(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111386344 B
(45)授权公告日 2024.02.02

(21)申请号 201880074261.4

(22)申请日 2018.09.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111386344 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(30)优先权数据
102017000105372 2017.09.20 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2018/057262 2018.09.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/058304 EN 2019.03.28

(73)专利权人 意大利技术基金会
地址 意大利热那亚
专利权人 国际高等研究院

(72)发明人 S·古斯丁奇 S·祖切利

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
C12N 15/67(2006.01)

(56)对比文件
US 2017114369 A1,2017.04.27
CA 2872241 A1,2013.11.28
US 2004043468 A1,2004.03.04
CN 105624156 A,2016.06.01
CN 102762729 A,2012.10.31
CN 105209621 A,2015.12.30
US 2014107187 A1,2014.04.17
CN 1324401 A,2001.11.28
US 2007065924 A1,2007.03.22
Zucchelli S等.Engineering Translation in Mammalian Cell Factories to Increase Protein Yield: The Unexpected Use of Long Non-Coding SINEUP RNAs.Comput Struct Biotechnol J.2016,第14卷404-410..
Patrucco L等.Engineering mammalian cell factories with SINEUP noncoding RNAs to improve translation of secreted proteins.Gene.2015,第569卷(第569期),287-293.
Gosuke Hayashi等.Activation of prokaryotic translation by antisense oligonucleotides binding to coding region of mRNA.Biochemical and Biophysical Research Communications.2012,第429卷(第429期),105-110.
(续)

审查员 留盛鹏

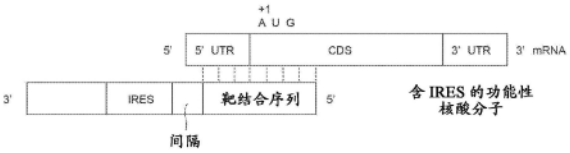
权利要求书1页 说明书25页
序列表57页 附图27页

(54)发明名称

功能性核酸分子及其用途

(57)摘要

公开了一种反式作用功能性核酸分子,其包含真核生物靶结合序列和调节序列,所述真核生物靶结合序列包含与待增强蛋白质翻译的靶mRNA序列反向互补的序列,所述调节序列包含内部核糖体进入位点(IRES)序列或内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列,并增强靶mRNA序列的翻译,其中所述调节序列位于靶结合序列的3'。



CN 111386344 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Ito T等. The 3′-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site.Journal of Virology.1998,第72卷(第72期),8789-8796.

卢明枝.CVB3 2A蛋白酶对蛋白翻译的影响.中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑.2015,(第undefined期),E059-75.

1.一种反式作用功能性核酸分子,其包含:

-靶结合序列,其包含与待增强蛋白质翻译的真核靶mRNA序列反向互补的序列;和

-调节序列,其由内部核糖体进入位点(IRES)序列组成,并增强靶mRNA序列的翻译,

其中所述调节序列位于靶结合序列的3'。

2.根据权利要求1所述的反式作用功能性核酸分子,其中所述靶结合序列由从3'至5'与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的1至50个核苷酸和靶mRNA序列的编码序列(CDS)的1至40个核苷酸反向互补的序列组成。

3.根据权利要求2所述的反式作用功能性核酸分子,其中所述靶结合序列由从3'至5'与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的10至45个核苷酸和靶mRNA序列的编码序列(CDS)的2至6个核苷酸反向互补的序列组成。

4.根据权利要求1所述的反式作用功能性核酸分子,其中所述IRES序列在所述反式作用功能性核酸分子中相对于功能性核酸分子的5'至3'方向以正向方向定向。

5.根据权利要求1所述的反式作用功能性核酸分子,其中所述的IRES序列是选自SEQ ID NO:36至SEQ ID NO:65的序列。

6.根据权利要求1所述的反式作用功能性核酸分子,其中所述反式作用功能性核酸分子是RNA分子或修饰的RNA分子。

7.根据权利要求1所述的反式作用功能性核酸分子,其进一步在所述靶结合序列和所述调节序列之间包含间隔序列。

8.一种DNA分子,其编码根据权利要求1至7中任一项所述的反式作用功能性核酸分子。

9.一种表达载体,其包含权利要求8所述的DNA分子。

10.一种体外增强蛋白质翻译的方法,其包括将根据权利要求1至7中任一项所述的反式作用功能性核酸分子或根据权利要求8所述的DNA分子或根据权利要求9所述的表达载体转染到细胞中。

11.一种组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的反式作用功能性核酸分子或根据权利要求8所述的DNA分子或根据权利要求9所述的表达载体。

12.根据权利要求1至7中任一项所述的反式作用功能性核酸分子或根据权利要求8所述的DNA分子或根据权利要求9所述的表达载体用于体外增强靶mRNA序列的翻译中的用途。

功能性核酸分子及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年9月20日提交的意大利专利申请号102017000015372的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及具有增强真核生物中特定靶mRNA的蛋白质翻译功能的反式作用的功能性核酸分子、编码此类分子的DNA分子、此类分子的用途以及增强蛋白质翻译的方法。

现有技术

[0004] 在真核生物中,mRNA主要通过帽依赖性机制进行翻译,根据所述帽依赖性机制,起始因子将40S核糖体亚基募集到mRNA的5'端的帽结构。但是,一些病毒和细胞信息在没有帽的情况下启动蛋白质合成(Thompson SR,Trends Microbiol 2012;Jackson RJ,Cold Spring Harb Perspect Biol.2013)。在这些情况下,称为内部核糖体进入位点(IRES)的结构化RNA元件募集40S核糖体亚基。IRES是20多年前在小核糖核酸病毒中发现的。在细胞中,IRES序列促进非帽依赖性的编码蛋白质的mRNA亚基的翻译,从而克服了在应激条件下发生的帽依赖性翻译的普遍抑制。IRES序列通常存在于编码应激反应基因的细胞mRNA的5'非翻译区,从而刺激其顺式翻译。

[0005] 最近的高通量筛选系统已经扩大了细胞mRNA内验证的IRES序列的列表(Weingarten-Gabbay S等人,Science,2016)。

[0006] 可通过修饰编码蛋白质的mRNA,以包括包含内部核糖体进入(IRES)序列或翻译增强子序列的修饰的5'序列,来实现基因特异性翻译的上调。在这样的系统中,IRES或翻译增强子序列被顺式放置在编码感兴趣的特定基因的cDNA的5'端。该方法已用于构建表达两个顺反子的载体,并用于增强过表达基因的翻译。但是,当目标是诱导内源表达的mRNA的翻译上调时,不能使用翻译增强的顺式调节。因此,需要鉴定促进基因特异性翻译上调并作用于内源性mRNA的反式调节元件。还需要作为非依赖性RNA结构域发挥作用的翻译上调反式调节元件。

[0007] 近年来,由于在临床上的潜在应用,使用核酸分子在体内操纵基因表达引起了极大的兴趣。迄今为止,大多数努力都集中在使用siRNA、miRNA和反义寡核苷酸来下调毒性蛋白的能力上。然而,许多疾病是由基因剂量减少引起的,因此需要增加蛋白产物。尽管许多研究已经在转录水平上解决了该问题,但是仅存在一个使用功能性反义RNA分子(SINEUP)来增加翻译的例子(Carrieri C.等人,Nature,2012)。SINEUP是反义、长的非编码RNA,其能够促进部分重叠的编码蛋白质的mRNA的翻译,而对mRNA水平没有影响。SINEUP活性取决于两个功能结构域:重叠区域(或"结合结构域"),其决定了SINEUP的特异性,而嵌入的反向SINEB2元件则作为"效应子结构域"发挥作用,其控制mRNA翻译的增强(Zucchelli S.等人,Front Cell Neurosci 2015;Zucchelli S.等人,RNA Biol,2015)。通过利用其模块结构,可以设计合成的SINEUP来特异性增强几乎任何感兴趣靶基因的翻译(Zucchelli S.等人,

Front Cell Neurosci 2015;Zucchelli S.等人,RNA Biol,2015;Indrieri A.等人,Scientific Reports,2016;Gustincich S.等人,Prog Neurobiol,2016;Zucchelli S.等人,Comput Struct Biotechnol J,2016)。

[0008] EP2691522公开了包括SINEUP的功能性核酸分子。

[0009] 尽管SINEUP具有潜力,但其仍依赖于嵌入的SINE元件的翻译增强子的活性,SINE元件是源自小鼠基因组的序列,具有在受体细胞中逆转座(从一个基因组位置移动到另一个基因组位置)的潜力。这对于涉及翻译上调以校正基因剂量不足的任何治疗用途都是不利的。因此,需要反式调节元件,其促进基因特异性翻译上调并作用于不是源自小鼠序列的内源性mRNA。还需要反式调节元件,其促进基因特异性翻译上调并且不是源自转座元件。

[0010] EP2691522的大多数功能性核酸分子具有相当长的长度。需要鉴定较短的反式调节元件,其促进基因特异性翻译上调并作用于内源性mRNA,以使RNA分子向受体细胞更有效地递送。

[0011] EP2691522的功能性核酸分子的翻译增强作用通常为1.5-2.0倍,这取决于细胞类型。如果目的是在人中诱导翻译上调以校正不足的基因剂量,则这种蛋白增加的水平可能不足。因此,需要鉴定促进更高水平的基因特异性翻译上调并作用于内源性mRNA的反式调节元件。

发明内容

[0012] 因此,本发明的目的是提供一种克服上述问题并且可能还具有增强功能的功能性核酸分子。

[0013] 该目的通过权利要求1中所定义的反式作用功能性核酸分子来实现。

[0014] 本发明的其他目的是提供权利要求10所定义的DNA分子、权利要求11所定义的表达载体、权利要求12所定义的用于增强蛋白质翻译的方法、权利要求13所定义的组合物以及权利要求14和15所定义的反式作用功能性核酸分子的用途。

附图说明

[0015] 图1显示了根据本发明的反式作用功能性核酸分子的示意图。

[0016] 图2A显示了根据现有技术(SINEUP)的功能性核酸分子的示意图。

[0017] 图2B显示了在分别用空对照质粒(-)、全长SINEUP-DJ-1(FL)及其缺失突变体(ΔED=缺失效应子结构域的突变体,ΔBD=缺失结合结构域的突变体)转染的人胚胎肾293T/17细胞(以下也称为HEK 293T/17细胞)的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0018] 图2C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图2B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和SINEUP RNA(下图)的表达。

[0019] 图2D显示了HEK 293T/17细胞(N=5)中全长SINEUP-DJ-1、ΔED和ΔBD对内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的图示。$p<0.05$

[0020] 图3显示了靶向DJ-1mRNA的根据本发明的通用反式作用功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0021] 图4显示了用于测试含有IRES的功能性反义核酸分子的翻译上调活性的实验程序的示意图。

[0022] 图5A显示了靶向DJ-1基因并包括HCV IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0023] 图5B显示了在分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向(direct)(HCV(d))和反向方向(HCV(i))上包括HCV IRES的IRUP转染的HEK293T/17细胞的裂解物上进行蛋白质印迹的结果。

[0024] 图5C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图5B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0025] 图6A显示了靶向DJ-1基因并包括脊髓灰质炎病毒IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0026] 图6B显示了在分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向(Polio(d))和反向方向(Polio(i))上包括脊髓灰质炎IRES的IRUP转染的HEK293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0027] 图6C显示了qRT-PCR的结果,其定量了如图6B所示在样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0028] 图7A显示了靶向DJ-1基因并包括脑心肌炎病毒(EMCV)IRES和蟋蟀麻痹病毒(cricket paralysis virus,CrPV)IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0029] 图7B显示了在分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(EMCV(d))和反向方向(EMCV(i))上包括EMCV IRES的IRUP,和在正向方向(CrPV(d))和反向方向(CrPV(i))上包括CrPV IRES的IRUP分别转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0030] 图7C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图7B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0031] 图8A和8B显示了一组图,其总结了转染了本发明的HCV(d)和HCV(i)IRUP、Polio(d)和Polio(i)IRUP和EMCV(d)、EMCV(i)、CrPV(d)和CrPV(i)IRUP的HEK 293T/17细胞与转染空载体的293T/17细胞相比,DJ-1蛋白数量的增加。

[0032] 图9A显示了靶向DJ-1基因并包括人凋亡肽酶激活因子1(Apaf-1)mRNA IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0033] 图9B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(Apaf-1(d))和反向方向(Apaf-1(i))上包括Apaf-1 IRES的IRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0034] 图9C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图9B所示样品上进行内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0035] 图10A显示了靶向DJ-1基因并包括人增强水平的基因组不稳定性1(ELG-1)mRNA IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0036] 图10B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(ELG-1(d))和反向方向(ELG-1(i))上包括ELG-1IRES的IRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0037] 图10C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图10B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0038] 图11A显示了靶向DJ-1基因并包括人V-Myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物

(cMYC)mRNA IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0039] 图11B显示了在分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(cMYC(d))和反向方向(cMYC(i))上包括cMYC IRES的IRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0040] 图11C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图11B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0041] 图12A显示了靶向DJ-1基因的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图,其包括图11A至11C的人V-Myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(cMYC)mRNA IRES的较短版本。

[0042] 图12B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(cMYC(d))和反向方向(cMYC(i))上包括cMYC IRES(短变体)的IRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0043] 图12C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图12B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0044] 图13A显示了靶向DJ-1基因并包括人肌营养不良蛋白(DMD)mRNA IRES的根据本发明的功能性核酸分子(IRUP)的示意图。

[0045] 图13B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和在正向方向(DMD(d))和反向方向(DMD(i))上包括DMD IRES的IRUP转染的HEK293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0046] 图13C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图13B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0047] 图14A和14B显示了一组图,其总结了用本发明的Apaf-1(d)和Apaf-1(i)IRUP、ELG-1(d)和ELG-1(i)IRUP、cMYC(d)短版本和cMYC(i)短版本IRUP、DMD(d)和DMD(i)IRUP、以及cMYC(d)长版本和cMYC(i)长版本IRUP转染的HEK 293T/17细胞,相对于空载体转染的293T/17细胞中,DJ-1蛋白数量的增加。

[0048] 图15A-15D显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1、包括正向(d)或反向(i)方向的HCV IRES序列、正向(d)或反向(i)方向的Polio和cMYC IRES序列、正向(d)或反向(i)方向的Apaf-1和ELG-1IRES序列、和正向(d)或反向(i)方向的DMD IRES序列的IRUP转染的人肝细胞癌(HepG2)细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0049] 图16A和图16B显示了一组图,其总结了用本发明的HCV(d)和HCV(i)IRUP、Polio(d)和Polio(i)IRUP、cMYC(d)短版本和cMYC(i)短版本IRUP、Apaf-1(d)和Apaf-1(i)IRUP、ELG-1(d)和ELG-1(i)IRUP、和DMD(d)和DMD(i)IRUP转染的HepG2细胞,相对于空载体转染的HepG2细胞中,DJ-1蛋白数量的增加。

[0050] 图17A显示了靶向DJ-1基因的根据本发明的功能性核酸分子的微型化版本(miniIRUP)的示意图。

[0051] 图17B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和包括正向方向的HCV IRES(HCV(d))、正向方向(Polio(d))和反向方向(Polio(i))的脊髓灰质炎病毒IRES、和正向方向IRES(cMYC short(d))的cMYC短版本IRES的miniIRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0052] 图17C显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图17B所示样品上进行的内源DJ-

1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0053] 图17D显示了SINEUP-DJ-1和mini-IRUP对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的图示(N＝6)。

