

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02112818.9

[45] 授权公告日 2006年2月8日

[11] 授权公告号 CN 1240439C

[22] 申请日 2002.3.28 [21] 申请号 02112818.9

[71] 专利权人 南京凯基生物科技发展有限公司

地址 210009 江苏省南京市中央路238号三  
楼

[72] 发明人 叶青 王雪根 陈武领 冯莹

审查员 宋智刚

[74] 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公  
司

代理人 徐冬涛

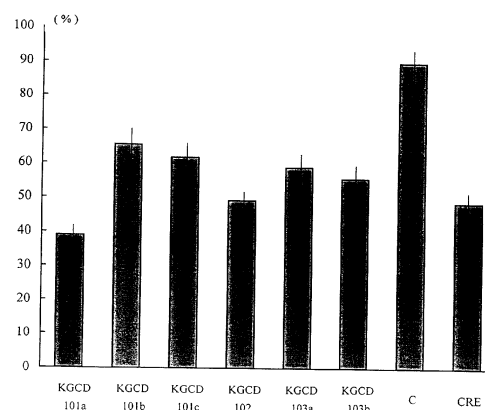
权利要求书1页 说明书15页 附图3页

## [54] 发明名称

肿瘤基因开关药物

## [57] 摘要

本发明涉及肿瘤基因开关药物的是由一段序列特异的 decoy 核酸组成的药物，此类核酸可在细胞内特异地结合某些癌基因的转录调控因子，阻抑这些癌基因的过度表达，从而抑制肿瘤细胞生长，可发展成为肿瘤基因治疗的药物。



- 
1. 一种肿瘤基因开关药物，其特征是由序列 6 构成的寡聚脱氧核糖核酸组成。
  2. 根据权利要求 1 所述的寡聚脱氧核糖核酸，其具有硫基、甲基、酰胺基中任何一种基团修饰的磷酸二酯键。
  3. 权利要求 1 所述的寡聚脱氧核糖核酸与生理盐水、磷酸缓冲液或脂质体组成的药物组合物。
  4. 权利要求 1 所述的寡聚脱氧核糖核酸在制备抗肿瘤药物中的应用。

## 肿瘤基因开关药物

### 技术领域:

肿瘤治疗药物。

### 背景技术:

从分子水平来看,肿瘤是涉及多基因活动异常的疾病,每种组织癌变或每种细胞表型都涉及数十乃至数百种基因活动。把哪个基因作为治疗靶点仍不明确。但现在已初步明晰,肿瘤的发生是多步骤多阶段进行的。与某一细胞表型相关基因群的活动是按时空有序进行的,有级联式表达规律,处于级联式下游的功能基因的活动是受上游的调控基因所控制。因此,通过改变上游的调控基因的活动异常,仍可以控制整个下游基因群的活动,进而使细胞表型从恶性表型恢复至良性表型,达到治愈肿瘤的目的。

上游的调控基因即是表达细胞核因子(DNA结合蛋白)的基因,包括肿瘤发生相关的原癌基因和抑癌基因。由于某些外界因素作用下,原癌基因激活而过度表达和抑癌基因的失活。即调控基因发生失控紊乱,本身表达调控失常,并引发其他下游基因调控及表达失常的连锁反应,导致肿瘤发生,因此,原癌基因、抑癌基因是肿瘤基因治疗的重要靶点。

肿瘤细胞一个特征是原癌基因过度表达,其中 c-myc 在髓性白血病、B 淋巴瘤、T 淋巴瘤、肉瘤等多种肿瘤均有高表达,并在白血病、乳腺癌、胃癌、小细胞肺癌、结肠癌、神经细胞瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤均有不同程度的扩增。在人肝癌细胞低甲基化引起过度表达。c-fos 在骨肉瘤、淋巴瘤等过度表达。c-jun 在小细胞性肺癌和非小细胞性肺癌、结肠直肠癌高表达。在肿瘤的启动、促瘤阶段,有 c-myc、c-jun 的高表达(与肿瘤发生有关)。

