaaga tggtgcgctc ctggacgtag ccttcgggca tggcggactt 120

gaagaagtcg tgctgcttca tgtggtcggg gtagcggctg aagcactgca cgccgtaggt 180

gaaggtggtc acgagggtgg gccagggcac gggcagcttg ccggtggtgc agatgaactt 240

cagggtcagc ttgccgtagg tggcatcgcc ctcgccctcg ccggacacgc tgaacttgtg 300

gccgtttacg tcgccgtcca gctcgaccag gatgggcacc accccggtga acagctcctc 360

gcccttgctc actatggatc aactagggat ccccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa 420

gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc agtgcttcag 480

ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 540

cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt 600

gaagttcgag ggcgacaccc tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga 660

ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 720

catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 780

ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 840

cgtgctgctg ccaagcttta ggtgatccaa gcttgatccg ggctttactt gtacagctcg 900

tccatgccga gagtgatccc ggcggcggtc acgaactcca gcaggaccat gtgatcgcgc 960

ttctcgttgg ggtctttgct cagggcggac tgggtgctca ggtagtggtt gtcgggcagc 1020

agcacggggc cgtcgccgat gggggtgttc tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgctg 1080

ccgtcctcga tgttgtggcg gatcttgaag ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgtcg 1140

gccatgatat agacgttgtg gctgttgtag ttgtactcca gcttgtgccc caggatgttg 1200

ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc tcgatgcggt tcaccattgt cgggatac 1258

<210> 5

<211> 1346

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding Gus ledRNA

<400> 5

taatacgact cactataggg aacagacgcg tggttacagt cttgcgcgac atgcgtcacc 60

acggtgatat cgtccaccca ggtgttcggc gtggtgtaga gcattacgct gcgatggatt 120

ccggcatagt taaagaaatc atggaagtaa gactgctttt tcttgccgtt ttcgtcggta 180

atcaccattc ccggcgggat agtctgccag ttcagttcgt tgttcacaca aacggtgata 240

cgtacacttt tcccggcaat aacatacggc gtgacatcgg cttcaaatgg cgtatagccg 300

ccctgatgct ccatcacttc ctgattattg acccacactt tgccgtaatg agtgaccgca 360

tcgaaacgca gcacgatacg ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac ttcgcgctga 420

taccagacgt gccgtatgtt attgccggga aaagtgtacg tatcaccgtt tgtgtgaaca 480

acgaactgaa ctggcagact atcccgccgg gaatggtgat taccgacgaa aacggcaaga 540

aaaagcagtc ttacttccat gatttcttta actatgccgg aatccatcgc agcgtaatgc 600

tctacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcaccgt ggtgacgcat gtcgcgcaag 660

actgtaacca cgcgtctgtt cccgactggc aggtggtggc caatggtgat gtcagcgttg 720

aactgcgtga tgcggatcaa caggtggttg caactggaca aggcactagc gggactttgc 780

aagtggtgaa tccgcacctc tggcaaccgg gtgaaggtta tctctatgaa ctgtgcgtca 840

cagccaaaag ccagacagag tgtgatatct acccgcttcg cgtcggcatc cggtcagtgg 900

cagtgaaggg ccaacagttc ctgattaacc acaaaccgtt ctactttact ggctttggtc 960

gtcatgaaga tgcggactta cgtggcaaag gattcgataa cgtgctgatg gtgcacgacc 1020

acgcattaat ggactggatt ggggccaact cctaccgtac ctcgcattac ccttacgctg 1080

aagagatgct cgatgtggtt aatcaggaac tgttggccct tcactgccac tgaccggatg 1140

ccgacgcgaa gcgggtagat atcacactct gtctggcttt tggctgtgac gcacagttca 1200

tagagataac cttcacccgg ttgccagagg tgcggattca ccacttgcaa agtcccgcta 1260

gtgccttgtc cagttgcaac cacctgttga tccgcatcac gcagttcaac gctgacatca 1320

ccattggcca ccacctgcca gtcaac 1346

<210> 6

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA construct encoding FAD2.1 ledRNA

<400> 6

atttaggtga cactatagaa gatctgtagc ctctcgcggt cattgtagat tgggccgtaa 60

gggtcatagt gacatgcaaa gcgatcataa tgtcggccag aaacattgaa agccaagtac 120

aaaggccagc caagagtaag ggtgatcgta agtgaaataa cccggcctgg tggattgttc 180

aagtacttgg aataccatcc gagttgtgat ttcggcttag gcacaaaaac ctcatcgcgc 240

tcgagtgagc cagtgttgga gtggtggcga cgatgactat atttccaaga gaagtagggc 300

accatcagag cagagtggag gataagcccg acagtgtcat caacccactg gtagtcacta 360

aaggcatggt ggccacattc gtgcgcaata acccaaatac cagtgcaaac acaaccctga 420

caaatccagt aaataggcca tgcaaggtag caatcctagg cactctgctc tgatggtgcc 480

ctacttctct tggaaatata gtcatcgtcg ccaccactcc aacactggct cactcgagcg 540

cgatgaggtt tttgtgccta agccgaaatc acaactcgga tggtattcca agtacttgaa 600

caatccacca ggccgggtta tttcacttac gatcaccctt actcttggct ggcctttgta 660

cttggctttc aatgtttctg gccgacatta tgatcgcttt gcatgtcact atgaccctta 720

cggcccaatc tacaatgacc gcgagaggct acagatcttc ctttctgatg ctggagttat 780

tggagctggt tatctactat atcgtattgc cttggtaaaa gggctagctt ggctcgtgtg 840

tatgtatggc gtaccactcc taatcgtgaa cggcttcctt gtcttgatca cttatttgca 900

gcacactcac ccgtcattgc ctcactacga ttcatccgaa tgggattggc taaggggagc 960

tttggcaacc gtcgacagag actatggcat tctaaacaag gtcttccaca acatcaccga 1020

tactcacgta gtccaccatc tgttctcgac catgccacac tctagagtga tgcttcatct 1080

ttctccacat agatacactc ttttgcttcc ctccacattg ccttgaaaac cggggttccg 1140

tcaaattggt agtagtctcc gagtaatggc ttgactgctt ttgttgcctc cattgcattg 1200

tagtgtggca tggtcgagaa cagatggtgg actacgtgag tatcggtgat gttgtggaag 1260

accttgttta gaatgccata gtctctgtcg acggttgcca aagctcccct tagccaatcc 1320

cattcggatg aatcgtagtg aggcaatgac gggtgagtgt gctgcaaata agtgatcaag 1380

acaaggaagc cgttcacgat taggagtggt acgccataca tacacacgag ccaagctagc 1440

ccttttacca aggcaatacg atatagtaga taaccagctc caataactcc agcatcagaa 1500

agcccgggac tc 1512

<210> 7

<211> 732

<212> DNA

<213> Aequorea victoria

<400> 7

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

agcccggatc tc 732

<210> 8

<211> 1855

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

atggtccgtc ctgtagaaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60

ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacaa 120

gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180

cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240

ggccagcgta tcgtgctgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300

aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360

tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420

cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480

ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcg taatgctcta caccacgccg 540

aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg 600

tctgttcccg actggcaggt ggtggccaat ggtgatgtca gcgttgaact gcgtgatgcg 660

gatcaacagg tggttgcaac tggacaaggc actagcggga ctttgcaagt ggtgaatccg 720

cacctctggc aaccgggtga aggttatctc tatgaactgt gcgtcacagc caaaagccag 780

acagagtgtg atatctaccc gcttcgcgtc ggcatccggt cagtggcagt gaagggccaa 840

cagttcctga ttaaccacaa accgttctac tttactggct ttggtcgtca tgaagatgcg 900

gacttacgtg gcaaaggatt cgataacgtg ctgatggtgc acgaccacgc attaatggac 960

tggattgggg ccaactccta ccgtacctcg cattaccctt acgctgaaga gatgctcgac 1020

tgggcagatg aacatggcat cgtggtgatt gatgaaactg ctgctgtcgg ctttaacctc 1080

tctttaggca ttggtttcga agcgggcaac aagccgaaag aactgtacag cgaagaggca 1140

gtcaacgggg aaactcagca agcgcactta caggcgatta aagagctgat agcgcgtgac 1200

aaaaaccacc caagcgtggt gatgtggagt attgccaacg aaccggatac ccgtccgcaa 1260

gtgcacggga atatttcgcc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccc gacgcgtccg 1320

atcacctgcg tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctcttt 1380

gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggtatgtcc aaagcggcga tttggaaacg 1440

gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500

atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560

tggagtgaag agtatcagtg tgcatggctg gatatgtatc accgcgtctt tgatcgcgtc 1620

agcgccgtcg tcggtgaaca ggtatggaat ttcgccgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680

ttgcgcgttg gcggtaacaa gaaagggatc ttcactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740

gcttttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcaggga 1800

ggcaaacaat gaatcaacaa ctctcctggc gcaccatcgt cggctacagc ctcgg 1855

<210> 9

<211> 1152

<212> DNA

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 9

atgggagctg gtggtaatat gtctcttgta accagcaaga ctggcgaaaa gaagaatcct 60

cttgaaaagg taccaacctc aaagcctcct ttcacagttg gtgatatcaa gaaggccatc 120

ccacctcact gctttcagcg gtctctcgtt cgttcgttct cctatgttgt gtatgacctt 180

ttactggtgt ccgtcttcta ctacattgcc accacttact tccacctcct cccgtcccca 240

tattgctacc ttgcatggcc tatttactgg atttgtcagg gttgtgtttg cactggtatt 300

tgggttattg cgcacgaatg tggccaccat gcctttagtg actaccagtg ggttgatgac 360

actgtcgggc ttatcctcca ctctgctctg atggtgccct acttctcttg gaaatatagt 420

catcgtcgcc accactccaa cactggctca ctcgagcgcg atgaggtttt tgtgcctaag 480

ccgaaatcac aactcggatg gtattccaag tacttgaaca atccaccagg ccgggttatt 540

tcacttacga tcacccttac tcttggctgg cctttgtact tggctttcaa tgtttctggc 600

cgacattatg atcgctttgc atgtcactat gacccttacg gcccaatcta caatgaccgc 660

gagaggctac agatcttcct ttctgatgct ggagttattg gagctggtta tctactatat 720

cgtattgcct tggtaaaagg gctagcttgg ctcgtgtgta tgtatggcgt accactccta 780

atcgtgaacg gcttccttgt cttgatcact tatttgcagc acactcaccc gtcattgcct 840

cactacgatt catccgaatg ggattggcta aggggagctt tggcaaccgt cgacagagac 900

tatggcattc taaacaaggt cttccacaac atcaccgata ctcacgtagt ccaccatctg 960

ttctcgacca tgccacacta caatgcaatg gaggcaacaa aagcagtcaa gccattactc 1020

ggagactact accaatttga cggaaccccg gttttcaagg caatgtggag ggaagcaaaa 1080

gagtgtatct atgtggagaa agatgaagca tcacaaggca aaggtgtttt ctggtacaaa 1140

aacaaattct ga 1152

<210> 10

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding hairpin RNA molecules targeting the GUS mRNA

<400> 10

cctcgaggat cctcgcgtcg gcatccggtc agtggcagtg aagggcgaac agttcctgat 60

taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggtcgtcat gaagatgcgg acttgcgtgg 120

caaaggattc gataacgtgc tgatggtgca cgaccacgca ttaatggact ggattggggc 180

caactcctac cgtacctcgc attacccttа cgaagcttgg taccc 225

<210> 11

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for the construct encoding the hairpin RNA molecule hpGUS[G:U]

<400> 11

ccctcgagtt gtgttggtat ttggttagtg gtagtgaagg gtgaatagtt tttgattaat 60

tataaattgt tttattttat tggttttggt tgttatgaag atgtggattt gtgtggtaaa 120

ggatttgata atgtgttgat ggtgtatgat tatgtattaa tggattggat tggggttaat 180

ttttattgta ttttgtatta tttttatggg tacccc 216

<210> 12

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding the hairpin RNA molecule hpGUS[1:4]

<400> 12

ccctcgagtc gggtccgcaa ccgctcactg ggagtcaagc gcgtacactt cgtgaataag 60

cactaacggt tgtacattag tgggtttcgt cctcaagaac atggggagtt gggtgccaat 120

ggaatcgtta aggtggtgaa ggtccaccac ctcgctttat tggtctgcat tcggggcaag 180

tccaacccta cgtcggattt cccataccgg tacccc 216

<210> 13

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS sense region for constructs encoding the hairpin RNA molecule hpGUS[2:10]

<400> 13

ccctcgagtc gcgtcgcgat ccggtctctg gcagtgttgg gcgaactctt cctgatatac 60

cacaaagggt tctactaaac tggcttacgt cgtcatctag atgcggtgtt gcgtgggtaa 120

ggattcctta acgtgcacat ggtgcagcac cacgcaaaaa tggactccat tggggcgtac 180

tcctacgcta cctcgctata cccttagcgg tacccc 216

<210> 14

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of nucleotides 781-1020 of the protein coding region of the GUS gene

<400> 14

gagtgtgata tctacccgct tcgcgtcggc atccggtcag tggcagtgaa gggcgaacag 60

ttcctgatta accacaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac 120

ttgcgtggca aaggattcga taacgtgctg atggtgcacg accacgcatt aatggactgg 180

attggggcca actcctaccg tacctcgcat tacccttacg ctgaagagat gctcgactgg 240

<210> 15

<211> 463

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[wt] RNA

<400> 15

ggauccucgc gucggcaucc ggucaguggc agugaagggc gaacaguucc ugauuaacca 60

caaaccguuc uacuuuacug gcuuuggucg ucaugaagau gcggacuugc guggcaaagg 120

auucgauaac gugcugaugg ugcacgacca cgcauuaaug gacuggauug gggccaacuc 180

cuaccguacc ucgcauuacc cuuacgaagc uugguacccc agcuuguugg gaagcugggu 240

ucgaaaucga uaagcuucgu aaggguaaug cgagguacgg uaggaguugg ccccaaucca 300

guccauuaau gcguggucgu gcaccaucag cacguuaucg aauccuuugc cacgcaaguc 360

cgcaucuuca ugacgaccaa agccaguaaa guagaacggu uuguggguuaa ucaggaacug 420

uucgcccuuc acugccacug accggaugcc gacgcgagga ucc 463

<210> 16

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[G:U] RNA

<400> 16

cucgaguugu guugguauuu gguuaguggu agugaagggu gaauaguuuu ugauuaauua 60

uaaauuguuu uauuuuauug guuuugguug uuaugaagau guggauuugu gugguaaagg 120

auuugauaau guguugaugg uguaugauua uguauuaaug gauuggauug ggguuaauuu 180

uuauuguauu uuguauuauu uuuaugggua ccccagcuug uugggaagcu ggguucgaaa 240

ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uuggccccaa uccaguccau 300

uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaauccu uugccacgca aguccgcauc 360

uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uuaaucagga acuguucgcc 420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 17

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[1:4] RNA

<400> 17

cucgagucgg guccgcaacc gcucacuggg agucaagcgc guacacuucg ugaauaagca 60

cuaacgguug uacauuagug gguuucgucc ucaagaacau ggggaguugg gugccaaugg 120

aaucguuaag guggugaagg uccaccaccu cgcuuuauug gucugcauuc ggggcaaguc 180

caacccuacg ucggauuucc cauaccggua ccccagcuug uugggaagcu ggguucgaaa 240

ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uuggccccaa uccaguccau 300

uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaauccu uugccacgca aguccgcauc 360

uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uuaaucagga acuguucgcc 420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 18

<211> 457

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hairpin structure (including its loop) of the hpGUS[2:10] RNA

<400> 18

cucgagucgc gucgcgaucc ggucucuggc aguguugggc gaacucuucc ugauauacca 60

caaaggguuc uacuaaacug gcuuacgucg ucaucuagau gcgguguugc gugggguaagg 120

auuccuuaac gugcacaugg ugcagcacca cgcaaaaaug gacuccauug gggcguacuc 180

cuacgcuacc ucgcuauacc cuuagcggua ccccagcuug uugggaagcu ggguucgaaa 240

ucgauaagcu ucguaagggu aaugcgaggu acgguaggag uuggccccaa uccaguccau 300

uaaugcgugg ucgugcacca ucagcacguu aucgaauccu uugccacgca aguccgcauc 360

uucaugacga ccaaagccag uaaaguagaa cgguuugugg uuaaucagga acuguucgcc 420

cuucacugcc acugaccgga ugccgacgcg aggaucc 457

<210> 19

<211> 4851

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

atctctctct ttcgatggaa ctgagctctt tctctctttc ctcttctttt ctctctctat 60

ctctatctct cgtagcttga taagagtttc tctcttttga agatccgttt ctctctctct 120

cactgagact attgttgtta ggtcaacttg cgatcatggc gatttcgaag gtctgaagct 180

gatttcgaat ggtttggaga tatccgtagt ggttaagcat atggaagtct atgttctgct 240

cttggttgct ctgttagggc ttcctccatt tggaccaact tagctgaatg ttgtatgatc 300

tctctccttg aagcagcaaa taagaagaag gtctggtcct taacttaaca tctggttact 360

agaggaaact tcagctatta ttaggtaaag aaagactgta cagagttgta taacaagtaa 420

gcgttagagt ggctttgttt gcctcggtga tagaagaacc gactgattcg ttgttgtgtg 480

ttagctttgg agggaatcag atttcgcgag ggaaggtgtt ttagatcaaa tctgtgaatt 540

ttactcaact gaggctttta gtgaaccacg actgtagagt tgaccttgaa tcctactctg 600

agtaattata ttatcagata gatttaggat ggaagctgaa attgtgaatg tgagacctca 660

gctagggttt atccagagaa tggttcctgc tctacttcct gtccttttgg tttctgtcgg 720

atatattgat cccgggaaat gggttgcaaa tatcgaagga ggtgctcgtt tcgggtatga 780

cttggtggca attactctgc ttttcaattt tgccgccatc ttatgccaat atgttgcagc 840

tcgcataagc gttgtgactg gtaaacactt ggctcagatc tgcaatgaag aatatgacaa 900

gtggacgtgc atgttcttgg gcattcaggc ggagttctca gcaattctgc tcgaccttac 960

catggttgtg ggagttgcgc atgcacttaa ccttttgttt ggggtggagt tatccactgg 1020

agtgtttttg gccgccatgg atgcgttttt atttcctgtt ttcgcctctt tccttgaaaa 1080

tggtatggca aatacagtat ccatttactc tgcaggcctg gtattacttc tctatgtatc 1140

tggcgtcttg ctgagtcagt ctgagatccc actctctatg aatggagtgt taactcggtt 1200

aaatggagag agcgcattcg cactgatggg tcttcttggc gcaagcatcg tccctcacaa 1260

tttttatatc cattcttatt ttgctgggga aagtacatct tcgtctgatg tcgacaagag 1320

cagcttgtgt caagaccatt tgttcgccat ctttggtgtc ttcagcggac tgtcacttgt 1380

aaattatgta ttgatgaatg cagcagctaa tgtgtttcac agtactggcc ttgtggtact 1440

gacttttcac gatgccttgt cactaatgga gcaggtattt atgagtccgc tcattccagt 1500

ggtctttttg atgctcttgt tcttctctag tcaaattacc gcactagctt gggctttcgg 1560

tggagaggtc gtcctgcatg acttcctgaa gatagaaata cccgcttggc ttcatcgtgc 1620

tacaatcaga attcttgcag ttgctcctgc gctttattgt gtatggacat ctggtgcaga 1680

cggaatatac cagttactta tattcaccca ggtcttggtg gcaatgatgc ttccttgctc 1740

ggtaataccg cttttccgca ttgcttcgtc gagacaaatc atgggtgtcc ataaaatccc 1800

tcaggttggc gagttcctcg cacttacaac gtttttggga tttctggggt tgaatgttgt 1860

ttttgttgtt gagatggtat ttgggagcag tgactgggct ggtggtttga gatggaatac 1920

cgtgatgggc acctcgattc agtacaccac tctgcttgta tcgtcatgtg catccttatg 1980

cctgatactc tggctggcag ccacgccgct gaaatctgcg agtaacagag cggaagctca 2040

aatatggaac atggatgctc aaaatgcttt atcttatcca tctgttcaag aagaggaaat 2100

tgaaagaaca gaaacaagga ggaacgaaga cgaatcaata gtgcggttgg aaagcagggt 2160

aaaggatcag ttggatacta cgtctgttac tagctcggtc tatgatttgc cagagaacat 2220

tctaatgacg gatcaagaaa tccgttcgag ccctccagag gaaagagagt tggatgtaaa 2280

gtactctacc tctcaagtta gtagtcttaa ggaagactct gatgtaaagg aacagtctgt 2340

attgcagtca acagtggtta atgaggtcag tgataaggat ctgattgttg aaacaaagat 2400

ggcgaaaatt gaaccaatga gtcctgtgga gaagattgtt agcatggaga ataacagcaa 2460

gtttattgaa aaggatgttg aaggggtttc atgggaaaca gaagaagcta ccaaagctgc 2520

tcctacaagc aactttactg tcggatctga tggtcctcct tcattccgca gcttaagtgg 2580

ggaaggggga agtgggactg gaagcctttc acggttgcaa ggtttgggac gtgctgcccg 2640

gagacactta tctgcgatcc ttgatgaatt ttggggacat ttatatgatt ttcatgggca 2700

attggttgct gaagccaggg caaagaaact agatcagctg tttggcactg atcaaaagtc 2760

agcctcttct atgaaagcag attcgtttgg aaaagacatt agcagtggat attgcatgtc 2820
accaactgcg aagggaatgg attcacagat gacttcaagt ttatatgatt cactgaagca 2880
gcagaggaca ccgggaagta tcgattcgtt gtatggatta caaagaggtt cgtcaccgtc 2940
accgttggtc aaccgtatgc agatgttggg tgcatatggt aacaccacta ataataataa 3000
tgcttacgaa ttgagtgaga gaagatactc tagcctgcgt gctccatcat cttcagaggg 3060
ttgggaacac caacaaccag ctacagttca cggataccag atgaagtcat atgtagacaa 3120
tttggcaaaa gaaaggcttg aagccttaca atcccgtgga gagatcccga catcgagatc 3180

tatggcgctt ggtacattga gctatacaca gcaacttgct ttagccttga aacagaagtc 3240
ccagaatggt ctaacccctg gaccagctcc tgggtttgag aattttgctg ggtctagaag 3300
catatcgcga caatctgaaa gatcttatta cggtgttcca tcttctggca atactgatac 3360
tgttggcgca gcagtagcca atgagaaaaa atatagtagc atgccagata tctcaggatt 3420
gtctatgtcc gcaaggaaca tgcatttacc aaacaacaag agtggatact gggatccgtc 3480
aagtggagga ggagggtatg gtgcgtctta tggtcggtta agcaatgaat catcgttata 3540
ttctaatttg gggtcacggg tgggagtacc ctcgacttat gatgacattt ctcaatcaag 3600

aggaggctac agagatgcct acagtttgcc acagagtgca acaacaggga ccggatcgct 3660
ttggtccaga cagcccttg agcagtttgg tgtagcggag aggaatggtg ctgttggtga 3720
ggagctcagg aatagatcga atccgatcaa tatagacaac aacgcttctt ctaatgttga 3780
tgcagaggct aagcttcttc agtcgttcag gcactgtatt ctaaagctta ttaaacttga 3840
aggatccgag tggttgtttg gacaaagcga tggagttgat gaagaactga ttgaccgggt 3900
agctgcacga gagaagttta tctatgaagc tgaagctcga gaaataaacc aggtgggtca 3960
catgggggag ccactaattt catcggttcc taactgtgga gatggttgcg tttggagagc 4020

tgatttgatt gtgagctttg gagtttggtg cattcaccgt gtccttgact tgtctctcat 4080
ggagagtcgg cctgagcttt ggggaaagta cacttacgtt ctcaaccgcc tacagggagt 4140
gattgatccg gcgttctcaa agctgcggac accaatgaca ccgtgctttt gccttcagat 4200
tccagcgagc caccagagag cgagtccgac ttcagctaac ggaatgttac ctccggctgc 4260
aaaaccggct aaaggcaaat gcacaaccgc agtcacactt cttgatctaa tcaaagacgt 4320
tgaaatggca atctcttgta gaaaaggccg aaccggtaca gctgcaggtg atgtggcttt 4380
cccaaagggg aaagagaatt tggcttcggt tttgaagcgg tataaacgtc ggttatcgaa 4440

taaaccagta ggtatgaatc aggatggacc cggttcaaga aaaaacgtga ctgcgtacgg 4500

atcattgggt tgaagaagaa gaacattgtg agaaatctca tgatcaaagt gacgtcgaga 4560

gggaagccga agaatcaaaa ctctcgcttt tgattgctcc tctgcttcgt taattgtgta 4620

ttaagaaaag aagaaaaaaa atggattttt gttgcttcag aatttttcgc tctttttttc 4680

ttaatttggt tgtaatgtta tgtttatata catatatcat catcatagga ccatagctac 4740

aaaccgaatc cggtttgtgt aattctatgc ggaatcataa agaaatcgtc ggtttgaaat 4800

gttaaatctc ctaaaccgga tctctgcacg tagctgacac atcgacgcta g 4851

<210> 20

<211> 1703

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

gttgcaaata tataaatcaa tcaaaagatt taaaacccac cattcaatct tggtaagtaa 60

cgaaaaaaaa gggaagcaag aagaaccaca gaaaaggggg ctaacaacta gacacgtaga 120

tcttcatctg cccgtccatc taacctacca cactctcatc ttctttttcc cgtgtcagtt 180

tgttatataa gctctcactc tccggtatat ttccaaatac acctaacttg tttagtacac 240

aacagcaaca tcaaactcta ataaacccaa gttggtgtat actataatgg tgatggctgg 300

tgcttcttct ttggatgaga tcagacaggc tcagagagct gatggacctg caggcatctt 360

ggctattggc actgctaacc ctgagaacca tgtgcttcag gcggagtatc ctgactacta 420

cttccgcatc accaacagtg aacacatgac cgacctcaag gagaagttca agcgcatgtg 480

cgacaagtcg acaattcgga aacgtcacat gcatctgacg gaggaattcc tcaaggaaaa 540

cccacacatg tgtgcttaca tggctccttc tctggacacc agacaggaca tcgtggtggt 600

cgaagtccct aagctaggca aagaagcggc agtgaaggcc atcaaggagt ggggccagcc 660

caagtcaaag atcactcatg tcgtcttctg cactacctcc ggcgtcgaca tgcctggtgc 720

tgactaccag ctcaccaagc ttcttggtct ccgtccttcc gtcaagcgtc tcatgatgta 780

ccagcaaggt tgcttcgccg gcggtactgt cctccgtatc gctaaggatc tcgccgagaa 840

caatcgtgga gcacgtgtcc tcgttgtctg ctctgagatc acagccgtta ccttccgtgg 900

tccctctgac acccaccttg actccctcgt cggtcaggct cttttcagtg atggcgccgc 960

cgcactcatt gtggggtcgg accctgacac atctgtcgga gagaaaccca tctttgagat 1020

ggtgtctgcc gctcagacca tccttccaga ctctgatggt gccatagacg gacatttgag 1080

ggaagttggt ctcaccttcc atctcctcaa ggatgttccc ggcctcatct ccaagaacat 1140

tgtgaagagt ctagacgaag cgtttaaacc tttggggata agtgactgga actccctctt 1200

ctggatagcc caccctggag gtccagcgat cctagaccag gtggagataa agctaggact 1260

aaaggaagag aagatgaggg cgacacgtca cgtgttgagc gagtatggaa acatgtcgag 1320

cgcgtgcgtt ctcttcatac tagacgagat gaggaggaag tcagctaagg atggtgtggc 1380

cacgacagga gaagggttgg agtggggtgt cttgtttggt ttcggaccag gtctcactgt 1440

tgagacagtc gtcttgcaca gcgttcctct ctaaacagaa cgcttgcctt ctatctgcct 1500

acctacctac gcaaaacttt aatcctgtct tatgttttat ataatataat cattatatgt 1560

ttacgcaata attaaggaag aattcatttg atgtgatatg tgatatgtgc tggacaggtc 1620

tattcgactg tttttgtact ctctttttttg tgtcttttta caatattaaa tctatgggtc 1680

ttgaatgaca tcaaatcttt gtt 1703

<210> 21

<211> 229

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

cctcgaggat cctctagacc tcagctaggg tttatccaga gaatggttcc tgctctactt 60

cctgtccttt tggtttctgt cggatatatt gatcccggga aatgggttgc aaatatcgaa 120

ggaggtgctc gtttcgggta tgacttggtg gcaattactc tgcttttcaa ttttgccgcc 180

atcttatgcc aatatgttgc agctcgcata agcgttaagc ttggtaccc 229

<210> 22

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt sense sequence of EIN2

<400> 22

cctcgagtct agattttagt tagggtttat ttagagaatg gtttttgttt tatttttttgt 60

ttttttggtt tttgttggat atattgattt tgggaaatgg gttgtaaata ttgaaggagg 120

tgtttgtttt gggtatgatt tggtggtaat tattttgttt tttaattttg ttgttatttt 180

atgttaatat gttgtagttt gtataagtgt tggtaccc 218

<210> 23

<211> 230

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

cctcgaggat ccgttgtctg ctctgagatc acagccgtta ccttccgtgg tccctctgac 60

acccaccttg actccctcgt cggtcaggct cttttcagtg atggcgccgc cgcactcatt 120

gtggggtcgg accctgacac atctgtcgga gagaaaccca tctttgagat ggtgtctgcc 180

gctcagacca tccttccaga ctctgatggt gctctagaag cttggtaccc 230

<210> 24

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt sense sequence of CHS

<400> 24

cctcgaggtt gtttgttttg agattatagt tgttattttt tgtggttttt ttgatattta 60

ttttgatttt tttgttggtt aggttttttt tagtgatggt gttgttgtat ttattgtggg 120

gttggatttt gatatatttg ttggagagaa atttatttt gagatggtgt ttgttgttta 180

gattattttt ttagattttg atggtgtcta gaggtaccc 219

<210> 25

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt antisense sequence of EIN2