[0054] 图18A显示了靶向DJ-1基因的根据本发明的功能性核酸分子的微型化版本(miniIRUP)的示意图。关于图17A-17D的miniIRUP,在不同启动子的控制下克隆了含有IRES的功能性核酸序列。

[0055] 图18B显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和包括正向方向的HCV IRES(HCV(d))、正向方向(Polio(d))和反向方向(Polio(i))的脊髓灰质炎病毒IRES、和正向方向的cMYC短版本IRES的miniIRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0056] 图18C显示了qRT-PCR结果,其定量了在如图18B所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0057] 图18D显示了SINEUP-DJ-1和mini-IRUP对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的图示(N＝6)。

[0058] 图19A显示了用于在哺乳动物细胞中共同表达功能性核酸分子和感兴趣基因的pDUAL-GFP质粒的示意图。

[0059] 图19B显示了分别用如图19A所示空对照质粒、含SINE(SINE)或含IRES(IRES)的微型功能性核酸分子转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0060] 图19C显示了qRT-PCR的结果,其定量了用图19A的构建体转染的HEK 293T/17细胞中过表达的GFP mRNA的表达。

[0061] 图19D显示了qRT-PCR的结果,其定量了功能性核酸SINE或IRES RNA的表达。

[0062] 图20A显示了具有GFP靶向功能性核酸分子的pDUAL-GFP质粒的示意图,其中效应子结构域由SINE或HCV IRES序列表示。

[0063] 图20B显示了分别用在图20A所示的空对照质粒、含SINE(SINE)或含IRES(IRES)的微型功能性核酸分子转染的人神经母细胞瘤Neuro2a细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0064] 图21显示了HCV IRES RNA二级结构的示意图。

[0065] 图22A显示了分别用空对照质粒、SINEUP-DJ-1和包括WT HCV IRES和M2和M5突变的HCV IRES的IRUP转染的HEK 293T/17细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹的结果。

[0066] 图22B显示了qRT-PCR的结果,其定量了在如图22A所示样品上进行的内源性DJ-1mRNA(上图)和IRUP RNA(下图)的表达。

[0067] 图22C显示了SINEUP-DJ-1和IRUP对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的图示(N＝7)。

[0068] 图23A显示了如何将IRES序列5'端和含IRES的细胞mRNA内的序列视为结合结构域的示意图。

[0069] 图23B显示了cMYC mRNA参考序列(NM_002467)内的功能性核酸序列元件。显示了结合结构域(黑色)、IRES序列(深灰色)、编码序列或CDS(浅灰色)和3'非翻译区(白色)。

[0070] 图23C显示了使用c-MYC mRNA作为查询序列在反义方向鉴定部分重叠的靶mRNA蛋白编码序列的生物信息学分析(BLAST)的结果。

[0071] 图24A显示了编码MYC的全长mRNA(cMYC-FL)的哺乳动物表达质粒的示意图。

[0072] 图24B显示了用抗JAG2、抗DYRK2、抗LYS、抗UBE3A、抗NRF1抗体在哺乳动物SAOS细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹。

[0073] 图24C和24D显示了qRT-PCR的结果,其定量了内源性JAG2、DYRK2、LIS1、UBE3A、NRF1和cMYC mRNA的表达。

[0074] 图24E显示了平均cMyc全长mRNA水平。

[0075] 图25A显示了编码MYC的全长mRNA(cMYC-FL)或缺少cMYC DNA结合结构域(deltaC)并且仅由5'UTR(5'UTR)或仅由IRES(IRES)结构域组成的变体的哺乳动物表达质粒的示意图。

[0076] 图25B显示了用抗JAG2、抗DYRK2、抗LYS、抗UBE3A、抗NRF1抗体在哺乳动物SAOS细胞的裂解物上进行的蛋白质印迹。

[0077] 图25C显示了qRT-PCR的结果,其定量了内源性JAG2、DYRK2、LIS1、UBE3A、NRF1和cMYC mRNA的表达。

[0078] 定义

[0079] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。以下描述了优选的方法和材料,尽管可以在实践或测试本发明中使用许多与本文描述的方法或材料相似或等同的方法和材料。除非另有说明,否则本文描述的用于本发明的技术是本领域普通技术人员众所周知的标准方法。

[0080] 术语“内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列”是指与内部核糖体进入位点(IRES)序列具有同源性的核酸序列,从而保留其功能活性,即翻译增强活性。特别地,内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列可以通过基因工程或化学修饰从天然存在的IRES序列获得,例如通过分离保留功能的IRES序列的特定序列、或通过突变/缺失/引入IRES序列中的一个或多个核苷酸、或用结构修饰的核苷酸或类似物替换IRES序列中的一个或多个核苷酸。更特别地,本领域技术人员将知道内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列是能够促进双顺反子构建体中第二顺反子翻译的核苷酸序列。通常,编码双重荧光素酶(萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶)的质粒用于实验测试。最近已经使用基于双重报告基因或双顺反子质粒的大规模筛选调查来自人基因组的序列作为IRES发挥作用的能力(Weingarten-Gabbay S等人,Science.2016,351:6270)。存在主要数据库,即IRESite,其用于注释已被使用双重报告基因或双顺反子测定法实验验证为IRES的核苷酸序列(http://iresite.org/IRESite_web.php)。在IRESite中,可以使用基于Web的工具来搜索感兴趣的查询序列与数据库中所有经注释和实验验证的IRES序列之间的基于序列和基于结构的相似性(http://iresite.org/IRESite_web.php?page＝search)。该程序的输出是在使用双顺反子构建体的验证实验中能够作为IRES发挥作用的任何核苷酸序列的概率得分。可以使用其他基于序列和基于结构的基于Web的浏览工具来建议任何给定核苷酸序列的IRES活性潜能的数字预测值(http://rna.informatik.uni-freiburg.de/;http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/index1.php)。

[0081] 发明详述

[0082] 参考图1,本发明的反式作用功能性核酸分子(以下也称为“IRUP”)包含靶结合序列(也称为“结合结构域”)和调节序列(也称为“效应子结构域”)。

[0083] 靶结合序列包含与待增强蛋白质翻译的真核靶mRNA序列反向互补的序列。

[0084] 真核靶mRNA序列优选是动物或人靶mRNA序列,更优选人靶mRNA序列。

[0085] 调节序列包含内部核糖体进入位点(IRES)序列或内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列,其增强靶mRNA序列的翻译。

[0086] 调节序列位于靶结合序列的3'。

[0087] 反式作用功能性核酸分子通过靶结合序列与靶mRNA序列杂交,并且IRES或IRES衍生的序列增强靶mRNA序列的翻译。

[0088] 本发明的功能性核酸分子允许利用IRES序列作为反式调节元件,用于基因特异性地增加几乎任何细胞内源性或过表达的编码蛋白质的mRNA的翻译。

[0089] 优选地,靶结合序列由从3'至5'与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的1至50个核苷酸和靶mRNA序列的编码序列(CDS)的1至40个核苷酸反向互补的序列组成。具体的非限制性实例包括由以下组成的靶结合序列:

[0090] -与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的40个核苷酸和编码序列(CDS)的4个核苷酸(提及起始甲硫氨酸密码子或内部符合读码框甲硫氨酸密码子)反向互补的序列;

[0091] -与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的40个核苷酸和编码序列(CDS)的32个核苷酸反向互补的序列;

[0092] -与靶mRNA序列的5'非翻译区(5'UTR)的14个核苷酸和编码序列(CDS)的4个核苷酸(提及起始甲硫氨酸密码子)反向互补的序列。

[0093] 调节序列包含内部核糖体进入位点(IRES)序列,其优选衍生自人病毒或人蛋白编码基因。已经成功地测试了具有48至576个核苷酸的序列的一些IRES,例如人丙型肝炎病毒(HCV)IRES(SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37)、人脊髓灰质炎病毒IRES(SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39)、人脑心肌炎(EMCV)病毒(SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41)、人蟋蟀麻痹病毒(CrPV)(SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43)、人Apaf-1(SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45)、人ELG-1(SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47)、人c-MYC(SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51)、人肌营养不良蛋白(DMD)(SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53)。可以在实施例部分中找到更多详细信息。已经鉴定、分离了编码IRES的结构元件的序列,其是翻译增强活性的基础,并用作反式作用功能性核酸分子的调节序列。

[0094] 如定义中已经提到的,内部核糖体进入位点(IRES)衍生的序列可以包括基因工程或化学修饰的IRES。

[0095] 化学修饰包括但不限于以下:

[0096] 碱基修饰:假尿苷;5'-溴尿苷;5'-甲基胞苷。

[0097] 糖修饰(2'修饰):2'-O-甲基-(2'-O-Me);2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE);锁核酸(LNA)。

[0098] 骨架修饰(磷酸骨架修饰):硫代磷酸酯(PS);磷酸三酯。

[0099] 其他(细胞类型特异性靶向结构域):GalNAc连接(肝细胞)。

[0100] 相对于功能性核酸分子的5'至3'方向无论是以正向方向或反向方向插入反式作用功能性核酸分子,IRES序列或IRES衍生的序列均是功能性的,但是,优选地的方向为正向方向。换句话说,"正向"是指将IRES序列以与功能性核酸分子相同的5'至3'方向嵌入(插入)的情况。相反,"反向"是指将IRES序列的反向互补序列插入核酸分子中的情况(IRES序

列相对于功能性核酸分子为3'至5'方向)。

[0101] 优选地,IRES序列或IRES衍生的序列是与选自SEQ ID NO:36至SEQ ID NO:65的序列具有75%同源性的序列,更优选地与选自SEQ ID NO:36至SEQ ID NO:65的序列具有90%同源性的序列,甚至更优选为选自SEQ ID NO:36至SEQ ID NO:65的序列。

[0102] 反式作用功能性核酸分子优选是RNA分子或修饰的RNA分子。修饰的示例如下:

[0103] 碱基修饰:假尿苷;5'-溴尿苷;5'-甲基胞苷。

[0104] 糖修饰(2'修饰):2'-O-甲基-(2'-O-Me);2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE);锁核酸(LNA)。

[0105] 骨架修饰(磷酸骨架修饰):硫代磷酸酯(PS);磷酸三酯。

[0106] 其他(细胞类型特异性靶向结构域):GalNAc连接(肝细胞)。

[0107] 反式作用功能性核酸分子优选进一步包含靶结合序列和调节序列之间的间隔序列。

[0108] 另外,反式作用功能性核酸分子任选地包含非编码的3'尾序列,例如包括用于将分子克隆到合适的质粒中的限制性位点。

[0109] 根据本发明已经生成了几种反式作用功能性核酸分子。

[0110] 下面总结了其中一些分子的特征。(BD=结合结构域;括号中的编号是相对于AUG三联体A=+1)

[0111] SEQ ID NO:1

[0112] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0113] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV,383个核苷酸,正向方向

[0114] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0115] ED=IRES HCV(383ntd)(SEQ ID NO:36)

[0116] 骨架=Delta5'ASUch11

[0117] IRES方向:正向方向

[0118] SEQ ID NO:2

[0119] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0120] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV,383个核苷酸,反向方向

[0121] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0122] ED=IRES HCV(383ntd)(SEQ ID NO:37)

[0123] 骨架=Delta5'ASUch11

[0124] IRES方向:反向(反向互补)

[0125] SEQ ID NO:3

[0126] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0127] IRES:病毒IRES,人脊髓灰质炎病毒,312个核苷酸,正向方向

[0128] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0129] ED=IRES脊髓灰质炎病毒(312ntd)(SEQ ID NO:38)

[0130] 骨架=Delta5'ASUch11

[0131] IRES方向:直接

[0132] SEQ ID NO:4

[0133] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0134] IRES:病毒IRES,人脊髓灰质炎病毒,312个核苷酸,反向方向

[0135] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0136] ED＝IRES脊髓灰质炎病毒(312ntd)(SEQ ID NO:39)

[0137] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0138] IRES方向:反向(反向互补)

[0139] SEQ ID NO:5

[0140] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0141] IRES:病毒IRES,人脑心肌炎病毒,EMCV-R,

[0142] 576个核苷酸,正向方向

[0143] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0144] ED＝IRES EMCV-R(576ntd)(SEQ ID NO:40)

[0145] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0146] IRES方向:直接

[0147] SEQ ID NO:6

[0148] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0149] IRES:病毒IRES,人脑心肌炎病毒,EMCV-R,

[0150] 576个核苷酸,反向方向

[0151] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0152] ED＝IRES EMCV-R(576ntd)(SEQ ID NO:41)

[0153] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0154] IRES方向:反向(反向互补)

[0155] SEQ ID NO:7

[0156] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0157] IRES:病毒IRES,人蟋蟀麻痹病毒,CrPV,192个核苷酸,正向方向

[0158] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0159] ED＝IRES CrPV(192ntd)(SEQ ID NO:42)

[0160] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0161] IRES方向:直接

[0162] SEQ ID NO:8

[0163] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0164] IRES:病毒IRES,人蟋蟀麻痹病毒,CrPV,192个核苷酸,反向方向

[0165] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0166] ED＝IRES CrPV(192ntd)(SEQ ID NO:43)

[0167] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0168] IRES方向:反向(反向互补)

[0169] SEQ ID NO:9

[0170] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0171] IRES:细胞IRES,人Apaf-1,231个核苷酸,正向方向

[0172] (Ensembl:ENSG00000120868;MIM:602233)

[0173] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0174] ED＝IRES Apaf-1(231ntd)(SEQ ID NO:44)

[0175] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0176] IRES方向:直接

[0177] SEQ ID NO:10

[0178] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0179] IRES:细胞IRES,人Apaf-1,231个核苷酸,反向方向

[0180] (Ensembl:ENSG00000120868;MIM:602233)

[0181] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0182] ED＝IRES Apaf-1(231ntd)(SEQ ID NO:45)

[0183] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0184] IRES方向:反向(反向互补)

[0185] SEQ ID NO:11

[0186] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0187] IRES:细胞IRES,人ELG-1,460个核苷酸,正向方向

[0188] (Ensembl:ENSG00000176208;MIM:609534)

[0189] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0190] ED＝IRES ELG-1(460ntd)(SEQ ID NO:46)

[0191] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0192] IRES方向:直接

[0193] SEQ ID No:12

[0194] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0195] IRES:细胞IRES,人ELG-1,460个核苷酸,反向方向

[0196] (Ensembl:ENSG00000176208;MIM:609534)

[0197] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0198] ED＝IRES ELG-1(460ntd)(SEQ ID NO:47)

[0199] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0200] IRES方向:反向(反向互补)

[0201] SEQ ID NO:13

[0202] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0203] IRES:细胞IRES,人c-MYC,395个核苷酸,正向方向

[0204] (Ensembl:ENSG00000136997;MIM:190080)

[0205] 特征:BD＝DJ-1s(-40/+4)

[0206] ED＝IRES c-MYC全长(395ntd)(SEQ ID NO:48)

[0207] 骨架＝Delta5'ASUch11

[0208] IRES方向:直接

[0209] 其他:包括SEQ ID NO:15中包含的48nt最小序列(SEQ ID NO:50)。

[0210] SEQ ID NO:14

[0211] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0212] IRES:细胞IRES,人c-MYC,395个核苷酸,反向方向

[0213] (Ensembl:ENSG00000136997;MIM:190080)

[0214] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0215] ED=IRES c-MYC全长(395ntd)(SEQ ID NO:49)

[0216] 骨架=Delta5'ASUchll

[0217] IRES方向:反向(反向互补)