肿瘤细胞另一特征:失去细胞周期特异性,失去对细胞增殖信号的反应能力,而 c-myc 过度表达是细胞增殖的前提之一。MYC-MAX 异二聚体结合于 E-box,激活本身及下游通讯基因 CYC25A 等表达,形成细胞增殖表型,并与 E2F 共同作用,激活 cyclinA、cyclin E,在细胞周期中 G1→S 期的转化是起关键作用。c-myc 还可活化端粒酶的表达,在促进肿瘤形成上起重要作用。c-jun 和 c-fos 在 RAS 信号传导途径的下游核相中起重要作用。(被称为早期快速反应基因或第三信使)。c-myc 和 c-fos 在细胞分化中起重要作用。此外,

c-myc、c-fos、c-jun 在细胞凋亡、基因组稳定、细胞成熟中有重要作用。因此，改变 c-myc、c-fos、c-jun 的调控异常，从而可以改变恶性增殖表型为良性表型，

原癌基因和抑癌基因在正常细胞和肿瘤细胞同时存在，不同的是两类细胞中的表达程度不同，肿瘤细胞是原癌基因过度表达，是正常细胞的 2~10 倍，且抑癌基因失活。这说明基因的表达调控出现了异常，这种异常是基因的调控区上顺反式因子结合状态及数量的发生了改变，如何消除这种异常，改变基因调控状态，目前世界上有一种新的策略即转录因子“诱饵”（decoy）的方法，用特异性的 DNA 序列结合转录调控因子（包括原癌基因上增强子上的转录激活因子和抑癌基因沉默子上的转录抑制因子），改变调控基因的表达状态，从而改变细胞表型。

人们在 DNA 与蛋白质相互作用关系的基础研究中，已发现并证实：体外合成一段序列特异的短链 DNA，可与细胞核蛋白提取物中某一种因子结合，在聚丙烯酰胺电泳中产生凝胶阻滞现象，为现在 decoy 核酸发展成为药物提供了实验基础。自从 90 年代来，Bielinska(1990)提出用双链寡聚核酸调控基因表达以来，decoy 核酸已首先用于在治疗心血管药物开发，用 E2F 因子的 decoy 核酸治疗静脉搭桥术后血管的内膜增生（Mann.et al 1999）已进入临床，用 NF-Kappa  $\beta$  的 decoy 核酸防治心肌梗塞（Sawa. 1997 .Tounita. 1998），还有 AGE、SRF 的 decoy 核酸等。decoy 核酸应用于肿瘤治疗刚处于起步阶段，如：CREB 因子的 decoy 核酸（Cho-chong 1999）已在多种肿瘤细胞株及动物模型开展。ER 的 decoy 核酸（PivaR et al 2000），用于抑制乳腺癌细胞生长。NF-Kappa  $\beta$  的 decoy 核酸（Sharma.HW et al）在小鼠纤维瘤体内外试验取得一定抑制效果。

#### 发明内容：

本发明的目的之一是提供肿瘤基因开关药物，其特征是一系列序列特异的 decoy 核酸，可特异性结合各自转录调控因子。下调过度表达的癌基因 c-fos、c-jun、c-myc，从而抑制肿瘤细胞的恶性增殖，达到治疗肿瘤的目的。

本发明的另一目的是提供含有本发明 decoy 核酸药物组合物。

本发明的另一目的是本发明 decoy 核酸用于制备抗肿瘤药物的用途。

本发明的目的可以通过以下措施来达到：

肿瘤基因开关药物的设计是将转录因子特异结合的序列作为药物 decoy 核酸的核心序列，并适当增加核心序列的侧翼长度，使其易形成空间结构，以加强药物的稳定性及与靶因子的亲和力。

药物 KGCD101A 系列是为调控原癌基因 C-FOS 的过度表达而设计的。根据原癌基因

C-FOS 的调控区结合了多个因子，如：SRF、CREB、AP-1、SIF 因子等，其中 CREB 因子的结合位点 CRE 增强子序列 STGACGTMR（序列 1）作为药物 decoy 核酸的核心序列，竞争结合 CREB，下调原癌基因 C-FOS 的表达。例如：药物 KGCD101a（序列 6）由 34 个核苷酸组成，含此核心序列，并具有发夹结构。另如：药物 KGCD101a-1 也可以是由含此核心序列的序列 7 和序列 8 组成，48 个核苷酸，两个序列结合成双链过程中形成十字形结构。药物 KGCD101a-2 是由序列 7 与序列 9 形成 T 形结构。总之，这类 decoy 核酸药物，可以设计为以 STGACGTMR 为核心序列，核苷酸总数为 15-55 个。并易形成发夹、假结、茎环、哑铃、十字多种二级结构的短链 DNA 分子。