<400> 25

caagcttaat gtttatgtga gttgtaatat attggtataa gatggtggta aaattgaaaa 60

gtagagtaat tgttattaag ttatatttga aatgagtatt ttttttgata tttgtaattt 120

atttttttggg attaatatat ttgatagaaa ttaaaaggat aggaagtaga gtaggaatta 180

ttttttggat aaattttagt tgaggttcta gaggatccc 219

<210> 26

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment comprising the 200nt antisense sequence of CHS

<400> 26

caagcttcta gagtattatt agagtttgga aggatggttt gagtggtaga tattatttta 60

aagatgggtt ttttttgat agatgtgtta gggtttgatt ttataatgag tgtggtggtg 120

ttattattga aaagagtttg attgatgagg gagttaaggt gggtgttaga gggattatgg 180

aaggtaatgg ttgtgatttt agagtagata atggatccc 219

<210> 27

<211> 300

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 27

agtaattata ttatcagata gatttaggat ggaagctgaa attgtgaatg tgagacctca 60

gctagggttt atccagagaa tggttcctgc tctacttcct gtccttttgg tttctgtcgg 120

atatattgat cccgggaaat gggttgcaaa tatcgaagga ggtgctcgtt tcgggtatga 180

cttggtggca attactctgc ttttcaattt tgccgccatc ttatgccaat atgttgcagc 240

tcgcataagc gttgtgactg gtaaacactt ggctcagatc tgcaatgaag aatatgacaa 300

<210> 28

<211> 300

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 28

tccgtatcgc taaggatctc gccgagaaca atcgtggagc acgtgtcctc gttgtctgct 60

ctgagatcac agccgttacc ttccgtggtc cctctgacac ccaccttgac tccctcgtcg 120

gtcaggctct tttcagtgat ggcgccgccg cactcattgt ggggtcggac cctgacacat 180

ctgtcggaga gaaacccatc tttgagatgg tgtctgccgc tcagaccatc cttccagact 240

ctgatggtgc catagacgga catttgaggg aagttggtct caccttccat ctcctcaagg 300

<210> 29

<211> 240

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

tcttcattgc agatctgagc caagtgttta ccagtcacaa cgcttatgcg agctgcaaca 60

tattggcata agatggcggc aaaattgaaa agcagagtaa ttgccaccaa gtcatacccg 120

aaacgagcac ctccttcgat atttgcaacc catttcccgg gatcaatata tccgacagaa 180

accaaaagga caggaagtag agcaggaacc attctctgga taaaccctag ctgaggtctc 240

<210> 30

<211> 300

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

gatggaaggt gagaccaact tccctcaaat gtccgtctat ggcaccatca gagtctggaa 60

ggatggtctg agcggcagac accatctcaa agatgggttt ctctccgaca gatgtgtcag 120

ggtccgaccc cacaatgagt gcggcggcgc catcactgaa aagagcctga ccgacgaggg 180

agtcaaggtg ggtgtcagag ggaccacgga aggtaacggc tgtgatctca gagcagacaa 240

cgaggacacg tgctccacga ttgttctcgg cgagatcctt agcgatacgg aggacagtac 300

<210> 31

<211> 4035

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 31

atgggatcta gggttccaat agaaaccatc gaagaagacg gcgaattcga ttgggaagca 60

gcagtcaaag aaatcgactt ggcttgtctt aaaaccacaa acgcttcttc ttcttcgtca 120

tcccatttca ctcctttggc taatccacca attacggcaa atctcactaa gccacctgcg 180

aagagacaat ctactctcga taaattcatc ggcagaaccg aacataaacc ggagaatcat 240

caagttgttt ccgagtgtgg tgttaacgat aacgataata gtcctttagt tgggattgat 300

cctgaggcag ctaaaacttg gatttatcca gtgaatggga gtgttccttt aagagattat 360

cagtttgcta taacgaagac tgctttgttt tcgaatacat tggtggcttt gcctacggga 420

cttggtaaaa cgcttatagc tgcggttgtt atgtataatt acttcagatg gtttccacaa 480

ggtaaaatag tatttgcggc gccttctagg cctcttgtga tgcagcagat tgaggcgtgt 540

cataatattg ttggaatacc acaagaatgg acgattgact tgacgggtca gacatgtcct 600

tcgaaaagag ctttttgtg gaaaagcaaa cgggttttct ttgtcactcc acaagtgtta 660

gagaaggata tacagtcagg aacatgtctt actaactact tggtttgctt ggtgatcgac 720

gaggcacatc gagctttagg gaattattct tattgtgttg tagttcgtga gttgatggcg 780

gtaccgatac agctgagaat actggctctt actgcaactc ctggatcaaa gacacaggcc 840

atccagggta tcattgataa tttgcagata tccacacttg aatatcgaaa tgagagtgac 900

catgatgttt gcccttatgt ccacgacaga aaattagaag tcatcgaggt tcccttgggt 960

caagatgcag atgatgtatc gaaacgcctg tttcatgtta tacgtccata tgcagtcagg 1020

cttaaaaact ttggggttaa tctaaataga gatatacaaa ctttaagtcc acacgaagta 1080
cttatggcaa gggataagtt tcgtcaagca cctctaccag gccttcccca tgtaaatcac 1140
ggagatgtag aatcttgctt tgcagctctt atcactcttt atcatattcg taagctcctt 1200
tctagtcatg gaataagacc agcgtatgag atgctagaag agaaattgaa agaagggcca 1260
tttgctaggt tgatgagtaa gaatgaagat attaggatga cgaagctttt gatgcagcaa 1320
aggttgtcac atggagcacc aagcccaaaa ttgtcgaaga tgttagaaat actggttgat 1380
catttcaaag tgaaagatcc gaagacatca cgggtcatta ttttctcaaa tttcagagga 1440

agcgtaagag acataatgaa cgcattaagt aatattggag atatggtcaa agcaactgag 1500
tttattggtc aaagttcagg taagacattg aaaggccagt cgcaaaaaat tcagcaggct 1560
gttttggaga aatttagagc tgggggggttc aatgttattg tcgcaacatc tattggtgaa 1620
gaaggcttgg atatcatgga agttgaccta gttatatgtt ttgatgctaa tgtatctcct 1680
ctgaggatga ttcaacggat gggaagaact ggaaggaaaa ataatggtcg agttgtagtt 1740
cttgcttgtg aaggatcaga aaagaacagc tatatgcgaa agcaagcaag tggacgggct 1800
attaaaaaac acatgcggaa tggaggaaca aatagtttta attttcatcc tagtccaagg 1860

atgattcccc atgtttataa gccagaagtt cagcatgttg agttttcaat caagcaattc 1920
gttccacgtg gaaagaaact acaagaggag tatgccactg agactccagc tttccagaaa 1980
aagcttacac ctgcagagac gcatatgctc gctaagtatt acaacaaccc cgatgaggaa 2040
aagttgagag tgtccttaat tgcgttccct cacttccaga cattgccatc caaggtgcac 2100
aaagtaatgc attcacgtca aacaggcatg ttaattgacg ctatgcagca cttgcaagag 2160
ccaacttttt cagaacagag taaaagcttc ttcactgagt ttcgagctcc tttgggtgaa 2220
agagaagagc ttgatacagg tctgagggtt actaatgatc caaaagatct acactctgtc 2280

cgtgatttgg aagtcaacac atcacagaga aaggcaaaac aagttgaatc tcccacaagc 2340
accttagaga caacagagaa ggattacgaa gaatcttcac ccacacaccg ttatcttttc 2400
agttcagaat gtgcatccgt tgatactctg gggaacgtct tcgtaatgcc agttcctctt 2460
ttattctttc ctaatgttct ggagtcagac aatacgcctc tgcctaaaac agaaaaacaa 2520
cattcttgcc ggaatacatc tcacattgac ttagttccag tagatacttc ggaaaaacat 2580
cggcaagata atatctcatg caagttaaag gaaagattct cgccagacgg tgccagcgag 2640
acactagaga ctcatagcct tgtgaaaagg aactccacca gagtaggtga agatgatgta 2700

gcgaattctg ttggagaaat tgtgttatca tcggatgaag atgactgtga gggattggag 2760

cttagtccac ggctcactaa cttcatcaag agcggcattg ttccagagtc acctgtctat 2820

gaccaagggg aagcgaacag agaagaagat cttgaatttc ctcagctttc ttcacccatg 2880

aggttcagta acgaattggc aggagagtct tctttccctg agagaaaggt tcagcataag 2940

tgcaacgatt ataacattgt gtctacaacc actgaattga gaactcctca gaaggaggta 3000

ggtttggcca acggaacaga atgcttggct gtttctccta ttcctgagga ttggagaact 3060

cccttggcga atctgacaaa cacaaacagc agcgctcgca aagattggcg ggtgagttct 3120

ggagaaaagt tagaaactct tcgacagcct cgcaagttga agagactacg tagacttgga 3180

gattgctcga gtgctgtaaa ggagaattat cctggtatta cagaggcaga ccatatcaga 3240

tctcgttctc gcggtaaaaa gcacattaga ggtaagaaga agatgatcat ggatgatgat 3300

gtccaagtct tcattgacga ggaagctgag gtctcttcgg gagcagagat gtcggctgat 3360

gagaacgaag atgtgactgg cgattcattt gaagatagtt tcatagatga cggaacaatg 3420

cctacagcaa atactcaagc cgagtctggt aaagttgaca tgatggctgt ttacaggcgt 3480

tctcttctca gccagtcacc attaccggcg agatttcgtg atttagccgc atcaagtctg 3540

agtccttatt ctgctggacc cttgacgaga ataaatgaga gcagaagcga ctcagataaa 3600

tcattgtctt ctcttcgaac accaaaaaca acaaactctg agtcaaacca agatgcaatg 3660

atgataggaa acctttcggt agtacaaatc tcgtcagata gccggaaaag gaaatttagc 3720

ttatgcaact cggcgaatgc ccccgtgatt aacttagaaa gcaagtttgc agctcatgca 3780

caagccacgg agaaggaaag ccatgaaggc gtgagaagca atgcaggtgc gttagagtac 3840

aatgatgatg atgatgatgc attctttgcg acactagact ttgatgcaat ggaagcacaa 3900

gccacattgt tattgtcgaa acagagatcc gaagcaaaag agaaagaaga cgcaacggtt 3960

atacctaatc caggcatgca gagaagtgat ggtatggaga aagatgcacc atcttttgat 4020

cttggtctgt ggtga 4035

<210> 32

<211> 2310

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 32

atgtcaaatg aaaataaaaa tataaaaact aaatttcatc ctagttcaag gatgattccc 60

catgtttata agccagaagt tcagcatgtt aagttttcga tcgagcaatt cattccacgt 120

ggaaagaagc tacaagatga gcctgccact gagactccag ctttcaagaa aaagcttaca 180

ccggaagaga tggatatgct cgccaagtat ttcaaaccca acgaggaaaa gtggagagtt 240

tccttgattg ctttccctca cttccaaaca ttgccatcca aagtgcacaa agtaatgcat 300

tcacgccaaa caagcatatt aattgatgct atgcagcatc tgcaagagac aactttgaca 360

gagcaaagta aaagtttctt cattaagtat ggagctcctt tggctgaaag agatgagctt 420

gacgcaggtc tgagggttgg tgatgatccg aaagatttac cctcttccga tgatttggat 480

gtcaacacat cacagagaaa ggcaaaacaa attttagaat ctcccacaag cacattagag 540

actacagaga aggatttcga agcatcttca cccacacact gttatctttt cagttcagaa 600

tgtgcgtccg ttgatactct ggggaaggtc tttgtattgc cggttcctct ctcattctct 660

tctaatgtac cagggtcaga ctgcgtggga agagaaaaag aactttcttc cccgaataag 720

tcccacactg acgttgttcc gatagatagt tcctcaaaac atcggcaaga taatatttca 780

tgcaagttaa agcaaggatt cttgccagat tgtgccaacg agactttgga gtcccaaagc 840

cttttgaaaa ggcactccac cgatgtaggt aaaggagata tagagaattg tgctggagaa 900

attatgatat catcggatga agaagacgac tgtgaggatt tggagcttag tccaaggctc 960

actaacttca tcaagagtgg cgttgttcca gattcacctg tctatgacca agttgcatac 1020

gaagcaaaca gagaagaaga ccttgatctt ccacacacga gtttaactaa tgaattggca 1080

gaagagccat cgacacctga gaaaaaggtt cacattgctt ctacggccaa tgaattcaga 1140

actcctcaga aggaagaaga tttagccaac gaaacagaaa gcttcgctgt ttctccaatg 1200

cctgaggagt ggagaactcc cttggcgaat atcaccaacg caagcagcag cgctagcaaa 1260

gattggcgcg tgagttcggg agaaaagtca gaaactcttc gacagcctcg caagttgaag 1320

agacttcgta gacttggaga ttgctcgagt gctgtgaagg agaataatcc tggtattgca 1380

aagacagacc atatcagatc tcgttctcgc agtgtaaaga acataagagg taaaatgatt 1440

ctgtatttcc ttttgctctg tgttcaaggc aagaagaaga tacgcgcgga taataatgct 1500

agaatcttca ttgaagcgga agctgaggtg tcttcggaat cagaaatgtc ggttgatgag 1560

aacgtagatt tgaccagcga ttcatttgaa gatagcttca tagatgacgg tacaatgcct 1620

acagcaaata ctcaagccga gtgtgctaaa gttgacatga tggccgttta caggtatata 1680

tcgaatcaaa acaagtcttt cttctactat gatttactaa gaatcataag ctatggtttc 1740

cacagacgtt ctctactcag ccaatcacca ttaccggcaa gatttcgtga tgtagctgca 1800

tcaagtccga gtccttattc ttctggtctc ttgaagacaa taaatgagag cagaagcgac 1860

tcagataaat cattgtcttc tcttagaacc ccacaaacaa cgaacaacga gtcaaacaag 1920

gatgcaatgg ccacaggaga cctttcggta gcacaaatct caacagacag ccggaaaagg 1980

aaattcagct tatgcaactc agcgaatgtc ccagtgatta acttggaaaa caagtttgaa 2040

gctcatgcac aagccacgga gaaggaaagc catgaaggtc cgagaagcaa tgcaggtgca 2100

tcacagtaca aggatgagga tgaagatgat gatgcattct acgcgacact ggactttgat 2160

gccatggaag cgcatgcgac attgctattg tcgaaacaaa ggtcagaaac gaaaacaaaa 2220

gaagatgcat cggtgaaacc tcatttgggc aatcagagga atgatggttt gccgaaggat 2280

gggccatctt ttgatcttgg tttgtggtga 2310

<210> 33

<211> 1822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-At[wt]

<400> 33

ggctcgagaa ccgaattcta atacgactca ctatagggtc aggaacatgt cttactaact 60

acttggtttg cttggtgatc gacgaggcac atcgagcttt agggaattat tcttattgtg 120

ttgtagttcg tgagttgatg gcggtaccga tacagctgag aatactggct cttactgcaa 180

ctcctggatc aaagacacag gccatccagg gtatcattga taatttgcag atatccacac 240

ttgaatatcg aaatgagagt gaccatgatg tttgccctta tgtccccgac agaaaattag 300

aagtcatcga ggttcccttg ggtcaagatg cagatgatgt atcgaaacgc ctgtttcatg 360

ttatacgtcc atatgcagtc aggcttaaaa actttggggt taatctaaat agagatatac 420

aaactttaag tccacacgaa gtacttatgg caagggataa gtttcgtcaa gcacctctac 480

caggccttcc ccatgtaaat cacggagatg tagaatcttg ctttgcagct cttatcaggt 540

aaggaaataa ttattttctt ttttcctttt agtataaaat agttaagtga tgttaattag 600

tatgattata ataatatagt tgttataatt gtgaaaaaat aatttataaa tatattgttt 660

acataaacaa catagtaatg taaaaaaata tgacaagtga tgtgtaagac gaagaagata 720

aaagttgaga gtaagtatat tatttttaat gaatttgatc gaacatgtaa gatgatatac 780

tagcattaat atttgtttta atcataatag taattctagc tggtttgatg aattaaatat 840

caatgataaa atactatagt aaaaataaga ataaataaat taaaataata ttttttttatg 900

attaatagtt tattatataa ttaaatatct ataccattac taaatatttt agtttaaaag 960

ttaataaata ttttgttaga aattccaatc tgcttgtaat ttatcaataa acaaaatatt 1020

aaataacaag ctaaagtaac aaataatatc aaactaatag aaacagtaat ctaatgtaac 1080

aaaacataat ctaatgctaa tataacaaag cgcaagatct atcattttat atagtattat 1140

tttcaatcaa cattcttatt aatttctaaa taatacttgt agttttatta acttctaaat 1200

ggattgacta ttaattaaat gaattagtcg aacatgaata aacaaggtaa catgatagat 1260

catgtcattg tgttatcatt gatcttacat ttggattgat tacagttgat aagagctgca 1320

aagcaagatt ctacatctcc gtgatttaca tggggaaggc ctggtagagg tgcttgacga 1380

aacttatccc ttgccataag tacttcgtgt ggacttaaag tttgtatatc tctatttaga 1440

ttaaccccaa agtttttaag cctgactgca tatggacgta taacatgaaa caggcgtttc 1500

gatacatcat ctgcatcttg acccaaggga acctcgatga cttctaattt tctgtcgggg 1560

acataagggc aaacatcatg gtcactctca tttcgatatt caagtgtgga tatctgcaaa 1620

ttatcaatga taccctggat ggcctgtgtc tttgatccag gagttgcagt aagagccagt 1680

attctcagct gtatcggtac cgccatcaac tcacgaacta caacacaata agaataattc 1740

cctaaagctc gatgtgcctc gtcgatcacc aagcaaacca agtagttagt aagacatgtt 1800

cctgaccccg ggatccaagc tt 1822

<210> 34

<211> 1822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-At[G:U]

<400> 34

ggctcgagaa ccgaattcta atacgactca ctatagggtt aggaatatgt tttattaatt 60

atttggtttg tttggtgatt gatgaggtat attgagtttt agggaattat ttttattgtg 120

ttgtagtttg tgagttgatg gtggtattga tatagttgag aatattggtt tttattgtaa 180

tttttggatt aaagatatag gttatttagg gtattattga taatttgtag atatttatat 240

ttgaatattg aaatgagagt gattatgatg tttgttttta tgtttttgat agaaaattag 300

aagttattga ggtttttttg ggttaagatg tagatgatgt attgaaatgt ttgttttatg 360

ttatatgttt atatgtagtt aggtttaaaa attttggggt taatttaaat agagatatat 420

aaattttaag tttatatgaa gtatttatgg taagggataa gttttgttaa gtatttttat 480

taggtttttt ttatgtaaat tatggagatg tagaattttg ttttgtagtt tttattaggt 540

aaggaaataa ttattttctt ttttccttttt agtataaaat agttaagtga tgttaattag 600

tatgattata ataatatagt tgttataatt gtgaaaaaat aatttataaa tatattgttt 660

acataaacaa catagtaatg taaaaaaata tgacaagtga tgtgtaagac gaagaagata 720

aaagttgaga gtaagtatat tatttttaat gaatttgatc gaacatgtaa gatgatatac 780

tagcattaat atttgtttta atcataatag taattctagc tggtttgatg aattaaatat 840

caatgataaa atactatagt aaaaataaga ataaataaat taaaataata ttttttttatg 900

attaatagtt tattatataa ttaaatatct ataccattac taaatatttt agtttaaaag 960

ttaataaata ttttgttaga aattccaatc tgcttgtaat ttatcaataa acaaaatatt 1020

aaataacaag ctaaagtaac aaataatatc aaactaatag aaacagtaat ctaatgtaac 1080

aaaacataat ctaatgctaa tataacaaag cgcaagatct atcattttat atagtattat 1140

tttcaatcaa cattcttatt aatttctaaa taatacttgt agttttatta acttctaaat 1200

ggattgacta ttaattaaat gaattagtcg aacatgaata aacaaggtaa catgatagat 1260

catgtcattg tgttatcatt gatcttacat ttggattgat tacagttgat aagagctgca 1320

aagcaagatt ctacatctcc gtgatttaca tggggaaggc ctggtagagg tgcttgacga 1380

aacttatccc ttgccataag tacttcgtgt ggacttaaag tttgtatatc tctatttaga 1440

ttaaccccaa agtttttaag cctgactgca tatggacgta taacatgaaa caggcgtttc 1500

gatacatcat ctgcatcttg acccaaggga acctcgatga cttctaattt tctgtcgggg 1560

acataagggc aaacatcatg gtcactctca tttcgatatt caagtgtgga tatctgcaaa 1620

ttatcaatga taccctggat ggcctgtgtc tttgatccag gagttgcagt aagagccagt 1680

attctcagct gtatcggtac cgccatcaac tcacgaacta caacacaata agaataattc 1740

cctaaagctc gatgtgcctc gtcgatcacc aagcaaacca agtagttagt aagacatgtt 1800

cctgaccccg ggatccaagc tt 1822

<210> 35

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-Bn[wt]

<400> 35

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagaaat tatgatatca tcggatgaag 60

aagacgactg tgaggatttg gagcttagtc caaggctcac taacttcatc aagagtggcg 120

ttgttccaga ttcacctgtc tatgaccaag ttgcatacga agcaaacaga gaagaagacc 180

ttgatcttcc acacacgagt ttaactaatg aattggcaga agagccatcg acacctgaga 240

aaaaggttca cattgcttct acggccaatg aattcagaac cccaacgaag gaagaagatt 300

tagccaacga aacagaaagc ttcgctgttt ctccaatgcc tgaggagtgg agaactccct 360

tggcgaatat caccaacgca agcagcagcg ctagcaaaga ttggcgcgtg agttcgggag 420

aaaagtcaga aactcttcga cagcctcgca agttgaagag acttcgtaga cttggagatt 480

gctcgagtgc tgtgaaggag aataatcctg gtattgcaaa gacagaccat atcgtaagga 540

aataattatt ttctttttc cttttagtat aaaatagtta agtgatgtta attagtatga 600

ttataataat atagttgtta taattgtgaa aaaataattt ataaatatat tgtttacata 660

aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt 720

tgagagtaag tatattattt ttaatgaatt tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca 780

ttaatatttg ttttaatcat aatagtaatt ctagctggtt tgatgaatta aatatcaatg 840

ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa taaattaaaa taatattttt ttatgattaa 900

tagtttatta tataattaaa tatctatacc attactaaat attttagttt aaaagttaat 960

aaatattttg ttagaaattc caatctgctt gtaatttatc aataaacaaa atattaaata 1020

acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact aatagaaaca gtaatctaat gtaacaaaac 1080

ataatctaat gctaatataa caaagcgcaa gatctatcat tttatatagt attattttca 1140

atcaacattc ttattaattt ctaaataata cttgtagttt tattaacttc taaatggatt 1200

gactattaat taaatgaatt agtcgaacat gaataaacaa ggtaacatga tagatcatgt 1260

cattgtgtta tcattgatct tacatttgga ttgattacag gatatggtct gtctttgcaa 1320

taccaggatt attctccttc acagcactcg agcaatctcc aagtctacga agtctcttca 1380

acttgcgagg ctgtcgaaga gtttctgact tttctcccga actcacgcgc caatctttgc 1440

tagcgctgct gcttgcgttg gtgatattcg ccaagggagt tctccactcc tcaggcattg 1500

gagaaacagc gaagctttct gtttcgttgg ctaaatcttc ttccttcgtt ggggttctga 1560

attcattggc cgtagaagca atgtgaacct ttttctcagg tgtcgatggc tcttctgcca 1620

attcattagt taaactcgtg tgtggaagat caaggtcttc ttctctgttt gcttcgtatg 1680

caacttggtc atagacaggt gaatctggaa caacgccact cttgatgaag ttagtgagcc 1740

ttggactaag ctccaaatcc tcacagtcgt cttcttcatc cgatgatatc ataatttctc 1800

tctagaaagg atcccggg 1818

<210> 36

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpFANCM-Bn[G:U]

<400> 36

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagaaat tatgatatta ttggatgaag 60

aagatgattg tgtggatttg gagtttagtt taaggtttat taattttatt aagagtggtg 120

ttgttttaga tttatttgtt tatgattaag ttgtatatga agtaaatagt gaagaagatt 180

ttgatttttt atatatgagt ttaattaatg aattggtaga agagttattg atatttgaga 240

aaaaggttta tattgttttt atggttaatg aatttagaat tttaatgaag gaagaagatt 300

tagttaatga aatagaaagt tttgttgttt ttttaatgtt tgaggagtgg agaatttttt 360

tggtgaatat tattaatgta agtagtagtg ttagtaaaga ttggtgtgtg agtttgggag 420

aaaagttaga aatttttga tagttttgta agttgaagag attttgtaga tttggagatt 480

gtttgagtgt tgtgaaggag aataattttg gtattgtaaa gatagattat attgtaagga 540

aataattatt ttctttttc cttttagtat aaaatagtta agtgatgtta attagtatga 600

ttataataat atagttgtta taattgtgaa aaaataattt ataaatatat tgtttacata 660

aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt 720

tgagagtaag tatattattt ttaatgaatt tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca 780

ttaatatttg ttttaatcat aatagtaatt ctagctggtt tgatgaatta aatatcaatg 840

ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa taaattaaaa taatattttt ttatgattaa 900

tagtttatta tataattaaa tatctatacc attactaaat attttagttt aaaagttaat 960

aaatattttg ttagaaattc caatctgctt gtaatttatc aataaacaaa atattaaata 1020

acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact aatagaaaca gtaatctaat gtaacaaaac 1080

ataatctaat gctaatataa caaagcgcaa gatctatcat tttatatagt attattttca 1140

atcaacattc ttattaattt ctaaataata cttgtagttt tattaacttc taaatggatt 1200

gactattaat taaatgaatt agtcgaacat gaataaacaa ggtaacatga tagatcatgt 1260

cattgtgtta tcattgatct tacatttgga ttgattacag gatatggtct gtctttgcaa 1320

taccaggatt attctccttc acagcactcg agcaatctcc aagtctacga agtctcttca 1380

acttgcgagg ctgtcgaaga gtttctgact tttctcccga actcacgcgc caatctttgc 1440

tagcgctgct gcttgcgttg gtgatattcg ccaagggagt tctccactcc tcaggcattg 1500

gagaaacagc gaagctttct gtttcgttgg ctaaatcttc ttccttcgtt ggggttctga 1560

attcattggc cgtagaagca atgtgaacct ttttctcagg tgtcgatggc tcttctgcca 1620

attcattagt taaactcgtg tgtggaagat caaggtcttc ttctctgttt gcttcgtatg 1680

caacttggtc atagacaggt gaatctggaa caacgccact cttgatgaag ttagtgagcc 1740

ttggactaag ctccaaatcc tcacagtcgt cttcttcatc cgatgatatc ataatttctc 1800

tctagaaagg atcccggg 1818

<210> 37

<211> 2274

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 37

atggttagtc tgcgctccac agaaaacact ccggcttcgg aaatggccag cgacggcaaa 60

acggagaaag atggctccgg cgactcaccc acttctgttc tcagcgatga ggaaaactgt 120

gaagagaaaa ctgctactgt tgctgtagag gaagagatac ttctagccaa gaatggagat 180

tcgtctctta tctctgaggc catggctcag gaagaagagc agcttctcaa aatccgggaa 240

gatgaagaga ttgctaaacg tgctgctggc tctggtgaag ctcctgatct gaatgatact 300

cagtttacta aacttgatga gctcttgacc caaacccagc tctactctga gtttctcctt 360

gagaaaatgg aggatatcac caaaaatggg atagaaggtg agacccaaaa ggccgagcct 420

gagcctgagc ctgagcccga gaagaaaggc cgtggacgta aaagaaaggc tgctcctcag 480

ggcgacagta tgaaggctaa gaaagctgtt gctgctatga tttcaagatc caaagaaggc 540

cgtgaatctg ccgactcaga tctgacagag gaagaaagag tcatgaaaga gcagggtgaa 600

cttgttcctc ttctgactgg cggaaagtta aagtcttatc agctcaaagg tgtcaaatgg 660

ctgatatcat tgtggcaaaa tggtttgaat ggaattttag ctgatcaaat gggtcttgga 720

aagacaattc aaaccattgg tttcctatca cacctcaaag gaaatgggtt ggatggtcca 780

tatctagtca ttgccccact ctctactctt tcaaactgga tgaatgagat cgctaggttc 840

acgccttcca ttaatgcaat catttaccat ggagataaga aagaaaggga tgagctcagg 900

aagaggcaca tgcccagaac tgttggtccg aagttcccta tagtcataac ttcttatgag 960

gttgctatga atgatgctaa aaagaatctg cggcactatc catggaaata tgttgtgatt 1020

gatgagggtc acaggttgaa aaaccacaag tgtaaactgc tgagggagct aagatacttg 1080

aatatggaga acaaacttct gctgacagga acacctctgc aaaataattt gtctgagctt 1140

tggtcactgt tgaattttat tctgcctgac atctttgcat cacatgacga atttgaatca 1200

tggtttgatt tttctggaaa gaataataat gaagcaacta aggaagaagg agaagagaaa 1260

agaagagctc aagtggttgc gaaacttcat aatatactac gacctttcat cctccggaga 1320

atgaaatgtg atgttgagct ctcacttccc cggaaaaaag agattatcat ctatgctaca 1380

atgacggacc atcagaagaa gttccaggaa catcttgtga accacacctt ggaagcacac 1440

attagagatg atactgtccg aggtcatggc ttgaagggaa agcttaacaa tcttgctatt 1500

caacttcgaa agaactgcaa ccatcctgac cttcttgtgg ggcaactaga tggctcatat 1560

ctctacccac ctttggaaga cattgtggga cagtgcggta aattccgctt attggagaga 1620

ttgcttgttc ggttatttgc caaaaatcac agagtcctta tcttctccca gtggacaaaa 1680

atactggaca ttatggatta ctacttcagt gagaaggggt ttgaggtttg ccgaatcgac 1740

ggtagtgtga aactagaaga aaggagaaga cagatccaag aattcaatga tgagaagagc 1800

aactgcagga tatttcttct cagtaccaga gccggaggac tcggaattaa tcttactgct 1860

gcagatacat gcatcctcta cgatagcgat tggaaccctc aaatggactt gcaagccatg 1920

gacagatgcc acagaattgg tcagacaaaa cctgttcatg tttacaggct tgcgacggct 1980

cagtcaatag agggccgagt tctgaaacga gcatacagta agcttaagct ggaacatgtg 2040

gttattggca aggggcagtt tcatcaagaa cgtgccaagt cttcaacacc gttagaggaa 2100

gatgacatac tggcgttgct taaggacgac gaaaatgctg aagataaact gatacaaacc 2160

gacataagcg aggaggatct tgacagggtg cttgaccgta gtgatctgat gattacctta 2220

ccgggcgaga ctcaagcaca tgaagctttt ccagtgaagg gtccgggttg ggaa 2274

<210> 38

<211> 1824

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpDDM1-Bn[wt]