[0218] 其他:包括SEQ ID NO:16中包含的48nt最小序列(SEQ ID NO:51)。

[0219] SEQ ID NO:15

[0220] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0221] IRES:细胞IRES,人c-MYC,48个核苷酸,正向方向

[0222] (Ensembl:ENSG00000136997;MIM:190080)

[0223] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0224] ED=IRES c-MYC(48ntd)(SEQ ID NO:50)

[0225] 骨架=Delta5'ASUchll

[0226] IRES方向:直接

[0227] SEQ ID NO:16

[0228] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0229] IRES:细胞IRES,人c-MYC,48个核苷酸,反向方向

[0230] (Ensembl:ENSG00000136997;MIM:190080)

[0231] 功能:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0232] ED=IRES c-MYC(48ntd)(SEQ ID NO:51)

[0233] 骨架=Delta5'ASUchll

[0234] IRES方向:反向(反向互补)

[0235] SEQ ID NO:17

[0236] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0237] IRES:细胞IRES,人肌营养不良蛋白(DMD),71个核苷酸,正向方向

[0238] (Ensembl:ENSG00000198947;MIM:300377)

[0239] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0240] ED=IRES DMD(71ntd)(SEQ ID NO:52)

[0241] 骨架=Delta5'ASUchll

[0242] IRES方向:直接

[0243] SEQ ID NO:18

[0244] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0245] IRES:细胞IRES,人肌营养不良蛋白(DMD),71个核苷酸,反向方向

[0246] (Ensembl:ENSG00000198947;MIM:300377)

[0247] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0248] ED=IRES DMD(71ntd)(SEQ ID NO:53)

[0249] 骨架=Delta5'ASUchll

[0250] IRES方向:反向(反向互补)

[0251] SEQ ID NO:19

[0252] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0253] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#1,303个核苷酸,delta II(40-119),与核糖体蛋白相互作用

[0254] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0255] ED=HCV IRES正向,delta II(SEQ ID NO:54)

[0256] 骨架=Delta5'ASUchll

[0257] 突变体#1:delta II(40-119),与核糖体蛋白相互作用

[0258] SEQ ID NO:20

[0259] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0260] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#2,367个核苷酸,delta III(156-171),eIF3结合位点

[0261] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0262] ED=HCV IRES正向,delta IIIa(SEQ ID NO:55)

[0263] 骨架=Delta5'ASUchll

[0264] 突变体#2:delta IlIa(156-171),eIF3结合位点

[0265] SEQ ID NO:21

[0266] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0267] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#3,356个核苷酸,delta IIId(253-279),18S rRNA结合区

[0268] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0269] ED=HCV IRES正向,deltalllld(SEQ ID NO:56)

[0270] 骨架=Delta5'ASUchll

[0271] 突变体#3:delta IIId(253-279),18S rRNA结合区

[0272] SEQ ID NO:22

[0273] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0274] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#4,330个核苷酸,delta IV(331-383),含AUG的末端序列

[0275] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0276] ED=HCV IRES正向,deltaIV(SEQ ID NO:57)

[0277] 骨架=Delta5'ASUchll

[0278] 突变体#4:delta IV(331-383),包含AUG的末端序列

[0279] SEQ ID NO:23

[0280] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0281] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#5,383个核苷酸,G266->C;单个点突变,与18S rRNA接触

[0282] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0283] ED=HCV IRES正向,G266->C(SEQ ID NO:58)

[0284] 骨架＝Delta5'ASUchll

[0285] 突变体#5:G266->C;单个点突变,与18S rRNA接触

[0286] SEQ ID NO:24

[0287] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0288] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#6,383个核苷酸,U228→C;在HCV IRES另一个位点的对照单个点突变,降低IRES活性而不会破坏前起始复合物的形成

[0289] 特征:BD＝DJ-ls(-40/+4)

[0290] ED＝HCV IRES正向,U228->C(SEQ ID NO:59)

[0291] 骨架＝Delta5'ASUchll

[0292] 突变体#6:U228->C;在HCV IRES另一个位点的对照单个点突变,降低IRES活性,而不会破坏前起始复合物的形成。突变版本降低了对eIF3的亲和力。

[0293] SEQ ID NO:25

[0294] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0295] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#7,383个核苷酸,G267->C;IIId环,单个点突变,与18S rRNA接触

[0296] 特征:BD＝DJ-ls(-40/+4)

[0297] ED＝HCV IRES正向,G267->C(SEQ ID NO:60)

[0298] 骨架＝Delta5'ASUchll

[0299] 突变体#7:G267->C;IIId环,单个点突变,与18S rRNA接触

[0300] SEQ ID NO:26

[0301] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0302] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#8,383个核苷酸,G268->C;IIId环,单个点突变,与18S rRNA接触

[0303] 特征:BD＝DJ-ls(-40/+4)

[0304] ED＝HCV IRES正向,G268->C(SEQ ID NO:61)

[0305] 骨架＝Delta5'ASUchll

[0306] 突变体#8:G268->C;IIId环,单个点突变,与18S rRNA接触

[0307] SEQ ID NO:27

[0308] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0309] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#9,383个核苷酸,$G_{266}G_{267}G_{268}$->$C_{266}C_{267}C_{268}$;IIId环,三个点突变,与18S rRNA接触

[0310] 特征:BD＝DJ-ls(-40/+4)

[0311] ED＝HCV IRES正向,$G_{266}G_{267}G_{268}$->$C_{266}C_{267}C_{268}$(SEQ ID NO:62)

[0312] 骨架＝Delta5'ASUchll

[0313] 突变体#9:$G_{266}G_{267}G_{268}$->$C_{266}C_{267}$ C_{268};IIId环,三个点突变,与18S rRNA接触

[0314] SEQ ID NO:28

[0315] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0316] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#10,383个核苷酸,G266->A/G268->T;双点突变突变体;HCV 5a分离株,感染力较弱

[0317] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0318] ED=HCV IRES正向,G266->A/G268->T(SEQ ID NO:63)

[0319] 骨架=Delta5'ASUchll

[0320] 突变体#10:G266->A/G268->T;双点突变突变体;HCV 5a分离株,感染力较弱

[0321] SEQ ID NO:29

[0322] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0323] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#11,383个核苷酸,IIIa->IIIa-comp;AGTA->TCAT

[0324] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0325] ED=HCV IRES正向,IIIa->IIIa-comp;AGTA->TCAT(SEQ ID NO:64)

[0326] 骨架=Delta5'ASUchl 1

[0327] 突变体#11:HCV IRES正向,IIIa->IIIa-comp;AGTA->TCAT)

[0328] SEQ ID NO:30

[0329] 定义:IRUP功能性核酸分子

[0330] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV突变体#12,383个核苷酸,IIe->IIIe-comp;TGATAG->ACTATC

[0331] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0332] ED=HCV IRES正向,IIIe->IIIe-comp;TGATAG->ACTATC(SEQ ID NO:65)

[0333] 骨架=Delta5'ASUchll

[0334] 突变体#12:HCV IRES正向,IIIe->IIIe-comp;TGATAG->ACTATC

[0335] SEQ ID NO:31

[0336] 定义:miniIRUP功能性核酸分子

[0337] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV,383个核苷酸,正向方向

[0338] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0339] ED=IRES HCV(383ntd)(SEQ ID NO:36)

[0340] IRES方向:正向

[0341] SEQ ID NO:32

[0342] 定义:miniIRUP功能性核酸分子

[0343] IRES:病毒IRES,人脊髓灰质炎病毒,312个核苷酸,正向方向

[0344] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0345] ED=IRES脊髓灰质炎病毒(312ntd)(SEQ ID NO:38)

[0346] IRES方向:正向

[0347] SEQ ID NO:33

[0348] 定义:miniIRUP功能性核酸分子

[0349] IRES:病毒IRES,人脊髓灰质炎病毒,312个核苷酸,反向方向

[0350] 特征:BD=DJ-ls(-40/+4)

[0351] ED=IRES脊髓灰质炎病毒(312ntd)(SEQ ID NO:39)

[0352] IRES方向:反向(反向互补)

[0353] SEQ ID NO:34

[0354] 定义:miniIRUP功能性核酸分子

[0355] IRES:细胞IRES,人c-MYC,48个核苷酸,正向方向(Ensembl:ENSG00000136997;MIM:190080)

[0356] 特征:BD=DJ-1s(-40/+4)

[0357] ED=IRES c-MYC(48ntd)(SEQ ID NO:50)

[0358] IRES方向:正向

[0359] SEQ ID NO:35

[0360] 定义:miniIRUP功能性核酸分子

[0361] IRES:病毒IRES,人丙型肝炎病毒,HCV,383个核苷酸,正向方向

[0362] 特点:BD=GFP(-40/+32)

[0363] ED=IRES HCV(383ntd)(SEQ ID NO:36)

[0364] IRES方向:正向

[0365] 根据本发明的DNA分子编码任何以上公开的反式作用功能性核酸分子。

[0366] 根据本发明的表达载体包含上述DNA分子。特别地,以下质粒已用于有效表达功能性核酸分子。

[0367] 哺乳动物表达质粒:

[0368] 质粒名称:pCS2+

[0369] 表达:CMVie92启动子

[0370] SV40polyA终止子

[0371] 质粒名称:pCDN3.1(-)

[0372] 表达:CMV启动子

[0373] BGH终止子

[0374] 质粒名称:pDUAL-eGFPΔ(由修饰peGFP-C1而得)

[0375] 表达:H1启动子;CMV启动子

[0376] BGH终止子;SV40终止子

[0377] 病毒载体:

[0378] 载体名称:pAAV

[0379] 病毒:腺相关病毒

[0380] 表达:CAG启动子/CMV增强子

[0381] SV40polyA终止子

[0382] 载体名称:pLVX-TetOne-Puro

[0383] 病毒:慢病毒

[0384] 表达:TRE3G启动子(诱导型表达)

[0385] SV40polyA终止子

[0386] 应当指出,进行的实验突出了反式作用功能性核酸分子的功能不受所用质粒的影响。

[0387] 根据本发明的用于增强蛋白质翻译的方法包括将上述公开的反式作用功能性核酸分子或DNA分子或表达载体转染到细胞中。

[0388] 根据本发明的组合物包含上述公开的反式作用功能性核酸分子或DNA分子或表达

载体。反式作用功能性核酸分子可以作为裸RNA递送,RNA任选地包括适于增加RNA稳定性的修饰。作为替代,反式作用功能性核酸分子可以是封装在基于脂质的纳米颗粒的阵列中的体外转录的RNA或封装在基于外来体(exosome-based)的颗粒中的体外转录的RNA。

[0389] 以上公开的反式作用功能性核酸分子或DNA分子或表达载体可用于增强靶mRNA序列的翻译。实施例显示了两种不同的靶mRNA序列,PARK7/DJ-1(也称为DJ-1)和GFP的翻译增强,但是可以成功靶向任何其他mRNA序列而不影响mRNA水平。

[0390] 应该注意的是,IRUP可以增强感兴趣基因的翻译,而不影响其自身的mRNA量。

[0391] 因此,上述公开的反式作用功能性核酸分子或DNA分子或表达载体可以成功地用作分子工具,以验证细胞中的基因功能以及实现重组蛋白生产的程序。

[0392] 以上公开的反式作用功能性核酸分子或DNA分子或表达载体可用于治疗由编码蛋白质的mRNA的下调引起的遗传疾病,或用于治疗某些编码蛋白质的mRNA的水平降低是不利的散发性疾病。以下是此类疾病的示例。当正常表型需要两个等位基因的蛋白质产物,并且基因功能降低到50%或更低会导致异常表型时,就会出现单倍体不足(haploinsufficiency)的病症。这是导致多种疾病的原因,包括特定类型的癌症、共济失调以及由于发育过程衰竭而导致的疾病。大量罕见病是由导致基因剂量减少的突变或微缺失而引起的。转录因子、突触蛋白和染色质重塑酶似乎对基因剂量特别敏感。在衰老过程中还可以观察到基因表达的降低。

实施例

[0393] 实施例1

[0394] 图2显示,嵌入的效应子结构域(ED)是靶向内源性人DJ-1mRNA的反义、长的非编码RNA(lncRNA)的翻译上调功能所必需的。

[0395] 图2A显示了上调靶标特异性mRNA翻译的功能性反义lncRNA分子的示意图。指出了使用SINE B2家族的嵌入式鼠转座元件的原始分子(SINEUP)。突出显示了SINEUP功能结构域:SINEUP结合结构域(BD):其为在反义方向与正义蛋白质编码mRNA重叠的SINEUP序列;SINEUP效应子结构域(ED):其为SINEUP的非重叠部分中的反向SINEB2元件(SINE),可激活蛋白质合成。指出了正义和反义RNA分子的5'至3'方向。靶标特异性mRNA包括5'非翻译区(5'UTR)、编码序列(CDS)和3'非翻译区(3'UTR)。还显示了翻译起始AUG密码子。

[0396] 设计合成的SINEUP以靶向内源性人DJ-1mRNA(SINEUP-DJ-1)。产生缺少结合结构域(ΔBD)或效应子结构域(ΔED)的SINEUP-DJ-1突变体。用编码SINEUP-DJ-1全长(FL)或其缺失突变体(ΔED=具有缺失的效应子结构域的突变体,ΔBD=具有缺失的结合结构域的突变体)的质粒转染人胚肾(HEK)293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。转染后48小时,将细胞裂解并处理以用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图2B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。

[0397] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和SINEUP RNA的表达(图2C)。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N=5个独立重复。

[0398] 图2D显示了SINEUP-DJ-1FL、ΔBD和ΔED对HEK 293T/17细胞中的内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性(N=5)。$p<0.05$。

[0399] 实施例2

[0400] 合成的IRUP设计为靶向内源性人DJ-1mRNA。如图3所示,通过用衍生自具有IRES活性的人病毒或人mRNA的IRES序列交换原始SINE B2序列生成含IRES的功能性核酸分子。

[0401] 表1包括在根据本发明的反式作用功能性核酸分子中使用的一些IRES序列的列表。

[0402] 指出了IRES名称、IRES起源、克隆方向和IRES长度。

[0403] 表1

[0404]

IRES	起源	方向	长度(nt)
HCV	人病毒	正向	383
HCV	人病毒	反向	383
Polio	人病毒	正向	312
Polio	人病毒	反向	312
EMCV	人病毒	正向	576
EMCV	人病毒	反向	576
CrPV	人病毒	正向	192
CrPV	人病毒	反向	192
Apaf-1	人mRNA	正向	231
Apaf-1	人mRNA	反向	231
ELG-1	人mRNA	正向	460
ELG-1	人mRNA	反向	460
cMYC(长)	人mRNA	正向	395
cMYC(长)	人mRNA	反向	395
cMYC(短)	人mRNA	正向	48
cMYC(短)	人mRNA	反向	48
DMD	人mRNA	正向	71
DMD	人mRNA	反向	71

[0405] 图4显示了用于测试含IRES的功能性反义核酸分子的翻译上调活性的实验步骤的示意图。用人DJ-1重叠序列(结合结构域)和IRES序列(效应子结构域)产生了用于翻译激活的反义功能性核酸分子。将含IRES的功能性核酸分子克隆到哺乳动物表达载体中,以在体外培养的哺乳动物细胞中表达。使用表达内源量的人DJ-1mRNA的细胞。显示了细胞接种、细胞转染和收获的时间。收获细胞以纯化RNA(用于定量实时PCR,qRT-PCR)和蛋白质(用于蛋白质印记,WB)。