药物 KGCD101B 和 KGCD101C 系列是为调控多种原癌基因而设计的。FOS-JUN 形成异源二聚体，成为 AP-1 转录激活因子，其结合于多个基因的顺式元件 STGASTMA（序列 2）上，激活多种基因的表达。采用该序列为药物 decoy 核酸的核心序列，下调含 AP-1 增强子基因的表达，从而抑制肿瘤细胞的生长。例如：药物 KGCD101b 由序列 10 和序列 11 构成的，含此核心序列，核苷酸总数为 42 个的双链 DNA 分子。药物 KGCD101b-1(序列 12),有 35 个核苷酸并含此核心序列，具有发夹结构。药物 KGCD101b-2（序列 13）有 42 个核苷酸并含此核心序列，具有哑铃结构，可用连接酶使 5' 和 3' 端连接成闭环，以增加药物稳定性。药物 KGCD101C 由序列 14 和序列 15 组成，其核苷酸总数为 42 个，含此核心序列，具有十字形结构。药物 KGCD101c1 由序列 16 和序列 17 组成，其核苷酸总数为 44 个，含此核心序列，具有十字形结构。总之，这类 decoy 核酸药物，可以设计为以 STGASTMA（序列 2）为核心序列，核苷酸总数为 15-55 个，并易形成发夹、假结、茎环、哑铃、十字多种二级结构的短链 DNA 分子。

药物 KGCD102 系列是为调控原癌基因 c-jun 而设计的。根据 c-jun 自身活化表达的作用。c-jun 蛋白结合自身基因的增强子序列 TTACCTCA(序列 3),该序列作为药物 KGCD102 系列的 decoy 核酸的核心序列，下调 c-jun 表达。例如药物 KGCD102（序列 18）为含此核心序列，核苷酸总数为 37 个,具有发夹结构的此类 decoy 核酸药物之一。另有药物 KGCD102-1（序列 19）为 40 个核苷酸，具有发夹结构。药物 KGCD102-2（序列 20）为 38 个核苷酸，具有哑铃结构。药物 KGCD102-3（序列 21 和序列 22）为 54 个核苷酸，具有茎环结构。总之，这类 decoy 核酸药物，可以设计为以 TTACCTCA（序列 3）为核心序列，核苷酸总数为 15-55 个，并易形成发夹、假结、茎环、哑铃、十字多种二级结构的短链 DNA 分子。

药物 KGCD103a 系列是为调控原癌基因 C-MYC 而设计的。根据 C-MYC 与自身增强

子 TCTCTTA (序列 4) 序列结合, 将此核心序列作为 decoy 核酸药物的基本组成, 下调 C-MYC 基因表达。例如: 药物 KGCD103a 由序列 23 和序列 24 形成的: 双链 DNA 组成, 52 个核苷酸含此核心序列。药物 KGCD103a-1 (序列 25) 有含此核心序列的 35 个核苷酸, 发夹结构。药物 KGCD103a-2 由序列 26 和序列 27 形成的: 茎环结构组成, 43 个核苷酸含此核心序列。药物 KGCD103a-3 由序列 28 和序列 29 形成的锤形结构组成, 36 个核苷酸含此核心序列。总之, 这类 decoy 核酸药物, 可以设计为以 TCTCTTA (序列 4) 为核心序列, 核苷酸总数为 15-55 个, 并易形成发夹、假结、茎环、哑铃、十字多种二级结构的短链 DNA 分子。

药物 KGCD103b 是为调控控制细胞周期的相关基因而设计的。根据 MYC-MAX 异源二聚体促进细胞增殖, 使细胞失去周期特异性, 顺式元件 RACCACGTGGTY (序列 5) 作为 decoy 核酸的核心序列, 体外合成并导入细胞, 与基因本身的顺式元件竞争结合 MYC-MAX 复合二聚体, 抑制下游基因表达, 改变恶性增殖表型。例如: 药物 KGCD103b (序列 30) 为 32 个核苷酸, 含此核心序列。药物 KGCD103b-1 由序列 31 和序列 32 形成的十字结构, 47 个核苷酸, 含此核心序列。总之, 这类 decoy 核酸药物, 可以设计为以 RACCACGTGGTY (序列 5) 为核心序列, 核苷酸总数为 15-55 个, 并易形成发夹、假结、茎环、哑铃、十字多种二级结构的短链 DNA 分子。