<400> 38

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggagctgt tgctgctatg atttcaagat 60

ccaaagaagg ccgtgaatct gccgactcag atctgacaga ggaagaaaga gtcatgaatg 120

agcagggtga acttgttcct cttctgactg gcggaaagtt aaagtcttat cagctcaaag 180

gtgtcaaatg gctgatatca ttgtggcaaa atggtttgaa tggaatttta gctgatcaaa 240

tgggtcttgg aaagacaatt caaaccattg gtttcctatc accccaacaa ggaaatgggt 300

tggatggtcc atatctagtc attgccccac tctctactct ttcaaaagcg attggaaccc 360

tcaaatggac ttgcaagcca tggacagatg ccacagaatt ggtcagacaa aacctgttca 420

tgtttacagg cttgcgacgg ctcagtcaat agagggccga gttctgaaac gagcatacag 480

taagcttaag ctggaacatg tggttattgg caaggggcag tttcatcaag aacgtggtaa 540

ggaaataatt attttctttt ttccttttag tataaaatag ttaagtgatg ttaattagta 600

tgattataat aatatagttg ttataattgt gaaaaaataa tttataaata tattgtttac 660

ataaacaaca tagtaatgta aaaaaatatg acaagtgatg tgtaagacga agaagataaa 720

agttgagagt aagtatatta tttttaatga atttgatcga acatgtaaga tgatatacta 780

gcattaatat ttgttttaat cataatagta attctagctg gtttgatgaa ttaaatatca 840

atgataaaat actatagtaa aaataagaat aaataaatta aaataatatt tttttatgat 900

taatagttta ttatataatt aaatatctat accattacta aatattttag tttaaaagtt 960

aataaatatt ttgttagaaa ttccaatctg cttgtaattt atcaataaac aaaatattaa 1020

ataacaagct aaagtaacaa ataatatcaa actaatagaa acagtaatct aatgtaacaa 1080

aacataatct aatgctaata taacaaagcg caagatctat cattttatat agtattattt 1140

tcaatcaaca ttcttattaa tttctaaata atacttgtag ttttattaac ttctaaatgg 1200

attgactatt aattaaatga attagtcgaa catgaataaa caaggtaaca tgatagatca 1260

tgtcattgtg ttatcattga tcttacattt ggattgatta cagtcacgtt cttgatgaaa 1320

ctgccccttg ccaataacca catgttccag cttaagctta ctgtatgctc gtttcagaac 1380

tcggccctct attgactgag ccgtcgcaag cctgtaaaca tgaacaggtt ttgtctgacc 1440

aattctgtgg catctgtcca tggcttgcaa gtccatttga gggttccaat cgcttttgaa 1500

agagtagaga gtggggcaat gactagatat ggaccatcca acccatttcc ttgttggggt 1560

gataggaaac caatggtttg aattgtcttt ccaagaccca tttgatcagc taaaattcca 1620

ttcaaaccat tttgccacaa tgatatcagc catttgacac ctttgagctg ataagacttt 1680

aactttccgc cagtcagaag aggaacaagt tcaccctgct ctttcatgac tctttcttcc 1740

tctgtcagat ctgagtcggc agattcacgg ccttctttgg atcttgaaat catagcagca 1800

acagcttcta gaaaggatcc cggg 1824

<210> 39

<211> 1823

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpDDM1-Bn[G:U]

<400> 39

ggatccttgg tacctaatac gactcactat agggttgttg ttgttatgat tttaagattt 60

aaagaaggtt gtgaatttgt tgatttagat ttgatagagg aagaaagagt tatgaatgag 120

tagggtgaat ttgtttttt tttgattggt ggaaagttaa agttttatta gtttaaaggt 180

gttaaatggt tgatattatt gtggtaaaat ggtttgaatg gaattttagt tgattaaatg 240

ggttttggaa agataattta aattattggt tttttattat attttaaagg aaatgggttg 300

gatggtttat atttagttat tgttttattt tttatttttt taaaagtgat tggaattttt 360

aaatggattt gtaagttatg gatagatgtt atagaattgg ttagataaaa tttgtttatg 420

tttataggtt tgtgatggtt tagttaatag agggttgagt tttgaaatga gtatatagta 480

agtttaagtt ggaatatgtg gttattggta aggggtagtt ttattaagaa tgtgtggtaa 540

ggaaataatt attttctttt ttccttttag tataaaatag ttaagtgatg ttaattagta 600

tgattataat aatatagttg ttataattgt gaaaaaataa tttataaata tattgtttac 660
ataaacaaca tagtaatgta aaaaaatatg acaagtgatg tgtaagacga agaagataaa 720
agttgagagt aagtatatta tttttaatga atttgatcga acatgtaaga tgatatacta 780
gcattaatat ttgttttaat cataatagta attctagctg gtttgatgaa ttaaatatca 840
atgataaaat actatagtaa aaataagaat aaataaatta aaataatatt tttttatgat 900
taatagttta ttatataatt aaatatctat accattacta aatattttag tttaaaagtt 960
aataaatatt ttgttagaaa ttccaatctg cttgtaattt atcaataaac aaaatattaa 1020

ataacaagct aaagtaacaa ataatatcaa actaatagaa acagtaatct aatgtaacaa 1080
aacataatct aatgctaata taacaaagcg caagatctat cattttatat agtattattt 1140
tcaatcaaca ttcttattaa tttctaaata atacttgtag ttttattaac ttctaaatgg 1200
attgactatt aattaaatga attagtcgaa catgaataaa caaggtaaca tgatagatca 1260
tgtcattgtg ttatcattga tcttacattt ggattgatta cagtcacgtt cttgatgaaa 1320
ctgccccttg ccaataacca catgttccag cttaagctta ctgtatgctc gtttcagaac 1380
tcggccctct attgactgag ccgtcgcaag cctgtaaaca tgaacaggtt ttgtctgacc 1440

aattctgtgg catctgtcca tggcttgcaa gtccatttga gggttccaat cgcttttgaa 1500
agagtagaga gtggggcaat gactagatat ggaccatcca acccatttcc ttgttggggt 1560
gataggaaac caatggtttg aattgtcttt ccaagaccca tttgatcagc taaaattcca 1620
ttcaaaccat tttgccacaa tgatatcagc catttgacac ctttgagctg ataagacttt 1680
aactttccgc cagtcagaag aggaacaagt tcaccctgct ctttcatgac tctttcttcc 1740
tctgtcagat ctgagtcggc agattcacgg ccttctttgg atcttgaaat catagcagca 1800
acagttctag aaaggatccc ggg 1823

<210> 40
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFP
<400> 40
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 41

<211> 1262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEGFP[wt]

<400> 41

gctagctaat acgactcact atagggcagc agcacggggc cgtcgccgat gggggtgttc 60

tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tgttgtggcg gatcttgaag 120

ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgtcg gccatgatgt atacgttgtg gctgttgaag 180

ttgtactcca gcttgtgccc caggatgttg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc 240

tcgatgcggt tcaccagggt gtcgccctcg aacttcacct cggcgcgggt cttgtagttg 300

ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttcgggcat ggcggacttg 360

aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggctga agcactgcac gccgtaagcg 420

aaggtggtca ctagtgtggg ccagggcacg ggcagcttgc cggtggtgca gatgaacttc 480

agggtctaga ccgcgtcggc atccggtcag tggcagtgaa gggcgaacag ttcctgatta 540

gggggatgaa gctacctggt ccgaaccaca aaccgttcta ctttactggc tttggtcgtc 600

atgaagatgc ggacttgcgt ggcaaaggat tcgataacgt gctgatggtg cacgaccacg 660

cattaatgga ctttaccttt taatggggaa tgaagctacc tggtccgaac tcctaccgta 720

cctcgcatta cccttacgct gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat ggcatcgtat 780

ttaggtgaca ctatagccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 840

cccacactag tgaccacctt cgcttacggc gtgcagtgct tcagccgcta ccccgaccac 900

atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 960

atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 1020

accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 1080

gggcacaagc tggagtacaa cttcaacagc cacaacgtat acatcatggc cgacaagcag 1140

aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 1200

ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccgtcg 1260

ac 1262

<210> 42

<211> 1262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEGFP[G:U]

<400> 42

gctagctaat acgactcact atagggcagc agcacggggc cgtcgccgat gggggtgttc 60

tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tgttgtggcg gatcttgaag 120

ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgtcg gccatgatgt atacgttgtg gctgttgaag 180

ttgtactcca gcttgtgccc caggatgttg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc 240

tcgatgcggt tcaccagggt gtcgccctcg aacttcacct cggcgcgggt cttgtagttg 300

ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttcgggcat ggcggacttg 360

aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggctga agcactgcac gccgtaagcg 420

aaggtggtca ctagtgtggg ccagggcacg ggcagcttgc cggtggtgca gatgaacttc 480

agggtctaga ccgcgtcggc atccggtcag tggcagtgaa gggcgaacag ttcctgatta 540

gggggatgaa gctacctggt ccgaaccaca aaccgttcta ctttactggc tttggtcgtc 600

atgaagatgc ggacttgcgt ggcaaaggat tcgataacgt gctgatggtg cacgaccacg 660

cattaatgga ctttaccttt taatggggaa tgaagctacc tggtccgaac tcctaccgta 720

cctcgcatta cccttacgct gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat ggcatcgtat 780

ttaggtgaca ctatagcctt gaagtttatt tgtattattg gtaagttgtt tgtgttttgg 840

tttatattag tgattatttt tgtttatggt gtgtagtgtt ttagttgtta ttttgattat 900

atgaagtagt atgatttttt taagtttgtt atgtttgaag gttatgttta ggagtgtatt 960

atttttttta aggatgatgg taattataag atttgtgttg aggtgaagtt tgagggtgat 1020

attttggtga attgtattga gttgaagggt attgatttta aggaggatgg taatattttg 1080

gggtataagt tggagtataa ttttaatagt tataatgtat atattatggt tgataagtag 1140

aagaatggta ttaaggtgaa ttttaagatt tgttataata ttgaggatgg tagtgtgtag 1200

tttgttgatt attattagta gaatattttt attggtgatg gttttgtgtt gttgttgtcg 1260

ac 1262

<210> 43

<211> 1259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ledEGFP[wt]

<400> 43

gctagctaat acgactcact atagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg cgcgggtctt 60

gtagttgccg tcgtccttga agaagatggt gcgctcctgg acgtagcctt cgggcatggc 120

ggacttgaag aagtcgtgct gcttcatgtg gtcggggtag cggctgaagc actgcacgcc 180

gtaggtgaag gtggtcacga gggtgggcca gggcacgggc agcttgccgg tggtgcagat 240

gaacttcagg gtctagaccg cgtcggcatc cggtcagtgg cagtgaaggg cgaacagttc 300

ctgattaggg ggatgaagct acctggtccg aaccacaaac cgttctactt tactggcttt 360

ggtcgtcatg aagatgcgga cttgcgtggc aaaggattcg accctgaagt tcatctgcac 420

caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttcacct acggcgtgca 480

gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 540

cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 600

cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 660

cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 720

cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 780

caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg 840

cgacggcccc gtgctgctgc ctaacgtgct gatggtgcac gaccacgcat taatggactt 900

taccttttaa tggggaatga agctacctgg tccgaactcc taccgtacct cgcattaccc 960

ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtggcag cagcacgggg 1020

ccgtcgccga tgggggtgtt ctgctggtag tggtcggcga gctgcacgct gccgtcctcg 1080

atgttgtggc ggatcttgaa gttcaccttg atgccgttct tctgcttgtc ggccatgata 1140

tagacgttgt ggctgttgta gttgtactcc agcttgtgcc ccaggatgtt gccgtcctcc 1200

ttgaagtcga tgcccttcag ctcgatgcgg ttcaccattg tcgggataca ctcgtcgac 1259

<210> 44

<211> 1259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ledEGFP[G:U]

<400> 44

gctagctaat acgactcact atagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg cgcgggtctt 60

gtagttgccg tcgtccttga agaagatggt gcgctcctgg acgtagcctt cgggcatggc 120

ggacttgaag aagtcgtgct gcttcatgtg gtcggggtag cggctgaagc actgcacgcc 180

gtaggtgaag gtggtcacga gggtgggcca gggcacgggc agcttgccgg tggtgcagat 240

gaacttcagg gtctagaccg cgtcggcatc cggtcagtgg cagtgaaggg cgaacagttc 300

ctgattaggg ggatgaagct acctggtccg aaccacaaac cgttctactt tactggcttt 360

ggtcgtcatg aagatgcgga cttgcgtggc aaaggattcg attttgaagt ttatttgtat 420

tattggtaag ttgtttgtgt tttggtttat ttttgtgatt atttttattt atggtgtgta 480

gtgttttagt tgttattttg attatatgaa gtagtatgat ttttttaagt ttgttatgtt 540

tgaaggttat gtttaggagt gtattatttt ttttaaggat gatggtaatt ataagatttg 600

tgttgaggtg aagtttgagg gtgatatttt ggtgaattgt attgagttga agggtattga 660

ttttaaggag gatggtaata ttttggggta taagttggag tataattata atagttataa 720

tgtttatatt atggttgata agtagaagaa tggtattaag gtgaatttta agatttgtta 780

taatattgag gatggtagtg tgtagtttgt tgattattat tagtagaata tttttattgg 840

tgatggtttt gtgttgttgt ttaacgtgct gatggtgcac gaccacgcat taatggactt 900

tacctttaa tggggaatga agctacctgg tccgaactcc taccgtacct cgcattaccc 960

ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtggcag cagcacgggg 1020

ccgtcgccga tgggggtgtt ctgctggtag tggtcggcga gctgcacgct gccgtcctcg 1080

atgttgtggc ggatcttgaa gttcaccttg atgccgttct tctgcttgtc ggccatgata 1140

tagacgttgt ggctgttgta gttgtactcc agcttgtgcc ccaggatgtt gccgtcctcc 1200

ttgaagtcga tgcccttcag ctcgatgcgg ttcaccattg tcgggataca ctcgtcgac 1259

<210> 45

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[G:U]

<400> 45

ttgtgttggt atttggttag tggtagtgaa gggtgaatag tttttgatta attataaatt 60

gttttatttt attggttttg gttgttatga agatgtggat ttgtgtggta aaggatttga 120

taatgtgttg atggtgtatg attatgtatt aatggattgg attggggtta atttttattg 180

tattttgtat tatttttatg 200

<210> 46

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[1:4]

<400> 46

tcgggtccgc aaccgctcac tgggagtcaa gcgcgtacac ttcgtgaata agcactaacg 60

gttgtacatt agtgggtttc gtcctcaaga acatggggag ttgggtgcca atggaatcgt 120

taaggtggtg aaggtccacc acctcgcttt attggtctgc attcggggca agtccaaccc 180

tacgtcggat ttcccatacc 200

<210> 47

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpGUS[2:10]

<400> 47

tcgcgtcgcg atccggtctc tggcagtgtt gggcgaactc ttcctgatat accacaaagg 60

gttctactaa actggcttac gtcgtcatct agatgcggtg ttgcgtgggt aaggattcct 120

taacgtgcac atggtgcagc accacgcaaa aatggactcc attggggcgt actcctacgc 180

tacctcgcta tacccttagc 200

<210> 48

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEIN2[G:U]

<400> 48

gattttagtt agggtttatt tagagaatgg tttttgtttt atttttgtt tttttggttt 60

ttgttggata tattgatttt gggaaatggg ttgtaaatat tgaaggaggt gtttgttttg 120

ggtatgattt ggtggtaatt attttgtttt ttaattttgt tgttatttta tgttaatatg 180

ttgtagtttg tataagtgtt 200

<210> 49

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpCHS[G:U]

<400> 49

gttgtttgtt ttgagattat agttgttatt ttttgtggtt tttttgatat ttatttttgat 60

tttttttgttg gttaggtttt ttttagtgat ggtgttgttg tatttattgt ggggttggat 120

tttgatatat ttgttggaga gaaatttatt tttgagatgg tgtttgttgt ttagattatt 180

tttttagatt ttgatggtgt 200

<210> 50

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpEIN2[G:U/U:G]

<400> 50

aatgtttatg tgagttgtaa tatattggta taagatggtg gtaaaattga aaagtagagt 60

aattgttatt aagttatatt tgaaatgagt attttttttg atatttgtaa tttatttttt 120

gggattaata tatttgatag aaattaaaag gataggaagt agagtaggaa ttatttttttg 180

gataaatttt agttgaggtt 200

<210> 51

<211> 199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hpCHS[G:U/U:G]

<400> 51

gtattattag agtttggaag gatggtttga gtggtagata ttattttaaa gatgggtttt 60

tttttgatag atgtgttagg gtttgatttt ataatgagtg tggtggtgtt attattgaaa 120

agagtttgat tgatgaggga gttaaggtgg gtgttagagg gattatggaa ggtaatggtt 180

gtgattttag agtagataa 199

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-WT-F

<400> 52

cctcgaggat cctcgcgtcg gcatccggtc 30

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-WT-R

<400> 53

gggtaccaag cttcgtaagg gtaatgcgag gta 33

<210> 54

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-GU-F

<400> 54

ccctcgagtt gtgttggtat ttggttagtg gtagtgaagg gtgaatagtt tttgattaat 60

tataaattgt tttattttat tggttttggt tgttatgaag atgtggattt gtgtggta 118

<210> 55

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-GU-R

<400> 55

ggggtaccca taaaaataat acaaaataca ataaaaatta accccaatcc aatccattaa 60

tacataatca tacaccatca acacattatc aaatccttta ccacacaaat ccacatct 118

<210> 56

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-4M-F

<400> 56

ccctcgagtc gggtccgcaa ccgctcactg ggagtcaagc gcgtacactt cgtgaataag 60

cactaacggt tgtacattag tgggtttcgt cctcaagaac atggggagtt gggtgcca 118

<

210> 57

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-4M-R

<400> 57

ggggtaccgg tatgggaaat ccgacgtagg gttggacttg ccccgaatgc agaccaataa 60

agcgaggtgg tggaccttca ccaccttaac gattccattg gcacccaact ccccatgt 118

<210> 58

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-10M-F

<400> 58

ccctcgagtc gcgtcgcgat ccggtctctg gcagtgttgg gcgaactctt cctgatatac 60

cacaaagggt tctactaaac tggcttacgt cgtcatctag atgcggtgtt gcgtgggt 118

<

210> 59

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GUS-10M-R

<400> 59

ggggtaccgc taagggtata gcgaggtagc gtaggagtac gccccaatgg agtccatttt 60

tgcgtggtgc tgcaccatgt gcacgttaag gaatccttac ccacgcaaca ccgcatct 118

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer (35S-F3)

<400> 60

tggctcctac aaatgccatc 20

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer (GUSwt-R2)

<220><221> R

<222> (3)..(4)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (9)..(9)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (13)..(13)

<223> A or G

<400> 61

carraactrt tcrcccttca c 21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer (GUSgu-R2)

<400> 62

caaaaactat tcacccttca c 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (GUS4m-R2)

<220><221> R

<222> (4)..(4)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (7)..(7)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (9)..(9)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (13)..(13)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (15)..(15)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (19)..(19)

<223> A or G

<400> 63

cacraartrt acrcrcttra c 21

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer (35S-F2)

<400> 64

gaggatctaa cagaactcgc 20

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (35S-R1)

<400> 65

ctctccaaat gaaatgaact tcc 23

<210> 66

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIN2wt-F

<400> 66

cctcgaggat cctctagacc tcagctaggg tttatc 36

<210> 67

<211

> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIN2wt-R

<400> 67

gggtaccaag cttaacgctt atgcgagctg caa 33

<210> 68

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHSwt-F

<400> 68

cctcgaggat ccgttgtctg ctctgagatc ac 32

<210> 69

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHSwt-R

<400> 69

gggtaccaag cttctagagc accatcagag tctggaag 38

<210> 70

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIN2gu-F

<400> 70

cctcgagtct agattttagt tagggtttat ttagagaatg gtttttgttt tatttttgt 60

ttttttggtt tttgttggat atattgattt tgggaaatgg gttgtaaata ttgaaggag 119

<210> 71

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIN2gu-R

<400> 71

gggtaccaac acttatacaa actacaacat attaacataa aataacaaca aaattaaaaa 60

acaaaataat taccaccaaa tcatacccaa aacaaacacc tccttcaata tttacaacc 119

<

210> 72

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHSgu-F

<400> 72

cctcgaggtt gtttgttttg agattatagt tgttattttt tgtggttttt ttgatattta 60

ttttgatttt tttgttggtt aggtttttt tagtgatggt gttgttgtat ttattgtgg 119

<210> 73

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHSgu-R

<400> 73

gggtacctct agacaccatc aaaatctaaa aaaataatct aaacaacaaa caccatctca 60

aaaataaatt tctctccaac aaatatatca aaatccaacc ccacaataaa tacaacaac 119

<210

> 74

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asEIN2gu-F

<400> 74

caagcttaat gtttatgtga gttgtaatat attggtataa gatggtggta aaattgaaaa 60

gtagagtaat tgttattaag ttatatttga aatgagtatt ttttttgata tttgtaattt 120

<210> 75

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asEIN2gu-R

<400> 75

gggatcctct agaacctcaa ctaaaattta tccaaaaaat aattcctact ctacttccta 60

tccttttaat ttctatcaaa tatattaatc ccaaaaaata aattacaaat atcaaaaaaa 120

<

210> 76

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asCHSgu-F

<400> 76

caagcttcta gagtattatt agagtttgga aggatggttt gagtggtaga tattatttta 60

aagatgggtt ttttttgat agatgtgtta gggtttgatt ttataatgag tgtggtggtg 120

<210> 77

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> asCHSgu-R

<400> 77

gggatccatt atctactcta aaatcacaac cattaccttc cataatccct ctaacaccca 60

ccttaactcc ctcatcaatc aaactctttt caataataac accaccacac tcattataaa 120

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHS-200-F2

<400> 78

gacatgcctg gtgctgacta 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHS-200-R2

<400> 79

ccttagcgat acggaggaca 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin2-For

<400> 80

tccctcagca cattccagca 20

<210> 81

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin2-Rev

<400> 81

gatcccattc ataaaacccc ag 22

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Top-35S-F2

<220><221> Y

<222> (8)..(8)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (11)..(11)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (14)..(14)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (17)..(17)

<223> C or T

<400> 82

agaaaatytt ygtyaayatg gtgg 24

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Top-35S-R2

<220><221> R

<222> (4)..(4)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (6)..(7)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (9)..(9)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (12)..(12)

<223> A or G

<400> 83

tcartrrara trtcacatca atcc 24

<210> 84

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Link-35S-F2

<220><221> Y

<222> (1)..(2)

<223>

C or T

<220><221> Y

<222> (5)..(5)

<223> C or T

<220><221> Y

<222> (10)..(10)

<223> C or T

<400> 84

yyatyattgy gataaaggaa agg 23

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Link-EIN2-R2

<220><221> R

<222> (6)..(6)

<223> A or G

<220><221> R

<222> (14)..(14)

<223> A or G

<400> 85

taattrccac caartcatac cc 22

<210> 86

<211> 22

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense si22

<400> 86

gcaagcugac ccugaaguuc au 22

<210> 87

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense si22

<400> 87

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 88

ttttagtata tgtgctgccg 20

<210> 89

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 89

ctcgagttcc aaaaaagctg accctgaagt tcatctctct tgaagatgaa cttcagggtc 60

agccaaacaa ggcttttctc caa 83

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 90

ttttagtata tgtgctgccg 20

<210> 91

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> reverse primer

<400> 91

ctcgagttcc aaaaaaataa gtcgcagcag tacaatctct tgaattgtac tgctgcgact 60

tatgaatacc gcttcctcct gag 83

<210> 92

<211> 88

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dsRNA molecules

<400> 92

aagugauuug ugaauggauu cgguuaaguu agugauaggu aucacgcugg ccauuacuga 60

caugaccgga uucguucgcg agucacuu 88

<210> 93

<211> 2653

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 93

agaaaaatcg aaaaatgtga cagtgcgtct tttcacttaa taccctcgtt ttgaatttgc 60

tctcggaaag cgtctgagag agtgttcggt gatttctccc gccgcttggg gttttttccg 120

ttaccggaat atccttctcc tccgatggtt agtctgcgct ccacagaaaa cactccggct 180

tcggaaatgg ccagcgacgg caaaacggag aaagatggct ccggcgactc acccacttct 240

gttctcagcg atgaggaaaa ctgtgaagag aaaactgcta ctgttgctgt agaggaagag 300

atacttctag ccaagaatgg agattcgtct cttatctctg aggccatggc tcaggaagaa 360

gagcagcttc tcaaaatccg ggaagatgaa gagattgcta aacgtgctgc tggctctggt 420

gaagctcctg atctgaatga tactcagttt actaaacttg atgagctctt gacccaaacc 480

cagctctact ctgagtttct ccttgagaaa atggaggata tcaccaaaaa tgggatagaa 540

ggtgagaccc aaaaggccga gcctgagcct gagcctgagc ccgagaagaa aggccgtgga 600

cgtaaaagaa aggctgctcc tcagggcgac agtatgaagg ctaagaaagc tgttgctgct 660

atgatttcaa gatccaaaga aggccgtgaa tctgccgact cagatctgac agaggaagaa 720

agagtcatga aagagcaggg tgaacttgtt cctcttctga ctggcggaaa gttaaagtct 780

tatcagctca aaggtgtcaa atggctgata tcattgtggc aaaatggttt gaatggaatt 840

ttagctgatc aaatgggtct tggaaagaca attcaaacca ttggtttcct atcacacctc 900

aaaggaaatg ggttggatgg tccatatcta gtcattgccc cactctctac tctttcaaac 960

tggatgaatg agatcgctag gttcacgcct tccattaatg caatcattta ccatggagat 1020

aagaaagaaa gggatgagct caggaagagg cacatgccca gaactgttgg tccgaagttc 1080

cctatagtca taacttctta tgaggttgct atgaatgatg ctaaaaagaa tctgcggcac 1140

tatccatgga aatatgttgt gattgatgag ggtcacaggt tgaaaaacca caagtgtaaa 1200

ctgctgaggg agctaagata cttgaatatg gagaacaaac ttctgctgcc aggaacacct 1260

ctgcaaaata atttgtctga gcttcggtca ctgttgaatt ttattctgcc tgacatcttt 1320

gcatcacatg acgaatttga atcatggttt gatttttctt gaaagaataa taatgaagca 1380

actaaggaag aaggagaaga gaaaagaaga gctcaagtgg ttgcgaaact tcataatata 1440

ctacgacctt tcatcctccg gagaatgaaa tgtgatgttg agctctcact tccccggaaa 1500

aaagagatta tcatctatgc tacaatgacg gaccatcaga agaagttcca ggaacatctt 1560

gtgaaccaca ccttggaagc acacattaga gatgatactg tccgaggtca tggcttgaag 1620

ggaaagctta acaatcttgc tattcaactt cgaaagaact gcaaccatcc tgaccttctt 1680

gtggggcaac tagatggctc atatctctac ccacctttgg aagacattgt gggacagtgc 1740

ggtaaattcc gcttattgga gagattgctt gttcggttat ttgccaaaaa tcacagagtc 1800

cttatcttct cccagtggac aaaaatactg gacattatgg attactactt cagtgagaag 1860

gggtttgagg tttgccgaat cgacggtagt gtgaaactag aagaaaggag aagacagatc 1920

caagaattca atgatgagaa gagcaactgc aggatatttc ttctcagtac cagagccgga 1980

ggactcggaa ttaatcttac tgctgcagat acatgcatcc tctacgatag cgattggaac 2040

cctcaaatgg acttgcaagc catggacaga tgccacagaa ttggtcagac aaaacctgtt 2100

catgtttaca ggcttgcgac ggctcagtca atagagggcc gagttctgaa acgagcatac 2160

agtaagctta agctggaaca tgtggttatt ggcaaggggc agtttcatca agaacgtgcc 2220

aagtcttcaa caccgttaga ggaagatgac atactggcgt tgcttaagga cgacgaaaat 2280

gctgaagata aactgataca aaccgacata agcgaggagg atcttgacag ggtgcttgac 2340

cgtagtgatc tgatgattac cttaccgggc gagactcaag cacatgaagc ttttccagtg 2400

aagggtccgg gttgggaagt ggtctcgtct agctcagctg gagggatgct gtcttccctc 2460

aacagttaga accactcttt gcaaaaccac ttcggtgtgt tttttttcc ggaacataac 2520

cggttacttt tgcctgctac tcggaagttt taacttgaaa ccttggaaac atctgatgaa 2580

aacaattgcg gatattatgt tattagacta tttatttatg ccttttgaaa tttggcagta 2640

atttttagt taa 2653

<210> 94

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting a DDM1 gene of B. napus

<400> 94

gggagctgtt gctgctatga tttcaagatc caaagaaggc cgtgaatctg ccgactcaga 60

tctgacagag gaagaaagag tcatgaatga gcagggtgaa cttgttcctc ttctgactgg 120

cggaaagtta aagtcttatc agctcaaagg tgtcaaatgg ctgatatcat tgtggcaaaa 180

tggtttgaat ggaattttag ctgatcaaat gggtcttgga aagacaattc aaaccattgg 240

tttcctatca ccccaacaag gaaatgggtt ggatggtcca tatctagtca ttgccccact 300

ctctactctt tcaaaagcga ttggaaccct caaatggact tgcaagccat ggacagatgc 360

cacagaattg gtcagacaaa acctgttcat gtttacaggc ttgcgacggc tcagtcaata 420

gagggccgag ttctgaaacg agcatacagt aagcttaagc tggaacatgt ggttattggc 480

aaggggcagt ttcatcaaga acgtggtaag gaaataatta ttttcttttt tccttttagt 540

ataaaatagt taagtgatgt taattagtat gattataata atatagttgt tataattgtg 600

aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 660

caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 720

tttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 780

ttctagctgg tttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 840

aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 900

ccattactaa atattttagt ttaaaagtta ataaatattt tgttagaaat tccaatctgc 960

ttgtaattta tcaataaaca aaatattaaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 1020

ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 1080

aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 1140

tacttgtagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 1200

atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcattgtgt tatcattgat cttacatttg 1260

gattgattac agtcacgttc ttgatgaaac tgccccttgc caataaccac atgttccagc 1320

ttaagcttac tgtatgctcg tttcagaact cggccctcta ttgactgagc cgtcgcaagc 1380

ctgtaaacat gaacaggttt tgtctgacca attctgtggc atctgtccat ggcttgcaag 1440

tccatttgag ggttccaatc gcttttgaaa gagtagagag tggggcaatg actagatatg 1500

gaccatccaa cccatttcct tgttggggtg ataggaaacc aatggtttga attgtctttc 1560

caagacccat ttgatcagct aaaattccat tcaaaccatt ttgccacaat gatatcagcc 1620

atttgacacc tttgagctga taagacttta actttccgcc agtcagaaga ggaacaagtt 1680

caccctgctc tttcatgact ctttcttcct ctgtcagatc tgagtcggca gattcacggc 1740

cttctttgga tcttgaaatc atagcagcaa cag 1773

<210> 95

<211> 1773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U basepairs, targeting a DDM1 gene of B. napus

<400> 95

gggttgttgt tgttatgatt ttaagattta aagaaggttg tgaatttgtt gatttagatt 60

tgatagagga agaaagagtt atgaatgagt agggtgaatt tgtttttttt ttgattggtg 120

gaaagttaaa gttttattag tttaaaggtg ttaaatggtt gatattattg tggtaaaatg 180

gtttgaatgg aattttagtt gattaaatgg gttttggaaa gataatttaa attattggtt 240

ttttattata ttttaaagga aatgggttgg atggtttata tttagttatt gttttatttt 300

ttatttttt aaaagtgatt ggaattttta aatggatttg taagttatgg atagatgtta 360

tagaattggt tagataaaat ttgtttatgt ttataggttt gtgatggttt agttaataga 420

gggttgagtt ttgaaatgag tatatagtaa gtttaagttg gaatatgtgg ttattggtaa 480

ggggtagttt tattaagaat gtgtggtaag gaaataatta ttttcttttt tccttttagt 540

ataaaatagt taagtgatgt taattagtat gattataata atatagttgt tataattgtg 600

aaaaaataat ttataaatat attgtttaca taaacaacat agtaatgtaa aaaaatatga 660

caagtgatgt gtaagacgaa gaagataaaa gttgagagta agtatattat ttttaatgaa 720

tttgatcgaa catgtaagat gatatactag cattaatatt tgttttaatc ataatagtaa 780

ttctagctgg tttgatgaat taaatatcaa tgataaaata ctatagtaaa aataagaata 840

aataaattaa aataatattt ttttatgatt aatagtttat tatataatta aatatctata 900

ccattactaa atattttagt ttaaaagtta ataaatattt tgttagaaat tccaatctgc 960

ttgtaattta tcaataaaca aaatattaaa taacaagcta aagtaacaaa taatatcaaa 1020

ctaatagaaa cagtaatcta atgtaacaaa acataatcta atgctaatat aacaaagcgc 1080

aagatctatc attttatata gtattatttt caatcaacat tcttattaat ttctaaataa 1140

tacttgtagt tttattaact tctaaatgga ttgactatta attaaatgaa ttagtcgaac 1200

atgaataaac aaggtaacat gatagatcat gtcattgtgt tatcattgat cttacatttg 1260

gattgattac agtcacgttc ttgatgaaac tgccccttgc caataaccac atgttccagc 1320

ttaagcttac tgtatgctcg tttcagaact cggccctcta ttgactgagc cgtcgcaagc 1380

ctgtaaacat gaacaggttt tgtctgacca attctgtggc atctgtccat ggcttgcaag 1440

tccatttgag ggttccaatc gcttttgaaa gagtagagag tggggcaatg actagatatg 1500

gaccatccaa cccatttcct tgttggggtg ataggaaacc aatggtttga attgtctttc 1560

caagacccat ttgatcagct aaaattccat tcaaaccatt ttgccacaat gatatcagcc 1620

atttgacacc tttgagctga taagacttta actttccgcc agtcagaaga ggaacaagtt 1680

caccctgctc tttcatgact ctttcttcct ctgtcagatc tgagtcggca gattcacggc 1740

cttctttgga tcttgaaatc atagcagcaa cag 1773

<210> 96

<211> 1260

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a DDM1 gene

of B. napus

<400> 96

ggggtgatag gaaaccaatg gtttgaattg tctttccaag acccatttga tcagctaaaa 60

ttccattcaa accattttgc cacaatgata tcagccattt gacacctttg agctgataag 120

actttaactt tccgccagtc agaagaggaa caagttcacc ctgctctttc atgactcttt 180

cttcctctgt cagatctgag tcggcagatt cacggccttc tttggatctt gaaatcatag 240

cagcaacagc tttcttagcc ttcatactgt cgccctgagg agcagccttt cttttacgtc 300

cacggccttt cttctcgggc tcaggctcag gctcaggctc ggccttttgg gtctcacctt 360

ctatcccatt tttggtgata gctgttgctg ctatgatttc aagatccaaa gaaggccgtg 420

aatctgccga ctcagatctg acagaggaag aaagagtcat gaatgagcag ggtgaacttg 480

ttcctcttct gactggcgga aagttaaagt cttatcagct caaaggtgtc aaatggctga 540

tatcattgtg gcaaaatggt ttgaatggaa ttttagctga tcaaatgggt cttggaaaga 600

caattcaaac cattggtttc ctatcacccc aacaaggaaa tgggttggat ggtccatatc 660

tagtcattgc cccactctct actctttcaa aagcgattgg aaccctcaaa tggacttgca 720

agccatggac agatgccaca gaattggtca gacaaaacct gttcatgttt acaggcttgc 780

gacggctcag tcaatagagg gccgagttct gaaacgagca tacagtaagc ttaagctgga 840

acatgtggtt attggcaagg ggcagtttca tcaagaacgt cactacggtc aagcaccctg 900

tcaagatcct cctcgcttat gtcggtttgt atcagtttat cttcagcatt ttcgtcgtcc 960

ttaagcaacg ccagtatgtc atcttcctct aacggtgttg aagacttggc acgttcttga 1020

tgaaactgcc ccttgccaat aaccacatgt tccagcttaa gcttactgta tgctcgtttc 1080

agaactcggc cctctattga ctgagccgtc gcaagcctgt aaacatgaac aggttttgtc 1140

tgaccaattc tgtggcatct gtccatggct tgcaagtcca tttgagggtt ccaatcgctt 1200

ttgaaagagt agagagtggg gcaatgacta gatatggacc atccaaccca tttccttgtt 1260

<210> 97

<211> 4421

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 97

tcttccaaaa tttgcccgcc attctctgtg tctcttcgtc taagggtttc ttccaaagaa 60

cgacgacaaa accactgaac ctaaaatccg aaatccaaaa gattcatgcg aaaaaatcgt 120

taaagagtac caatttcaga aagttacatt cttacagaga acaagtaatt ccccagaaat 180

gggatctagg gttccaatag aaaccatcga agaagacggc gaattcgatt gggaagcagc 240

agtcaaagaa atcgacttgg cttgtcttaa aaccacaaac gcttcttctt cttcgtcatc 300

ccatttcact cctttggcta atccaccaat tacggcaaat ctcactaagc cacctgcgaa 360

gagacaatct actctcgata aattcatcgg cagaaccgaa cataaaccgg agaatcatca 420

agttgtttcc gagtgtggtg ttaacgataa cgataatagt cctttagttg ggattgatcc 480

tgaggcagct aaaacttgga tttatccagt gaatgggagt gttcctttaa gagattatca 540

gtttgctata acgaagactg ctttgttttc gaatacattg gtggctttgc ctacgggact 600

tggtaaaacg cttatagctg cggttgttat gtataattac ttcagatggt ttccacaagg 660

taaaatagta tttgcggcgc cttctaggcc tcttgtgatg cagcagattg aggcgtgtca 720

taatattgtt ggaataccac aagaatggac gattgacttg acgggtcaga catgtccttc 780

gaaaagagct tttttgtgga aaagcaaacg ggttttcttt gtcactccac aagtgttaga 840

gaaggatata cagtcaggaa catgtcttac taactacttg gtttgcttgg tgatcgacga 900

ggcacatcga gctttaggga attattctta ttgtgttgta gttcgtgagt tgatggcggt 960

accgatacag ctgagaatac tggctcttac tgcaactcct ggatcaaaga cacaggccat 1020

ccagggtatc attgataatt tgcagatatc cacacttgaa tatcgaaatg agagtgacca 1080

tgatgtttgc ccttatgtcc acgacagaaa attagaagtc atcgaggttc ccttgggtca 1140

agatgcagat gatgtatcga aacgcctgtt tcatgttata cgtccatatg cagtcaggct 1200

taaaaacttt ggggttaatc taaatagaga tatacaaact ttaagtccac acgaagtact 1260

tatggcaagg gataagtttc gtcaagcacc tctaccaggc cttccccatg taaatcacgg 1320

agatgtagaa tcttgctttg cagctcttat cactctttat catattcgta agctcctttc 1380

tagtcatgga ataagaccag cgtatgagat gctagaagag aaattgaaag aagggccatt 1440

tgctaggttg atgagtaaga atgaagatat taggatgacg aagcttttga tgcagcaaag 1500

gttgtcacat ggagcaccaa gcccaaaatt gtcgaagatg ttagaaatac tggttgatca 1560

tttcaaagtg aaagatccga agacatcacg ggtcattatt ttctcaaatt tcagaggaag 1620

cgtaagagac ataatgaacg cattaagtaa tattggagat atggtcaaag caactgagtt 1680

tattggtcaa agttcaggta agacattgaa aggccagtcg caaaaaattc agcaggctgt 1740

tttggagaaa tttagagctg gggggttcaa tgttattgtc gcaacatcta ttggtgaaga 1800

aggcttggat atcatggaag ttgacctagt tatatgtttt gatgctaatg tatctcctct 1860

gaggatgatt caacggatgg gaagaactgg aaggaaaaat aatggtcgag ttgtagttct 1920

tgcttgtgaa ggatcagaaa agaacagcta tatgcgaaag caagcaagtg gacgggctat 1980

taaaaaacac atgcggaatg gaggaacaaa tagttttaat tttcatccta gtccaaggat 2040

gattccccat gtttataagc cagaagttca gcatgttgag ttttcaatca agcaattcgt 2100

tccacgtgga aagaaactac aagaggagta tgccactgag actccagctt tccagaaaaa 2160

gcttacacct gcagagacgc atatgctcgc taagtattac aacaaccccg atgaggaaaa 2220

gttgagagtg tccttaattg cgttccctca cttccagaca ttgccatcca aggtgcacaa 2280

agtaatgcat tcacgtcaaa caggcatgtt aattgacgct atgcagcact tgcaagagcc 2340

aacttttca gaacagagta aaagcttctt cactgagttt cgagctcctt tgggtgaaag 2400

agaagagctt gatacaggtc tgagggttac taatgatcca aaagatctac actctgtccg 2460

tgatttggaa gtcaacacat cacagagaaa ggcaaaacaa gttgaatctc ccacaagcac 2520

cttagagaca acagagaagg attacgaaga atcttcaccc acacaccgtt atcttttcag 2580

ttcagaatgt gcatccgttg atactctggg gaacgtcttc gtaatgccag ttcctctttt 2640

attctttcct aatgttctgg agtcagacaa tacgcctctg cctaaaacag aaaaacaaca 2700

ttcttgccgg aatacatctc acattgactt agttccagta gatacttcgg aaaaacatcg 2760

gcaagataat atctcatgca agttaaagga aagattctcg ccagacggtg ccagcgagac 2820

actagagact catagccttg tgaaaaggaa ctccaccaga gtaggtgaag atgatgtagc 2880

gaattctgtt ggagaaattg tgttatcatc ggatgaagat gactgtgagg gattggagct 2940

tagtccacgg ctcactaact tcatcaagag cggcattgtt ccagagtcac ctgtctatga 3000

ccaaggggaa gcgaacagag aagaagatct tgaatttcct cagctttctt cacccatgag 3060

gttcagtaac gaattggcag gagagtcttc tttccctgag agaaaggttc agcataagtg 3120

caacgattat aacattgtgt ctacaaccac tgaattgaga actcctcaga aggaggtagg 3180

tttggccaac ggaacagaat gcttggctgt ttctcctatt cctgaggatt ggagaactcc 3240

cttggcgaat ctgacaaaca caaacagcag cgctcgcaaa gattggcggg tgagttctgg 3300

agaaaagtta gaaactcttc gacagcctcg caagttgaag agactacgta gacttggaga 3360

ttgctcgagt gctgtaaagg agaattatcc tggtattaca gaggcagacc atatcagatc 3420

tcgttctcgc ggtaaaaagc acattagagg taagaagaag atgatcatgg atgatgatgt 3480

ccaagtcttc attgacgagg aagctgaggt ctcttcggga gcagagatgt cggctgatga 3540

gaacgaagat gtgactggcg attcatttga agatagtttc atagatgacg gaacaatgcc 3600

tacagcaaat actcaagccg agtctggtaa agttgacatg atggctgttt acaggcgttc 3660

tcttctcagc cagtcaccat taccggcgag atttcgtgat ttagccgcat caagtctgag 3720

tccttattct gctggaccct tgacgagaat aaatgagagc agaagcgact cagataaatc 3780

attgtcttct cttcgaacac caaaaacaac aaactctgag tcaaaccaag atgcaatgat 3840

gataggaaac ctttcggtag tacaaatctc gtcagatagc cggaaaagga aatttagctt 3900

atgcaactcg gcgaatgccc ccgtgattaa cttagaaagc aagtttgcag ctcatgcaca 3960

agccacggag aaggaaagcc atgaaggcgt gagaagcaat gcaggtgcgt tagagtacaa 4020

tgatgatgat gatgatgcat tctttgcgac actagacttt gatgcaatgg aagcacaagc 4080

cacattgtta ttgtcgaaac agagatccga agcaaaagag aaagaagacg caacggttat 4140

acctaatcca ggcatgcaga gaagtgatgg tatggagaaa gatgcaccat cttttgatct 4200

tggtctgtgg tgattcttct ttcatacgaa gatactaagt tatgtatata gattgacaaa 4260

ggagacagta gagcataggc atttggatgt atgttttgtg tattaagttt aggtatatcc 4320

tattgaagta cagtgcttaa ggcagtgcac atggttaaat caaggttaat gcctcaattc 4380

gttgaaccct ttaagtaatg acacaaatat gactacatcg g 4421

<210> 98

<211> 1771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting

a FANCM gene of A. thaliana

<400> 98

gggtcaggaa catgtcttac taactacttg gtttgcttgg tgatcgacga ggcacatcga 60

gctttaggga attattctta ttgtgttgta gttcgtgagt tgatggcggt accgatacag 120

ctgagaatac tggctcttac tgcaactcct ggatcaaaga cacaggccat ccagggtatc 180

attgataatt tgcagatatc cacacttgaa tatcgaaatg agagtgacca tgatgtttgc 240

ccttatgtcc ccgacagaaa attagaagtc atcgaggttc ccttgggtca agatgcagat 300

gatgtatcga aacgcctgtt tcatgttata cgtccatatg cagtcaggct taaaaacttt 360

ggggttaatc taaatagaga tatacaaact ttaagtccac acgaagtact tatggcaagg 420

gataagtttc gtcaagcacc tctaccaggc cttccccatg taaatcacgg agatgtagaa 480
tcttgctttg cagctcttat caggtaagga aataattatt ttctttttc cttttagtat 540
aaaatagtta agtgatgtta attagtatga ttataataat atagttgtta taattgtgaa 600
aaaataattt ataaatatat tgtttacata aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca 660
agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt tgagagtaag tatattattt ttaatgaatt 720
tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca ttaatatttg ttttaatcat aatagtaatt 780
ctagctggtt tgatgaatta aatatcaatg ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa 840

taaattaaaa taatattttt ttatgattaa tagtttatta tataattaaa tatctatacc 900
attactaaat attttagttt aaaagttaat aaatattttg ttagaaattc caatctgctt 960
gtaatttatc aataaacaaa atattaaata acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact 1020
aatagaaaca gtaatctaat gtaacaaaac ataatctaat gctaatataa caaagcgcaa 1080
gatctatcat tttatatagt attattttca atcaacattc ttattaattt ctaaataata 1140
cttgtagttt tattaacttc taaatggatt gactattaat taaatgaatt agtcgaacat 1200
gaataaacaa ggtaacatga tagatcatgt cattgtgtta tcattgatct tacatttgga 1260

ttgattacag ttgataagag ctgcaaagca agattctaca tctccgtgat ttacatgggg 1320
aaggcctggt agaggtgctt gacgaaactt atcccttgcc ataagtactt cgtgtggact 1380
taaagtttgt atatctctat ttagattaac cccaaagttt ttaagcctga ctgcatatgg 1440
acgtataaca tgaaacaggc gtttcgatac atcatctgca tcttgaccca agggaacctc 1500
gatgacttct aattttctgt cggggacata agggcaaaca tcatggtcac tctcatttcg 1560
atattcaagt gtggatatct gcaaattatc aatgataccc tggatggcct gtgtctttga 1620
tccaggagtt gcagtaagag ccagtattct cagctgtatc ggtaccgcca tcaactcacg 1680

aactacaaca caataagaat aattccctaa agctcgatgt gcctcgtcga tcaccaagca 1740
aaccaagtag ttagtaagac atgttcctga c 1771

<210> 99

<211> 1771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U basepairs, targeting a FANCM gene of A. thaliana

<400> 99

gggttaggaa tatgttttat taattatttg gtttgtttgg tgattgatga ggtatattga 60

gttttaggga attattttta ttgtgttgta gtttgtgagt tgatggtggt attgatatag 120

ttgagaatat tggtttttat tgtaattttt ggattaaaga tataggttat ttagggtatt 180

attgataatt tgtagatatt tatatttgaa tattgaaatg agagtgatta tgatgtttgt 240

ttttatgttt ttgatagaaa attagaagtt attgaggttt ttttgggtta agatgtagat 300

gatgtattga aatgtttgtt ttatgttata tgtttatatg tagttaggtt taaaaatttt 360

ggggttaatt taaatagaga tatataaatt ttaagtttat atgaagtatt tatggtaagg 420

gataagtttt gttaagtatt tttattaggt tttttttatg taaattatgg agatgtagaa 480

ttttgttttg tagtttttat taggtaagga aataattatt ttctttttc cttttagtat 540

aaaatagtta agtgatgtta attagtatga ttataataat atagttgtta taattgtgaa 600

aaaataattt ataaatatat tgtttacata aacaacatag taatgtaaaa aaatatgaca 660

agtgatgtgt aagacgaaga agataaaagt tgagagtaag tatattattt ttaatgaatt 720

tgatcgaaca tgtaagatga tatactagca ttaatatttg ttttaatcat aatagtaatt 780

ctagctggtt tgatgaatta aatatcaatg ataaaatact atagtaaaaa taagaataaa 840

taaattaaaa taatattttt ttatgattaa tagtttatta tataattaaa tatctatacc 900

attactaaat attttagttt aaaagttaat aaatattttg ttagaaattc caatctgctt 960

gtaatttatc aataaacaaa atattaaata acaagctaaa gtaacaaata atatcaaact 1020

aatagaaaca gtaatctaat gtaacaaaac ataatctaat gctaatataa caaagcgcaa 1080

gatctatcat tttatatagt attattttca atcaacattc ttattaattt ctaaataata 1140

cttgtagttt tattaacttc taaatggatt gactattaat taaatgaatt agtcgaacat 1200

gaataaacaa ggtaacatga tagatcatgt cattgtgtta tcattgatct tacatttgga 1260

ttgattacag ttgataagag ctgcaaagca agattctaca tctccgtgat ttacatgggg 1320

aaggcctggt agaggtgctt gacgaaactt atcccttgcc ataagtactt cgtgtggact 1380

taaagtttgt atatctctat ttagattaac cccaaagttt ttaagcctga ctgcatatgg 1440

acgtataaca tgaaacaggc gtttcgatac atcatctgca tcttgaccca agggaacctc 1500

gatgacttct aattttctgt cggggacata agggcaaaca tcatggtcac tctcatttcg 1560

atattcaagt gtggatatct gcaaattatc aatgataccc tggatggcct gtgtctttga 1620

tccaggagtt gcagtaagag ccagtattct cagctgtatc ggtaccgcca tcaactcacg 1680

aactacaaca caataagaat aattccctaa agctcgatgt gcctcgtcga tcaccaagca 1740

aaccaagtag ttagtaagac atgttcctga c 1771

<210> 100

<211> 1259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a FANCM gene of A. thaliana

<400> 100

gggacataag ggcaaacatc atggtcactc tcatttcgat attcaagtgt ggatatctgc 60

aaattatcaa tgataccctg gatggcctgt gtctttgatc caggagttgc agtaagagcc 120

agtattctca gctgtatcgg taccgccatc aactcacgaa ctacaacaca ataagaataa 180

ttccctaaag ctcgatgtgc ctcgtcgatc accaagcaaa ccaagtagtt agtaagacat 240

gttcctgact gtatatcctt ctctaacact tgtggagtga caaagaaaac ccgtttgctt 300

ttccacaaaa aagctctttt cgaaggacat gtctgacccg tcaagtcaat cgtccattct 360

tgtggtattc caacaatatg tcaggaacat gtcttactaa ctacttggtt tgcttggtga 420

tcgacgaggc acatcgagct ttagggaatt attcttattg tgttgtagtt cgtgagttga 480

tggcggtacc gatacagctg agaatactgg ctcttactgc aactcctgga tcaaagacac 540

aggccatcca gggtatcatt gataatttgc agatatccac acttgaatat cgaaatgaga 600

gtgaccatga tgtttgccct tatgtccccg acagaaaatt agaagtcatc gaggttccct 660

tgggtcaaga tgcagatgat gtatcgaaac gcctgtttca tgttatacgt ccatatgcag 720

tcaggcttaa aaactttggg gttaatctaa atagagatat acaaacttta agtccacacg 780

aagtacttat ggcaagggat aagtttcgtc aagcacctct accaggcctt ccccatgtaa 840

atcacggaga tgtagaatct tgctttgcag ctcttatcat tcgtcatcct aatatcttca 900

ttcttactca tcaacctagc aaatggccct tctttcaatt tctcttctag catctcatac 960

gctggtctta ttccatgact agaaaggagc ttacgaatat gataaagagt gataagagct 1020

gcaaagcaag attctacatc tccgtgattt acatggggaa ggcctggtag aggtgcttga 1080

cgaaacttat cccttgccat aagtacttcg tgtggactta aagtttgtat atctctattt 1140

agattaaccc caaagttttt aagcctgact gcatatggac gtataacatg aaacaggcgt 1200

ttcgatacat catctgcatc ttgacccaag ggaacctcga tgacttctaa ttttctgtc 1259

<210> 101

<211> 4228

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 101

tccaaaattg gttttgcccg ccaatgtggc ttcggcgagg gtttcttcca caaaacccca 60

ctcaacctaa aatctgattc ggcgagaaac gctgtctact tatctcacgc gaaaagaaag 120

gcgtagatcc accctaaact aaaacagagc atcaagtgaa atgggacccg agtttccgat 180

cgaactcgtt gaagaagaag atggattcga ttgggaagca gcagtcagag aaatcgactt 240

ggcttgcctc aaatccttaa acccttcttc ttcttcttcg acccatttca ccaacggcaa 300

tggcactaaa cctgctaaaa gacaatctac tcttgatcga ttcatcgcaa gagccgacca 360

caagcctcct cctccgtatc ctcctgttgt ttccgacccg agtttcgagt gtggtactaa 420

cgacaacact cccagcgtcg ggattgatcc tgagacagct aaaacttgga tttatccaat 480

gaacgttcct ctaagagatt atcagtttgc tataacgaag actgctttgt tttcaaacac 540

attagttgct ttaccaacag gccttggtaa aacgctcata gctgcagttg taatgtataa 600

ttacttcaga tggtttccac aaggtaaaat tgtctttgcc gcaccttcta ggcctcttgt 660

gatgcagcag attgaggcct gccataatat cgtggggata ccacaagaat ggacgattga 720

cttgacgggt cagacttgcc cttccaaaag agcttccttg tggaaaacca aaagggtttt 780

cttcgtcact ccacaagttc ttgagaagga tatacagtca ggaacgtgtg ttaccaactg 840

cttggtttgc ttggtgatcg acgaggcaca tcgagcttta gggaattatt cttattgtgt 900

tgtagttcgt gagttgatgg cagtaccagt gcagttgaga atattggctc ttactgcaac 960

tcctggatca aagacacagg ccatacaggg tatccttgat aatttgcaga tatcaacact 1020

tgaatatcga aacgagagtg accatgatgt ctgcccttat gtccacgaca gaaaagtaga 1080

actaatcgag gttcccttgg gtaaagatgc agatgaggta tctaaacgcc tattagatgt 1140

tatacgtcca tatgctgtca ggcttaaaaa tttcggggtc attctaagca gggattatca 1200

aactttgagt ccacacgaat tacttatggc aagggataag tttcgtgaag cacctgtacc 1260

aggcattccc catataagtc acggagatgt agaatcttgc tttgcagctc ttatcacgct 1320

ttatcacatt cgcaagcttc tttctagtca tggaataagg ccagcgtatg agatgcttga 1380

agaaaaactt caggaagggc catttgctag gttgatgagt aagaatgaag atattaggat 1440

gacgaagctt ttgatgcagc aaaggttgtc gaacggagca ccaagcccga aattgtccaa 1500

gatgttggag attctagttg atcactacaa aataaaagat ccgaggacat cacgggtcat 1560

tattttctcg aatttcagag gaagcgtaag agacataatg gacgcattaa gtaatattga 1620

agatgttgtc aaagcaactg agtttattgg tcaaagttca ggtaagacac tgaagggaca 1680

gtcgcaaaaa gttcagcaag ctgttctgga gaaatttaga tctggtgggt ttaatgttat 1740

tgttgcaaca tctatcggcg aagaaggctt ggatatcatg gaagtcgact tagttatatg 1800

ttttgatgct aatgtatccc ctctgaggat gatccaacgc atgggaagaa ctggaaggaa 1860

aaataatggc cgagttgtag ttcttgcttg tgaaggatct gaaaagaata gctatatgcg 1920

aaagaaagca aatggccaag ccattaaaaa acacatgcgg aatggaggaa tgaatagttt 1980

taattttcat cctagtccaa ggatgattcc ccatgtttat aagccagaag ttcagcatgt 2040

taagttttcg atcgagcaat tcattccacg tggaaagaag ctacaagatg agcctgccac 2100

tgagactcca gctttcaaga aaaagcttac accggaagag atggatatgc tcgccaagta 2160

tttcaaaccc aacgaggaaa agtggagagt ttccttgatt gctttccctc acttccaaac 2220

attgccatcc aaagtgcaca aagtaatgca ttcacgccaa acaagcatat taattgatgc 2280

tatgcagcat ctgcaagaga caactttgac agagcaaagt aaaagtttct tcattaagta 2340

tggagctcct ttggctgaaa gagatgagct tgacgcaggt ctgagggttg gtgatgatcc 2400

gaaaggtaaa tttagtctca atgatttgga tggcaacaca tcacagagaa aggcaaaaca 2460

aattttagaa tctcccacaa gcacattaga gactacagag aaggatttcg aagcatcttc 2520

acccacacac tgttatcttt tcagttcaga atgtgcgtcc gttgatactc tggggaaggt 2580

ctttgtattg ccggttcctc tctcattctc ttctaatgta ccagggtcag actgcgtggg 2640

aagagaaaaa gaactttctt ccccgaataa gtcccacact gacgttgttc cgatagatag 2700

ttcctcaaaa catcggcaag ataatatttc atgcaagtta aagcaaggat tcttgccaga 2760

ttgtgccaac gagactttgg agtcccaaag ccttttgaaa aggcactcca ccgatgtagg 2820

taaaggagat atagagaatt gtgctggaga aattatgata tcatcggatg aagaagacga 2880

ctgtgaggat ttggagctta gtccaaggct cactaacttc atcaagagtg gcgttgttcc 2940

agattcacct gtctatgacc aaggagttgc atacgaagca aacagagaag aagaccttga 3000

tcttccaccc acgagtttaa ctaatgaatt ggcagaagag ccatcgacac ctgagaaaaa 3060

ggttcacatt gcttctacgg ccaatgaatt cagaactcct cagaaggaag aagatttagc 3120

caacgaaaca gaaagcttcg ctgtttctcc aatgcctgag gagtggagaa ctcccttggc 3180

gaatatcacc aacgcaagca gcagcgctag caaagattgg cgcgtgagtt cgggagaaaa 3240

gtcagaaact cttcgacagc ctcgcaagtt gaagagactt cgtagacttg gagattgctc 3300

gagtgctgtg aaggagaata atcctggtat tgcaaagaca gaccatatca gatctcgttc 3360

tcgcagtgta aagaacataa gaggcaagaa gaagatacgc gcggataata atgctagaat 3420

cttcattgaa gcggaagctg aggtgtcttc ggaatcagaa atgtcggttg atgagaacgt 3480

agatttgacc agcgattcat ttgaagatag cttcatagat gacggtacaa tgcctacagc 3540

aaatactcaa gccgagtgtg ctaaagttga catgatggcc gtttacagac gttctctact 3600

cagccaatca ccattaccgg caagatttcg tgatgtagct gcatcaagtc cgagtcctta 3660
ttcttctggt ctcttgaaga caataaatga gagcagaagc gactcagata aatcattgtc 3720
ttctcttaga accccacaaa caacgaacaa cgagtcaaac aaggatgcag tggccacagg 3780
agacttttg gtagcacaaa tctcaacaga cagccggaaa aggaaattca gcttatgcaa 3840
ctcagcgaat gtcccagtga ttaacttgga aaacaagttt gaagctcatg cacaagccac 3900
ggagaaggaa agccatgaag gtccgagaag caatgcaggt gcatcacagt acaaggatga 3960
ggatgaagat gatgatgcat tctacgcgac actggacttt gatgccatgg aagcgcatgc 4020

gacattgcta ttgtcgaaac aaaggtcaga aacgaaaaca aaagaagatg catcggtgaa 4080
acctcatttg ggcaatcaga ggaatgatgg tttgccgaag gatgggccat cttttgatct 4140
tggtttgtgg tgattattct cctattaagt taaagtgtat aaaggttgac atttggatgt 4200
atgttttgtg tatttagttt gtgtcata 4228