[0406] 图5A显示了反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人丙型肝炎病毒(HCV)的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过将HCV IRES序列以正向(HCV(d)-SEQ ID NO:1)或反向(HCV(i)-SEQ ID NO:2)方向克隆而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0407] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中HCV IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定

量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图5B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。相对于含SINE的功能性核酸分子,含IRES的功能性核酸分子的效力更高或相似。

[0408] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图5C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0409] 实施例3

[0410] 图6A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人脊髓灰质炎病毒的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(Polio(d)-SEQ ID NO:3)或反向(Polio(i)-SEQ ID NO:4)方向克隆Polio IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0411] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中Polio IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图6B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0412] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图6C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0413] 实施例4

[0414] 图7A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域分别是来自人脑心肌炎病毒(EMCV)的IRES序列和来自蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(EMCV(d)-SEQ ID NO:5)或反向(EMCV(i)-SEQ ID NO:6)方向克隆EMCV IRES序列,以及相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(CrPV(d)-SEQ ID NO:7)或反向(CrPV(i)-SEQ ID NO:8)方向克隆CrPV IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0415] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中EMCV和CrPV IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图7B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0416] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图7C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0417] 实施例5

[0418] 通过蛋白质印记测量相对于空载体转染的HEK 293T/17细胞,实施例2的HCV(d)和HCV(i)IRUP、实施例3的Polio(d)和Polio(i)IRUP、实施例4的EMCV(d)、EMCV(i)、CrPV(d)和

CrPV(i)IRUP转染的HEK293T/17细胞中内源性DJ-1蛋白的数量增加。

[0419] 结果总结在图8A和8B中。显然,含IRES的功能性核酸分子反式激活了翻译,并且比含SINE的分子更具活性。数据代表N>5个生物重复的平均值和标准偏差。单个星号(*)表示相对于空对照细胞,IRES序列具有统计上显著的反式翻译增强活性;双星号(**)表示相对于含SINE的功能性核酸分子,IRES序列显示统计学上显著增强的效能。

[0420] 实施例6

[0421] 图9A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人凋亡肽酶激活因子(Apaf-1)mRNA的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(Apaf-1(d)-SEQ ID NO:9)或反向(Apaf-1(i)-SEQ ID NO:10)方向克隆Apaf-1 IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0422] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中Apaf-1IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图9B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力相对于含SINE的功能性核酸分子的效力更高或类似。

[0423] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图9C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0424] 实施例7

[0425] 图10A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人增强水平的基因组不稳定性1(ELG-1)mRNA的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(ELG-1(d)-SEQ ID NO:11)或反向(ELG-1(i)-SEQ ID NO:12)方向克隆ELG-1IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0426] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中ELG-1IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图10B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0427] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图10C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0428] 实施例8

[0429] 图11A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人V-Myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(cMYC)mRNA的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(cMYC全长(d)-SEQ ID NO:13)或反向(cMYC全长(i)-SEQ ID NO:14)方向克隆cMYC IRES序列(长变体)而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0430] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中cMYC IRES序列为正向(d)

或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图11B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力相对于含SINE的功能性核酸分子的效力更高或类似。

[0431] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图11C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0432] 实施例9

[0433] 图12A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是实施例8的来自人V-Myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(cMYC)mRNA的IRES序列的较短版本。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(cMYC短变体(d)-SEQ ID NO:15)或反向(cMYC短变体(i)-SEQ ID NO:16)方向克隆cMYC IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0434] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中cMYC IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图11B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力相对于含SINE的功能性核酸分子的效力更高或类似。

[0435] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图12C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0436] 实施例10

[0437] 图13A显示反式作用功能性核酸分子的示意图,其中效应子结构域是来自人肌营养不良蛋白(DMD)mRNA的IRES序列。相对于功能性核酸分子的5'到3'方向,通过以正向(DMD(d)-SEQ ID NO:17)或反向(DMD(i)-SEQ ID NO:18)方向克隆DMD IRES序列而产生含IRES的功能性核酸分子。

[0438] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的质粒(其中DMD IRES序列为正向(d)或反向(i)方向)转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图13B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0439] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和IRUP RNA的表达(图13C)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。数据代表N>5个独立重复。

[0440] 实施例11

[0441] 通过蛋白质印记测量相对于空载体转染的HEK 293T/17细胞,实施例6的Apaf-1(d)和Apaf-1(i)IRUP、实施例7的ELG-1(d)和ELG-1(i)IRUP、实施例8的cMYC全长(d)和cMYC

全长(i)IRUP、实施例9的cMYC短变体(d)和cMYC短变体(i)IRUP、和实施例10的DMD(d)和DMD(i)IRUP转染的HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1蛋白的数量增加。

[0442] 结果总结在图14A和14B中。显然,含IRES的功能性核酸分子反式激活翻译,并且比含SINE的分子更具活性。数据代表N>5个生物重复的平均值和标准偏差。单个星号(*)表示相对于空对照细胞,IRES序列具有统计上显著的反式翻译增强活性;双星号(**)表示相对于含SINE的功能性核酸分子,IRES序列显示统计学上显著增强的效能。

[0443] 实施例12

[0444] 如所示,用编码含IRES功能性核酸分子的质粒(其中HCV(图15A)IRES序列为正向(d)或反向(i)方向(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)、Polio和cMYC(图15B)IRES序列为正向(d)或反向(i)方向(SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14)、Apaf-1和ELG-1(图15C)IRES序列为正向(d)或反向(i)方向(SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12、以及DMD(图15D)IRES序列为正向(d)或反向(i)方向(SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18))转染人肝细胞癌(HepG2)细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含IRES的功能性核酸分子的效力几乎总是比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0445] 实施例13

[0446] 通过蛋白质印记测量相对于空载体转染的HepG2细胞,用HCV(d)和HCV(i)IRUP、Polio(d)和Polio(i)IRUP和cMYC短变体(d)和cMYC短变体(i)IRUP、Apaf-1(d)和Apaf-1(i)IRUP、ELG-1(d)和ELG-1(i)IRUP、DMD(d)和DMD(i)IRUP转染的HepG2细胞中内源性DJ-1蛋白的数量增加。

[0447] 结果总结在图16A和16B中。含IRES的功能性核酸分子反式激活翻译,并且比含SINE的分子更具活性。数据代表N>2个生物重复的平均值和标准偏差。

[0448] 实施例14

[0449] 图17A显示了反式作用功能性核酸分子的微型化版本(minilRUP)的示意图,其中效应子结构域是来自HCV、脊髓灰质炎病毒或cMYC短版本的IRES序列。通过将HCV IRES序列以正向(HCV(d)-SEQ ID NO:31)方向克隆、将Polio IRES序列以正向(Polio(d)-SEQ ID NO:32)和反向(Polio(i)-SEQ ID NO:33)方向克隆、以及将cMYC短IRES序列以正向(cMYC短变体(d)-SEQ ID NO:34)方向克隆,在哺乳动物细胞中用于通过RNA聚合酶II表达的基于SV40的启动子控制下,生成含IRES的功能性核酸分子。

[0450] 如所示,用编码以上所述含微型IRES的功能性核酸分子的质粒转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图17B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含微型IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0451] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和微型IRUP RNA的表达(图17C)。

[0452] 图17D显示了SINEUP-DJ-1和微型IRUP对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的示意图(N＝6)。

[0453] 实施例15

[0454] 图18A显示了反式作用功能性核酸分子的微型化版本(miniIRUP)的示意图,其中效应子结构域是来自HCV、脊髓灰质炎病毒或cMYC短版本的IRES序列。通过将HCV IRES序列以正向(HCV(d)-SEQ ID NO:31)方向克隆、将Polio IRES序列以正向(Polio(d)-SEQ ID NO:32)和反向(Polio(i)-SEQ ID NO:33)方向克隆、以及将cMYC短IRES序列以正向(cMYC短版本(d)-SEQ ID NO:34)方向克隆,在哺乳动物细胞中用于通过RNA聚合酶III表达的基于H1的启动子控制下,生成含IRES的功能性核酸分子。

[0455] 如所示,用编码以上所述含微型IRES的功能性核酸分子的质粒转染HEK 293T/17细胞。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图18B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含微型IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高(在一种情况下类似)。

[0456] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和微型IRUP RNA的表达(图18C)。

[0457] 图18D显示了SINEUP-DJ-1和微型IRUP对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的示意图(N＝6)。

[0458] 实施例16

[0459] 图19A显示了用于在哺乳动物细胞中共同表达两个感兴趣基因的pDUAL-GFP质粒的示意图。pDUAL-GFP质粒包含一个用于通过RNA聚合酶II表达GFP mRNA的CMV启动子元件;和一个用于表达GFP靶向的功能性核酸分子微型化版本的H1启动子(方向相反),以使GFP翻译增强。所产生的对照质粒缺乏翻译增强子功能性核酸分子,且表达基础水平的GFP蛋白。如所示,创建了pDUAL-GFP/miniGFP质粒,其中效应子结构域由SINE B2序列或HCV IRES表示。

[0460] 用单独编码GFP或编码GFP与含SINE(SINE)或含IRES(IRES)的微型功能性核酸分子组合的pDUAL质粒转染HEK 293T/17细胞。仅用pDUAL-GFP转染的细胞用作测试含IRES分子效率的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗GFP抗体进行蛋白质印迹(图19B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。

[0461] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测过表达GFP mRNA(图19C)和功能性核酸SINE或IRES RNA(图19D)的表达。

[0462] 结果表明,当GFP在HEK 293T/17细胞中过表达时,带有与GFP mRNA反义的结合结构域的含IRES功能性核酸分子增强GFP mRNA的翻译。

[0463] 实施例17

[0464] 图20A显示了具有GFP靶向功能性核酸分子的pDUAL-GFP质粒的示意图,其中效应子结构域由SINE或HCV IRES序列表示。

[0465] 用图20A所示的pDUAL-GFP质粒转染人神经母细胞瘤Neuro2a细胞。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗GFP抗体进行蛋白质印迹(图20B)。将β-肌动蛋白

用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。含微型IRES的功能性核酸分子的效力比含SINE的功能性核酸分子的效力更高。

[0466] 实施例18

[0467] 设计了包含DJ-1靶向结合结构域和HCV IRES效应子结构域的功能性核酸分子,其在对HCV IRES顺式活性重要的结构区中具有特定突变。

[0468] 图21显示了HCV IRES RNA二级结构的示意图。HCV IRES结构域(IIa,IIb,IIIa,IIIb,IIIc,IIId,IIIe和IIIf)在不同的方块表示中。还显示了每个结构域对于序列的内部核糖体进入活性的功能,并与核糖体RNA和/或核糖体蛋白接触。功能性核酸分子用作诱变的模板,所述功能性核酸分子中的效应子结构域由衍生自HCV并含有DJ-1靶向结合结构域的IRES序列表示。通过缺失IIIa茎环(HCV IRES序列-IRES的氨基酸156-171=SEQ ID NO:55;IRUP=SEQ ID NO:20)产生M2突变体,IIIa茎环参与与真核翻译起始因子eIF3和核糖体蛋白eS27的接触。通过核苷酸G266的定点核苷酸取代(G266->C-IRES=SEQ ID NO:58;IRUP=SEQ ID NO:23)产生M5突变体,核苷酸G266对18S rRNA的碱基配对和HCV IRES的顺式活性很重要。

[0469] 实施例19

[0470] 如所示,用编码含IRES的功能性核酸分子的哺乳动物表达质粒转染HEK 293T/17细胞,该含IRES的功能性核酸分子具有正向方向的HCV IRES序列(WT)或HCV IRES DIIIa(M2)或G266->C(M5)突变体。用空对照质粒(-)转染对照细胞。用SINEUP-DJ-1转染的细胞用作测试含IRES分子效力的参考。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。用抗DJ-1抗体进行蛋白质印迹(图22A)。将β-肌动蛋白用作上样对照。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。相对于含SINE的功能性核酸分子,WT和含突变的IRES的功能性核酸分子的效力更高或类似。

[0471] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性DJ-1mRNA和功能性核酸RNA的表达(图22B)。为了比较含SINE和含IRES的功能性核酸分子间的RNA数量,将引物定位于效应子结构域的3'端。数据表示平均值±标准偏差。

[0472] 图22C显示了具有SINE或HCV IRES嵌入序列的功能性核酸分子对HEK 293T/17细胞中内源性DJ-1mRNA的翻译增强活性的示意图(N=7)。双星号(**)表示突变的IRES序列相对于含WT HCV IRES的功能性核酸分子,显示在统计上显著降低的翻译增强。

[0473] 该实施例表明,顺式HCV IRES活性所需的结构元件有助于作为包含DJ-1靶向结合结构域的功能性核酸分子中嵌入的效应子结构域(ED)的反式HCV IRES的翻译增强活性的增加。

[0474] 实施例20

[0475] 该实施例表明,靶mRNA中的任何核酸序列均可被包含IRES衍生序列的功能性核酸分子的结合结构域识别。

[0476] 图23A显示了如何将IRES序列的5'的序列和含IRES的细胞mRNA内的序列视为结合结构域的示意图,图23B显示了cMYC mRNA参考序列(NM_002467)中的功能性核酸序列元件。

[0477] 图23C显示了使用c-MYC mRNA作为查询序列在反义方向鉴定部分重叠的靶mRNA蛋白编码序列的生物信息学分析(BLAST)的结果。在表中,标出了注释的基因ENSEMBL命名法、基因名称和基因配对区。IRES衍生的结合结构域可以在反义方向与靶mRNA在5'UTR、第一外

显子、内部外显子中重叠,并具有18至198的不同配对长度。

[0478] 用编码MYC的全长mRNA(cMYC-FL)的哺乳动物表达质粒转染哺乳动物的SAOS细胞(图24A)。用空载体质粒转染对照细胞(对照)。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。如所示,用抗JAG2、抗DYRK2、抗LYS、抗UBE3A、抗NRF1抗体进行蛋白质印迹(图24B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。抗cMYC抗体被用作另外的对照,以验证转染后cMYC蛋白的表达。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品(C),计算诱导倍数。含cMYC IRES的功能性核酸分子对于所有测试的靶mRNA均具有明显的效力,其中结合结构域的长度范围为144(JAG2)至20(UBE3A,NRF1)个核苷酸。

[0479] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性JAG2、DYRK2、LIS1、UBE3A、NRF1和cMYC mRNA的表达(图24C和图24D)。

[0480] 该实施例表明,含IRES的功能性核酸分子的结合结构域和编码靶蛋白的mRNA之间的配对区域可以在位置和长度上变化,而保持其全部翻译增强活性。

[0481] 实施例21

[0482] 该实施例表明,含IRES的功能性核酸分子不需要cMYC的编码蛋白质的CDS部分和DNA结合结构域来增加部分重叠的编码蛋白质的mRNA的翻译。

[0483] 用编码MYC全长mRNA(cMYC-FL)或缺少cMYC DNA结合结构域(deltaC)的和仅包含5'UTR(5'UTR)、或仅包含IRES(IRES)结构域的变体的哺乳动物表达质粒转染哺乳动物SAOS细胞(图25A)。用空载体质粒转染对照细胞(对照)。转染后48小时,将细胞裂解并处理用于蛋白质定量。如所示,用抗JAG2、抗DYRK2、抗LYS、抗UBE3A、抗NRF1抗体进行蛋白质印迹(图25B)。将β-肌动蛋白用作上样对照。抗cMYC抗体被用作另外的对照,以验证转染后cMYC蛋白的表达。蛋白质印迹图像针对β-肌动蛋白归一化和相对于空对照样品,计算诱导倍数。相对于对照细胞的蛋白质量的倍数变化显示在蛋白质印迹相图像的底部。