decoy 核酸药物经 DNA 全自动合成仪合成, 硫代化, 脱保护, 纯化和冻干, 溶于水中, 定量定性测定分析后, 进行体外筛选和药效试验, 用 NCI-H460 肺癌细胞作为筛选体系, 将细胞加入 96 孔培养板, 用 RPMI 1640 完全培养液培养 24h 后, 加入脂质体和上述 decoy 核酸, 继续于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中培养 48h。用 SRB 比色法测定细胞的成活率。筛选结果表明六种 decoy 核酸对 NCI-H460 细胞都有不同程度的抑制作用, 其中 KGCD101a 和 KGCD102 的抑制作用最大。这些 decoy 核酸都可开发成为抗肿瘤药物。

本发明的优点:

decoy 核酸与反义核酸不同, 结构上的差异为: 反义核酸为单链线性寡聚核酸, decoy 核酸可形成双链并具二级结构; 作用位点的差异: 反义核酸互补于基因的转录产物 mRNA 的某段序列, decoy 核酸结合于基因转录调控因子 (蛋白质) 上; 用量上的差异: 一个拷贝基因转录出 200~300 条 mRNA, 且 mRNA 具有瞬时性, 需反义核酸药量大, 而一个拷贝基因上转录调控因子仅 1~数个, 需 decoy 核酸药量少。

因 decoy 核酸的核心序列在 6~12 个碱基对之间, 链短易降解, 双链不稳定, 常温下易解链。无二级空间结构不易与蛋白结合, 因而设计药物时需适当增加碱基, 加长链长, 增

强稳定性及与转录因子的亲和性,其中以回文结构、发夹、十字、茎环、哑铃状等结构最佳,因此 decoy 核酸被设计成含有上述核心序列的 15~55 碱基之间,可合成出单链,自交形成双链及其二级结构,也可各合成两条单链,杂交形成双链。因核酸在细胞内极易被核酸酶降解失去活性,因此需修饰保护,以增强抗降解能力,提高稳定性。硫代修饰为最常见的保护基团。

综上所述,本发明所述的五类 decoy 核酸对肿瘤细胞均有抑制作用,在抗肿瘤药物开发上有相当大的应用前景,本发明的 decoy 核酸药物可以与药用载体合,药用载体包括生理盐水等常用载体和缓冲液及脂质体、聚合物等。

#### 附图说明:

图 1: KGCD 系列的 decoy 核酸对肿瘤细胞 NCI—H460 的生长抑制图

图 2 : KGCD101a 和 KGCD102 decoy 核酸对各种细胞的生长抑制图

图 3 : KGCD101a 和 KGCD102 decoy 核酸对肿瘤细胞 NCI—H460 的半致死剂量 (IC<sub>50</sub>) 图

如图 1 所示:将肺癌细胞株 NCI—H460 分为阳性对照组、阴性对照组、空白对照组和六种 KGCD 系列的 decoy 核酸实验组,分别接种于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中的 96 孔培养板,接种数量为  $2-3 \times 10^4$ /孔,培养 24 小时后,更换成无血清培养液,空白对照组仅加入 0.6  $\mu$ l/孔脂质体,其余均加入 0.6  $\mu$ l/孔脂质体和终浓度为 200nM 的不同 decoy 核酸,处理 5 小时后,更换成含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 小时后,用 SRB 染色,酶标仪于  $\lambda_{510nm}$  测定其 OD 值,并计算细胞存活率,以空白对照组数值为 100%,作出细胞生长抑制图。从图 1 中可见:CRE 代表阳性对照组的试验结果,C 代表阴性对照组的试验结果,其余的 6 组均为 KGCD 系列 decoy 核酸实验组的试验结果,这 6 组 KGCD 系列 decoy 核酸对 NCI-H460 细胞均显示出不同程度的抑制作用,其中以 KGCD101a 和 KGCD102 的抑制率最高。

如图 2 所示:用 KGCD101a 和 KGCD102 decoy 核酸分别处理下述肿瘤细胞株 NCI--H460 (肺癌),CNE (鼻咽癌),U251 (神经胶质瘤),MCF-7 (乳腺癌),BEL-7402 (肝癌)和正常细胞株:L-02 (肝细胞)和 NIH3T3,最浅色柱体代表阴性对照组(错配序列),对各种细胞生长影响较小。而用 KGCD101a 和 KGCD102 decoy 核酸对各种肿瘤细胞生长均有不同程度的抑制作用,其中对 U251 (神经胶质瘤)和 NCI-H460 (肺癌)抑制最大,而对正常细胞株的生长影响较小。