<210> 102
<211> 1769
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct targeting a FANCM gene of B. napus
<400> 102

gggagaaatt atgatatcat cggatgaaga agacgactgt gtggatttgg agcttagtcc 60

aaggctcact aacttcatca agagtggcgt tgttccagat tcacctgtct atgaccaagt 120
tgcatacgaa gcaaacagtg aagaagacct tgatcttcca cacacgagtt taactaatga 180
attggcagaa gagccatcga cacctgagaa aaaggttcac attgcttcta cggccaatga 240
attcagaacc ccaacgaagg aagaagattt agccaacgaa acagaaagct tcgctgtttc 300
tccaatgcct gaggagtgga gaactccctt ggcgaatatc accaacgcaa gcagcagcgc 360
tagcaaagat tggcgcgtga gttcgggaga aaagtcagaa actcttcgac agcctcgcaa 420
gttgaagaga cttcgtagac ttggagattg ctcgagtgct gtgaaggaga ataatcctgg 480

tattgcaaag acagaccata tcgtaaggaa ataattattt tctttttcc ttttagtata 540
aaatagttaa gtgatgttaa ttagtatgat tataataata tagttgttat aattgtgaaa 600
aaataattta taaatatatt gtttacataa acaacatagt aatgtaaaaa aatatgacaa 660
gtgatgtgta agacgaagaa gataaaagtt gagagtaagt atattatttt taatgaattt 720

gatcgaacat gtaagatgat atactagcat taatatttgt tttaatcata atagtaattc 780

tagctggttt gatgaattaa atatcaatga taaaatacta tagtaaaaat aagaataaat 840

aaattaaaat aatatttttt tatgattaat agtttattat ataattaaat atctatacca 900

ttactaaata ttttagttta aaagttaata aatattttgt tagaaattcc aatctgcttg 960

taatttatca ataaacaaaa tattaaataa caagctaaag taacaaataa tatcaaacta 1020

atagaaacag taatctaatg taacaaaaca taatctaatg ctaatataac aaagcgcaag 1080

atctatcatt ttatatagta ttattttcaa tcaacattct tattaatttc taaataatac 1140

ttgtagtttt attaacttct aaatggattg actattaatt aaatgaatta gtcgaacatg 1200

aataaacaag gtaacatgat agatcatgtc attgtgttat cattgatctt acatttggat 1260

tgattacagg atatggtctg tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga 1320

gcaatctcca agtctacgaa gtctcttcaa cttgcgaggc tgtcgaagag tttctgactt 1380

ttctcccgaa ctcacgcgcc aatctttgct agcgctgctg cttgcgttgg tgatattcgc 1440

caagggagtt ctccactcct caggcattgg agaaacagcg aagctttctg tttcgttggc 1500

taaatcttct tccttcgttg gggttctgaa ttcattggcc gtagaagcaa tgtgaacctt 1560

tttctcaggt gtcgatggct cttctgccaa ttcattagtt aaactcgtgt gtggaagatc 1620

aaggtcttct tctctgtttg cttcgtatgc aacttggtca tagacaggtg aatctggaac 1680

aacgccactc ttgatgaagt tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc 1740

ttcttcatcc gatgatatca taatttctc 1769

<210> 103

<211> 1769

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a hairpin RNAi (hpRNA) construct with G:U basepairs, targeting a FANCM gene of B. napus

<400> 103

gggagaaatt atgatattat tggatgaaga agatgattgt gtggatttgg agtttagttt 60

aaggtttatt aattttatta agagtggtgt tgttttagat ttatttgttt atgattaagt 120

tgtatatgaa gtaaatagtg aagaagattt tgatttttta tatatgagtt taattaatga 180

attggtagaa gagttattga tatttgagaa aaaggtttat attgttttta tggttaatga 240

atttagaatt ttaatgaagg aagaagattt agttaatgaa atagaaagtt ttgttgtttt 300

tttaatgttt gaggagtgga gaatttttt ggtgaatatt attaatgtaa gtagtagtgt 360

tagtaaagat tggtgtgtga gtttgggaga aaagttagaa atttttgat agttttgtaa 420

gttgaagaga ttttgtagat ttggagattg tttgagtgtt gtgaaggaga ataattttgg 480

tattgtaaag atagattata ttgtaaggaa ataattattt tctttttcc ttttagtata 540

aaatagttaa gtgatgttaa ttagtatgat tataataata tagttgttat aattgtgaaa 600

aaataattta taaatatatt gtttacataa acaacatagt aatgtaaaaa aatatgacaa 660

gtgatgtgta agacgaagaa gataaaagtt gagagtaagt atattatttt taatgaattt 720

gatcgaacat gtaagatgat atactagcat taatatttgt tttaatcata atagtaattc 780

tagctggttt gatgaattaa atatcaatga taaaatacta tagtaaaaat aagaataaat 840

aaattaaaat aatatttttt tatgattaat agtttattat ataattaaat atctatacca 900

ttactaaata ttttagttta aaagttaata aatattttgt tagaaattcc aatctgcttg 960

taatttatca ataaacaaaa tattaaataa caagctaaag taacaaataa tatcaaacta 1020

atagaaacag taatctaatg taacaaaaca taatctaatg ctaatataac aaagcgcaag 1080

atctatcatt ttatatagta ttattttcaa tcaacattct tattaatttc taaataatac 1140

ttgtagtttt attaacttct aaatggattg actattaatt aaatgaatta gtcgaacatg 1200

aataaacaag gtaacatgat agatcatgtc attgtgttat cattgatctt acatttggat 1260

tgattacagg atatggtctg tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga 1320

gcaatctcca agtctacgaa gtctcttcaa cttgcgaggc tgtcgaagag tttctgactt 1380

ttctcccgaa ctcacgcgcc aatctttgct agcgctgctg cttgcgttgg tgatattcgc 1440

caagggagtt ctccactcct caggcattgg agaaacagcg aagctttctg tttcgttggc 1500

taaatcttct tccttcgttg gggttctgaa ttcattggcc gtagaagcaa tgtgaacctt 1560

tttctcaggt gtcgatggct cttctgccaa ttcattagtt aaactcgtgt gtggaagatc 1620

aaggtcttct tctctgtttg cttcgtatgc aacttggtca tagacaggtg aatctggaac 1680

aacgccactc ttgatgaagt tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc 1740

ttcttcatcc gatgatatca taatttctc 1769

<210> 104

<211> 1259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting a FANCM gene of B. napus

<400> 104

gggttctgaa ttcattggcc gtagaagcaa tgtgaacctt tttctcaggt gtcgatggct 60

cttctgccaa ttcattagtt aaactcgtgt gtggaagatc aaggtcttct tctctgtttg 120

cttcgtatgc aacttggtca tagacaggtg aatctggaac aacgccactc ttgatgaagt 180

tagtgagcct tggactaagc tccaaatcct cacagtcgtc ttcttcatcc gatgatatca 240

taatttctcc agcacaattc tctatatctc ctttacctac atcggtggag tgccttttca 300

aaaggctttg ggactccaaa gtctcgttgg cacaatctgg caagaatcct tgctttaact 360

tgcatgaaat attatcttgg agaaattatg atatcatcgg atgaagaaga cgactgtgtg 420

gatttggagc ttagtccaag gctcactaac ttcatcaaga gtggcgttgt tccagattca 480

cctgtctatg accaagttgc atacgaagca aacagtgaag aagaccttga tcttccacac 540

acgagtttaa ctaatgaatt ggcagaagag ccatcgacac ctgagaaaaa ggttcacatt 600

gcttctacgg ccaatgaatt cagaacccca acgaaggaag aagatttagc caacgaaaca 660

gaaagcttcg ctgtttctcc aatgcctgag gagtggagaa ctcccttggc gaatatcacc 720

aacgcaagca gcagcgctag caaagattgg cgcgtgagtt cgggagaaaa gtcagaaact 780

cttcgacagc ctcgcaagtt gaagagactt cgtagacttg gagattgctc gagtgctgtg 840

aaggagaata atcctggtat tgcaaagaca gaccatatcc agcttccgct tcaatgaaga 900

ttctagcatt attatccgcg cgtatcttct tcttgccttg aacacagagc aaaaggaaat 960

acagaatcat tttacctctt atgttcttta cactgcgaga acgagatctg atatggtctg 1020

tctttgcaat accaggatta ttctccttca cagcactcga gcaatctcca agtctacgaa 1080

gtctcttcaa cttgcgaggc tgtcgaagag tttctgactt ttctcccgaa ctcacgcgcc 1140

aatctttgct agcgctgctg cttgcgttgg tgatattcgc caagggagtt ctccactcct 1200

caggcattgg agaaacagcg aagctttctg tttcgttggc taaatcttct tccttcgtt 1259

<210> 105

<211> 7074

<212> DNA

<213> Nicotiana benthamiana

<400> 105

atgcgagctg tttttgaaac aaagcgtgat cgtgaaatct tggtccttgc tagtaaagtt 60

ctgggtcacc tagctagatc tggcggtgca atgactgcag atgaagtgga acgtcagata 120

aaagttgcac taggatggct tcgtggtgaa agaattgagt atcgtttctt tgctgctgtc 180

ttaatattga aggaaatggc ggaaaatgct tcaactgttt tcaatgttca tgtgccggac 240

tttgtggagg ttgtttgggt tgctctgaag gatccaacat tggctgttcg agagaaggct 300

gttgaggcat tgcgtgcctg ccttcgcgtt attgaaaagc gcgagacacg atggcgtgtt 360

cagtggtatt ataagatgtt tgaggctacc caagatggat tgaccagaac tgcgcctgtt 420

catagtatac atggctccct tctcgcagtg ggagagctgc taaggaatac aggagagttc 480

atgatgtcaa gatacaggga ggttgcagaa attgttataa gatacttgga gcaccgagat 540

cgcctagttc ggctcagcat aacttctcta cttcctcgaa ttgctcattt cctgcgtgat 600

cgatttgtga ctaactactt aacgatatgc atgaatcata tacttcatgt ccttaaaata 660

cctgcagaac gtgccagtgg gttcattgct cttggggaga tggctggtgc tctggatggt 720

gaactcatta actatttgcc gacaataacc tctcacttgc gtgatgcgat tgctccccgt 780

agaggcaggc cctcatttga ggctctggca tgtgttggaa atattgctaa agcaatggga 840

cctgcaatgg agcctcatgt tcgtggtctc ttggatgcta tgttttctgc tgggctttcc 900

ctgacactag tggaagcctt ggagcaaata actgaaagca ttccatcttt gttgccgacc 960

attcaagatc ggcttcttga atgtatttca gcaattctct ccagatctaa tcatgcactc 1020

tcaagacaat caactgctat gagtcgagga catattgcaa cagttacccc ccaagtacca 1080

gaactgagtg gtcctgcact agttcaactt gctttgcaga ctcttgctcg ttttaatttc 1140

aagggccatg atcttcttga gtttgcaagg gagtctgttg ttgtgtattt agaagatgag 1200

gatggagcta cacgaaaaga tgctgcgcta tgttgctgca aactagtagc aaattctttc 1260

ttggcgatat cttctaccca gtttagtcct agtagaatca atcgtgccag tggaaagcga 1320

cgtcgacttg ttgaagagat tgtgcaaaaa cttctcatcg ctgctgttgc cgacgctgat 1380

gttactgttc ggcattcaat tttttcttct ctgtatgctg atggaggatt cgatgagttt 1440

ctagctcagg ctgatagttt gacagctata tttgccactt taaatgatga ggattttgaa 1500

gttcgtgact atgcaatttc actagctggt agactatctg aaaagaatcc agcatatgtt 1560

cttccagcac ttcgtcgcca tcttattcag ctgttaactt acctagagca aagtgcagat 1620

aataaatgta aagaagagag tgcaaagtta ttgggttgct tgattcgcaa ttgtgaacga 1680

ttagttcttc catacattgc tcccatacac aaggctcttg ttgcgaaact ctgtgaaggc 1740

acaggagtca atgcgaatag tggcattatt agtggagttc tagtgactgt tggagatctt 1800

gccagagtgg gtggctttgc catgcggcag tatatttcag aacttatgcc attaatcgtt 1860

gaagctctac tggatggggc agctgccacc aaacgtgaag tggccgtttc aacacttggt 1920

caagttgtac agagtacagg atatgtcata actccataca atgagtatcc tcagttgctt 1980

ggtttactct tgaaactgct caatggtgaa ctggcttggt caaccagaag agaggttttg 2040

aaggttctcg gcatcatggg tgcattagat ccccatgtgc acaagcgcaa tcagcaaagc 2100

ttacccggat cccatggtga agttacccgg gtgactggtg atcctggtca acatatcaga 2160

tcaatggatg aattgcctat ggatctttgg ccctcctttg caacatctga agattattat 2220

tccactgttg ctatcaactc actcatgcgg atactcaggg atccatctct gtcaagttac 2280

caccagaaag tggttggatc tcttatgttt attttcaagt ccatgggcct tggctgtgtc 2340

ccttatttgc ctaaggtttt gcctgatctc tttcacattg tacgaacatg tgaggatggt 2400

ctaaaagaat ttataacatg gaagcttgga accttggtat ctattgtccg ccagcacatc 2460

cgtaagtatc tgccagagtt actctctctg atatcagaaa tatggtcatc tttcagcttg 2520

cctgttgcta acagacctgt tcacattgct cctattttgc atctcgtgga gcaactttgc 2580

ttggctctca acgatgaatt tagaaagtac cttgctgata tacttccctg ctgtattcaa 2640

gttcttactg atgcagagag gtttagtgac tacacatacg ttattcctat tctccacaca 2700

cttgaagttt ttggtgggac attagatgag catatgcatc tgcttcttcc tgcacttatt 2760

cggttgttta aattggatgc ttcagtagaa gtaagacgcg gtgcaatcaa aactctcaca 2820

agattgatac ctcgtgtgca ggtcactgga cacatatctt ctcttgtgca tcacttgaag 2880

cttgtcttgg acgggaacaa agaagagctc aggaaggatg ctgttgatgc actttgttgt 2940

ctagctcatg ctcttggaga ggacttcacc atttttattc attctattca caagcttatg 3000

gttaaacata ggctgcagca caaggaattt gaagaaatcc gaggacgact ggaaaaacgt 3060

gagccactga ttttggggag caccgcagct cagagattaa atcggcggtt cccagttgag 3120

gtcatcagtg atcctttgag tgatggagag aatgagcact acgaggttgg gacggacatg 3180

cataagcagc ttaaaagcca tcaggttaat gatggtagat tgcgtaccgc tggtgaggct 3240

tctcaacgaa gcactaaaga ggattgggca gagtggatga ggcatttcag cattgaactt 3300

ctgaaagaat cacctagtcc agcattgcga acttgtgcaa gactcgctca actgcagcct 3360

tttgttgggc gagagttgtt tgctgcaggt tttgttagct gctggtcaca acttaatgag 3420

gctagtcaaa ggcagctagt acgtagtcta gaaatggcat tttcgtctcc aaatatccct 3480

cctgaaattc ttgctacact tctgaacttg gcggagttta tggaacacga tgagagaccc 3540

cttcctattg atatccgtct gcttggtgct cttgcggaga agtgtcgagc atttgcaaag 3600

gccctacact acaaggaaat ggaatttgaa ggcgcacttt caaataggag ggatgcaaat 3660

cctgttgctg tagttgaagc tctaatccat ataaataatc aattacatca acatgaggca 3720

gctgttggaa tattaacata tgctcagcag catttggggg ttcaattgaa ggagtcatgg 3780

tacgagaaat tgcaacgctg ggatgatgct cttaaagcat acactgctaa ggcgtcacaa 3840

gcttcgagtc cacatcttgc tttggatgct actttagggc gtatgcgatg ccttgctgct 3900

ctagctcggt gggaggagct taacaatctt tgtaaggaat actggacacc agctgagcca 3960

gcagctcgac tggaaatggc accaatggct gctagtgcgg cctggaacat gggtgagtgg 4020

gatcagatgg cagagtatgt ttctcggctt gatgatggtg atgaaaccaa actgcgagtc 4080

ttgggaaata ccgctgccag tggcgatgga agtagtaatg gcacctttt cagggctgtt 4140

cttctagttc ggcgagggaa gtacgatgaa gcacgtgaat atgttgaaag agcaaggaaa 4200

tgtttggcga ccgagctcgc tgcactggtt cttgagagct atgaacgtgc ttacagcaac 4260

atggtccgtg ttcagcagct ttctgaatta gaagaggtga ttgaatactg tactcttcct 4320

atgggaaacc ctgttgctga aggaagaaga gctcttgttc gcaatatgtg gaatgagcgc 4380

ataaagggta caaaaagaaa tgttgaggtt tggcaagtac ttttagctgt gagggcactt 4440

gtattgcctc ctacagaaga cattgaaaca tggatcaaat ttgcatcact ttgccggaag 4500

aatggcagaa ttagccaagc tagatctaca ttggttaaac ttttacagtt cgatccagaa 4560

tcaactcctg caactgtgcg gtatcatggt ccccctcagg tgatgctagc atacttaaag 4620

taccaatggt cacttggcga ggatcataag cgaaaggaag cctttgctag gttgcaggac 4680

cttgccatgg acctctcaag aacagcagct cttcaaccag tattgcagaa tggattagtt 4740

gcttcttctg gtgtgccact tgttgctcgt gtatatctca gactcggcac ttggaagtgg 4800

gcactttctc ctggtttgga tgatgattct attcaagaaa ttcttagtgc atttacaaat 4860

gctactcact gtgcaacgaa gtggggaaag gcatggcata cctgggcact tttcaatacc 4920

gcagtgatgt ctcattacac tctgagaggt tttgcgaata ttgcttcaca gtttgttgtt 4980

gctgccgtaa ctggttattt tcactctata gcatgcggag cacatgctaa gggtgttgat 5040

gatagtttac aggatattct tcgtcttctt actttgtggt tcaaccatgg agctacttcg 5100

gatgtccaaa tggcattgca gaaaggattc actcatgtta acatcaacac atggttggtt 5160

gttttacctc agattattgc acggatacat tcaaataacc atgctgtcag agaactgata 5220

caatccttgc tagtgcgaat tggacagagt catccacagg ctcttatgta tccgcttctt 5280

gtggcatgta agtcaattag caatttgcgc agagctgcgg ctcaagaagt ggttgataaa 5340

gttagacagc acagcggcgt actcgttgat caggcccaac ttgtctcaaa ggagcttatc 5400

agggttgcaa tactgtggca tgaaatgtgg catgaggcac tggaagaggc cagccgttta 5460

tattttggcg aacacaacat tgagggcatg ctgaaggtgt tagagcctct gcatgaaatg 5520

cttgaggaag gagcgatgag gaacaatacc actataaagg agaaagcatt catccaggca 5580

taccgtcttg agttgttgga ggcgtatgaa tgttgtatga agtatcggag aactggtaaa 5640

gatgctgaat taacgcaggc ttgggatctc tattatcatg tattcaggcg gatagataag 5700

cagcttcaaa cactcacaac cctggatttg cagtctgttt cccccgagtt actggagtgt 5760

cgaaatttgg agctagctgt tcctggaact tatatagcag atgcaccagt ggtgacaatt 5820

gcatcatttg caccccaact tgttgtaatt acatccaaac aacggcctcg aaaattgaca 5880

atccatggga gtgatggaga agactatgct tttttgctca aagggcacga agatctacgc 5940

caagatgaac gtgtcatgca gttgtttggt ctggttaata ctttgctcga gaattcaaga 6000

aagactgcag agaaagattt atcaattcaa cgatatgctg tcattccatt gtcccctaat 6060

agtggactga taggatgggt tccaaattgc gacaccttgc accagcttat tcgagaatat 6120

agggatgccc ggaagatcac cctaaatcaa gagcataaat tgatgctgag ttttgcaccg 6180

gattatgata atttgccact tattgctaag gtggaggtgt ttgaatatgc tttgcaaaat 6240

acagaaggga atgacttatc aagggttctt tggttaaaga gtcgtacttc tgaagtctgg 6300

ctggacagaa gaacaaatta tacaagaagt ttggctgtca tgagtatggt tggataccta 6360

cttggtctgg gtgatcgaca tcctagtaac ctcatgcttc accgatacag tgggaagatt 6420

ctgcatattg actttggaga ttgctttgaa gcttcaatga atcgggagaa gtttccagag 6480

aaggttccct ttcgactcac tagaatgctt gtaaaagcaa tggaggttag tggtatagag 6540

ggaaatttcc ggtcaacatg tgagaatgta atgcaagttc tccgactgca taaagatagt 6600

gttatggcta tgatggaggc ctttgttcac gatccactta taaattggcg tcttttcaac 6660

ttcaatgaag ttccgcaaat gtccgcactt gccagtgcac atgtccctcc tgttgtgaac 6720

agtgaggaat cttcttcaaa tagagagctt cttcagccac aaaggggtgc aagggagaga 6780

gaactgcttc aggcggtcaa tcaattaggt gatgccaatg aggttctaaa tgaacgtgct 6840

gtggctgtta tggctcgaat gagtaataaa ctcacaggac gtgattttgc tgctacttct 6900

acatctgcga gctctctaca acatgcactg gaccacagta cgttaatttc tggagagacg 6960

cgtgaagctg atcatggttt atcagtgaaa ctacaagtcc aaaaacttat tcaacaagcg 7020

tcgtctcatg aaaatctttg ccaaaattat gttgggtggt gtccattttg gtag 7074

<210> 106

<211> 1513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a TOR gene of N. benthamiana

<400> 106

tgaatttagg tgacactata gaacaaagaa gagctcagga aggatgctgt tgatgcactt 60

tgttgtctag ctcatgctct tggagaggac ttcaccattt ttattcattc tattcacaag 120

cttatggtta aacataggct gcagcacaag gaatttgaag aaatccgagg acgactggaa 180

aaacgtgagc cactgatttt ggggagcacc gcagctcaga gattaaatcg gcggttccca 240

gttgaggtca tcagtgatcc tttgagtgat ggagagaatg agcactacga ggttgggacg 300

gacatgcata agcagcttaa aagccatcag gttaatgatg gtagattgcg taccgctggt 360

gaggcttctc aacgaagcac taaagaggat tgggcagagt ggatgaggca tttcagcatt 420

gaacttctga aagaatcacc tagtccagca ttgcgaactt ttaagctgct tatgcatgtc 480

cgtcccaacc tcgtagtgct cattctctcc atcactcaaa ggatcactga tgacctcaac 540

tgggaaccgc cgatttaatc tctgagctgc ggtgctcccc aaaatcagtg gctcacgttt 600

ttccagtcgt cctcggattt cttcaaattc cttgtgctgc agcctatgtt taaccataag 660

cttgtgaata gaatgaataa aaatggtgaa gtcctctcca agagcatgag ctagacaaca 720

aagtgcatca acagcatcct tcctgagctc ttctttgttc ccgtccaaga caagcttcaa 780

gtgatgcaca agagaagata tgtgtccagt gacctgcaca cgaggtatca atcttgtgag 840

agttttgatt gcaccgcgtc ttacttctac tgaagcatcc aatttaaaca accgaataag 900

tgcaggaaga agcagatgca tatgctcatc taatgtccca ccaaaaactt caagtgtgtg 960

gagaatagga ataacgtatg tgtagtcact aaacctctct gcatcagtaa gaacttgaat 1020

acagcaggga agtatatcag caaggtactt tctaaattca cacatccgta agtatctgcc 1080

agagttactc tctctgatat cagaaatatg gtcatctttc agcttgcctg ttgctaacag 1140

acctgttcac attgctccta ttttgcatct cgtggagcaa ctttgcttgg ctctcaacga 1200

tgaatttaga aagtaccttg ctgatatact tccctgctgt attcaagttc ttactgatgc 1260

agagaggttt agtgactaca catacgttat tcctattctc cacacacttg aagtttttgg 1320

tgggacatta gatgagcata tgcatctgct tcttcctgca cttattcggt tgtttaaatt 1380

ggatgcttca gtagaagtaa gacgcggtgc aatcaaaact ctcacaagat tgatacctcg 1440

tgtgcaggtc actggacaca tatcttctct tgtgcatcac ttgaagcttg tcttggacgg 1500

cccgggactc gaa 1513

<210> 107

<211> 1941

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 107

atggccgcag ccacctccgc cgccgtcgca ttctcgggcg ccgccgccgc cgccgcggcc 60

ttacccaagc ccgccctcca tcctctcccg cgccaccagc ccgcctcgcg ccgcgcgctc 120

cccgcccgcg tcgtcaggtg ctgcgccgcg tcccccgccg ccaccacggc cgcgcctccc 180

cccacctctc tccggccgtg ggggccctcc gagccccgca agggcgccga catcctcgtc 240

gaggcgctcg agcgctgcgg catcgtcgac gtcttcgcct accccggcgg cgcgtccatg 300

gagatccacc aggcgctcac gcgctcgccc gtcatcacca accacctctt ccgccacgag 360

caggggggagg cgttcgcagc gtccgggtac gcacgcgcgt ccggccgcgt cggcgtctgc 420

gtcgccacct ccggccccgg ggccaccaac ctcgtctccg cgctcgccga cgctctcctc 480

gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtcccac gccgcatgat cggcacggac 540

gcgttccagg agacgcccat agtggaggtc acgcgctcca tcaccaagca caactacctg 600

gtccttgacg tggaggacat cccccgcgtc atccaggaag ccttcttcct cgcgtcctct 660

ggccgcccgg ggcctgtgct ggttgatatc cccaaggaca tccagcagca gatggccgtg 720

cctgtttggg acacgccgat gagtttgcca gggtacatcg cccgcctgcc caagccacca 780

tctactgaat cgcttgagca ggtcctgcgc ctggttggcg aggcacggcg cccgattctg 840

tatgttggtg gcggctgcgc tgcatctggc gaggagttgc gccgctttgt tgagctcact 900

ggaattccag ttacaactac tctgatgggc cttggcaact tccccagtga cgacccactg 960

tcactgcgca tgcttgggat gcatggtacc gtgtatgcaa attatgcagt agataaggct 1020

gacctgttgc ttgcatttgg tgtgcggttt gatgatcgcg tgactgggaa aattgaggct 1080

tttgcaagca ggtccaagat tgtgcacatt gacattgatc cagctgagat tggcaagaac 1140

aagcagccac atgtctccat ttgtgcagat gttaagcttg ctttacaggg gttgaatggt 1200

ctattaagtg gcagcaaagc acaacagggt ctagattttg gtccatggca caaggagttg 1260

gatcagcaga agagggagtt tcctctagga tacaagactt ttggtgaggc aatcccaccg 1320

cagtatgcta tccaggtact ggatgagctg acaaaagggg aggcgattat tgccacaggt 1380

gttgggcagc atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acgtcagtgg 1440

ctgtcttcgt ctggtttggg ggcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgcttct 1500

gtggccaacc caggtgtcac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac 1560

attcaggagt tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac 1620

aaccagcacc tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg 1680

cacacatacc ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt 1740

gctaaaggat tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacaaaga agagtgaagt cagtgcagct 1800

atcaagaaga tgcttgagac cccagggccg tacctgctgg atatcattgt cccgcatcag 1860

gagcacgtgc tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt 1920

gatggcagga cctcgtatta a 1941

<210> 108

<211> 1505

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA targeting the ALS gene of barley (H. vulgare)