[0484] 从转染的细胞中纯化RNA。使用特异性引物通过qRT-PCR监测内源性JAG2、DYRK2、LIS1、UBE3A、NRF1和cMYC mRNA的表达(图25C),证明了含IRES的功能性核酸分子的转录后机制。

[0485] 优点

[0486] 本发明的反式作用功能性核酸分子允许在不影响靶mRNA水平的情况下增强几乎任何靶mRNA序列的翻译。

[0487] 相对于EP 2691522中公开的功能性核酸分子,本发明的那些核酸分子避免了由于小鼠SINE序列引起的逆转座的风险,并促进了更高水平的蛋白质翻译增强,如实施例2至11的HEK 293T/17中所示,以及实施例12中的HepG2细胞所示。特别地,在图5(HCV IRES,正向)、图6(Polio IRES,正向和反向)、图7(ECMV IRES,正向和反向;CrPV IRES,正向和反向)、图9(Apaf1 IRES,正向)、图10(ELG-1IRES,正向和反向)、图11(cMYC IRES,正向)、图12(短cMYC IRES,正向)、图12(DMD IRES,正向和反向)中给出了在HEK细胞中更有效的IRES序列的实例。此外,在HepG2细胞中也给出了更有效的IRES序列的实例(图15)。

[0488] 一些IRES序列短至40至50个核苷酸。这允许工程化非常短的反式作用功能性核酸分子。

[0489] 另外,特别是与EP2691522中公开的功能性核酸分子相比,本发明的反式作用功能性核酸分子可以包括特别短的靶结合序列。

[0490] 调节序列和靶结合序列的有限长度均有助于保持短的分子长度,同时允许最佳靶向和蛋白质合成增强。具有短分子的主要优点之一是克服了合成长度超过100个核苷酸的RNA的困难。

[0491] 本发明的反式作用功能性核酸分子的另一个优点是它们具有模块结构,即具有独立的靶结合结构域和独立的效应子结构域。

序列表

<110> 意大利理工学院基金会
国际高级研究院

<120>功能性核酸分子及其用途

<130> 484-17

<160> 65

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV(d) IRUP

[0001] <400> 1

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga gugguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

[0002]

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 2
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV(i) IRUP

<400> 2
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuguuacgu uugguuuuuc uuugagguuu aggauucgug cucauggugc acggucuacg 120

agaccucccg gggcacucgc aagcacccua ucaggcagua ccacaaggcc uuucgcgacc 180

caacacuacu cggcuagcag ucuugcgggg gcacgcccaa aucuccaggc auugagcggg 240

uuuauccaag aaaggacccg gucguccugg caauuccggu guacucaccg guuccgcaga 300

ccacuauggc ucucccggga ggggggucc uggaggcugc acgacacuca uacuaacgcc 360

auggcuagac gcuuucugcg ugaagacagu aguuccucac aggggaguga uucauggugg 420

agugucgccc ccaucagggg gcuggcaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca ccccccaccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

[0003]

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 3
<211> 1366
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> Polio(d) IRUP

<400> 3
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuaugaguc uggacauccc ucaccgguga cgguggucca ggcugcguug gcggccuacc 120

uauggcuaac gccaugggac gcuaguugug aacaaggugu gaagagccua uugagcuaca 180

uaagaauccu ccggccccug aaugcggcua aucccaaccu cggagcaggu ggucacaaac 240

cagugauugg ccugucguaa cgcgcaaguc cguggcggaa ccgacuacuu uggguguccg 300

uguuuccuuu uauuuuauug uggcugcuua uggugacaau cacagauugu uaucauaaag 360

cgaauuggau uggccagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg 420

guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga 480

[0004]

cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccaccccu ccccauaaag gcagaauaaa 540

agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaauaaaa caaaaccaag aucucuccac 600

cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggcccuuug gagugcagga uauucggcag 660

gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc 720

aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga 780

ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug 840

acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa 900

caaggugcag gagguaggag uggguccugg gcaaagcagg gggugcaucc cagccucagg 960

gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg 1020

aucaagaaug ggcaaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc 1080

ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaua gaagaugccc ccccaccccc 1140

ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuacccua uauuacucug uguuggcggc 1200

gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuaa ugacaggaag 1260

uuccuuuugc uuguaugcaa gagauggcuc acacgaugga gaauuuaauc uugaagggcg 1320

aauuccacca cacuggacua guggauccga gcucgguacc aagcuu 1366

<210> 4
<211> 1366
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Polio(i) IRUP

<400> 4
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuggccaau ccaauucgcu uuaugauaac aaucugugau ugucaccaua agcagccaca 120

[0005]

auaaaauaaa aggaaacacg gacacccaaa guagucgguu ccgccacgga cuugcgcguu 180

acgacaggcc aaucacuggu uugugaccac cugcuccgag guuugggauua gccgcauuca 240

ggggccggag gauucuuaug uagcucaaua ggcucuucac accuuguuca caacuagcgu 300

cccauggcgu uagccauagg uaggccgcca acgcagccug gaccaccguc accggugagg 360

gauguccaga cucauagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg 420

guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga 480

cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccaccccu ccccauaaag gcagaauaaa 540

agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaauaaaa caaaaccaag aucucuccac 600

cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggcccuuug gagugcagga uauucggcag 660

gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc 720

aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga 780

ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug 840

acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa 900

caaggugcag gagguaggag uggguccugg gcaaagcagg gggugcaucc cagccucagg 960

gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg 1020

aucaagaaug ggcaaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc 1080

ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaua gaagaugccc ccccaccccc 1140

ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuacccua uauuacucug uguuggcggc 1200

gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuaa ugacaggaag 1260

uuccuuuugc uuguaugcaa gagauggcuc acacgaugga gaauuuaauc uugaagggcg 1320

aauuccacca cacuggacua guggauccga gcucgguacc aagcuu 1366

[0006] <210> 5
<211> 1630
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EMCV(d) IRUP

<400> 5
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuucccccccc ucucccucccc ccccccccuaa cguuacuggc cgaagccgcu uggaauaagg 120

ccggugugcg uuugucuaua uguuauuuuc caccauauug ccgucuuuug gcaaugugag 180

ggcccggaaa ccuggcccug ucuucuugac gagcauuccu aggggucuuu ccccucucgc 240

caaaggaaug caaggucugu ugaaugucgu gaaggaagca guuccucugg aagcuucuug 300

aagacaaaca acgucuguag cgacccuuug caggcagcgg aacccccccac cuggcgacag 360

gugccucugc ggccaaaagc cacguguaua agauacaccu gcaaaggcgg cacaacccca 420

[0007]

gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagagucaaa uggcucuccu caagcguauu 480

caacaagggg cugaaggaug cccagaaggu accccauugu augggaucug aucuggggcc 540

ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuaaaa aacgucuagg ccccccgaac 600

cacggggacg ugguuuuccu uugaaaaaca cgaugauaaa gucucuuaaa aaacaaacaa 660

acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac uauaauucua guacucagga 720

ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauauaagga gaaucuguug ucacccccac 780

cccucccccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaaac aaauaaacaa acaacccaau 840

aaaacaaaac caagaucucu ccaccuuuuc uuugcuuuuu cagacuuugu aauaaggccc 900

uuuggagugc aggauauucg gcaggacaag cagagaggga gaccaucagu ucuuucuuug 960

aucaagaaga cuauguuccu uagcaaacug guguguauua ucucuuaugc aaugagccug 1020

gaaagagggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug gaugguacgc uacagagacu 1080

cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguagguu cagggaagaa uuggccugug 1140

aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggu gcaggaggua ggaguggguc cugggcaaag 1200

caggggugc aucccagccu cagggaauag cacagcagag gucuguugau gcaugcgagu 1260

gcaugaccug cuugccaaua gacgaucaag aaugggcaaa gcaucauggg ugaugagugg 1320

gagaggggau gagacauucc uuucucccug cugagacuuc cauugaaccg augaguucug 1380

aauagaagau gccccccccac ccccccacca guguagaauc ugaagggagg cauauauuac 1440

ccuauauuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc aaccuuccca uacauuucau 1500

ugggcauaca cuaaugacag gaaguuccuu uugcuuguau gcaagagaug gcucacacga 1560

uggagaauuu aaucuugaag ggcgaauucc accacacugg acuaguggau ccgagcucgg 1620

uaccaagcuu 1630

<210> 6

<211> 1630
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EMCV(i) IRUP

<400> 6

[0008]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuuuaucau cguguuuuuc aaaggaaaac cacgucccg ugguucgggg ggccuagacg 120

uuuuuuaacc ucgacuaaac acauguaaag caugugcacc gaggccccag aucagauccc 180

auacaauggg guaccuucug ggcauccuuc agccccuugu ugaauacgcu ugaggagagc 240

cauuugacuc uuuccacaac uauccaacuc acaacguggc acuggggguug ugccgccuuu 300

gcagguguau cuuauacacg uggcuuuugg ccgcagaggc accugucgcc aggugggggg 360

uuccgcugcc ugcaaagggu cgcuacagac guuguuuguc uucaagaagc uuccagagga 420

acugcuuccu ucacgacauu caacagaccu ugcauuccuu uggcgagagg ggaaagaccc 480

cuaggaaugc ucgucaagaa gacagggcca gguuuccggg cccucacauu gccaaaagac 540

ggcaauaugg uggaaaauaa cauauagaca aacgcacacc ggccuuauuc caagcggcuu 600

cggccaguaa cguuaggggg gggggaggga gagggggga gucucuuaaa aaacaaacaa 660

acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac uauaauucua guacucagga 720

ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauauaagga gaaucuguug ucacccccac 780

cccucccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaaac aaauaaacaa acaacccaau 840

aaaacaaaac caagaucucu ccaccuuuuc uuugcuuuuu cagacuuugu aauaaggccc 900

uuuggagugc aggauauucg gcaggacaag cagagaggga gaccaucagu ucuuucuuug 960

aucaagaaga cuauguuccu uagcaaacug guguguauua ucucuuaugc aaugagccug 1020

gaaagagggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug gaugguacgc uacagagacu 1080

cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguagguu cagggaagaa uuggccugug 1140

aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggu gcaggaggua ggaguggguc cugggcaaag 1200

caggggugc aucccagccu cagggaauag cacagcagag gucuguugau gcaugcgagu 1260

gcaugaccug cuugccaaua gacgaucaag aaugggcaaa gcaucauggg ugaugagugg 1320

gagaggggau gagacauucc uuucucccug cugagacuuc cauugaaccg augaguucug 1380

aauagaagau gccccccccac ccccccacca guguagaauc ugaagggagg cauauauuac 1440

ccuauauuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc aaccuucccа uacauuucau 1500

ugggcauaca cuaaugacag gaaguuccuu uugcuuguau gcaagagaug gcucacacga 1560

uggagaauuu aaucuugaag ggcgaauucc accacacugg acuaguggau ccgagcucgg 1620

uaccaagcuu 1630

[0009] <210> 7
<211> 1140
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CrPV(d) IRUP

<400> 7
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuaaagcaa aaaugugauc uugcuuguaa auacaauuuu gagagguuaa uaaauuacaa 120

guagugcuau uuuuguauuu agguuagcua uuuagcuuua cguuccagga ugccuagugg 180

cagccccaca auauccagga agcccucucu gcgguuuuuc agauuaggua gucgaaaaac 240

cuaagaaauu uaccuagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg 300

guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga 360

cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccaccccu ccccauaaag gcagaauaaa 420

agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaauaaaa caaaaccaag aucucuccac 480

cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggcccuuug gagugcagga uauucggcag 540

gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc 600

aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga 660

ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug 720

acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa 780

caaggugcag gagguaggag uggguccugg gcaaagcagg gggugcaucc cagccucagg 840

gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg 900

aucaagaaug ggcaaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc 960

ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaua gaagaugccc ccccaccccc 1020

ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuacccua uauuacucug uguuggcggc 1080

[0010]

gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuaa ugacaggaag 1140

<210> 8
<211> 1246
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CrPV(i) IRUP

<400> 8
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuagguaaa uuucuuaggu uuuucgacua ccuaaucuga aaaaccgcag agagggcuuc 120

cuggauauug uggggcugcc acuaggcauc cuggaacgua aagcuaaaua gcuaaccuaa 180

auacaaaaau agcacuacuu guaauuuauu aaccucucaa aauuguauuu acaagcaaga 240

ucacauuuuu gcuuuagucu cuuaaaaaac aaacaaacga acgaacagca agggagcugg 300

guaugacaac acauacuaua auucuaguac ucaggaugcu gaaacaggag gauugccuga 360

cugggagaua uaaggagaau cuguugucac ccccaccccu ccccauaaag gcagaauaaa 420

agaacguccu auaaacaaau aaacaaacaa cccaauaaaa caaaaccaag aucucuccac 480

cuuuucuuug cuuuuucaga cuuuguaaua aggcccuuug gagugcagga uauucggcag 540

gacaagcaga gagggagacc aucaguucuu ucuuugauca agaagacuau guuccuuagc 600

aaacuggugu guauuaucuc uuaugcaaug agccuggaaa gagggcacag ccaccgagga 660

ugguacagca uggauggaug guacgcuaca gagacucggg agcccaacug ugaguggcug 720

acuggcaugg uagguucagg gaagaauugg ccugugaaga aaauguucuu gaaaagugaa 780

caaggugcag gagguaggag uggguccugg gcaaagcagg gggugcaucc cagccucagg 840

gaauagcaca gcagaggucu guugaugcau gcgagugcau gaccugcuug ccaauagacg 900

aucaagaaug ggcaaagcau caugggugau gagugggaga ggggaugaga cauuccuuuc 960

[0011]

ucccugcuga gacuuccauu gaaccgauga guucugaaua gaagaugccc ccccaccccc 1020

ccaccagugu agaaucugaa gggaggcaua uauuacccua uauuacucug uguuggcggc 1080

gagcuaucug acagccaacc uucccauaca uuucauuggg cauacacuaa ugacaggaag 1140

uuccuuuugc uuguaugcaa gagauggcuc acacgaugga gaauuuaauc uugaagggcg 1200

aauuccacca cacuggacua guggauccga gcucgguacc aagcuu 1246

<210> 9
<211> 1285
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Apaf-1(d) IRUP

<400> 9
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

[0012]

cuucagagau ccaggggagg cgccugugag gcccggaccu gccccggggc gaaggguaug 120

uggcgagaca gagcccugca ccccuaauuc ccgguggaaa acuccuguug ccguuucccu 180

ccaccggccu ggagucuccc agucuugucc cggcagugcc gcccucccca cuaagaccua 240

ggcgcaaagg cuuggcucau gguugacagc ucagagagag aaagaucuga gggaagucuc 300

uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg uaugacaaca cauacuauaa 360

uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac ugggagauau aaggagaauc 420

uguugucacc cccaccccuc cccauaaagg cagaauaaaa gaacguccua uaaacaaaua 480

aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc uuuucuuugc uuuuucagac 540

uuuguaauaa ggcccuuugg agugcaggau auucggcagg acaagcagag agggagacca 600

ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca aacuggugug uauuaucucu 660

uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau gguacagcau ggauggaugg 720

uacgcuacag agacucggga gcccaacugu gaguggcuga cuggcauggu agguucaggg 780

aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac aaggugcagg agguaggagu 840

ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg aauagcacag cagaggucug 900

uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga ucaagaaugg gcaaagcauc 960

augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuucu cccugcugag acuuccauug 1020

aaccgaugag uucugaauag aagaugcccc cccacccccc caccagugua gaaucugaag 1080

ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg agcuaucuga cagccaaccu 1140

ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu uccuuuugcu uguaugcaag 1200

agauggcuca cacgauggag aauuuaaucu ugaagggcga auuccaccac acuggacuag 1260

uggauccgag cucgguacca agcuu 1285

<210> 10

<211> 1285
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Apaf-1(i) IRUP

<400> 10

[0013]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuucccuca gaucuuucuc ucucugagcu gucaaccaug agccaagccu uugcgccuag 120

gucuuagugg ggagggcggc acugccggga caagacuggg agacuccagg ccgguggagg 180

gaaacggcaa caggaguuuu ccaccgggaa uuaggggugc agggcucugu cucgccacau 240

acccuucgcc ccggggcagg uccgggccuc acaggcgccu ccccuggauc ucugagucuc 300

uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg uaugacaaca cauacuauaa 360

uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac ugggagauau aaggagaauc 420

uguugucacc cccaccccuc cccauaaagg cagaauaaaa gaacguccua uaaacaaaua 480

aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc uuuucuuugc uuuuucagac 540

uuuguaauaa ggcccuuugg agugcaggau auucggcagg acaagcagag agggagacca 600

ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca aacuggugug uauuaucucu 660

uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau gguacagcau ggauggaugg 720

uacgcuacag agacucggga gcccaacugu gaguggcuga cuggcauggu agguucaggg 780

aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac aaggugcagg agguaggagu 840

ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg aauagcacag cagaggucug 900

uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga ucaagaaugg gcaaagcauc 960

augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuucu cccugcugag acuuccauug 1020

aaccgaugag uucugaauag aagaugcccc cccacccccc caccagugua gaaucugaag 1080

ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg agcuaucuga cagccaaccu 1140

ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu uccuuuugcu uguaugcaag 1200

agauggcuca cacgauggag aauuuaaucu ugaagggcga auuccaccac acuggacuag 1260

uggauccgag cucgguacca agcuu 1285

<210> 11
<211> 1514
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ELG-1(d) IRUP

<400> 11
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuacuuuug gugggcauuu aaaaaugugu guguaugugu auauauguau guguauguau 120

[0014]

guguauauau guauauguau guauguaucg cguguaugug uguauguaug cauguguaug 180

uauguauaug cauguaugug uauguguaua uauguaugug uguguaugua uaugugugug 240

uauguguaug ugugugugua ugugugugug uauguaugua uguauguaua uguauuauac 300

acauauacac auauugguuu uuuuaaucau uugagaguua guugaagaua aaaacccauc 360

accccuaaau guauuccaaa gaauaagaac auuguuuuau acauagcaca cuuaacaaaa 420

ucaagaaauu uaacauuaau acaguacugu uaccuaaucc guagucgauu uucaaauuuu 480

gucaguuguu ccaauaaugu ccuuuauaua uuccccgccc agcagucucu uaaaaaacaa 540

acaaacgaac gaacagcaag ggagcugggu augacaacac auacuauaau ucuaguacuc 600

aggaugcuga aacaggagga uugccugacu gggagauaua aggagaaucu guugucaccc 660

ccacccccucc ccauaaaggc agaauaaaag aacguccuau aaacaaauaa acaaacaacc 720

caauaaaaca aaaccaagau cucuccaccu uuucuuugcu uuuucagacu uuguaauaag 780

gcccuuugga gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccau caguucuuuc 840

uuugaucaag aagacuaugu uccuuagcaa acuggugugu auuaucucuu augcaaugag 900

ccuggaaaga gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga 960

gacucgggag cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggga agaauuggcc 1020

ugugaagaaa auguucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccugggc 1080

aaagcagggg gugcauccca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc 1140

gagugcauga ccugcuugcc aauagacgau caagaauggg caaagcauca ugggugauga 1200

gugggagagg ggaugagaca uuccuuucuc ccugcugaga cuuccauuga accgaugagu 1260

ucugaauaga agaugccccc ccacccccc accaguguag aaucugaagg gaggcauaua 1320

uuacccuaua uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu 1380

ucauugggca uacacuaaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac 1440

[0015]

acgauggaga auuuaaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggauccgagc 1500

ucgguaccaa gcuu 1514

<210> 12
<211> 1514
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ELG-1(i) IRUP

<400> 12
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugcugggc ggggaauaua uaaaggacau uauuggaaca acugacaaaa uuugaaaauc 120

gacuacggau uagguaacag uacuguauua auguuaaauu ucuugauuuu guuaagugug 180

cuauguauaa aacaauguuc uuauucuuug gaauacauuu aggggugaug gguuuuuauc 240

uucaacuaac ucucaaauga uuaaaaaaac caauaugugu auauguguau aauacauaua 300

cauacauaca uacauacaca cacacauaca cacacacaua cacauacaca cacauauaca 360

uacacacaca uacauauaua cacauacaca uacaugcaua uacauacaua cacaugcaua 420

cauacacaca uacacgcgau acauacauac auauacauau auacacauac auacacauac 480

auauauacac auacacacac auuuuuaaau gcccaccaaa aguagucucu uaaaaaacaa 540

acaaacgaac gaacagcaag ggagcugggu augacaacac auacuauaau ucuaguacuc 600

aggaugcuga aacaggagga uugccugacu gggagauaua aggagaaucu guugucaccc 660

ccacccccucc ccauaaaggc agaauaaaag aacguccuau aaacaaauaa acaaacaacc 720

caauaaaaca aaaccaagau cucuccaccu uuucuuugcu uuuucagacu uuguaauaag 780

gcccuuugga gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccau caguucuuuc 840

uuugaucaag aagacuaugu uccuuagcaa acuggugugu auuaucucuu augcaaugag 900

[0016]

ccuggaaaga gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga 960

gacucgggag cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggga agaauuggcc 1020

ugugaagaaa auguucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccugggc 1080

aaagcagggg gugcauccca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc 1140

gagugcauga ccugcuugcc aauagacgau caagaauggg caaagcauca ugggugauga 1200

gugggagagg ggaugagaca uuccuuucuc ccugcugaga cuuccauuga accgaugagu 1260

ucugaauaga agaugccccc ccaccccccc accaguguag aaucugaagg gaggcauaua 1320

uuacccuaua uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu 1380

ucauugggca uacacuaaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac 1440

acgauggaga auuuaaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggauccgagc 1500

ucgguaccaa gcuu 1514

<210> 13
<211> 1449
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> cMYC 全长(d) IRUP

<400> 13

[0017]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuaauucca gcgagaggca gagggagcga gcgggcggcc ggcuagggug gaagagccgg 120

gcgagcagag cugcgcugcg ggcguccugg gaagggagau ccggagcgaa uaggggcuu 180

cgccucuggc ccagcccucc cgcuugaucc cccaggccag cgguccgcaa cccuugccgc 240

auccacgaaa cuuugcccau agcagcgggc gggcacuuug cacuggaacu uacaacaccc 300

gagcaaggac gcgacucucc cgacgcgggg aggcuauucu gcccauuugg ggacacuucc 360

ccgccgcugc caggacccgc uucucugaaa ggcucuccuu gcagcugcuu agacgcugga 420

uuuuuuucgg guaguggaaa accagcagcc ucccgcgaag ucucuuaaaa aacaaacaaa 480

cgaacgaaca gcaagggagc uggguaugac aacacauacu auaauucuag uacucaggau 540

gcugaaacag gaggauugcc ugacugggag auauaaggag aaucuguugu cacccccacc 600

ccucccccaua aaggcagaau aaaagaacgu ccuauaaaca aauaaacaaa caacccaaua 660

aaacaaaacc aagaucucuc caccuuuucu uugcuuuuuc agacuuugua auaaggcccu 720

uuggagugca ggauauucgg caggacaagc agagagggag accaucaguu cuuucuuuga 780

ucaagaagac uauguuccuu agcaaacugg uguguauuau cucuuaugca augagccugg 840

aaagagggca cagccaccga ggaugguaca gcauggaugg augguacgcu acagagacuc 900

gggagcccaa cugugagugg cugacuggca ugguagguuc agggaagaau uggccuguga 960

agaaaauguu cuugaaaagu gaacaaggug caggagguag gagugggucc ugggcaaagc 1020

aggggugca ucccagccuc agggaauagc acagcagagg ucuguugaug caugcgagug 1080

caugaccugc uugccaauag acgaucaaga augggcaaag caucaugggu gaugaguggg 1140

agaggggaug agacauuccu uucucccugc ugagacuucc auugaaccga ugaguucuga 1200

auagaagaug ccccccccacc cccccaccag uguagaaucu gaagggaggc auauauuacc 1260

cuauauuacu cuguguuggc ggcgagcuau cugacagcca accuucccau acauuucauu 1320

gggcauacac uaaugacagg aaguuccuuu ugcuuguaug caagagaugg cucacacgau 1380

ggagaauuua aucuugaagg gcgaauucca ccacacugga cuaguggauc cgagcucggu 1440

accaagcuu 1449

<210> 14
<211> 1449
<212> RNA
<213> 人工序列

[0018]

<220>
<223> cMYC 全长(i) IRUP

<400> 14
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuucgcggg aggcugcugg uuuuccacua cccgaaaaaa auccagcguc uaagcagcug 120

caaggagagc cuuucagaga agcggguccu ggcagcggcg gggaaguguc cccaaauggg 180

cagaauagcc uccccgcguc gggagagucg cguccuugcu cggguguugu aaguuccagu 240

gcaaagugcc cgcccgcugc uaugggcaaa guuucgugga ugcggcaagg guugcggacc 300

gcuggccugg gggaucaagc gggagggcug ggccagaggc gaagcccccu auucgcuccg 360

gaucucccuu cccaggacgc ccgcagcgca gcucugcucg cccggcucuu ccacccuagc 420

cggccgcccg cucgcucccu cugccucucg cuggaauuag ucucuuaaaa aacaaacaaa 480

cgaacgaaca gcaagggagc uggguaugac aacacauacu auaauucuag uacucaggau 540

gcugaaacag gaggauugcc ugacugggag auauaaggag aaucuguugu caccccccacc 600

ccucccccaua aaggcagaau aaaagaacgu ccuauaaaca aauaaacaaa caacccaaua 660

aaacaaaacc aagaucucuc caccuuuucu uugcuuuuuc agacuuugua auaaggcccu 720

uuggagugca ggauauucgg caggacaagc agagagggag accaucaguu cuuucuuuga 780

ucaagaagac uauguuccuu agcaaacugg uguguauuau cucuuaugca augagccugg 840

aaagagggca cagccaccga ggaugguaca gcauggaugg augguacgcu acagagacuc 900

gggagcccaa cugugagugg cugacuggca ugguagguuc agggaagaau uggccuguga 960

agaaaauguu cuugaaaagu gaacaaggug caggagguag gagugggucc ugggcaaagc 1020

agggggugca ucccagccuc agggaauagc acagcagagg ucuguugaug caugcgagug 1080

caugaccugc uugccaauag acgaucaaga augggcaaag caucaugggu gaugaguggg 1140

agaggggaug agacauuccu uucucccugc ugagacuucc auugaaccga ugaguucuga 1200

[0019]

auagaagaug ccccccccacc cccccaccag uguagaaucu gaagggaggc auauauuacc 1260

cuauauuacu cuguguuggc ggcgagcuau cugacagcca accuucccau acauuucauu 1320

gggcauacac uaaugacagg aaguuccuuu ugcuuguaug caagagaugg cucacacgau 1380

ggagaauuua aucuugaagg gcgaauucca ccacacugga cuaguggauc cgagcucggu 1440

accaagcuu 1449

<210> 15
<211> 1102
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> cMYC 短变体(d) IRUP

<400> 15
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugggcacu uugcacugga acuuacaaca cccgagcaag gacgcgacuc uagucucuua 120

aaaaacaaac aaacgaacga acagcaaggg agcuggguau gacaacacau acuauaauuc 180

uaguacucag gaugcugaaa caggaggauu gccugacugg gagauauaag gagaaucugu 240

ugucaccccc accccucccc auaaaggcag aauaaaagaa cguccuauaa acaaauaaac 300

aaacaaccca auaaaacaaa accaagaucu cuccaccuuu ucuuugcuuu uucagacuuu 360

guaauaaggc ccuuuggagu gcaggauauu cggcaggaca agcagagagg gagaccauca 420

guucuuucuu ugaucaagaa gacuauguuc cuuagcaaac ugguguguau uaucucuuau 480

gcaaugagcc uggaaagagg gcacagccac cgaggauggu acagcaugga uggaugguac 540

gcuacagaga cucgggagcc caacugugag uggcugacug gcaugguagg uucagggaag 600

aauuggccug ugaagaaaau guucuugaaa agugaacaag gugcaggagg uaggaguggg 660

uccugggcaa agcagggggu gcaucccagc cucagggaau agcacagcag aggucuguug 720

[0020]

augcaugcga gugcaugacc ugcuugccaa uagacgauca agaaugggca aagcaucaug 780

ggugaugagu gggagagggg augagacauu ccuuucuccc ugcugagacu uccauugaac 840

cgaugaguuc ugaauagaag augccccccc acccccccac caguguagaa ucugaaggga 900

ggcauauauu acccuauauu acucuguguu ggcggcgagc uaucugacag ccaaccuucc 960

cauacauuuc auugggcaua cacuaaugac aggaaguucc uuuugcuugu augcaagaga 1020

uggcucacac gauggagaau uuaaucuuga agggcgaauu ccaccacacu ggacuagugg 1080

auccgagcuc gguaccaagc uu 1102

<210> 16
<211> 1102
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> cMYC 短变体(i) IRUP

<400> 16

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuagagucg cguccuugcu cggguguugu aaguuccagu gcaaagugcc cagucucuua 120

aaaaacaaac aaacgaacga acagcaaggg agcuggguau gacaacacau acuauaauuc 180

uaguacucag gaugcugaaa caggaggauu gccugacugg gagauauaag gagaaucugu 240

ugucaccccc accccucccc auaaaggcag aauaaaagaa cguccuauaa acaaauaaac 300

aaacaaccca auaaaacaaa accaagaucu cuccaccuuu ucuuugcuuu uucagacuuu 360

guaauaaggc ccuuuggagu gcaggauauu cggcaggaca agcagagagg gagaccauca 420

guucuuucuu ugaucaagaa gacuauguuc cuuagcaaac ugguguguau uaucucuuau 480

gcaaugagcc uggaaagagg gcacagccac cgaggauggu acagcaugga uggaugguac 540

gcuacagaga cucgggagcc caacugugag uggcugacug gcaugguagg uucagggaag 600

[0021] aauuggccug ugaagaaaau guucuugaaa agugaacaag gugcaggagg uaggaguggg 660

uccugggcaa agcagggggu gcaucccagc cucagggaau agcacagcag aggucuguug 720

augcaugcga gugcaugacc ugcuugccaa uagacgauca agaaugggca aagcaucaug 780

ggugaugagu gggagagggg augagacauu ccuuucuccc ugcugagacu uccauugaac 840

cgaugaguuc ugaauagaag augccccccc acccccccac caguguagaa ucugaaggga 900

ggcauauauu acccuauauu acucuguguu ggcggcgagc uaucugacag ccaaccuucc 960

cauacauuuc auugggcaua cacuaaugac aggaaguucc uuuugcuugu augcaagaga 1020

uggcucacac gauggagaau uuaaucuuga agggcgaauu ccaccacacu ggacuagugg 1080

auccgagcuc gguaccaagc uu 1102

<210> 17

<211> 1125

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> DMD(d) IRUP

<400> 17

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuguacuga caucguagau ggaaaucaua aacugacucu ugguuugauu uggaauauaa 120

uccuccacug gcagagucuc uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg 180

uaugacaaca cauacuauaa uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac 240

ugggagauau aaggagaauc uguugucacc cccaccccuc cccauaaagg cagaauaaaa 300

gaacguccua uaaacaaaua aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc 360

uuuucuuugc uuuuucagac uuuguaauaa ggcccuuugg agugcaggau auucggcagg 420

acaagcagag agggagacca ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca 480