如图 3 所示：用不同浓度的 KGCD101a 和 KGCD102 的 decoy 核酸处理肿瘤细胞 NCI—H460，由图可见：KGCD101a 和 KGCD102 在较低浓度的条件下对 NCI—H460 细胞有抑制作用，它们的半致死量为 30~50nM，而阴性对照组则对细胞生长无剂量差异。

具体实施方式：

#### 实施例 1 decoy 核酸药物的制备和分析

合成六种下述硫代 decoy 核酸药物：KGCD101a（序列 6），KGCD101b（序列 10 和序列 11），KGCD101c：（序列 14 和序列 15），KGCD102：（序列 18），KGCD103a：（序列 23 和序列 24），KGCD103b（序列 30）。

阴性对照序列：5'—TGTGGTCATGTGGTCATGTGTCA—3'

阳性对照序列：5'—TGACGTCATGACGTCATGACGTCA—3'

使用美国 PE 公司应用生物系统部 (Applied Biosystems) 制造的 391 型 DNA 合成仪。以亚磷酸胺固相合成法合成硫代的所设计的 decoy 核酸。主要原料有：四种二异丙基 β-氰乙基亚磷酸胺单体：腺苷 (A)、鸟苷 (G)、胞苷 (C)、胸苷 (T)，四种控制孔径玻璃粉 (CPG) 固相合成柱 (A, G, C, T)。合成规模为 10 微摩尔。盖帽试剂分别为：乙酸酐/二甲基吡啶/四氢呋喃和 1-甲基咪唑/四氢呋喃，硫代反应试剂：Beaucage 试剂/乙腈，脱三苯甲基试剂：三氯乙酸/二氯甲烷，液体溶剂：乙腈和三氯甲烷。碱基单体溶于无水乙腈中，浓度为 100 毫摩尔，其它试剂浓度及用量均按照仪器手册进行。合成过程由仪器本身程序控制。合成产物用浓氨水 (29%) 收集在密封耐压的玻璃瓶中，于 55℃ 处理 15 小时脱去核酸分子上各种碱基保护基团和氨基保护基团。脱保护结束后挥发脱去大部分氨气，冻干得白色粉末状粗品，重新溶于缓冲液中，用 Pharmacia Source 30 Q 层析及 AKTA 层析系统进行纯化。纯化样品 G-15 分子筛葡聚糖凝胶层析柱除盐，冻干，得白色絮状核酸纯品。储存于 -20℃ 取少量样品进行分析：用毛细管电泳法测其纯度及分子量和高效液相层析法测纯度均为 90% 以上，DNA 测序法测定序列完全正确，核磁共振法测硫代化程度大于 98.5%。

#### 实施例 2 六种 KGCD 系列 decoy 核酸对肺癌 NCI-H460 细胞的生长抑制

将肺癌细胞株 NCI—H460 分为阳性对照组、阴性对照组、空白对照组和六种 KGCD 系列的 decoy 核酸实验组，分别接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中的 96 孔培养板，接种数量为  $2-3 \times 10^4$  /孔，培养 24 小时后，更换成无血清培养液，空白对照组仅加入 0.6 μl /孔空脂质体，其余均加入 0.6 μl /孔脂质体和终浓度为 200nM 的不同 decoy 核酸，处理 5 小时后，更换成含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液，在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48



小时后,用SRB染色,酶标仪于 $\lambda_{510\text{nm}}$ 测定其OD值,并计算细胞存活率,以空白对照组数值为100%,作出细胞生长抑制图。从图中可见:CRE代表阳性对照组的试验结果,C代表阴性对照组的试验结果,其余的6组均为KGCD系列decoy核酸实验组的试验结果,这6种KGCD系列decoy核酸对NCI-H460细胞均显示出不同程度的抑制作用,其中以KGCD101a和KGCD102的抑制率最高。