<400> 108

agatttaggt gacactatag aatggtggtg cagtgggagg ataggtttta caaggccaac 60

cgggcgcaca cataccttgg caacccagaa aatgagagtg agatatatcc agattttgtg 120

acgattgcta aaggattcaa cgttccggca gttcgtgtga caaagaagag tgaagtcagt 180

gcagctatca agaagatgct tgagacccca gggccgtacc tgctggatat cattgtcccg 240

catcaggagc acgtgctgcc tatgatccca aacggtggtg ctttcaagga catgatcatg 300

gagggtgatg gcaggacctc gtattaatct gaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg 360

acatgcgcaa tcagcatgat gcctgcgtgt tgtatcaact actaggggtt cgactgtgaa 420

ccatgcgttt ttctagttta cttgtttcat tcatataaga ggtcctgcca tcaccctcca 480

tgatcatgtc cttgaaagca ccaccgtttg ggatcatagg cagcacgtgc tcctgatgcg 540

ggacaatgat atccagcagg tacggccctg gggtctcaag catcttcttg atagctgcac 600

tgacttcact cttctttgtc acacgaactg ccggaacgtt gaatccttta gcaatcgtca 660

caaaatctgg atatatctca ctctcatttt ctgggttgcc aaggtatgtg tgcgcccggt 720

tggccttgta aaacctatcc tcccactgca ccaccattcc caggtgctgg ttgttcaata 780

tcatcacctt cactgggagg ttctcaatac ggatcaacgc caactcctga atgttcatga 840

ggaaactacc atccccatca atgtcaacaa ctgtgacacc tgggttggcc acagaagcgc 900

cagctgcagc tggcaaccca aatcccattg cccccaaacc agacgaagac agccactgac 960

gtggccgctt gtaagtgtaa tactgagccg cccacatctg atgctgccca acacctgtgg 1020

caataatcgc ctccccttt gtcagctcat ccagtacctg aatggtctat taagtggcag 1080

caaagcacaa cagggtctag attttggtcc atggcacaag gagttggatc agcagaagag 1140

ggagtttcct ctaggataca agacttttgg tgaggcaatc ccaccgcagt atgctatcca 1200

ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc gattattgcc acaggtgttg ggcagcatca 1260

gatgtgggcg gctcagtatt acacttacaa gcggccacgt cagtggctgt cttcgtctgg 1320

tttgggggca atgggatttg ggttgccagc tgcagctggc gcttctgtgg ccaacccagg 1380

tgtcacagtt gttgacattg atggggatgg tagtttcctc atgaacattc aggagttggc 1440

gttgatccgt attgagaacc tcccagtgaa ggtgatgata ttgaacaacc agcacctggc 1500

ccggg 1505

<210> 109

<211> 1824

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 109

atgcagactc tgtcggcgca gcccctcgcc tcctcctctt cgatacagcg ccaccatggg 60

cgccgacgcg gccccggctc cgtccggttc gctccccgcg cggccgccgc ggctgccgcc 120

acgtccacca gcacggcccg ctcgccggcg tacgtctcgt cgccgtccac gaggaaggtg 180

cccgggtacg agcagtcgtc gccgcctgcc attgcctcgc cgcagaagca ggggagcagc 240

ggcggcgagg gcgagcagag cctcaacttc ttccagcgcg cggcggccgc ggcgctcgac 300

gcgttcgagg aggggttcat caacaatgtc ctggagcggc cccacgcgct gccgcgcacg 360

gccgacccgg ccgtgcagat cgccggcaac ttcgcccccg tcggcgagca gccccccgtg 420

cgcgccctca cggtctccgg ccgcatcccg cccttcatca acggcgtcta cgcccgcaac 480

ggcgccaacc cctgcttcga gcccacggcc ggccaccacc tcttcgacgg cgacggcatg 540

gtccacgcca tccgcatccg aaacggcgcc gccgagtcct acgcctgccg cttcaccgag 600

accgcccgcc tctcccagga gcgcgccgcg gggaggcccg tcttccctaa gaccatcggc 660

gagctccacg gccactctgg catcgcgagg ctggccctct tctacgcgcg cggcgcctgc 720

ggcctcgtcg acccgtccca cggcactggt gttgccaacg ccggcctcgt ctacttcaac 780

ggccgcctcc tcgccatgtc cgaggacgac ctcccgtacc aggtccgcgt caccgccggt 840

ggcgacctcg agaccgtcgg ccgctacgac ttcgacggcc agctcgactg cgccatgatc 900

gcgcacccca agctcgaccc tgtctccggc gagctcttcg cgctcagcta cgatgtcatc 960

aagaagccgt acctcaagta cttctacttc cacgccgacg gcaccaagtc cgccgacgtc 1020

gagatcgagc tcgaccagcc caccatgatc cacgacttcg ccatcaccga gaacttcgtc 1080

gtcgtgcccg accaccagat ggtgttcaag ctcgccgaga tgttccgcgg cggctcgccg 1140

gtgatgctcg acaaggagaa gacctcccgc ttcggcgtcc tcccaaagta cgccaaggac 1200

tcgtcggaga tgatgtgggt ggacgtgccg gactgcttct gtttccacct ctggaactcg 1260

tgggaggagc cggagacgga cgaggtggtg gtgatcggct cctgcacgac ccccgcagac 1320

tccatcttca acgacacgga cgaccacctc gagagcgtgc tcaccgagat ccggctcaac 1380

acgcgcaccg gcgagtccac gcggcgggcc atcctgccgc tggagagcca ggtgaacctc 1440

gaggtcggca tggtgaaccg caacatgctg ggccggaaga cgaggtacgc ctacctggcc 1500

gtggccgagc cgtggcccaa ggtgtccggg ttcgccaagg tggacctggt gaccggcgag 1560

ctgaccaagt tcgagtacgg cgagggccgg ttcggcggcg agccgtgctt cgtgcccatg 1620

gacggcgagc acgcgcgccc cggcgccgag gacgacggct acgtgctctc cttcgtgcgc 1680

gacgaggacg ccggcacatc cgagctcctg gtcgtcaacg ccgccgacat gcggctcgag 1740

gccaccgtgc agctgccgtc ccgggtcccc tatggcttcc acggcacatt catcggcgac 1800

gccgacctcg acgcccagca ctaa 1824

<210> 110

<211> 1779

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 110

atgcagacac tcacagcgtc cagctcggtc tcctccatac agcggcaccg gccgcacccc 60

gcgggccgcc ggtccagctc ggtcaccttc tccgcccgcg ccgtcagctc cgcgccgcgc 120

gcgccggcac cgtcccggtt cgtgcgcggc gccgacgcgg cgcccgccaa gcccctcatt 180

gccgtcccca agccgcccgc cgtggagagg caggagaaga agctcaactt cttccagcgc 240

gccgcggtca cggcgctcga cgcgttcgag gaaggatttg tggccaacgt gctcgagcgc 300

ccgcacggcc tctccaggac ggtcgacccc gcggtgcaga tcgccggcaa cttcgcgcct 360

gtcggggaga cacctcctgt gcaggcgctg cccgtgaccg accgcatccc cccgttcatc 420

aacggcgtgt acgcccgcaa cggcgccaac ccgcacttcg accccgtcgc cgggcaccac 480

ctgttcgacg gcgacggcat ggtgcacgct ctgcgcatcc gcaacggcgt cgccgagacc 540

tacgcctccc gcttcaccga gacggagcgc ctgcagcagg agcgcgcgct ggggcgcccg 600

atgttcccca aggccattgg tgagctccat ggccactctg ggatcgcgcg ccttgctctg 660

ttctacgcgc gcgcggcctg cggcctcatc gacccctcgc gcggcaccgg cgtggccaac 720

gccggcctgg tctacttcaa cggccacctc ctcgccatgt ccgaggacga catcccgtac 780

cacgtccgcg tcaccgacga cggcgacctc cagaccgtcg gccgctacga cttcgacggg 840

cagctcgagt gccccatgat cgcgcacccc aaactcgacc ccgccaccgg ggagctccac 900

gcgctcagct acgacgtcat caagaagcct tacctgaagt acttctactt cgcggccgac 960

ggcaccaagt cggccgacgt cgagatcccg ctggaccagc ccaccatgat ccacgacttc 1020

gccatcaccg agaattacgt ggtcgtgccc gaccaccagg tggtgttcaa gctgcaggag 1080

atgctgcgcg gcggctcgcc cgtggtgctc gacaaggaga agacgtcccg cttcggcgtg 1140

ctgcccaagt gcgccgccga cgcgtcggag atggtgtggg tggacgtgcc ggactgcttc 1200

tgcttccacc tctggaacgc gtgggaggag gaggagaccg acgaggtggt ggtgatcggc 1260

tcctgcatga cccccgccga ctccatcttc aacgagtcgg acgagtgcct cgagagcgtg 1320

ctcacggaga tccgcctcaa cacccgcacc ggcgagtcca cgcggcgccc catcctggcg 1380

ctgtcagagc aggtgaacct ggaggtcggc atggtgaact ccaacctgct gggccgcaag 1440

acgcggtacg cctacctggc cgtggccgag ccgtggccca aggtgtccgg cttcgccaag 1500

gtcgacctgg ccacgggcga gctcaccaaa ttcgagtacg gcgagggccg gttcggcggc 1560

gagccctgct tcgtgcccat ggacccggcc acgtcccgcg gcgaggacga cgggtacatt 1620

ctcaccttcg tgcacgacga ggccgccggc acgtcggagc tgctggtggt caatgccgcc 1680

gacatgcggc tggaggcgac catccagctg ccgtcccgcg tgccatacgg gttccacggc 1740

accttcatca ccggcaagga gctcgaatcc caggcctga 1779

<210> 111

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the NCED1 genes of barley Hordeum vulgare and wheat Triticum aestivum

<400> 111

taatacgact cactataggg tcgacgaggc cgcaggcgcc gcgcgcgtag aagagggcca 60

gcctcgcgat gccagagtgg ccgtggagct cgccgatggt cttagggaag acgggcctcc 120

ccgcggcgcg ctcctgggag aggcgggcgg tctcggtgaa gcggcaggcg taggactcgg 180

cggcgccgtt tcggatgcgg atggcgtgga ccatgccgtc gccgtcgaag aggtggtggc 240

cggccgtggg ctcgaagcag gggttggcgc cgttgcgggc gtagacgccg ttgatgaagg 300

gcgggatgcg gccggagacc gtgagggcgc gcacgggggg ctgctcgccg acgggggcga 360

agttgccggc gatctgcacg gccgggtcgg ccgtgcgcgg cagcgcgtgg ggccgctcca 420

ggacattgtt gatgaacccc tcctcgaacg cgtcgagctc cggccgcatc ccgcccttca 480

tcaacggcgt ctacgcccgc aacggcgcca acccctgctt cgagcccacg gccggccacc 540

acctcttcga cggcgacggc atggtccacg ccatccgcat ccgaaacggc gccgccgagt 600

cctacgcctg ccgcttcacc gagaccgccc gcctctccca ggagcgcgcc gcggggaggc 660

ccgtcttccc taagaccatc ggcgagctcc acggccactc tggcatcgcg aggctggccc 720

tcttctacgc gcgcggcgcc tgcggcctcg tcgacccgta ccacggcact ggtgttgcca 780

acgccggcct cgtctacttc aacggccgcc tcctcgccat gtccgaggac gacctcccgt 840

accaggtccg cgtcaccgcc ggtggcgacc tcgagaccgt cggccgctac gacttcgacg 900

gccagctcga ctgcgccatg atcgcgcacc ccaagctcga ccctgtctcc ggcgagctct 960

tcgcgctcag ctacgatgtc atcaagaagc cgtacctcaa gtacttctac ttcacgcccg 1020

acggcaccaa gtccgccgac gtcgagatcg agctcgacga agcgggaggt cttctccttg 1080

tcgagcatca ccggcgagcc gccgcggaac atctcggcga gcttgaacac catctggtgg 1140

tcgggcacga cgacgaagtt ctcggtgatg gcgaagtcgt ggatcatggt gggctggtcg 1200

agctcgatct cgacgtcggc ggacttggtg ccgtcgggcg tgaagtagaa gtacttgagg 1260

tacggcttct tgatgacatc gtagctgagc gcgaagagct cgccggagac agggtcgagc 1320

ttggggtgcg cgatcatggc gcagtcgagc tggccgtcga agtcgtagcg gccgacggtc 1380

tcgaggtcgc caccggcggt gacgcggacc tggtacggga ggtcgtcctc ggacatggcg 1440

aggaggcggc cgttgaagta gacgaggccg gcgttggcaa caccagtgcc gtggtacgta 1500

<210> 112

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the NCED2 genes of barley Hordeum vulgare and wheat Triticum aestivum

<400> 112

taatacgact cactataggg ttggcgccgt tgcgggcgta cacgccgttg atgaacgggg 60

ggatgcggtc ggtcacgggc agcgcctgca caggaggtgt ctccccgaca ggcgcgaagt 120

tgccggcgat ctgcaccgcg gggtcgaccg tcctggagag gccgtgcggg cgctcgagca 180

cgttggccac aaatccttcc tcgaacgcgt cgagcgccgt gaccgcggcg cgctggaaga 240

agttgagctt cttctcctgc ctctccacgg cgggcggctt ggggacggca atgaggggct 300

tggcgggcgc cgcgtcggcg ccgcgcacga accgggacgg tgccggcgcg cgcggcgcgg 360

agctgacggc gcgggcggag aaggtgaccg agctggaccg gcggcccgcg gggtgcggcc 420

ggtgccgctg tatggaggag accgagctgg acgctgtcga cgcggcgccc gccaagcccc 480

tcattgccgt ccccaagccg cccgccgtgg agaggcagga gaagaagctc aacttcttcc 540

agcgcgccgc ggtcacggcg ctcgacgcgt tcgaggaagg atttgtggcc aacgtgctcg 600

agcgcccgca cggcctctcc aggacggtcg accccgcggt gcagatcgcc ggcaacttcg 660

cgcctgtcgg ggagacacct cctgtgcagg cgctgcccgt gaccgaccgc atccccccgt 720

tcatcaacgg cgtgtacgcc cgcaacggcg ccaacccgta cttcgacccc gtcgccgggc 780

accacctgtt cgacggcgac ggcatggtgc acgctctgcg catccgcaac ggcgtcgccg 840

agacctacgc ctcccgcttc accgagacgg agcgcctgca gcaggagcgc gcgctggggc 900

gcccgatgtt ccccaaggcc attggtgagc tccatggcca ctctgggatc gcgcgccttg 960

ctctgttcta cgcgcgcgcg gcctgcggcc tcatcgaccc ctcgcgcggc accggcgtgg 1020

ccaacgccgg cctggtctac ttcaacggcc acctcctccc cggtggcggg gtcgagtttg 1080

gggtgcgcga tcatggggca ctcgagctgc ccgtcgaagt cgtagcggcc gacggtctgg 1140

aggtcgccgt cgtcggtgac gcggacgtgg tacgggatgt cgtcctcgga catggcgagg 1200

aggtggccgt tgaagtagac caggccggcg ttggccacgc cggtgccgcg cgaggggtcg 1260

atgaggccgc aggccgcgcg cgcgtagaac agagcaaggc gcgcgatccc agagtggcca 1320

tggagctcac caatggcctt ggggaacatc gggcgcccca gcgcgcgctc ctgctgcagg 1380

cgctccgtct cggtgaagcg ggaggcgtag gtctcggcga cgccgttgcg gatgcgcaga 1440

gcgtgcacca tgccgtcgcc gtcgaacagg tggtgcccgg cgacggggtc gaagtacgta 1500

<210> 113

<211> 1521

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 113

atggccttct tcctcctcct gtgcatcctc gtctctgtgg ccatcgtgtc ctacgcccac 60

cacgcaatcc ggcggaggcg ccagggctgc gctcatggcc gtcatgagca ggccgccctc 120

aagctgcccc ccggctccat gggcctgcct tacgtcggcg agaccctgca gctctactcc 180

caggacccca gcgtcttcct ctcctccaag cagaagcggt acggcgagat cttcaagacg 240

cacctcctgg ggtgcccgtg cgtgatgctg gcgagcccgg aggcggcgcg cttcgtgctg 300

gtgtcgcggg cccacctctt caagccgacg tacccgcgga gcaaggagcg cctcatcggc 360

ccgtcggcgc tcttcttcca ccagggcgac taccacctcc gcctccgccg gctcgtccag 420

ggcccgctcg gccccgaggc cctgcgcaag ctcgtgccgg acatcgaggc cgccgttcgc 480

tccacgctcg ccgcctgggc ggacggcgac gtcgccagca ctttccacgc catgaagagg 540

ctctcgttcg acgtcggcat cgtgacgatc ttcggcgggc ggctggacga gcggcggaag 600

gaggagctca ggcggaacta cgccgtcgtg gagaaaggct acaactcctt ccccaacagc 660

ttccccggga cgctatacta caaggcgatc caggcgaggc ggcggctgaa cggcgtgctg 720

agcgacgtcg tgcacgagcg tagggagcgg ggcgagcacg gcgacgacct cctcggctgc 780

ctcatgcggt cgcgggccgg cggcgacgac gccgacgacg agggcgcgct gctgacggac 840

gagcaggtcg ccgacaacgt catcggcgtg ctgttcgcgg cgcaggacac gacggccagc 900

gtgctcacct ggatcgtcaa gtacctccac gaccgcccga agctgctcga ggccgtcagg 960

gcggagcacg cggcgatcca cgaggccaac gacggcggga ggcggccgct gacatgggcg 1020

cagacgagga gcatgacgct gacgcacagg gtgattttgg agagcctaag gatggccagc 1080

atcatctcct tcacgttcag ggaggccgtg gccgacgtgg agtacaaagg gtttcttatc 1140

cccaaggggt ggaaggtgat gccgctcttc aggaacatcc atcacagccc ggactacttc 1200

caggatccac acaagttcga cccttcgcga ttcaaggtgg cgccgcggcc gaacaccttc 1260

acsccgttcg ggagcggggt gcacgcgtgc ccggggaacg agctggccaa gctcgagatg 1320

ctggtgctca tccaccacct ggtcaccggc tacaggtggg aggttgttgg atcgagcgac 1380

gacgtcgagt acagcccatt ccccgttccc cgccatggcc tgctcgccag ggtacggcga 1440

gatgacggcg tctgcgcggg taggaagggg tgcccgactg atgaagatga caactacgac 1500

gacgacgaag tgatagtgtg a 1521

<210> 114

<211> 1506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the ABA-OH-2 genes of barley Hordeum vulgare and wheat Triticum aestivum

<400> 114

taatacgact cactataggg cggtcgtgga ggtacttgac gatccaggtg agcacgctgg 60

ccgtcgtgtc ctgcgccgcg aacagcacgc cgatgacgtt gtcggcgacc tgctcgtccg 120

tcagcagcgc gccctcgtcg tcggcgtcgt cgccgccggc ccgcgaccgc atgaggcagc 180

cgaggaggtc gtcgccgtgc tcgccccgct ccctacgctc gtgcacgacg tcgctcagca 240

cgccgttcag ccgccgcctc gcctggatcg ccttgtagta tagcgtcccg gggaagctgt 300

tggggaagga gttgtagcct ttctccacga cggcgtagtt ccgcctgagc tcctccttcc 360

gccgctcgtc cagccgcccg ccgaagatcg tcacgatgcc gacgtcgaac gagagcctct 420

tcatggcgtg gaaagtgctg gcgacgtcgc cgtccgccta caactccttc cccaacagct 480

tccccgggac gctatactac aaggcgatcc aggcgaggcg gcggctgaac ggcgtgctga 540

gcgacgtcgt gcacgagcgt agggagcggg gcgagcacgg cgacgacctc ctcggctgcc 600

tcatgcggtc gcgggccggc ggcgacgacg ccgacgacga gggcgcgctg ctgacggacg 660

agcaggtcgc cgacaacgtc atcggcgtgc tgttcgcggc gcaggacacg acggccagcg 720

tgctcacctg gatcgtcaag tacctccacg accgcccgta gctgctcgag gccgtcaggg 780

cggagcacgc ggcgatccac gaggccaacg acggcgggag gcggccgctg acatgggcgc 840

agacgaggag catgacgctg acgcacaggg tgattttgga gagcctaagg atggccagca 900

tcatctcctt cacgttcagg gaggccgtgg ccgacgtgga gtacaaaggg tttcttatcc 960

ccaaggggtg gaaggtgatg ccgctcttca ggaacatcca tcacagcccg gactacttcc 1020

aggatccaca caagttcgac ccttcgcgat tcaaggtcgc tcgatccaac aacctcccac 1080

ctgtagccgg tgaccaggtg gtggatgagc accagcatct cgagcttggc cagctcgttc 1140

cccgggcacg cgtgcacccc gctcccgaac ggagtgaagg tgttcggccg cggcgccacc 1200

ttgaatcgcg aagggtcgaa cttgtgtgga tcctggaagt agtccgggct gtgatggatg 1260

ttcctgaaga gcggcatcac cttccacccc ttggggataa gaaacccttt gtactccacg 1320

tcggccacgg cctccctgaa cgtgaaggag atgatgctgg ccatccttag gctctccaaa 1380

atcaccctgt gcgtcagcgt catgctcctc gtctgcgccc atgtcagcgg ccgcctcccg 1440

ccgtcgttgg cctcgtggat cgccgcgtgc tccgccctga cggcctcgag cagctacgta 1500

ggtacc 1506

<210> 115

<211> 3885

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 115

atggaagctg aaattgtgaa tgtgagacct cagctagggt ttatccagag aatggttcct 60

gctctacttc ctgtcctttt ggtttctgtc ggatatattg atcccgggaa atgggttgca 120

aatatcgaag gaggtgctcg tttcgggtat gacttggtgg caattactct gcttttcaat 180

tttgccgcca tcttatgcca atatgttgca gctcgcataa gcgttgtgac tggtaaacac 240

ttggctcaga tctgcaatga agaatatgac aagtggacgt gcatgttctt gggcattcag 300

gcggagttct cagcaattct gctcgacctt accatggttg tgggagttgc gcatgcactt 360

aacctttttgt ttggggtgga gttatccact ggagtgtttt tggccgccat ggatgcgttt 420

ttatttcctg ttttcgcctc tttccttgaa aatggtatgg caaatacagt atccatttac 480

tctgcaggcc tggtattact tctctatgta tctggcgtct tgctgagtca gtctgagatc 540

ccactctcta tgaatggagt gttaactcgg ttaaatggag agagcgcatt cgcactgatg 600

ggtcttcttg gcgcaagcat cgtccctcac aatttttata tccattctta ttttgctggg 660

gaaagtacat cttcgtctga tgtcgacaag agcagcttgt gtcaagacca tttgttcgcc 720

atctttggtg tcttcagcgg actgtcactt gtaaattatg tattgatgaa tgcagcagct 780

aatgtgtttc acagtactgg ccttgtggta ctgacttttc acgatgcctt gtcactaatg 840

gagcaggtat ttatgagtcc gctcattcca gtggtctttt tgatgctctt gttcttctct 900

agtcaaatta ccgcactagc ttgggctttc ggtggagagg tcgtcctgca tgacttcctg 960

aagatagaaa tacccgcttg gcttcatcgt gctacaatca gaattcttgc agttgctcct 1020

gcgctttatt gtgtatggac atctggtgca gacggaatat accagttact tatattcacc 1080

caggtcttgg tggcaatgat gcttccttgc tcggtaatac cgcttttccg cattgcttcg 1140

tcgagacaaa tcatgggtgt ccataaaatc cctcaggttg gcgagttcct cgcacttaca 1200

acgtttttgg gatttctggg gttgaatgtt gtttttgttg ttgagatggt atttgggagc 1260

agtgactggg ctggtggttt gagatggaat accgtgatgg gcacctcgat tcagtacacc 1320

actctgcttg tatcgtcatg tgcatcctta tgcctgatac tctggctggc agccacgccg 1380

ctgaaatctg cgagtaacag agcggaagct caaatatgga acatggatgc tcaaaatgct 1440

ttatcttatc catctgttca agaagaggaa attgaaagaa cagaaacaag gaggaacgaa 1500

gacgaatcaa tagtgcggtt ggaaagcagg gtaaaggatc agttggatac tacgtctgtt 1560

actagctcgg tctatgattt gccagagaac attctaatga cggatcaaga aatccgttcg 1620

agccctccag aggaaagaga gttggatgta aagtactcta cctctcaagt tagtagtctt 1680

aaggaagact ctgatgtaaa ggaacagtct gtattgcagt caacagtggt taatgaggtc 1740

agtgataagg atctgattgt tgaaacaaag atggcgaaaa ttgaaccaat gagtcctgtg 1800

gagaagattg ttagcatgga gaataacagc aagtttattg aaaaggatgt tgaaggggtt 1860

tcatgggaaa cagaagaagc taccaaagct gctcctacaa gcaactttac tgtcggatct 1920

gatggtcctc cttcattccg cagcttaagt ggggaagggg gaagtgggac tggaagcctt 1980

tcacggttgc aaggtttggg acgtgctgcc cggagacact tatctgcgat ccttgatgaa 2040

ttttggggac atttatatga ttttcatggg caattggttg ctgaagccag ggcaaagaaa 2100

ctagatcagc tgtttggcac tgatcaaaag tcagcctctt ctatgaaagc agattcgttt 2160

ggaaaagaca ttagcagtgg atattgcatg tcaccaactg cgaagggaat ggattcacag 2220

atgacttcaa gtttatatga ttcactgaag cagcagagga caccgggaag tatcgattcg 2280

ttgtatggat tacaaagagg ttcgtcaccg tcaccgttgg tcaaccgtat gcagatgttg 2340

ggtgcatatg gtaacaccac taataataat aatgcttacg aattgagtga gagaagatac 2400

tctagcctgc gtgctccatc atcttcagag ggttgggaac accaacaacc agctacagtt 2460

cacggatacc agatgaagtc atatgtagac aatttggcaa aagaaaggct tgaagcctta 2520
caatcccgtg gagagatccc gacatcgaga tctatggcgc ttggtacatt gagctataca 2580
cagcaacttg ctttagcctt gaaacagaag tcccagaatg gtctaacccc tggaccagct 2640
cctgggtttg agaattttgc tgggtctaga agcatatcgc gacaatctga aagatcttat 2700
tacggtgttc catcttctgg caatactgat actgttggcg cagcagtagc caatgagaaa 2760
aaatatagta gcatgccaga tatctcagga ttgtctatgt ccgcaaggaa catgcattta 2820
ccaaacaaca agagtggata ctgggatccg tcaagtggag gaggagggta tggtgcgtct 2880

tatggtcggt taagcaatga atcatcgtta tattctaatt tggggtcacg ggtgggagta 2940
ccctcgactt atgatgacat ttctcaatca agaggaggct acagagatgc ctacagtttg 3000
ccacagagtg caacaacagg gaccggatcg ctttggtcca gacagccctt tgagcagttt 3060
ggtgtagcgg agaggaatgg tgctgttggt gaggagctca ggaatagatc gaatccgatc 3120
aatatagaca acaacgcttc ttctaatgtt gatgcagagg ctaagcttct tcagtcgttc 3180
aggcactgta ttctaaagct tattaaactt gaaggatccg agtggttgtt tggacaaagc 3240
gatggagttg atgaagaact gattgaccgg gtagctgcac gagagaagtt tatctatgaa 3300

gctgaagctc gagaaataaa ccaggtgggt cacatggggg agccactaat ttcatcggtt 3360
cctaactgtg gagatggttg cgtttggaga gctgatttga ttgtgagctt tggagtttgg 3420
tgcattcacc gtgtccttga cttgtctctc atggagagtc ggcctgagct ttggggaaag 3480
tacacttacg ttctcaaccg cctacaggga gtgattgatc cggcgttctc aaagctgcgg 3540
acaccaatga caccgtgctt ttgccttcag attccagcga gccaccagag agcgagtccg 3600
acttcagcta acggaatgtt acctccggct gcaaaaccgg ctaaaggcaa atgcacaacc 3660
gcagtcacac ttcttgatct aatcaaagac gttgaaatgg caatctcttg tagaaaaggc 3720

cgaaccggta cagctgcagg tgatgtggct ttcccaaagg ggaaagagaa tttggcttcg 3780
gttttgaagc ggtataaacg tcggttatcg aataaaccag taggtatgaa tcaggatgga 3840
cccggttcaa gaaaaaacgt gactgcgtac ggatcattgg gttga 3885

<210> 116

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the EIN2 gene of A. thaliana