[0022]

aacuggugug uauuaucucu uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau 540

gguacagcau ggauggaugg uacgcuacag agacucggga gcccaacugu gaguggcuga 600

cuggcauggu agguucaggg aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac 660

aaggugcagg agguaggagu ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg 720

aauagcacag cagaggucug uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga 780

ucaagaaugg gcaaagcauc augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuucu 840

cccugcugag acuuccauug aaccgaugag uucugaauag aagaugcccc cccacccccc 900

caccagugua gaaucugaag ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg 960

agcuaucuga cagccaaccu ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu 1020

uccuuuugcu uguaugcaag agauggcuca cacgauggag aauuuaaucu ugaagggcga 1080

auuccaccac acuggacuag uggauccgag cucgguacca agcuu 1125

<210> 18
<211> 1125
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DMD(i) IRUP

<400> 18

[0023]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuucugccag uggaggauua uauuccaaau caaaccaaga gucaguuuau gauuuccauc 120

uacgauguca guacagucuc uuaaaaaaca aacaaacgaa cgaacagcaa gggagcuggg 180

uaugacaaca cauacuauaa uucuaguacu caggaugcug aaacaggagg auugccugac 240

ugggagauau aaggagaauc uguugucacc cccaccccuc cccauaaagg cagaauaaaa 300

gaacguccua uaaacaaaua aacaaacaac ccaauaaaac aaaaccaaga ucucuccacc 360

uuuucuuugc uuuuucagac uuuguaauaa ggcccuuugg agugcaggau auucggcagg 420

acaagcagag agggagacca ucaguucuuu cuuugaucaa gaagacuaug uuccuuagca 480

aacuggugug uauuaucucu uaugcaauga gccuggaaag agggcacagc caccgaggau 540

gguacagcau ggauggaugg uacgcuacag agacucggga gcccaacugu gaguggcuga 600

cuggcauggu agguucaggg aagaauuggc cugugaagaa aauguucuug aaaagugaac 660

aaggugcagg agguaggagu ggguccuggg caaagcaggg ggugcauccc agccucaggg 720

aauagcacag cagaggucug uugaugcaug cgagugcaug accugcuugc caauagacga 780

ucaagaaugg gcaaagcauc augggugaug agugggagag gggaugagac auuccuuucu 840

cccugcugag acuuccauug aaccgaugag uucugaauag aagaugcccc cccacccccc 900

caccagugua gaaucugaag ggaggcauau auuacccuau auuacucugu guuggcggcg 960

agcuaucuga cagccaaccu ucccauacau uucauugggc auacacuaau gacaggaagu 1020

uccuuuugcu uguaugcaag agauggcuca cacgauggag aauuuaaucu ugaagggcga 1080

auuccaccac acuggacuag uggauccgag cucgguacca agcuu 1125

<210> 19
<211> 1357
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV Δ II(d) IRUP

<400> 19
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacccccccu cccgggagag 120

ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc caggacgacc ggguccuuuc 180

uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc cccgcaagac ugcuagccga 240

[0024]

guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau agggugcuug cgagugcccc 300

gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua aaccucaaag aaaaaccaaa 360

cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc aagggagcug gguaugacaa 420

cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga ggauugccug acugggagau 480

auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa ggcagaauaa aagaacgucc 540

uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa gaucucucca ccuuuucuuu 600

gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg auauucggca ggacaagcag 660

agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua uguuccuuag caaacuggug 720

uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca gccaccgagg augguacagc 780

auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu gugaguggcu gacuggcaug 840

guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu ugaaaaguga acaaggugca 900

ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc ccagccucag ggaauagcac 960

agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu gccaauagac gaucaagaau 1020

gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag acauuccuuu cucccugcug 1080

agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc ccccccaccc cccaccagug 1140

uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu guguuggcgg cgagcuaucu 1200

gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua augacaggaa guuccuuuug 1260

cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau cuugaagggc gaauuccacc 1320

acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1357

<210> 20
<211> 1421
<212> RNA
<213> 人工序列

[0025]

<220>
<223> HCV Δ IIIa(d) IRUP

<400> 20
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaaaa uugccaggac gaccgggucc 240

uuucuuggau aaacccgcuc aaugccugga gauuugggcg ugccccccgca agacugcuag 300

ccgaguagug uugggucgcg aaaggccuug ugguacugcc ugauagggug cuugcgagug 360

ccccgggagg ucucguagac cgugcaccau gagcacgaau ccuaaaccuc aaagaaaaac 420

caaacguaac agucucuuaa aaaacaaaca aacgaacgaa cagcaaggga gcuggguaug 480

acaacacaua cuauaauucu aguacucagg augcugaaac aggaggauug ccugacuggg 540

agauauaagg agaaucuguu gucaccccca ccccucccca uaaaggcaga auaaaagaac 600

guccuauaaa caaauaaaca aacaacccaa uaaaacaaaa ccaagaucuc uccaccuuuu 660

cuuugcuuuu ucagacuuug uaauaaggcc cuuuggagug caggauauuc ggcaggacaa 720

gcagagaggg agaccaucag uucuuucuuu gaucaagaag acuauguucc uuagcaaacu 780

gguguguauu aucucuuaug caaugagccu ggaaagaggg cacagccacc gaggauggua 840

cagcauggau ggaugguacg cuacagagac ucgggagccc aacugugagu ggcugacugg 900

caugguaggu ucagggaaga auuggccugu gaagaaaaug uucuugaaaa gugaacaagg 960

ugcaggaggu aggagugggu ccugggcaaa gcagggggug caucccagcc ucagggaaua 1020

gcacagcaga ggucuguuga ugcaugcgag ugcaugaccu gcuugccaau agacgaucaa 1080

gaaugggcaa agcaucaugg gugaugagug ggagagggga ugagacauuc cuuucucccu 1140

gcugagacuu ccauugaacc gaugaguucu gaauagaaga ugccccccca ccccccccacc 1200

[0026]

aguguagaau cugaagggag gcauauauua cccuauauua cucuguguug gcggcgagcu 1260

aucugacagc caaccuuccc auacauuuca uugggcauac acuaaugaca ggaaguuccu 1320

uuugcuugua ugcaagagau ggcucacacg auggagaauu uaaucuugaa gggcgaauuc 1380

caccacacug gacuagugga uccgagcucg guaccaagcu u 1421

<210> 21
<211> 1410
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV Δ IIId(d) IRUP

<400> 21
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuacuugu gguacugccu gauagggugc uugcgagugc cccgggaggu 360

cucguagacc gugcaccaug agcacgaauc cuaaaccuca aagaaaaacc aaacguaaca 420

gucucuuaaa aaacaaacaa acgaacgaac agcaagggag cuggguauga caacacauac 480

uauaauucua guacucagga ugcugaaaca ggaggauugc cugacuggga gauauaagga 540

gaaucuguug ucacccccac cccuccccau aaaggcagaa uaaaagaacg uccuauaaac 600

aaauaaacaa acaacccaau aaaacaaaac caagaucucu ccaccuuuuc uuugcuuuuu 660

cagacuuugu aauaaggccc uuuggagugc aggauauucg gcaggacaag cagagaggga 720

gaccaucagu ucuuucuuug aucaagaaga cuauguuccu uagcaaacug guguguauua 780

[0027]

ucucuuaugc aaugagccug gaaagagggc acagccaccg aggaugguac agcauggaug 840

gaugguacgc uacagagacu cgggagccca acugugagug gcugacuggc augguagguu 900

cagggaagaa uuggccugug aagaaaaugu ucuugaaaag ugaacaaggu gcaggaggua 960

ggaguggguc cugggcaaag caggggugc aucccagccu cagggaauag cacagcagag 1020

gucuguugau gcaugcgagu gcaugaccug cuugccaaua gacgaucaag aaugggcaaa 1080

gcaucauggg ugaugagugg gagaggggau gagacauucc uuucucccug cugagacuuc 1140

cauugaaccg augaguucug aauagaagau gccccccccac ccccccacca guguagaauc 1200

ugaagggagg cauauauuac ccuauauuac ucuguguugg cggcgagcua ucugacagcc 1260

aaccuuccca uacauuucau ugggcauaca cuaaugacag gaaguuccuu uugcuuguau 1320

gcaagagaug gcucacacga uggagaauuu aaucuugaag ggcgaauucc accacacugg 1380

acuaguggau ccgagcucgg uaccaagcuu 1410

<210> 22
<211> 1384
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV Δ IV(d) IRUP

<400> 22

[0028]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guaagucucu uaaaaaacaa acaaacgaac 420

gaacagcaag ggagcugggu augacaacac auacuauaau ucuaguacuc aggaugcuga 480

aacaggagga uugccugacu gggagauaua aggagaaucu guugucaccc ccacccccucc 540

ccauaaaggc agaauaaaag aacguccuau aaacaaauaa acaaacaacc caauaaaaca 600

aaaccaagau cucuccaccu uuucuuugcu uuuucagacu uuguaauaag gcccuuugga 660

gugcaggaua uucggcagga caagcagaga gggagaccau caguucuuuc uuugaucaag 720

aagacuaugu uccuuagcaa acuggugugu auuaucucuu augcaaugag ccuggaaaga 780

gggcacagcc accgaggaug guacagcaug gauggauggu acgcuacaga gacucgggag 840

cccaacugug aguggcugac uggcauggua gguucaggga agaauuggcc ugugaagaaa 900

auguucuuga aaagugaaca aggugcagga gguaggagug gguccugggc aaagcagggg 960

gugcauccca gccucaggga auagcacagc agaggucugu ugaugcaugc gagugcauga 1020

ccugcuugcc aauagacgau caagaauggg caaagcauca ugggugauga gugggagagg 1080

ggaugagaca uuccuuucuc ccugcugaga cuuccauuga accgaugagu ucugaauaga 1140

agaugccccc ccacccccc accaguguag aaucugaagg gaggcauaua uuacccuaua 1200

uuacucugug uuggcggcga gcuaucugac agccaaccuu cccauacauu ucauugggca 1260

uacacuaaug acaggaaguu ccuuuugcuu guaugcaaga gauggcucac acgauggaga 1320

auuuaaucuu gaagggcgaa uuccaccaca cuggacuagu ggauccgagc ucgguaccaa 1380

gcuu 1384

<210> 23
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0029] <223> HCV G266->C(d) IRUP

<400> 23
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguucg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga gugguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

[0030]

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 24
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV U228->C(d) IRUP

<400> 24
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu cgggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca ccccccacccc ucccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

[0031]

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 25

<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV G267->C(d) IRUP

<400> 25

[0032]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugc gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 26
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV G268->C(d) IRUP

[0033] <400> 26
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg cucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca ccccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga gugguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

[0034]

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 27
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV G266G267G268-> C266C267C268(d) IRUP

<400> 27
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguucc cucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

[0035]

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 28
<211> 1437
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> HCV G266->A/G268->T(d) IRUP

<400> 28

[0036]

ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguuag uucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga gugguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 29
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV IIIa->IIIa-comp; AGTA->TCAT(d) IRUP

<400> 29
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

[0037]

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugucauca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga guggguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

[0038]

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 30
<211> 1437
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV IIIe->IIIe-comp; TGATAG->ACTATC(d) IRUP

<400> 30
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccacua 360

ucggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaacaguc ucuuaaaaaa caaacaaacg aacgaacagc 480

aagggagcug gguaugacaa cacauacuau aauucuagua cucaggaugc ugaaacagga 540

ggauugccug acugggagau auaaggagaa ucuguuguca cccccacccc uccccauaaa 600

ggcagaauaa aagaacgucc uauaaacaaa uaaacaaaca acccaauaaa acaaaaccaa 660

gaucucucca ccuuuucuuu gcuuuuucag acuuuguaau aaggcccuuu ggagugcagg 720

auauucggca ggacaagcag agagggagac caucaguucu uucuuugauc aagaagacua 780

uguuccuuag caaacuggug uguauuaucu cuuaugcaau gagccuggaa agagggcaca 840

gccaccgagg augguacagc auggauggau gguacgcuac agagacucgg gagcccaacu 900

gugaguggcu gacuggcaug guagguucag ggaagaauug gccugugaag aaaauguucu 960

[0039]

ugaaaaguga acaaggugca ggagguagga gugguccug ggcaaagcag ggggugcauc 1020

ccagccucag ggaauagcac agcagagguc uguugaugca ugcgagugca ugaccugcuu 1080

gccaauagac gaucaagaau gggcaaagca ucauggguga ugagugggag aggggaugag 1140

acauuccuuu cucccugcug agacuuccau ugaaccgaug aguucugaau agaagaugcc 1200

cccccacccc cccaccagug uagaaucuga agggaggcau auauuacccu auauuacucu 1260

guguuggcgg cgagcuaucu gacagccaac cuucccauac auuucauugg gcauacacua 1320

augacaggaa guuccuuuug cuuguaugca agagauggcu cacacgaugg agaauuuaau 1380

cuugaagggc gaauuccacc acacuggacu aguggauccg agcucgguac caagcuu 1437

<210> 31
<211> 446
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV(d) 微型 IRUP

<400> 31
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugccagcc cccugauggg ggcgacacuc caccaugaau cacuccccug ugaggaacua 120

cugucuucac gcagaaagcg ucuagccaug gcguuaguau gagugucgug cagccuccag 180

gacccccccu cccgggagag ccauaguggu cugcggaacc ggugaguaca ccggaauugc 240

caggacgacc ggguccuuuc uuggauaaac ccgcucaaug ccuggagauu ugggcgugcc 300

cccgcaagac ugcuagccga guaguguugg gucgcgaaag gccuuguggu acugccugau 360

agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug caccaugagc acgaauccua 420

aaccucaaag aaaaaccaaa cguaac 446

[0040] <210> 32
<211> 375
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Polio(d) 微型 IRUP

<400> 32
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuaugaguc uggacauccc ucaccgguga cgguggucca ggcugcguug gcggccuacc 120

uauggcuaac gccaugggac gcuaguugug aacaaggugu gaagagccua uugagcuaca 180

uaagaauccu ccggccccug aaugcggcua aucccaaccu cggagcaggu ggucacaaac 240

cagugauugg ccugucguaa cgcgcaaguc cguggcggaa ccgacuacuu uggguguccg 300

uguuuccuuu uauuuuauug uggcugcuua uggugacaau cacagauugu uaucauaaag 360

cgaauuggau uggcc 375

<210> 33
<211> 375
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Polio(i) 微型 IRUP