### 实施例3 KGCD101a和KGCD102 decoy核酸对各种细胞的生长抑制

用KGCD101a和KGCD102 decoy核酸分别处理下述肿瘤细胞株NCI-H460(肺癌),CNE(鼻咽癌),U251(神经胶质瘤),MCF-7(乳腺癌),BEL-7402(肝癌)和正常细胞株:L-02(肝细胞)和NIH3T3,最浅色柱体代表阴性对照组(错配序列),对各种细胞生长影响较小。而用KGCD101a和KGCD102 decoy核酸对各种肿瘤细胞生长均有不同程度的抑制作用,其中对U251(神经胶质瘤)和NCI-H460(肺癌)抑制最大,而对正常细胞株的生长影响较小。

### 实施例4 药物KGCD101a和KGCD102对NCI-H460细胞的半致死量( $IC_{50}$ )

用不同浓度的KGCD101a和KGCD102(5-200nM)分别处理NCI-H460细胞,培养一定时间后,测其OD值。从如图3可以看出,KGCD101a和KGCD102在较低浓度的条件下对癌细胞有抑制作用,它们的半致死量为30~50nM,即为30~50 $\mu\text{g/ml}$ ,远远低于抗肿瘤药物筛选的标准( $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$ )。

### 实施例5 含decoy核酸的药物组合物

作为动物和人类体内给药的decoy核酸药物组合物组成如下:

decoy核酸KGCD101b: 1mg/ml

生理盐水或磷酸缓冲液(PH 7.4): 适量

本发明其它几种核酸也采用同样配方。

### 序列表

<110> 叶青

<120> 肿瘤基因开关药物

<160> 32

<210> 1

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

**stgacgtmr 9**

<210> 2

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

**stgastma 8**

<210> 3

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

**ttacctca 8**

<210> 4

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

**tctctta 7**

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

**raccacgtgg ty 12**

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

**gcctgacgtc aggggacttt ccctgacgtc aggc 34**

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

**gtttcgcggg gacgtcaccc tttc 24**

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

**gaaagggacg tacgtccgcg aaac 24**

<210> 9

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

**gaaaggcgcg aaac 14**

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

**cgcttgctga ctcagccgga a 21**

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

**ttccggctga gtcagcaagc g 21**

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

**gatcgtgact cagcgcgatt ttcgcgctga gtcac 35**

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

**actctctcag tctgactcat gctctcagca tgagtcagac tg 42**

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

**ctcaacctga ctcagaacct t 21**

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

**agggttact cagtgttga g 21**

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16

**ccggggctga ctcaggggca a 21**

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

**ttgccctaa cggtagccc cgg 23**

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

**ttacctcatt acctcagccc gtgaggtaat gaggtaa 37**

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

**ttacctcatt acctcattac ctcatgaggt aatgaggtaa 40**

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 20

**gagcccgtcg ttacctcatc agcccgtgat gaggtaac 38**

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 21

**ttacctcatt acgtcattac gtcattacct ca 32**

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 22

**tgaggtaatg ataatgaggt aa 22**

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

**tcaccatctc ttatgcggtt gaatag 26**

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

**ctattcaacc gcataagaga tggtag 26**

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

**tctcttatga ctaatctctt attagtcata agaga 35**

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

**tctcttagct ctcttagcct ctctta 26**

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27

**taagagaggc taagaga 17**

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 28

**gagtctctta ctcccgcgg 19**

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 29

**ccgcgggtct cttagac 17**

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 30

**cacggaacga gaccacgtgg tctcgttccg tg 32**

<210> 31

<211> 24

<212> DNA



<213> 人工序列

<400> 31

**ttctctgacc acgtggtcct cttc 24**

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 32

**gaagaggctc tcttagcaga gaa 23**

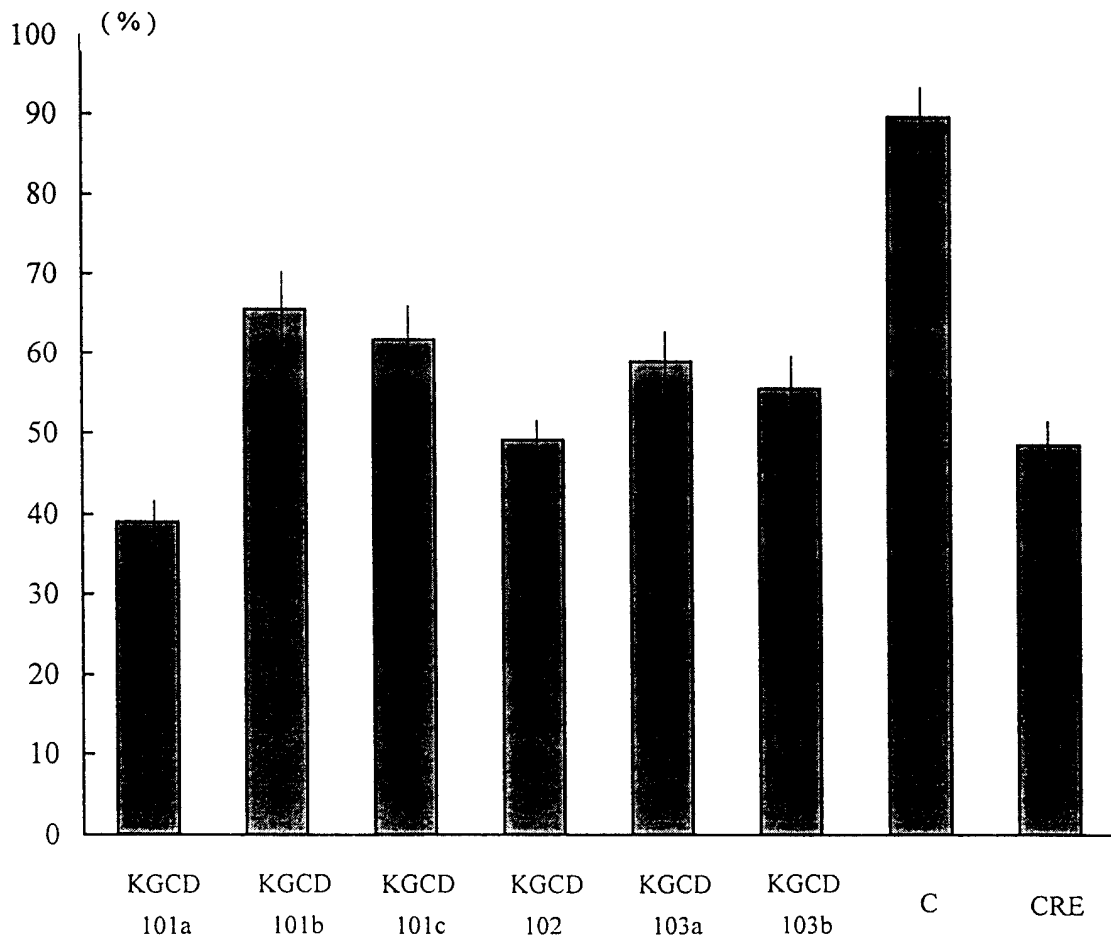


图 1

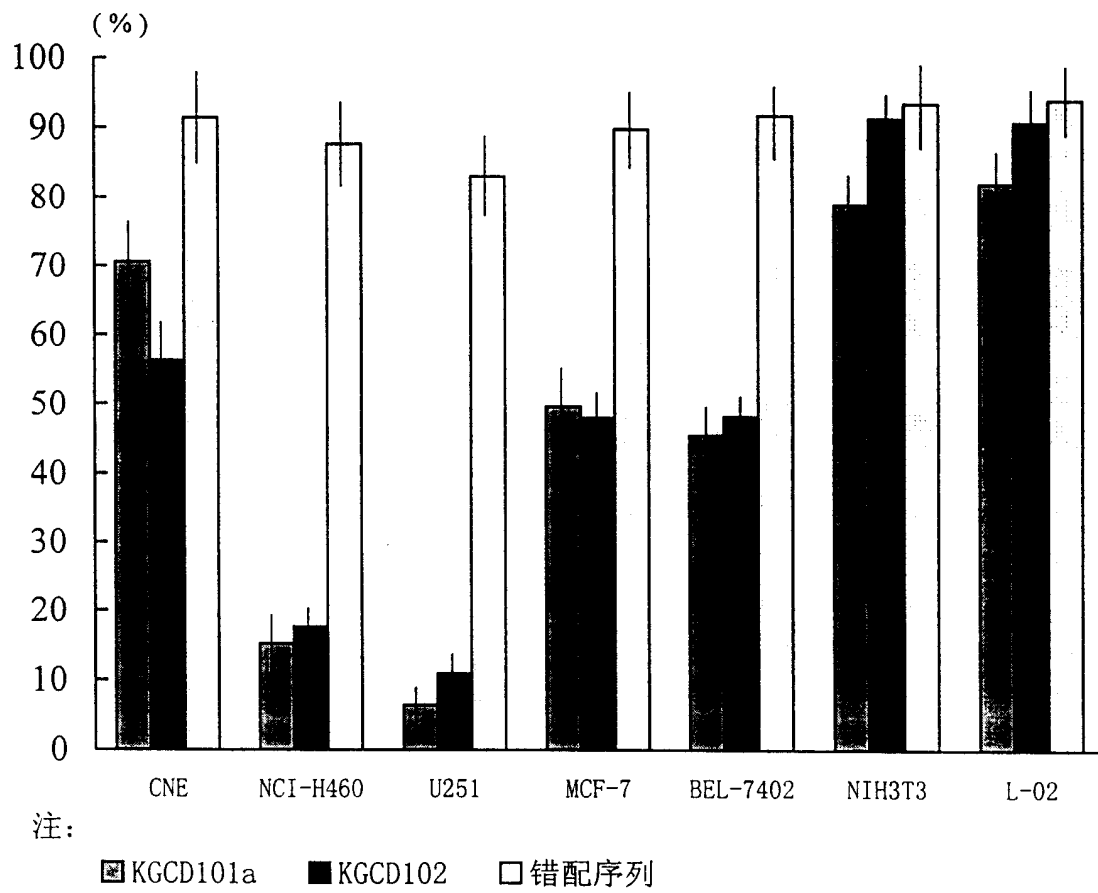


图 2

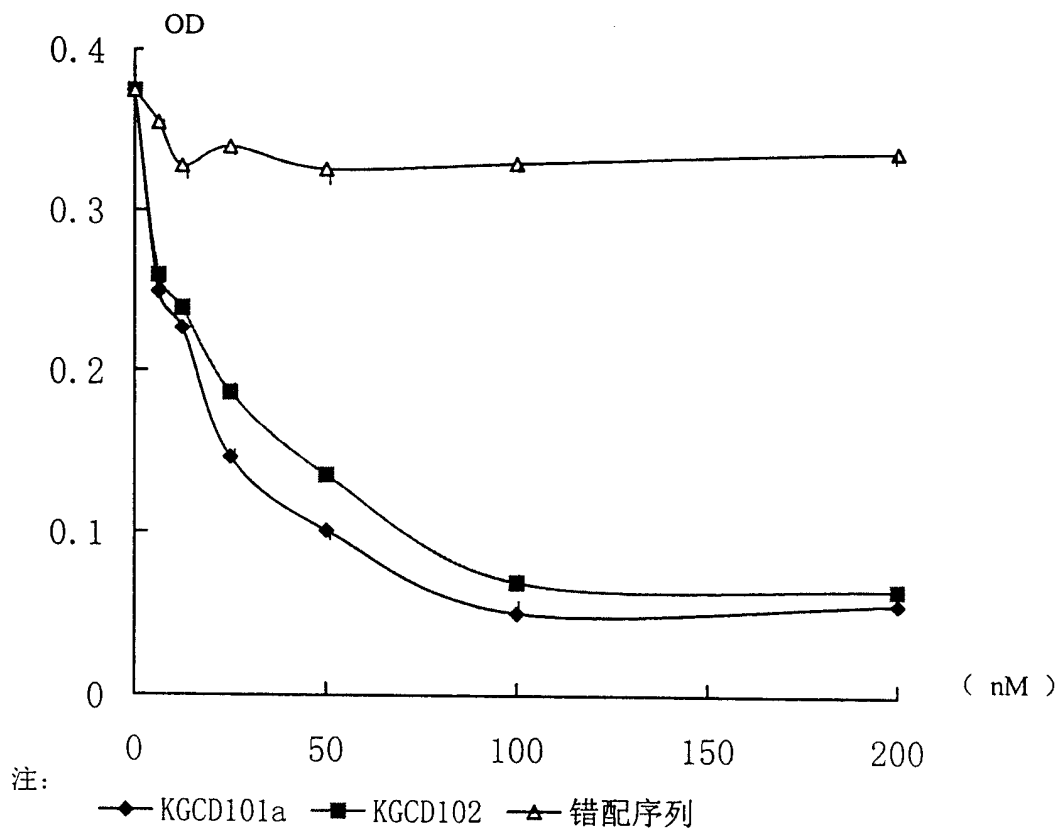


图 3