<400> 116

taatacgact cactataggg agctgcaaca tattggcata agatggcggc aaaattgaaa 60

agcagagtaa ttgccaccaa gtcatacccg aaacgagcac ctccttcgat atttgcaacc 120

catttcccgg gatcaatata tccgacagaa accaaaagga caggaagtag agcaggaacc 180

attctctgga taaaccctag ctgaggtctc acattcacaa tttcagcttc catcctaaat 240

ctatctgata atataattac tcagagtagg attcaaggta aactctacag tcgtggttca 300

ctaaaagcct cagttgagta aaattcacag atttgatcta aaacacctga atgtgagacc 360

tcagctaggg tttatccaga gaatggttcc tgctctactt cctgtccttt tggtttctgt 420

cggatatatt gatcccggga aatgggttgc aaatatcgaa ggaggtgctc gtttcgggta 480

tgacttggtg gcaattactc tgcttttcaa ttttgccgcc atcttatgcc aatatgttgc 540

agctcccaac agcgttgtga ctggtaaaca cttggctcag atctgcaatg aagaatatga 600

caagtggacg tgcatgttct tgggcattca ggcggagttc tcagcaattc tgctcgacct 660

taccatggtt gtgggagttg cgcatgcact taacctttg tttggggtgg agttatccac 720

tggagtgttt ttggccgcca tggatgcgag tgggatctca gactgactca gcaagacgcc 780

agatacatag agaagtaata ccaggcctgc agagtaaatg gatactgtat ttgccatacc 840

attttcaagg aaagaggcga aaacaggaaa taaaaacgca tccatggcgg ccaaaaacac 900

tccagtggat aactccaccc caaacaaaag gttaagtgca tgcgcaactc ccacaaccat 960

ggtaaggtcg agcagaattg ctgagaactc cgcctgaatg cccaagaaca tgcacgtcca 1020

cttgtcatat tcttcattgc agatctgagc caagtgttta ccagtcacaa cgctgttgac 1080

<210> 117

<211> 1188

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 117

atggtgatgg ctggtgcttc ttctttggat gagatcagac aggctcagag agctgatgga 60

cctgcaggca tcttggctat tggcactgct aaccctgaga accatgtgct tcaggcggag 120

tatcctgact actacttccg catcaccaac agtgaacaca tgaccgacct caaggagaag 180

ttcaagcgca tgtgcgacaa gtcgacaatt cggaaacgtc acatgcatct gacggaggaa 240

ttcctcaagg aaaacccaca catgtgtgct tacatggctc cttctctgga caccagacag 300

gacatcgtgg tggtcgaagt ccctaagcta ggcaaagaag cggcagtgaa ggccatcaag 360

gagtggggcc agcccaagtc aaagatcact catgtcgtct tctgcactac ctccggcgtc 420

gacatgcctg gtgctgacta ccagctcacc aagcttcttg gtctccgtcc ttccgtcaag 480

cgtctcatga tgtaccagca aggttgcttc gccggcggta ctgtcctccg tatcgctaag 540

gatctcgccg agaacaatcg tggagcacgt gtcctcgttg tctgctctga gatcacagcc 600

gttaccttcc gtggtccctc tgacacccac cttgactccc tcgtcggtca ggctcttttc 660

agtgatggcg ccgccgcact cattgtgggg tcggaccctg acacatctgt cggagagaaa 720

cccatctttg agatggtgtc tgccgctcag accatccttc cagactctga tggtgccata 780

gacggacatt tgagggaagt tggtctcacc ttccatctcc tcaaggatgt tcccggcctc 840

atctccaaga acattgtgaa gagtctagac gaagcgttta aacctttggg gataagtgac 900

tggaactccc tcttctggat agcccaccct ggaggtccag cgatcctaga ccaggtggag 960

ataaagctag gactaaagga agagaagatg agggcgacac gtcacgtgtt gagcgagtat 1020

ggaaacatgt cgagcgcgtg cgttctcttc atactagacg agatgaggag gaagtcagct 1080

aaggatggtg tggccacgac aggagaaggg ttggagtggg gtgtcttgtt tggtttcgga 1140

ccaggtctca ctgttgagac agtcgtcttg cacagcgttc ctctctaa 1188

<210> 118

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the CHS gene of A. thaliana

<400> 118

taatacgact cactataggg gccacaccat ccttagctga cttcctcctc atctcgtcta 60

gtatgaagag aacgcacgcg ctcgacatgt ttccatactc gctcaacacg tgacgtgtcg 120

ccctcatctt ctcttccttt agtcctagct ttatctccac ctggtctagg atcgctggac 180

ctccagggtg ggctatccag aagagggagt tccagtcact tatccccaaa ggtttaaacg 240

cttcgtctag actcttcaca atgttcttgg agatgaggcc gggaacatcc ttgaggagat 300

ggaaggtgag accaacttcc ctcaaatgtc cgtctatggc accatcagac tggaactccc 360

tcttctggat agcccaccct ggaggtccag cgatcctaga ccaggtggag ataaagctag 420

gactaaagga agagaagatg agggcgacac gtcacgtgtt gagcgagtat ggaaacatgt 480

cgagcgcgtg cgttctcttc atactagacg agatgaggag gaagtcagct aaggatggtg 540

tggccccgac aggagaaggg ttggagtggg gtgtcttgtt tggtttcgga ccaggtctca 600

ctgttgagac agtcgtcttg cacagcgttc ctctctaaac agaacgcttg ccttctatct 660

gcctacctac ctacgcaaaa ctttaatcct gtcttatgtt ttatataata taatcattat 720

atgtttacgc aataattaag gaagaatgac atttccaaac aaagatttga tgtcattcaa 780

gacccataga tttaatattg taaaaagaca caaaaaagag agtacaaaaa cagtcgaata 840

gacctgtcca gcacatatca catatcacat caaatgcatt cttccttaat tattgcgtaa 900

acatataatg attatattat ataaaacata agacaggatt aaagttttgc gtaggtaggt 960

aggcagatag aaggcaagcg ttctgtttag agaggaacgc tgtgcaagac gactgtctca 1020

acagtgagac ctggtccgaa accaaacaag acaccccact ccaacccttc tcctgtcaac 1080

<210> 119

<211> 3456

<212> DNA

<213> Lupinus angustifolius

<400> 119

atgttgactc ttcaacccac acatgagtca agtagtcaat accctcctca tacacttata 60

gctgagacct gtcactttga ttatctgtac tatactaatc aaagttctct aattatgtca 120

cttggagaat catccctgca atggaaatac catgttttct tgagttttag gggaggtgac 180

acccgcttaa gcttcactaa tcacttatat gctgcgttgg tgcgaaaagg aatcattact 240

ttccgagatg acaaacaact tcacaaagga gatgccattt ctcaacatct gcatcaatca 300

atccaacagt ctctagctgc cattgttgtt atctcggaga actatgcttc ttccacttgg 360

tgtttggatg agctaaaact aattcttgaa tcgagaatag atgttttcc agtcttttat 420

ggtgtcactc cttctgatgt tcgataccag aaaaatagtt ttgctgaggc tttcaataaa 480

catgttgtaa gatttgaaca agatgaagag aaagtgcaaa aatggagaga ttgcttgaaa 540

gaagttgctg atttttctgg atgggagtcc aaggacatgg ctgaagcaga actcattgaa 600

gatgttattg aaaaggtatg gataaaacta caaccaaaat tgccatccta caatgaagga 660

gtggttggat ttgattcaag ggtgaagaaa atgatttcac ttttaagcat aggatcacaa 720

gatattcggt ttatcgggat atggggtatg gctggaactg gaaaaacaat tcttgctaga 780

gtaatctacg aaacaataag tagccaattt gagattaaat gtttccttct taatgttaga 840

gaggtttctc aaacatctga tggattggtt tccttacaaa gaaaacttct ttctaccctt 900

aagataagca acctagaaat tgatgatttg tatgatggaa agaagaaaat tatgaacctt 960

ttgtgcaaca aaagtgttct tcttgtcctt gatgacatta gtcatttaag tcagctagag 1020

aatttggcta aaactaaagg ttggtttggt ccatgcagca gagtgataat aacaaccaaa 1080

gatatgcact tactagtatc acatggtgcg tgtgagaagt atgagatgag aatcttaaat 1140

gaaagttctt cctttcaact cttcagccag aaagcattca gaagagataa acctccagag 1200

ggttatttag aaataactaa aagtatggtc aaatatgctg gaggtcttcc tttggcactt 1260

aaagtgttgg gttcttttgt ttgtggaaga agtctcagtc agtggaagga tgctttggat 1320

aagataaaac aagttctgcc gaaagacatt ttgaacacac taataatagg ttatgatgga 1380

ctagaagatg cagaaaagac tttgttttta gatattgctt tcttctttac aggacggtcg 1440

aaaattgaag tgatacaggt attggcagat tgtggcctta atccaacaat tggaataagt 1500

cttcttattg aaagatctct agtaagttgt tgtggaggaa ttttggaaat gcatgattta 1560

cttcaagaaa tgggtagaaa tattgtatat caagaatctc cggatgatgc aagcagacgc 1620

agtaggttat gctctttaga agatattaac cgagtattca gaaaaaacaa gggaaccaat 1680

atcattcaag gaatagttct gaaatcaagt gacccatgtg aagcatattg gcatcctgaa 1740

gccttctcaa aaatggataa tcttagagta ctcatcattt tgtgtgattt gcaccttccc 1800

ctcggcctca aatgtctctc tagttcatta aaacttcttg aatggaaggg atatcctttg 1860

gaatatctac catttggcct gcaactgcta gaacttgttc acttgaaaat gcattgcagc 1920

aaacttaaac aactttggaa tggaactcaa attttcagag agctaaaatc aattgatctc 1980

agtgattcca gagatctaat tcaaactcca gatatttctg aggttccatg tcttgagagt 2040

ttagttttga aaggttgtaa aaaccttgtt gaggttcatc aatctgttgc aaagcacaag 2100

aatgttgcta tactagacct ggaaggttgc atcagtctta agaccctgcc aagaaaattg 2160

gagatgaatg ctttggaaaa gttcattctc tccggctgct cacaaattaa aaaccttccc 2220

gaatttgggg agagtatgga atgtctatct atgcttaatt taagagattg cacaagtctt 2280

gtttctcttc cacagagtgt tcgaaacatg aaatccttta gagatctcaa tatccatggt 2340

tgctcaaaat tgtttaagct gacaaacaat tcaaatgaaa ataatgtcgt ggaagaaatt 2400

gatgagactg aaacaggtag gagagaagtg cattcatcat ggagctttc tctccttact 2460

gagaaagtgt ttgatttcgt aaagtatcca gttagcatgg actcgaagtt gccttctctc 2520

tcaagtttcc ctcggttgaa gaaattagat atgggcaact gtaatctcag tgatggacca 2580

attatagatc atattggaca tttaacatca ctggaagtgt tatatttagc tgggaacaac 2640

tttgttgacc ttacagcaag cattggtaac ctttctcggc tacaacgcct tggtttatat 2700

aaatgccgaa gacttaggac attgcctgag cttccaccca gtgtatgcca gttacttatg 2760

aacgactgca ctcaactgga acctatgtta tttgacacac aaataatttt gaaaatattt 2820

gaggcaaata gatggagcct gacacgcgaa ttgtggttcc tgattccagg gagtgaaatc 2880

ccagcatggt ttgagcatca agattatttt agcctgaaac caagtttagc gcctttcgat 2940

tatcacgagg agtatgcttt tattgtttca acaatagtaa acatccctga ctattgcctt 3000

tcaagtgatt ggataggaat tattgtatgc tttttactgg aaagtggttt aaaggcagac 3060

ctacacagac atattcgtag aagtccggtc acgatcggat ggtcttttaa agatcccgat 3120

gcagaaacgg tttacccctt acgcttcact aaacgtcgtt ggacacattt caaaggcaat 3180

cacctattga ttactacttt tggaagtgat catagaatat acaagcacta cttaacttgt 3240

ggcaaaagca aagtgcaatt gatattttgt ggtgagaata tttgcaagtg cgggaagcta 3300

aagctgaaaa actgtgggat ccgtgtgatt tgtaaggaag atggtgtatc gcgtagaggc 3360

gaggaaacga gtgaagttga ggtgccttcc acttcagttg aatctgatgt tcacaaacaa 3420

tcacgaataa ctgaaattac agatgaatat gaataa 3456

<210> 120

<211> 1280

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting the L. angustifolius N-like gene

<400> 120

taatacgact cactataggg tatcgaacat cagaaggagt gacaccataa aagactggaa 60

aaacatctat tctcgattca agaattagtt ttagctcatc caaacaccaa gtggaagagt 120

atttccattg cagggatgat tctccaagtg acataattag agaactttga ttagtatagt 180

acagataatc aaagtgacag gtctcagcta taagtgtatg aggagggtat tgactacttg 240

actcatgtgt gggttgaaga gtcaacatat agcttcacgg atcccacagt ttttcagctt 300

tagcttcccg cacttgcaaa tattctcacc acaaaatatc aattgcactt tgcttttgcc 360

acaagttaag tagtgcttgt atattctatg atcaccctgt tgactcttca acccacacat 420

gagtcaagta gtcaataccc tcctcataca cttatagctg agacctgtca ctttgattat 480

ctgtactata ctaatcaaag ttctctaatt atgtcacttg gagaatcatc cctgcaatgg 540

aaatactctt ccacttggtg tttggatgag ctaaaactaa ttcttgaatc gagaatagat 600

gtttttccag tcttttatgg tgtcactcct tctgatgttc gatacccgta gttttgctga 660

ggctttcaat aaacatgttg taagatttga acaagatgaa gagaaagtgc agtttgagca 720

tcaagattat tttagcctga aaccaagttt agcgcctttc gattatcacg aggagtatgc 780

ttttattgtt tcaacaatag taaacatccc tgactattgc ctttcaagtg attggatagg 840

aattattgta tgctttttac tggaaagtgg tttaaaggca gacctacaca gacatattcc 900

aaaagtagta atcaataggt gattgccttt gaaatgtgtc caacgacgtt tagtgaagcg 960

taaggggtaa accgtttctg catcgggatc tttaaaagac catccgatcg tgaccggact 1020

tctacgaata tgtctgtgta ggtctgcctt taaaccactt tccagtaaaa agcatacaat 1080

aattcctatc caatcacttg aaaggcaata gtcagggatg tttactattg ttgaaacaat 1140

aaaagcatac tcctcgtgat aatcgaaagg cgctaaactt ggtttcaggc taaaataatc 1200

ttgatgctca aactgcactt tctcttcatc ttgttcaaat cttacaacat gtttattgaa 1260

agcctcagca aaactacgta 1280

<210> 121

<211> 1527

<212> DNA

<213> Vitis pseudoreticulata

<400> 121

atggctggcg acgaggagac gacgacgacg gcagcaacac ttgaaacaac gtccacttgg 60

gctgttgcct ctgtttgctt tattttgatt gcactctcca tacttattga gcatgccctc 120

catctcttag ccaagtactt caacaagaag cggaggaggt ctctcattca tgctcttaac 180

aacgtcaaat cggagttgat gctcttgggg ttcgtctctt tgttgctgac tgtgtgccaa 240

aagtatattg cgaagatttg tatcccaagg agcgtaggtg aaacttttct tccctgcaag 300

accttgacag aaagtgattc agaagaagaa accaaatgcg aagagcaggg aaagatgtct 360

ttgctgtcta gacaaggcgt ggaggaacta caatacttaa ttttcgtgct ggccttcttc 420

cattccctct actgcgtcct cacattcggt cttgggatgg ccaagatgaa gaaatgggag 480

tcctgggagg cagaaacaag aacactggaa tatcagttta caaatgatcc acggaggttc 540

aggctcatcc atcagacatc atttggaaag caacatctga gatattggag tgagcatcag 600

atacttcgtt ggccggcttg ttttattcgg cagttctatc catccgtctc caaagtggat 660

tacttgactc ttagacatgg gttcattatg gcccattttg cagaaggaag caactatgac 720

ttccaaaagt atataaaaag agctttggaa aaagactttg gagtggtggt gggaggaagt 780

ttctgggttt ggagtttctc catgcttttt gtgttcttca atgctcaagt attttacaac 840

tatttatggc tacccttttat tccattggtg atgctgttgt tggttggaac aaagctacag 900

ggcattataa ctaagatgtg cttagatagc catgataaag ctctcgttgt tagaggaact 960

ttgcttgtca ggcccagtga tcacttcttc tggtttggaa aaccggaatt gctcctacat 1020

cttatgcact ttatattgtt tcagaactct tttcaactgg cgttctttac atggacttgg 1080

tacaaatttg gattcagatc atgcttccat gatacaactg aggatatcgt cataaggctt 1140

gtcatgggtg tgttagtaca actcctttgt ggctacgtga cactgcctct gtatgccctg 1200

gtcacgcaga tggggacatc aatgaggaca attgtcttta ctgagggagt cgttgaaggt 1260

ctgaacagat ggagaaggaa agccaagaaa aacatagcac gcaggaacaa ccactcagct 1320

cgtccctccc tggatgcttc actcgacaat tcaccttctt ttaacactct ggatacttct 1380

ttctctgtag acctcgatca gccatcatca gatgctggtt atttgactgt tgaaatatca 1440

gatgaagaga cggtcgctac taaacggcca gaaccgcgtc agaagttggg atcttttgag 1500

ggtttcgact cgtgcaaaac atcataa 1527

<210> 122

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a first ledRNA construct targeting a Vitis MLO gene

<400> 122

taatacgact cactataggg tagccataaa tagttgtaaa atacttgagc attgaagaac 60

acaaaaagca tggagaaact ccaaacccag aaacttcctc ccaccaccac tccaaagtct 120

ttttccaaag ctctttttat atacttttgg aagtcatagt tgcttccttc tgcaaaatgg 180

gccataatga acccatgtct aagagtcaag taatccactt tggagacgga tggatagaac 240

tgctgaataa aacaaaccgg ccaacgaagt atccgatgct cactccaata tctcagatgt 300

tgctttccaa atgatgtctg atggatgagc gtgaacctcc gtggatcatt tgtaaactga 360

tattccagtg ttcttgtttc tgcctcccag gactcccatt tcttcatctt ggccatccca 420

agaccgaatg tgaggacgca gtagagcaca tcatttggaa agcaacatct gagatattgg 480

agtgagcatc ggatacttcg ttggccggtt tgttttattc agcagttcta tccatccgtc 540

tccaaagtgg attacttgac tcttagacat gggttcatta tggcccattt tgcagaagga 600

agcaactatg acttccaaaa gtatataaaa agagctttgg aaaaagactt tggagtggtg 660

gtgggaggaa gtttctgggt ttggagtttc tccatgcttt ttgtgttctt caatgctcaa 720

gtattttaca actatttatg gctacccgta attccattgg tgatgctgtt gttggttgga 780

acaaagctac agggcattat aactaagatg tgcctagata gccatgataa agctctcgtt 840

gttagaggaa ctttgcttgt caggcccagt gatcacttct tctggtttgg aaaaccggaa 900

ttgctcctac atcttatgca ctttatattg tttcagaact cttttcaact ggcgttcttt 960

acatggactt ggtacaaatt tggattcaga tcatgcttcc atgatacaac tgaggatatc 1020

gtcataaggc ttgtcatggg tgtgttatgg ctttccttct ccatctgttc agaccttcaa 1080

cgactccctc agtaaagaca attgtcctca ttgatgtccc catctgcgtg accagggcat 1140

acagaggcag tgtcacgtag ccacaaagga gttgtactaa cacacccatg acaagcctta 1200

tgacgatatc ctcagttgta tcatggaagc atgatctgaa tccaaatttg taccaagtcc 1260

atgtaaagaa cgccagttga aaagagttct gaaacaatat aaagtgcata agatgtagga 1320

gcaattccgg ttttccaaac cagaagaagt gatcactggg cctgacaagc aaagttcctc 1380

taacaacgag agctttatca tggctatcta ggcacatctt agttataatg ccctgtagct 1440

ttgttccaac caacaacagc atcaccaatg gaattacgta 1480

<210> 123

<211> 894

<212> DNA

<213> Myzus persicae

<400> 123

atgttcaaac acttgtgcaa taccgtttca caaagtataa aacctagtag ttttttatca 60

aaagtttgtt caaacaaata tctcgtcgtg ccgtaccgga tagcgatttt taacaacatg 120

ggaagttaca aattgtacct ggccgtcatg gcaatagctg tcatagctgc agttcaggaa 180

attagttgca aggttcagac ttccgaacag gacgatgatc aggaaggata ttacgatgat 240

gagggaggag tgaacgataa tcagggagaa gagaacgata atcagggaga agagaacgat 300

aatcagggag aagagaacga taatcaggga gaagagaagg aagaagtttc cgaaccagag 360

atggagcacc atcagtgcga agaatacaaa tcgaagatct ggaacgatgc atttagcaac 420

ccgaaggcta tgaacctgat gaaactgacg tttaatacag ctaaggaatt gggctccaac 480

gaagtgtgct cggacacgac ccgggcctta tttaacttcg tcgatgtgat ggccaccagc 540

ccgtacgccc acttctcgct aggtatgttt aacaagatgg tggcgtttat tttgagggag 600

gtggacacga catcggacaa atttaaagag acgaagcagg tggtcgaccg tatctcgaaa 660

actccagaga tccgtgacta tatcaggaac tcggccgcca agaccgtcga cttgctcaag 720

gaacccaaga ttagagcacg actgttcaga gtgatgaaag ccttcgagag tctgataaaa 780

ccaaacgaaa acgaagcatt aatcaaacag aagattaagg ggttaaccaa tgctcccgtc 840

aagttagcca agggtgccat gaaaacggtt ggacgtttct ttagacattt ttaa 894

<210> 124

<211> 960

<212> DNA

<213> Myzus persicae

<400> 124

atgactgaga caatgcaact ccgtggtacc cttcgtgggc ataatggttg ggttacgcag 60

atcgccacca atccgatcca cactgacatg attctgtctt gttcacgaga caagaccttg 120

attgtttggg atctgacacg tgatgagctc aactatggta tccccaagaa acgtttgtac 180

ggacattcgc acttcgtcag cgacgtcgtt ctttcatcag atggtaacta cgctctttcc 240

ggttcttggg ataagactct tcgtctgtgg gatttggctg ctggacgtac cactcgtcgt 300

tttgaagacc acaccaagga tgtattgagc gttgccttct ctgctgacaa ccgtcaaatc 360

gtttctggaa gtcgggacaa gactatcaag ttgtggaata ctttggctga gtgcaaatac 420

actattcagg atgatggaca tagcgattgg gtatcatgtg tacggttctc tcctaatatc 480

cataacccaa tcattgtgag tgctggttgg gacaaggttg tcaaggtatg gaacttaact 540

aactgccgca tcaagaccaa ccattatgga cacactggat accttaacac cgttactgtt 600

tcacctgatg gttctttgtg tgcttcagga ggaaaagatt gcaaagctat gttatgggat 660

cttaatgacg gcaaacactt gcacacactg gaccataacg atatcattga agctttgtgc 720

tttagcccca accgttactg gttgtgcgct gcatttggac catcaatcaa aatttgggat 780

ttggaaagca aagaaatggt tgaggaactt cgcccagaag ttgtatctca atcacagaat 840

agcaataccg aaccacccag atgtctgtca cttgcatggt caactgatgg acaaacattg 900

tttgctggat actcagacaa taacattaga gtttggcaag tgtctgtcag tgctcgttaa 960

<210> 125

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric construct encoding the ledRNA targeting M.persicae C002 gene

<400> 125

gaattctaat acgactcact atagggtgct ccatctctgg ttcggaaact tcttccttct 60

cttctccctg attatcgttc tcttctccct gattatcgtt ctcttctccc tgattatcgt 120

tctcttctcc ctgattatcg ttcactcctc cctcatcatc gtaatatcct tcctgatcat 180

cgtcctgttc ggaagtctga accttgcaac taatttcctg aactgcagct atgacagcta 240

ttgccatgac ggccaggtac aatttgtaac ttcccatgtt gttaaaaatc gctatccggt 300

acggcacgac gagatatttg tttgaacaaa cttttgataa aaaactacta ggttttatac 360

tttgtgaaac ggtattgcac aagtgtttga acataagaga gttggaagtt acaaattgta 420

cctggccgtc atggcaatag ctgtcatagc tgcagttcag gaaattagtt gcaaggttca 480

gacttccgaa caggacgatg atcaggaagg atattacgat gatgagggag gagtgaacga 540

taatcaggga gaagagaacg ataatcaggg agaagagaac gataatcagg gagaagagaa 600
cgataatcag ggagaagaga aggaagaagt ttccgaacca gagatggagc acccaacagt 660
gcgaagaata caaatcgaag atctggaacg atgcatttag caacccgaag gctatgaacc 720
tgatgaaact gacgtttaat acagctaagg aattgggctc caacgaagtg tgctcggaca 780
cgacccgggc cttatttaac ttcgtcgatg tgatggccac cagcccgtac gcccacttct 840
cgctaggtat gtttaacaag atggtggcgt ttattttgag ggaggtggac acgacatcgg 900
acaatctgaa cagtcgtgct ctaatcttgg gttccttgag caagtggacg gtcttggcgg 960

ccgagttcct gatatagtca cggatctctg gagttttcga gatacgggcg accacctgct 1020
tcgtctcttt aaatttgtcc gatgtcgtgt ccacctccct caaaataaac gccaccatct 1080
tgttaaacat acctagcgag aagtgggcgt acgggctggt ggccatcaca tcgacgaagt 1140
taaataaggc ccgggtcgtg tccgagcaca cttcgttgga gcccaattcc ttagctgtat 1200
taaacgtcag tttcatcagg ttcatagcct tcgggttgct aaatgcatcg ttccagatct 1260
tcgatttgta ttcttcgcac tgttaacaag cttagcatat ccatgatatc tgttagtttt 1320
tttcctgaaa gagcggccgc cctagcataa ccccgcgggg cctcttcggg ggtctcgcgg 1380

ggtttttgc tgaaaggatc c 1401

<210> 126

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric construct encoding the ledRNA targeting M.persicae Rack-1 gene

<400> 126

gaattctaat acgactcact atagggttat ggatattagg agagaaccgt acacatgata 60
cccaatcgct atgtccatca tcctgaatag tgtatttgca ctcagccaaa gtattccaca 120
acttgatagt cttgtcccga cttccagaaa cgatttgacg gttgtcagca gagaaggcaa 180
cgctcaatac atccttggtg tggtcttcaa aacgacgagt ggtacgtcca gcagccaaat 240

cccacagacg aagagtctta tcccaagaac cggaaagagc gtagttacca tctgatgaaa 300
gaacgacgtc gctgacgaag tgcgaatgtc cgtacaaacg tttcttgggg ataccatagt 360
tgagctcatc acgtgtcaga tcccaaacaa tcaaggtctt gtcccggttc ttgggataag 420
actcttcgtc tgtgggattt ggctgctgga cgtaccactc gtcgttttga agaccacacc 480

aaggatgtat tgagcgttgc cttctctgct gacaaccgtc aaatcgtttc tggaagtcgg 540

gacaagacta tcaagttgtg gaatactttg gctgagtgca aatacactat tcaggatgat 600

ggacatagcg attgggtatc atgtgtacgg ttctctccta atatccataa cccaaccatt 660

gtgagtgctg gttgggacaa ggttgtcaag gtatggaact taactaactg ccgcatcaag 720

accaaccatt atggacacac tggatacctt aacaccgtta ctgtttcacc tgatggttct 780

ttgtgtgctt caggaggaaa agattgcaaa gctatgttat gggatcttaa tgacggcaaa 840

cacttgcaca cactggacca taacgatatc attgaagctt tgtgctttag ccccaaccgt 900

tacacagaca tctgggtggt tcggtattgc tattctgtga ttgagataca acttctgggc 960

gaagttcctc aaccatttct ttgctttcca aatcccaaat tttgattgat ggtccaaatg 1020

cagcgcacaa ccagtaacgg ttggggctaa agcacaaagc ttcaatgata tcgttatggt 1080

ccagtgtgtg caagtgtttg ccgtcattaa gatcccataa catagctttg caatcttttc 1140

ctcctgaagc acacaaagaa ccatcaggtg aaacagtaac ggtgttaagg tatccagtgt 1200

gtccataatg gttggtcttg atgcggcagt tagttaagtt ccataccttg acaaccttgt 1260

cccaaccagc actcacaatg gttaacccgg gtagcatatc catgatatct gttagttttt 1320

ttcctgaaag agcggccgcc ctagcataac cccgcggggc ctcttcgggg gtctcgcggg 1380

gtttttgct gaaaggatcc c 1401

<210> 127

<211> 2396

<212> DNA

<213> Helicoverpa armigera

<400> 127

agacattgat tagtgagctc caaactccgt acgtacgttc ttagtttagt ttgttcgttc 60

gtattgtcgc agtcacatcg ctccggtgcc cgcttcgaca tttcccgcca aaagtgacgt 120

aacatatccg tgatctgtgt gaatatgtca gtgacttttt taaattaatt ttttaatagc 180

aaaattgtga tcgaaggaat ttttacaaga tgacggctgg gaatgaagag catgagcctc 240

taattacatc gtctgtcgac aatcagcgtg tggcctacag taattcacca ccggatgacc 300

gcacaccaga atcttcttcc ccacgcggca gtggcggaga agtaacgcta gccataccat 360

cacaccgcaa ctatggagcc atcggaggcg tggagaaggt cacatacacc tgggcagaca 420

tcaatgcctt tgctactgaa tccaggtcta ggtcccgaag gatttggaac ttctggaagc 480

cctccgccag tggcatgttc cagcaaagga aacagttgtt gaggaatgta aatggagccg 540

cctacccagg cgaactgctc gccatcatgg gatcctccgg tgccgggaag accacactcc 600

tcaacactct gaccttccgc actccaagcg gggtgctgtc cagtggcact cgagcactga 660

acggccagcc tgctaccct gaggcgttat cagcactgtc tgcgtatgtt cagcagcagg 720

atctgttcat tggcacgctg actgtgaagg agcatttagt attccaggct atggtgcgga 780

tggaccgaca tataccgtat gcgcagcgca tgaggagagt tcaagaggtt attactgagt 840

tggcgctaac aaaatgccag aacacagtga taggcatccc tgggcggctg aagggtatct 900

ccggcgggga gatgaagagg ctgtccttcg ccagcgaggt gctcacggat ccaccgctca 960

tgttctgcga tgaacccacc tctggactcg attcttttat ggcgcagaat gttatacagg 1020

tactgaaagg tctcgcacaa aaaggcaaga cagtcgtatg cacgatccac cagccgtctt 1080

cggagctgta cgcgatgttc gataagctgc tcatcatggc agacgggaag gtcgccttcc 1140

tcggctcccc tgatcaggct aatgatttct ttaaagacct aggagcagcg tgtcctccta 1200

actacaaccc agcggaccac ttcatccaac tcctggcggg agtgccgggc agggaggaga 1260

ccacgcgcac cactatcgat actgtctgca cggcattcgc gcgctctgag gtcggctgca 1320

agattgctgc agaagctgaa aatgcactct actttgagcg caagatatcg cagggctggg 1380

cggacccggc gtggtctgaa gccacggcta tccgcgcgcg ccgctcgccg tacaaggcgt 1440

cgtggtgcgc gcagttccgc gcggtgctgt ggcgctcgtg gctgtccgtc actaaggagc 1500

ccatgctcat caaagtgcgc ttcctacaga ctattatggt atcgatcctg atcggcgtga 1560

tctacttcgg gcagcacctg gaccaggacg gcgtgatgaa catcaacggc gccatcttca 1620

tgttcctcac caacatgacc ttccagaaca tcttcgctgt tattaacgta ttctgctcag 1680

aactgccaat attcatacga gaacaccact ccgggatgta tcgagctgac gtgtacttcc 1740

tatcgaagac gttagccgaa gcacctgtgt tcgccaccat accacttgtg ttcaccacca 1800

tagcatacta catgataggg ctgaaccctg aacctaagcg gttctttata gcgtccggtt 1860

tggctgccct gattactaac gttgctacgt cgtttggcta cctgatatcg tgtgccagca 1920

acagcgtgag catggcagcg tcagtgggac ctcccatcat catccccttc atgttgttcg 1980

gaggcttctt cctcaacact ggctccgtac caccatacct gggctggata tcgtacctgt 2040

cctggttcca ctacggcaac gaagcgctgc tggtcaacca gtggtctgga gtggaaacca 2100

tcgcctgcac ccgggagaac ttcacctgtc ccgcctctgg gcaggtcgtc ttggatactc 2160

ttagcttttc tgaggatgac ttcacaatgg acgtggtgaa catgatccta cttttcatcg 2220

gcttcagatt tttggcgtat ctcgctctct tgtaccgcgc tcgccgaggc aagtgagtct 2280

taggtacaaa atgctgcgag aatgggccat atgaaggaag aatgttgaat aaatagtgta 2340

attatttagg atgtaaggag tcaatggaga tttgataaat aaaacaattt ataccg 2396

<210> 128

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a ABC

transporter white gene of Helicoverpa armigera

<400> 128

taatacgact cactataggg tatatgtcgg tccatccgca ccatagcctg gaatactaaa 60

tgctccttca cagtcagcgt gccaatgaac agatcctgct gctgaacata cgcagacagt 120

gctgataacg cctcaggggt agcaggctgg ccgttcagtg ctcgagtgcc actggacagc 180

accccgcttg gagtgcggaa ggtcagagtg ttgaggagtg tggtcttccc ggcaccggag 240

gatcccatga tggcgagcag ttcgcctggg taggcggctc catttacatt cctcaacaac 300

tgtttccttt gctggaacat gccactggcg gagggcttcc agaagttcca aatccttcgg 360

gacctagacc tggattcagt agcaaaggca ttgatgtctg cccaggtgta tgtgaccttc 420

tccacgcctc cgatggctcc atagttgttc cagcaaagga aacagttgtt gaggaatgta 480

aatggagccg cctacccagg cgaactgctc gccatcatgg gatcctccgg tgccgggaag 540

accacactcc tcaacactct gaccttccgc actccaagcg gggtgctgtc cagtggcact 600

cgagcactga acggccagcc tgctacccct gaggcgttat cagcactgtc tgcgtatgtt 660

cagcagcagg atctgttcat tggcacgctg actgtgaagg agcatttagt attccaggct 720

atggtgcgga tggaccgaca tatacccgta tgcgcagcgc atgaggagag ttcaagaggt 780

tattactgag ttggcgctaa caaaatgcca gaacacagtg ataggcatcc ctgggcggct 840

gaagggtatc tccggcgggg agatgaagag gctgtccttc gccagcgagg tgctcacgga 900

tccaccgctc atgttctgcg atgaacccac ctctggactc gattctttta tggcgcagaa 960

tgttatacag gtactgaaag gtctcgcaca aaaaggcaag acagtcgtat gcacgatcca 1020

ccagccgtct tcggagctgt acgcgatgat gaagtggtcc gctgggttgt agttaggagg 1080

acacgctgct cctaggtctt taaagaaatc attagcctga tcaggggagc cgaggaaggc 1140

gaccttcccg tctgccatga tgagcagctt atcgaacatc gcgtacagct ccgaagacgg 1200

ctggtggatc gtgcatacga ctgtcttgcc tttttgtgcg agacctttca gtacctgtat 1260

aacattctgc gccataaaag aatcgagtcc agaggtgggt tcatcgcaga acatgagcgg 1320

tggatccgtg agcacctcgc tggcgaagga cagcctcttc atctccccgc cggagatacc 1380

cttcagccgc ccagggatgc ctatcactgt gttctggcat tttgttagcg ccaactcagt 1440

aataacctct tgaactctcc tcatgcgctg cgcatacgta 1480

<210> 129

<211> 811

<212> DNA

<213> Linepithema humile

<400> 129

agagagaacg atgaggacaa tgagatggaa aaaacaacaa cgtcccaacg tcccttcgac 60

gacgccattc caccagccct ataaaacccc gaggatcatc ggcgtcccaa cattactcgg 120

tcagagtctc gaggaacgcc gtgtccgaga tgatcatcac caggaaccgc atcaaccgcg 180

caactctaat ctgcgttctg gcgtcgtggc tttgcttggc gtctcgcgct tccgccgaat 240

acgaatcgcg ggagatgtcg aacggcggac cgggcgtcga cgcctcgtgc atcgagggca 300

agtgcatgaa gcgcaccgcc acgcaggatg ctaccgccag catgtggttc ggcccgcgtt 360

tgggaagacg gcgcagatcg gacgagaagc aggaagtgaa ttccgagata caggctctgg 420

cggaagcctt ggatagcggg cgtttggccc tatttgccat tccagctaac gacaagagac 480

aaccgactca atttacaccg cgactggggc gaggatcaga cgaggaccta tcctcctacg 540

gagacgcgat tgagaggaac gagatcgacg atcgtatatt acccgcgtta ttcgcgccgc 600

gtttaggacg acgaattcct tggtcaccgt cgccgagact tggacgccaa ttacgcagca 660

ttttgcgaaa aatgtaggcg ccgtcgaaag attattatca aaagttacaa atgaagagtg 720

atctcgtaga cctgcgcgtg aagatgaaat aacaactaaa attatagcac tattaagaca 780

taaagaaata aagtactgat gtttatttgt a 811

<210> 130

<211> 1360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a PBAN gene in Argentine ants

<400> 130

taatacgact cactataggg aattcacttc ctgcttctcg tccgatctgc gccgtcttcc 60

caaacgcggg ccgaaccaca tgctggcggt agcatcctgc gtggcggtgc gcttcatgca 120

cttgccctcg atgcacgagg cgtcgacgcc cggtccgccg ttcgacatct cccgcgattc 180

gtattcggcg gaagcgcgag acgccaagca aagccacgac gccagaacgc agattagagt 240

tgcgcggttg atgcggttcc tggtgatgat catctcggac acggcgttcc tcgagactct 300

gaccgagtaa tgttgggacg ccgatgatcc tcggggtttt atagggctgg tggaatggcg 360

tcgtcgaagg gacgttggga cgttgttgtt ttttccatct cattgtcctc atcgttcacg 420
ccgtgtccga gatgatcatc accaggaacc gcatcaaccg cgcaactcta atctgcgttc 480
tggcgtcgtg gctttgcttg gcgtctcgcg cttccgccga atacgaatcg cgggagatgt 540
cgaacggcgg accgggcgtc gacgcctcgt gcatcgaggg caagtgcatg aagcgcaccg 600
ccacgcagga tgctaccgcc agcatgtggt tcggcccgcg tttgggaaga cggcgcagat 660
cggacgagaa gcaggaagtg aattcccgta atacaggctc tggcggaagc cttggatagc 720
gggcgtttgg ccctatttgc cattccagct aacgacaaga gacaaccgac tcaatttaca 780

ccgcgactgg ggcgaggatc agacgaggac ctatcctcct acggagacgc gattgagagg 840
aacgagatcg acgatcgtat attacccgcg ttattcgcgc cgcgtttagg acgacgaatt 900
ccttggtcac cgtcgccgag acttggacgc caattacgca gcattttgcg aaaaatgaaa 960
catcagtact ttatttcttt atgtcttaat agtgctataa ttttagttgt tatttcatct 1020
tcacgcgcag gtctacgaga tcactcttca tttgtaactt ttgataataa tctttcgacg 1080
gcgcctacat ttttcgcaaa atgctgcgta attggcgtcc aagtctcggc gacggtgacc 1140
aaggaattcg tcgtcctaaa cgcggcgcga ataacgcggg taatatacga tcgtcgatct 1200

cgttcctctc aatcgcgtct ccgtaggagg ataggtcctc gtctgatcct cgccccagtc 1260
gcggtgtaaa ttgagtcggt tgtctcttgt cgttagctgg aatggcaaat agggccaaac 1320
gcccgctatc caaggcttcc gccagagcct gtattacgta 1360

<210> 131
<211> 1480
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding V-type proton ATPase catalytic subunit A of L. cuprina
<400> 131

taatacgact cactataggg aagttcttgt catagaaatc atccaaagca cgcatgtatt 60

tggagtagga aatcaaccaa ttgatggagg ggaaatgttt acgttgggcc aatttcttgt 120
ccaaacccca gaacacttgt acgataccca aagtggcaga agtaacggga tcagagaaat 180
caccaccagg aggagataca gcaccgacaa tggaaacgga accttcacgt tcagggttac 240
ccaaacactt gacacgacca gcacgttcgt agaaggaggc caaacgggca cccaagtagg 300
ctgggtaacc ggaatcggca ggcatttcag ccaaacgacc agaaatttca cgaagagctt 360

cggcccaacg ggaggtagaa tcagccatca tagatacgtt gtaacccata tcacggaagt 420

attcagacaa ggtaataccg gtataaacga ttccggttac ccagcctact tgggtgcccg 480

tttggcctcc ttctacgaac gtgctggtcg tgtcaagtgt ttgggtaacc ctgaacgtga 540

aggttccgtt tccattgtcg gtgctgtatc tcctcctggt ggtgatttct ctgatcccgt 600

tacttctgcc actttgggta tcgtacaagt gttctggggt ttggacaaga aattggccca 660

acgtaaacat ttcccctcca tcaattggtt gatttcctac tccaaataca tgcgtgcttt 720

ggatgatttc tatgacaaga acttcccgta attcgtacca ttgcgtacca aggtcaagga 780

aatcttgcaa gaagaagaag atttgtccga aattgtacaa ttggtcggta aggcttcatt 840

ggccgaaact gacaagatca ccttggaagt cgccaaattg cttaaggacg atttcttgca 900

acagaactcc tactcatcat acgacagatt ctgccccttc tacaagagtg tgggtatgtt 960

gaagaacatc attgccttct acgacttggc tcgtcactcc gtcgaatcca ccgctcaatc 1020

tgaaaacaaa atcacctgga atgtcattct gaaagcctgt tgtaaatctt cgtgtaattg 1080

ttcaaagtca gccttgatct tggcttcacc gtccttaacg ggatccttga atttcatgga 1140

agacaattgg tacataatgt tacccatagc ttcacggatg acattccagg tgattttgtt 1200

ttcagattga gcggtggatt cgacggagtg acgagccaag tcgtagaagg caatgatgtt 1260

cttcaacata cccacactct tgtagaaggg gcagaatctg tcgtatgatg agtaggagtt 1320

ctgttgcaag aaatcgtcct taagcaattt ggcgacttcc aaggtgatct tgtcagtttc 1380

ggccaatgaa gccttaccga ccaattgtac aatttcggac aaatcttctt cttcttgcaa 1440

gatttccttg accttggtac gcaatggtac gaattacgta 1480

<210> 132

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding RNAse 1/2 of L. cuprina

<400> 132

taatacgact cactataggg aataatttgt ggtagacata gcgggttact tcctcatgtt 60

cgttaaagca gacctggtat tgtctcatga aacgggaaga tgacaattca aaaccaacat 120

tgacgagagt agtgccacca ttgcagctgc tgcccgactt cttagctaca aaagcaggcc 180

aactggtgca aacaagactg ggcagggagt gctgaacacc attgacttta aaagtggtgc 240

cactaacaca ggtagcgata tgggtcttgc ctgataaagg atgagcaaag ccactggtac 300

aatggatctc aatattcttg ccagcagcca catcaattct tccagtatca gaaaaagggt 360

agagttcagt agtgccaggt ttgatataca agggttgttt agccttaaga ccaccgcgaa 420

tgggtatgga acaaccacca ctgcgtggaa tattgagatc cattgtacca gtggctttgc 480

tcatccttta tcaggcaaga cccatatcgc tacctgtgtt agtggcacca cttttaaagt 540

caatggtgtt cagcactccc tgcccagtct tgtttgcacc agttggcctg cttttgtagc 600

taagaagtcg ggcagcagct gcaatggtgg cactactctc gtcaatgttg gttttgaatt 660

gtcatcttcc cgtttcatga gacaatacca ggtctgcttt aacgaacatg aggaagtaac 720

ccgctatgtc taccacaaat tattcccgta cccaacagcg tgccactttc ctattcatta 780

atgcagctcc ccagtggcaa gttttcaatg ccggtaattg ggctcgtgta gaggatggtg 840

tacgcgcctg ggtgtccaaa aataaaatca atgttcgatg ctataccggt gtttatggtg 900

tcaccactct acccaacaaa gagggacgtg agactcctct atatttgtct cgtgatgcca 960

ataataatgg tttgattcct gttcccaaat tatacttccg tgtggttata caacctgcca 1020

ccaataaggg tattgttttc gttggtgtca caggcataag aataaccagc agtgatatca 1080

gttttcttcc aactaatata gttaacctta tcactgacat ctttgcaaat aatatagtcc 1140

tttttgattt gttccaaagt caaatgggga ttgttgacac caacgaaaac aataccctta 1200

ttggtggcag gttgtataac cacacggaag tataatttgg gaacaggaat caaaccatta 1260

ttattggcat cacgagacaa atatagagga gtctcacgtc cctctttgtt gggtagagtg 1320

gtgacaccat aaacaccggt atagcatcga acattgattt tatttttgga cacccaggcg 1380

cgtacaccat cctctacacg agcccaatta ccggcattga aaacttgcca ctggggagct 1440

gcattaatga ataggaaagt ggcacgctgt tgggtacgta 1480

<210> 133

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding chitin synthase of L. cuprina

<400> 133

taatacgact cactataggg tggcttgatt tttatattaa caccatacac ctcaaatgca 60

gctttttcaa tgctggtaat caatatttttt acatattcat tgagaggagg atttttcgga 120

ttctccacat atttttcatc cagtataaag gcatcatcaa agaaaatatt agctaaaatg 180

taaaaaaaag aaaacttaat tgatagatac tcttcattcc aatccacaat tcgtctattt 240

aatgttatac attgttcaac caaaaaacca caataccacg gacaaatgaa cagtttttcg 300

gtgggtaaat ttttatcatt ttttggacgc catatatgat ttgttatcca caattgtgac 360

agccaccaca acaaccatat ccaaagataa tctttagcga ccacattaaa aaaactccat 420

gtatcgtgac cgaagcccag tgacgttgat aaaaatttac ccaccgaaaa actgttcatt 480

tgtccgtggt attgtggttt tttggttgaa caatgtataa cattaaatag acgaattgtg 540

gattggaatg aagagtatct atcaattaag ttttcttttt tttacatttt agctaatatt 600

ttctttgatg atgcctttat actggatgaa aaatatgtgg agaatccgaa aaatcctcct 660

ctcaatgaat atgtaaaaat attgattacc agcattgaaa aagctgcatt tgaggtgtat 720

ggtgttaata taaaaatcaa gccacccgta aaaattgaaa caccttatgg cggtcgtttg 780

gtgtggacac tgcctggtcg ctcaaagatg attgcccatt taaaaaacaa agataaaata 840

cgacataaga aacgctggtc acaggttatg tacatgtact atttgttggg ttttcgtata 900

atggaattgg aatcagtatc ggccaagcgt aaggcagtga tagcagaaaa tacatttttg 960

ctggctcttg atggtgatat tgactttcaa ccgcaggcag tgcaactgtt aatagaccgt 1020

atgaaggcca tagatgaatt aggtgctagc caggactaca taaaacacaa ccaataacat 1080

gctctgttgc tttttgcaac caatgaccta tagcgtattc gaagatttga taccaaacca 1140

tagggcctct accaactgga tgaatacgac cacaggcagc acctaattca tctatggcct 1200

tcatacggtc tattaacagt tgcactgcct gcggttgaaa gtcaatatca ccatcaagag 1260

ccagcaaaaa tgtattttct gctatcactg ccttacgctt ggccgatact gattccaatt 1320

ccattatacg aaaacccaac aaatagtaca tgtacataac ctgtgaccag cgtttcttat 1380

gtcgtatttt atctttgttt tttaaatggg caatcatctt tgagcgacca ggcagtgtcc 1440

acaccaaacg accgccataa ggtgtttcaa tttttacgta 1480

<210> 134

<211> 1481

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding ecdysone receptor (EcR) of L. cuprina

<400> 134

taatacgact cactataggg tgaaagatca tcacgacctg atgatatgga attagctgat 60

tcagatctgg gtgtatgatg catcatacta ctgttattca tatgatgatg gtgatgatga 120

tttaatccat tactgatgat actgtgaatg ccaatattgg catgaataac ttggccattt 180

tgtgaggcct gtaacgagtt taactgttgg gcattgctaa cgatattggg accattaata 240

ttgaccgata agccaccacc accgccgcca atacccatgt ggccatttgt gtggtgggaa 300

ctgctattac tgtgattact gttgctgttg tggtgtaaat gattgtggct gtgattgtga 360

ttattcactt gactgccacc accaccaccc agaccattga gtgaagtcat accgggtaca 420

ccaccaccac ctccacctcc tccaacaaat cacagtaata gcagttccca ccacacaaat 480

ggccacatgg gtattggcgg cggtggtggt ggcttatcgg tcaatattaa tggtcccaat 540

atcgttagca atgcccaaca gttaaactcg ttacaggcct cacaaaatgg ccaagttatt 600

catgccaata ttggcattca cagtatcatc agtaatggat taaatcatca tcaccatcat 660

catatgaata acagtagtat gatgcatcat acacccagat ctgaatcagc taattccata 720

tcatcaggtc gtgatgatct ttcacccgta tccaccaaat caccccctta gtggttcgaa 780

acacttgtgt tccatttgtg gagaccgcgc cagtggaaaa cattatgggg tctacagttg 840

tgagggttgt aaagggttct tcaaacgtac cgtacgcaag gacttgacat atgcttgtcg 900

tgaggacaga aattgcatta tagataaacg acaaagaaat cgttgccagt attgtcgtta 960

tcaaaagtgt ttagcttgtg gcatgaaacg cgaagcggtc caagaggaac gacaacgtgg 1020

tactcgtgct gctaacgcta gagctgcctt ttgctcggct tcaatgatgc gttctatagt 1080

gagatcacgt aatgaactgc tgggtttaaa gtcttctccg ccagcaccaa ccacattgct 1140

taccccacca ccacctcctc caccaccgcc agcaccagca gctctagcgt tagcagcacg 1200

agtaccacgt tgtcgttcct cttggaccgc ttcgcgtttc atgccacaag ctaaacactt 1260

ttgataacga caatactggc aacgatttct ttgtcgttta tctataatgc aatttctgtc 1320

ctcacgacaa gcatatgtca agtccttgcg tacggtacgt ttgaagaacc ctttacaacc 1380

ctcacaactg tagaccccat aatgttttcc actggcgcgg tctccacaaa tggaacacaa 1440

gtgtttcgaa ccactaaggg ggtgatttgg tggatacgta g 1481

<210> 135

<211> 1481

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a gene encoding gamma-tubulin 1/1-like of L. cuprina

<400> 135

taatacgact cactataggg aaaacgctgt aggtttgtat aagtttctta ggaaaacgat 60

cagacaaacg ttccataata taagagccca tgccggaacc agtaccaccg gctatagaat 120

ggcatagaac aaatccctcc aaggaatcac tgccatctgc ctcacgatca ataatgtcaa 180

aaatttcctc ttgtaatttt tcaccttgac tatagccgga agcccaattg ttgccggcac 240

caccaccatg tttagacaag taaacatttt cgggattata taacttggca tagggtgaac 300

tcataatggt gtgtataact cgcggctcca aatccaaaag tacggcacgt ggtatatagt 360

gatcatcgtc agcctgataa aagaatacat ccttgcgatc tactccatct gtagcaaaat 420

cctctaacac tccactaggt gaaatgctat acacaccatt atgagttcac cctatgccaa 480

gttatataat cccgaaaatg tttacttgtc taaacatggt ggtggtgccg gcaacaattg 540

ggcttccggc tatagtcaag gtgaaaaatt acaagaggaa atttttgaca ttattgatcg 600

tgaggcagat ggcagtgatt ccttggaggg atttgttcta tgccattcta tagccggtgg 660

tactggttcc ggcatgggct cttatattat ggaacgtttg tctgatcgtt ttcctaagaa 720

acttatacaa acctacagcg ttttcccgta ccacaaccct acgttatcct tcatatatga 780

ataataattt gataggattg acggcacctt tgatacctac cccccaatta cattttctaa 840

tgaccggtta tactcctcta actacagata gtgatcccaa tttgaatata cgcaaaacta 900

cggtactaga tgttatgaga cgtttattgc aacccaaaaa tatgatggtt tcatcgggtc 960

cggataaagc aaatattcat tgttatattt ccatattaaa tattatacag ggtgaagtag 1020

atcccactca agtccacaaa tctctactga ttggccatca ttaggcccga aactttatga 1080

ttactttgta tatatggaga acttctggac aaggctactt gtatactggc cggaccccag 1140

ggtatgaatt gagctaattt gcgttcacgt atacgttgta gagatttgtg gacttgagtg 1200

ggatctactt caccctgtat aatatttaat atggaaatat aacaatgaat atttgcttta 1260

tccggacccg atgaaaccat catatttttg ggttgcaata aacgtctcat aacatctagt 1320

accgtagttt tgcgtatatt caaattggga tcactatctg tagttagagg agtataaccg 1380

gtcattagaa aatgtaattg gggggtaggt atcaaaggtg ccgtcaatcc tatcaaatta 1440

ttattcatat atgaaggata acgtagggtt gtggtacgta g 1481

<210> 136

<211> 1605

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 136

atggcaaagg acgacgggta ccccccggcg cggacgctgc cggagacgcc gtcctgggcg 60

gtggcgctgg tcttcgccgt catgatcatc gtctccgtcc tcctggagca cgcgctccac 120

aagctcggcc attggttcca caagcggcac aagaacgcgc tggcggaggc gctggagaag 180

atgaaggcgg agctgatgct ggtgggattc atctcgctgc tgctcgccgt cacgcaggac 240

ccaatctccg ggatatgcat ctcccagaag gccgccagca tcatgcgccc ctgcaaggtg 300

gaacccggtt ccgtcaagag caagtacaag gactactact gcgccaaaga gggcaaggtg 360

gcgctcatgt ccacgggcag cctgcaccag ctccacatat tcatcttcgt gctagccgtc 420

ttccatgtca cctacagcgt catcatcatg gctctaagcc gtctcaagat gagaacatgg 480

aagaaatggg agacagagac cgcctccttg gaataccagt tcgcaaatga tcctgcgcgg 540

ttccgcttca cgcaccagac gtcgttcgtg aagcggcacc tgggcctgtc cagcaccccc 600

ggcgtcagat gggtggtggc cttcttcagg cagttcttca ggtcggtcac caaggtggac 660

tacctcatct tgagggcagg cttcatcaac gcgcacttgt cgcagaacag caagttcgac 720

ttccacaagt acatcaagag gtccatggag gacgacttca aagtcgtcgt tggcatcagc 780

ctcccgctgt gggctgtggc gatcctcacc ctcttccttg atatcgacgg gatcggcaca 840

ctcacctggg tttctttcat ccctctcatc atcctcttgt gtgttggaac caagctagag 900

atgatcatca tggagatggc cctggagatc caggaccggt cgagcgtcat caaggggggca 960

cccgtggtcg agcccagcaa caagttcttc tggttccacc gccccgactg ggtcctcttc 1020

ttcatacacc tgacgctgtt ccagaacgcg tttcagatgg cacatttcgt gtggacagtg 1080

gccacgcccg gcttgaagga ctgcttccat atgaacatcg ggctgagcat catgaaggtc 1140

gtgctggggc tggctctcca gttcctgtgc agctacatca ccttcccct ctacgcgcta 1200

gtcacacaga tgggatcaaa catgaagagg tccatctttg acgagcagac agccaaggcg 1260

ctgaccaact ggcggaacac ggccaaggag aagaagaagg tccgagacac ggacatgctg 1320

atggcgcaga tgatcggcga cgcaacaccc agccgaggca cgtccccgat gcctagccgg 1380

ggctcatcgc cggtgcacct gcttcagaag ggcatgggac ggtctgacga tccccagagc 1440

gcaccgacct cgccaaggac catggaggag gctagggaca tgtacccggt tgtggtggcg 1500

catcctgtac acagactaaa tcctgctgac aggcggaggt cggtctcttc atcagccctc 1560

gatgccgaca tccccagcgc agatttttcc ttcagccagg gatga 1605

<210> 137

<211> 1277

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct, targeting Mlo from Triticum aestivum

<400> 137

taatacgact cactataggg tgccccttg atgacgctcg accggtcctg gatctccagg 60

gccatctcca tgatgatcat ctctagcttg gttccaacac acaagaggat gatgagaggg 120

atgaaagaaa cccaggtgag tgtgccgatc ccgtcgatat caaggaagag ggtgaggatc 180

gccacagccc acagcgggag gctgatgcca acgacgactt tgaagtcgtc ctccatggac 240

ctcttgatgt acttgtggaa gtcgaacttg ctgttatgcg acaaatgcgc gttgatgaag 300

cctgccctca aggtgaggta gtccaccttg gtgaccgacc tgaagaactg cctgaagaag 360

gccaccaccc atctgacgcc gggggtgctg gagaggggtt cgacttccac aagtacatca 420

agaggtccat ggaggacgac ttcaaagtcg tcgttggcat cagcctcccg ctgtgggctg 480

tggcgatcct caccctcttc cttgatatcg acgggatcgg cacactcacc tgggtttctt 540

tcatccctct catcatcctc ttgtgtgttg gaaccaagct agagatgatc atcatggaga 600

tggccctgga gatccaggac cggtcgagcg tcatcaaggg ggcacccgac gtcgagccca 660

gcaacaagtt cttctggttc caccgccccg actgggtcct cttcttcata cacctgacgc 720

tgttccagaa gtcacacaga tgggatcaaa catgaagagg tccatcttcg acgagcagac 780

agccaaggcg ctgaccaact ggcggaacac ggccaaggag aagaagaagg tccgagacac 840

ggacatgctg atggcgcaga tgatcggcga cgcgacgccc agccgaggca cgtcccccac 900

cacaaccggg tacatgtccc tagcctcctc catggtcctt ggcgaggtcg gtgcgctctg 960

gggatcgtca gaccgtccca tgcccttctg aagcaggtgc accggcgatg agccccggct 1020

aggcatcggg gacgtgcctc ggctgggcgt cgcgtcgccg atcatctgcg ccatcagcat 1080

gtccgtgtct cggaccttct tcttctcctt ggccgtgttc cgccagttgg tcagcgcctt 1140

ggctgtctgc tcgtcgaaga tggacctctt catgtttgat cccatctgtg tgacttctgg 1200

aacagcgtca ggtgtatgaa gaagaggacc cagtcggggc ggtggaacca gaagaacttg 1260

ttgctgggct cgacgtc 1277

<210> 138

<211> 1527

<212> DNA

<213> Vitis pseudoreticulata

<400> 138

atggctggcg acgaggagac gacgacgacg gcagcaacac ttgaaacaac gtccacttgg 60

gctgttgcct ctgtttgctt tattttgatt gcactctcca tacttattga gcatgccctc 120

catctcttag ccaagtactt caacaagaag cggaggaggt ctctcattca tgctcttaac 180

aacgtcaaat cggagttgat gctcttgggg ttcgtctctt tgttgctgac tgtgtgccaa 240

aagtatattg cgaagatttg tatcccaagg agcgtaggtg aaacttttct tccctgcaag 300

accttgacag aaagtgattc agaagaagaa accaaatgcg aagagcaggg aaagatgtct 360

ttgctgtcta gacaaggcgt ggaggaacta caatacttaa ttttcgtgct ggccttcttc 420

cattccctct actgcgtcct cacattcggt cttgggatgg ccaagatgaa gaaatgggag 480

tcctgggagg cagaaacaag aacactggaa tatcagttta caaatgatcc acggaggttc 540

aggctcatcc atcagacatc atttggaaag caacatctga gatattggag tgagcatcag 600

atacttcgtt ggccggcttg ttttattcgg cagttctatc catccgtctc caaagtggat 660

tacttgactc ttagacatgg gttcattatg gcccattttg cagaaggaag caactatgac 720

ttccaaaagt atataaaaag agctttggaa aaagactttg gagtggtggt gggaggaagt 780

ttctgggttt ggagtttctc catgcttttt gtgttcttca atgctcaagt attttacaac 840

tatttatggc tacccтttat tccattggtg atgctgttgt tggttggaac aaagctacag 900

ggcattataa ctaagatgtg cttagatagc catgataaag ctctcgttgt tagaggaact 960

ttgcttgtca ggcccagtga tcacttcttc tggtttggaa aaccggaatt gctcctacat 1020

cttatgcact ttatattgtt tcagaactct tttcaactgg cgttctttac atggacttgg 1080

tacaaatttg gattcagatc atgcttccat gatacaactg aggatatcgt cataaggctt 1140

gtcatgggtg tgttagtaca actcctttgt ggctacgtga cactgcctct gtatgccctg 1200

gtcacgcaga tggggacatc aatgaggaca attgtcttta ctgagggagt cgttgaaggt 1260

ctgaacagat ggagaaggaa agccaagaaa aacatagcac gcaggaacaa ccactcagct 1320

cgtccctccc tggatgcttc actcgacaat tcaccttctt ttaacactct ggatacttct 1380

ttctctgtag acctcgatca gccatcatca gatgctggtt atttgactgt tgaaatatca 1440

gatgaagaga cggtcgctac taaacggcca gaaccgcgtc agaagttggg atcttttgag 1500

ggtttcgact cgtgcaaaac atcataa 1527

<210> 139

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DNA encoding a ledRNA construct targeting a Vitis MLO gene

<400> 139

taatacgact cactataggg tagccataaa tagttgtaaa atacttgagc attgaagaac 60

acaaaaagca tggagaaact ccaaacccag aaacttcctc ccaccaccac tccaaagtct 120

ttttccaaag ctctttttat atacttttgg aagtcatagt tgcttccttc tgcaaaatgg 180

gccataatga acccatgtct aagagtcaag taatccactt tggagacgga tggatagaac 240

tgctgaataa aacaaaccgg ccaacgaagt atccgatgct cactccaata tctcagatgt 300

tgctttccaa atgatgtctg atggatgagc gtgaacctcc gtggatcatt tgtaaactga 360

tattccagtg ttcttgtttc tgcctcccag gactcccatt tcttcatctt ggccatccca 420

agaccgaatg tgaggacgca gtagagcaca tcatttggaa agcaacatct gagatattgg 480

agtgagcatc ggatacttcg ttggccggtt tgttttattc agcagttcta tccatccgtc 540

tccaaagtgg attacttgac tcttagacat gggttcatta tggcccattt tgcagaagga 600

agcaactatg acttccaaaa gtatataaaa agagctttgg aaaaagactt tggagtggtg 660

gtgggaggaa gtttctgggt ttggagtttc tccatgcttt ttgtgttctt caatgctcaa 720

gtattttaca actatttatg gctacccgta attccattgg tgatgctgtt gttggttgga 780

acaaagctac agggcattat aactaagatg tgcctagata gccatgataa agctctcgtt 840

gttagaggaa ctttgcttgt caggcccagt gatcacttct tctggtttgg aaaaccggaa 900

ttgctcctac atcttatgca ctttatattg tttcagaact cttttcaact ggcgttcttt 960

acatggactt ggtacaaatt tggattcaga tcatgcttcc atgatacaac tgaggatatc 1020

gtcataaggc ttgtcatggg tgtgttatgg ctttccttct ccatctgttc agaccttcaa 1080

cgactccctc agtaaagaca attgtcctca ttgatgtccc catctgcgtg accagggcat 1140

acagaggcag tgtcacgtag ccacaaagga gttgtactaa cacacccatg acaagcctta 1200

tgacgatatc ctcagttgta tcatggaagc atgatctgaa tccaaatttg taccaagtcc 1260

atgtaaagaa cgccagttga aaagagttct gaaacaatat aaagtgcata agatgtagga 1320

gcaattccgg ttttccaaac cagaagaagt gatcactggg cctgacaagc aaagttcctc 1380

taacaacgag agctttatca tggctatcta ggcacatctt agttataatg ccctgtagct 1440

ttgttccaac caacaacagc atcaccaatg gaattacgta 1480