<400> 33
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuuggccaau ccaauucgcu uuaugauaac aaucugugau ugucaccaua agcagccaca 120

auaaaauaaa aggaaacacg gacacccaaa guagucgguu ccgccacgga cuugcgcguu 180

acgacaggcc aaucacuggu uugugaccac cugcuccgag guuugggauua gccgcauuca 240

ggggccggag gauucuuaug uagcucaaua ggcucuucac accuuguuca caacuagcgu 300

cccauggcgu uagccauagg uaggccgcca acgcagccug gaccaccguc accggugagg 360

[0041]
gauguccaga cucau 375

<210> 34
<211> 111
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> cMYC 短变体(d) 微型 IRUP

<400> 34
ccauuuuuau guuauauguu uacaagcccc acaccaggcu gaaaaucugc agaauucgcc 60

cuugggcacu uugcacugga acuuacaaca cccgagcaag gacgcgacuc u 111

<210> 35
<211> 488
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV(d) 微型 IRUP

<400> 35
ccagugaaca gcuccucgcc cuugcucacc augguggcga ccgguagcgc uagcggaucu 60

gacgguucac uagaugcggc cgccacugug cuggaauucg cccuugccag cccccugaug 120

ggggcgacac uccaccauga aucacucccc ugugaggaac uacugucuuc acgcagaaag 180

cgucuagcca uggcguuagu augagugucg ugcagccucc aggacccccc cucccgggag 240

agccauagug gucugcggaa ccggugagua caccggaauu gccaggacga ccggguccuu 300

ucuuggauaa acccgcucaa ugccuggaga uuuggggcgug cccccgcaag acugcuagcc 360

gaguaguguu gggucgcgaa aggccuugug guacugccug auagggugcu ugcgagugcc 420

ccgggagguc ucguagaccg ugcaccauga gcacgaaucc uaaaccucaa agaaaaacca 480

aacguaac 488

[0042]

<210> 36
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus)

<220>
<223> HCV(d) IRES

<400> 36
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uuguggguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 37
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV(i) IRES

<400> 37
guuacguuug guuuuucuuu gaggguuuagg auucgugcuc auggugcacg gucuacgaga 60

ccucccgggg cacucgcaag cacccuauca ggcaguacca caaggccuuu cgcgacccaa 120

cacuacucgg cuagcagucu ugcgggggca cgcccaaauc uccaggcauu gagcgggguu 180

auccaagaaa ggacccgguc guccuggcaa uuccggugua cucaccgguu ccgcagacca 240

cuauggcucu cccgggaggg ggggguccugg aggcugcacg acacucauac uaacgccaug 300

[0043]

gcuagacgcu uucugcguga agacaguagu uccucacagg ggagugauuc augguggagu 360

gucgccccca ucaggggggcu ggc 383

<210> 38
<211> 312
<212> RNA
<213> 人脊髓灰质炎病毒（Human poliovirus）

<220>
<223> Polio(d) IRES

<400> 38
augagucugg acaucccuca ccggugacgg ugguccaggc ugcguuggcg gccuaccuau 60

ggcuaacgcc augggacgcu aguugugaac aaggugugaa gagccuauug agcuacauaa 120

gaauccuccg gccccugaau gcggcuaauc ccaaccucgg agcagguggu cacaaaccag 180

ugauuggccu gucguaacgc gcaaguccgu ggcggaaccg acuacuuugg guguccgugu 240

uuccuuuuau uuuauugugg cugcuuaugg ugacaaucac agauuguuau cauaaagcga 300

auuggauugg cc 312

<210> 39
<211> 312
<212> RNA
<213> 人脊髓灰质炎病毒

<220>
<223> Polio(i) IRES

<400> 39
ggccaaucca auucgcuuua ugauaacaau cugugauugu caccauaagc agccacaaua 60

aaauaaaagg aaacacggac acccaaagua gucgguuccg ccacggacuu gcgcguuacg 120

acaggccaau cacugguuug ugaccaccug cuccgagguu gggauuagcc gcauucaggg 180

gccggaggau ucuuauguag cucaauaggc ucuucacacc uuguucacaa cuagcguccc 240

[0044]

auggcguuag ccauagguag gccgccaacg cagccuggac caccgucacc ggugagggau 300

guccagacuc au 312

<210> 40
<211> 576
<212> RNA
<213> 脑心肌炎病毒

<220>
<223> EMCV(d) IRES

<400> 40
ccccccucu cccucccccc ccccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aauaaggccg 60

gugugcguuu gucuauaugu uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc 120

ccggaaaccu ggcccugucu ucuugacgag cauuccuagg ggucuuuccc cucucgccaa 180

aggaaugcaa ggucuguuga augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuugaag 240

acaaacaacg ucuguagcga cccuuugcag gcagcggaac cccccaccug gcgacaggug 300

ccucugcggc caaaagccac guguauaaga uacaccugca aaggcggcac aaccccagug 360

ccacguugug aguuggauag uuguggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauucaa 420

caaggggcug aaggaugccc agaagguacc ccauuguaug ggaucugauc uggggccucg 480

gugcacaugc uuuacaugug uuuagucgag guuaaaaaac gucuaggccc cccgaaccac 540

ggggacgugg uuuuccuuug aaaaacacga ugauaa 576

<210> 41
<211> 576
<212> RNA
<213> 脑心肌炎病毒

<220>
<223> ECMV(i) IRES

[0045]

<400> 41
uuaucaucgu guuuuucaaa ggaaaaccac gucccgugg uucgggggc cuagacguuu 60

uuuaaccucg acuaaacaca uguaaagcau gugcaccgag gccccagauc agaucccaua 120

caaugggua ccuucugggc auccuucagc cccuuguuga auacgcuuga ggagagccau 180

uugacucuuu ccacaacuau ccaacucaca acguggcacu gggguugugc cgccuuugca 240

gguguaucuu auacacgugg cuuuuggccg cagaggcacc ugucgccagg ugggggguuc 300

cgcugccugc aaagggucgc uacagacguu guuugucuuc aagaagcuuc cagaggaacu 360

gcuuccuuca cgacauucaa cagaccuugc auuccuuugg cgagagggga aagaccccua 420

ggaaugcucg ucaagaagac agggccaggu uuccgggccc ucacauugcc aaaagacggc 480

aauauggugg aaaauaacau auagacaaac gcacaccggc cuuauuccaa gcggcuucgg 540

ccaguaacgu uagggggggg ggagggagag gggggg 576

<210> 42

<211> 192
<212> RNA
<213> 蟋蟀麻痹病毒

<220>
<223> CrPV(d) IRES

<400> 42
aaagcaaaaa ugugaucuug cuuguaaaua caauuuugag agguuaauaa auuacaagua 60

gugcuauuuu uguauuuagg uuagcuauuu agcuuuacgu uccaggaugc cuaguggcag 120

ccccacaaua uccaggaagc ccucucugcg guuuuucaga uuagguaguc gaaaaaccua 180

agaaauuuac cu 192

<210> 43
<211> 192
<212> RNA
<213> 蟋蟀麻痹病毒

[0046]

<220>
<223> CrPV(i) IRES

<400> 43
agguaaauuu cuuagguuuu ucgacuaccu aaucugaaaa accgcagaga gggcuuccug 60

gauauugugg ggcugccacu aggcauccug gaacguaaag cuaaauagcu aaccuaaaua 120

caaaaauagc acuacuugua auuuauuaac cucucaaaau uguauuuaca agcaagauca 180

cauuuuugcu uu 192

<210> 44
<211> 231
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> Apaf-1(d) IRES

<400> 44

cagagaucca ggggaggcgc cugugaggcc cggaccugcc ccggggcgaa ggguaugugg 60

cgagacagag cccugcaccc cuaauucccg guggaaaacu ccuguugccg uuucccucca 120

ccggccugga gucucccagu cuugucccgg cagugccgcc cuccccacua agaccuaggc 180

gcaaaggcuu ggcucauggu ugacagcuca gagagagaaa gaucugaggg a 231

<210> 45
<211> 231
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> Apaf-1(i) IRES

<400> 45
ucccucagau cuuucucucu cugagcuguc aaccaugagc caagccuuug cgccuagguc 60

uuaguggggа gggcggcacu gccgggacaa gacugggaga cuccaggccg guggagggaa 120

[0047]

acggcaacag gaguuuucca ccgggaauua ggggugcagg gcucugucuc gccacauacc 180

cuucgccccg gggcaggucc gggccucaca ggcgccuccc cuggaucucu g 231

<210> 46
<211> 460
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> ELG-1(d) IRES

<400> 46
acuuuuggug ggcauuuaaa aaugugugug uauguguaua uauguaugug uauguaugug 60

uauauaugua uauguaugua uguaucgcgu guaugugugu auguaugcau guguauguau 120

guauaugcau guauguguau guguauauau guaugugugu guauguauau gugugуguau 180

guguaugugu gugуguaugu gugugуguau guauguaugu auguauaugu auuauacaca 240

uauacacaua uugguuuuuu uaaucauuug agaguuaguu gaagauaaaa acccaucacc 300

ccuaaaugua uuccaaagaa uaagaacauu guuuuauaca uagcacacuu aacaaaauca 360

agaaauuuaa cauuaauaca guacuguuac cuaauccgua gucgauuuuc aaauuuuguc 420

aguuguucca auaauguccu uuauauauuc cccgcccagc 460

<210> 47
<211> 460
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> ELG-1(i) IRES

<400> 47
gcugggcggg gaauauauaa aggacauuau uggaacaacu gacaaaauuu gaaaaucgac 60

uacggauuag guaacaguac uguauuaaug uuaaauuucu ugauuuuguu aagugugcua 120

[0048]
uguauaaaac aauguucuua uucuuuggaa uacauuuagg ggugaugggu uuuuaucuuc 180

aacuaacucu caaaugauua aaaaaaccaa uauguguaua uguguauaau acauauacau 240

acauacauac auacacacac acauacacac acacauacac auacacacac auauacauac 300

acacacauac auauauacac auacacauac augcauauac auacauacac augcauacau 360

acacacauac acgcgauaca uacauacaua uacauauaua cacauacaua cacauacaua 420

uauacacaua cacacacauu uuuaaaugcc caccaaaagu 460

<210> 48
<211> 395
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> cMYC 全长(d) IRES

<400> 48

aauuccagcg agaggcagag ggagcgagcg ggcggccggc uaggguggaa gagccgggcg 60

agcagagcug cgcugcgggc guccugggaa gggagauccg gagcgaauag ggggcuucgc 120

cucuggccca gcccucccgc uugaucccc aggccagcgg uccgcaaccc uugccgcauc 180

cacgaaacuu ugcccauagc agcgggcggg cacuuugcac uggaacuuac aacacccgag 240

caaggacgcg acucucccga cgcggggagg cuauucugcc cauuugggga cacuuccccg 300

ccgcugccag gacccgcuuc ucugaaaggc ucuccuugca gcugcuuaga cgcuggauuu 360

uuuucgggua guggaaaacc agcagccucc cgcga 395

<210> 49
<211> 395
<212> RNA
<213> 智人

<220>
[0049] <223> cMYC 全长(i) IRES

<400> 49
ucgcgggagg cugcugguuu uccacuaccc gaaaaaaauc cagcgucuaa gcagcugcaa 60

ggagagccuu ucagagaagc ggguccuggc agcggcgggg aaguguccc aaaugggcag 120

aauagccucc ccgcgucggg agagucgcgu ccuugcucgg guguuguaag uuccagugca 180

aagugcccgc ccgcugcuau gggcaaaguu ucguggaugc ggcaaggguu gcggaccgcu 240

ggccuggggg aucaagcggg agggcugggc cagaggcgaa gcccccuauu cgcuccggau 300

cucccuuccc aggacgcccg cagcgcagcu cugcucgccc ggcucuucca cccuagccgg 360

ccgcccgcuc gcucccucug ccucucgcug gaauu 395

<210> 50
<211> 48
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> cMYC 短变体(d) IRES

<400> 50
gggcacuuug cacuggaacu uacaacaccc gagcaaggac gcgacucu 48

<210> 51
<211> 48
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> cMYC 短变体(i) IRES

<400> 51
agagucgcgu ccuugcucgg guguuguaag uuccagugca aagugccc 48

<210> 52
<211> 71
[0050] <212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> DMD(d) IRES

<400> 52
guacugacau cguagaugga aaucauaaac ugacucuugg uuugauuugg aauauaaucc 60

uccacuggca g 71

<210> 53
<211> 71
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<223> DMD(i) IRES

<400> 53
cugccagugg aggauuauau uccaaaucaa accaagaguc aguuuaugau uuccaucuac 60

gaugucagua c 71

<210> 54
<211> 303
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV Δ II(d) IRES

<400> 54
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac ccccccuccc gggagagcca 60

uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag gacgaccggg uccuuucuug 120

gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc gcaagacugc uagccgagua 180

guguuggguc gcgaaaggcc uuugugguacu gccugauagg gugcuugcga gugccccggg 240

aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac cucaaagaaa aaccaaacgu 300

[0051]

aac 303

<210> 55
<211> 367
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV Δ IIIa(d) IRES

<400> 55
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaaauug ccaggacgac cgggguccuuu 180

cuuggauaaa cccgcucaau gccuggagau uuggggcgugc ccccgcaaga cugcuagccg 240

aguaguguug ggucgcgaaa ggccuugugg uacugccuga uagggugcuu gcgagugccc 300

cgggaggucu cguagaccgu gcaccaugag cacgaauccu aaaccucaaa gaaaaaccaa 360

acguaac 367

<210> 56
<211> 356
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV Δ IIId(d) IRES

<400> 56
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

[0052]

gcaagacugc uacuuguggu acugccugau agggugcuug cgagugcccc gggaggucuc 300

guagaccgug caccaugagc acgaauccua aaccucaaag aaaaaccaaa cguaac 356

<210> 57
<211> 330
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV Δ IV(d) IRES

<400> 57
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua 330

<210> 58
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV G266->C(d) IRES

<400> 58
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

[0053]

gcaagacugc uagccgagua guguucgguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 59
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV U228->C(d) IRES

<400> 59
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauucgg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uuugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 60
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV G267->C(d) IRES

<400> 60
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

[0054]

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguugcguc gcgaaaggcc uuugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 61
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV G268->C(d) IRES

<400> 61
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggcuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 62
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV G266G267G268->C266C267C268(d) IRES

[0055]

<400> 62
gccagccccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguucccuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 63
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV G266->A/G268->T(d) IRES

<400> 63
gccagccccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuaguuc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 64
<211> 383
<212> RNA
<213> 丙型肝炎病毒

[0056] <220>
<223> HVC IIIa->IIIa-comp; AGTA->TCAT(d) IRES

<400> 64
gccagccccc ugaugggggc gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gucaucaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguuggguc gcgaaaggcc uugugguacu gccugauagg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

<210> 65
<211> 383
<212> RNA

<213> 丙型肝炎病毒

<220>
<223> HCV IIIe-IIIe-comp; TGATAG->ACTATC(d) IRES

<400> 65
gccagccccc ugauggggge gacacuccac caugaaucac uccccuguga ggaacuacug 60

ucuucacgca gaaagcgucu agccauggcg uuaguaugag ugucgugcag ccuccaggac 120

[0057]

ccccccuccc gggagagcca uaguggucug cggaaccggu gaguacaccg gaauugccag 180

gacgaccggg uccuuucuug gauaaacccg cucaaugccu ggagauuugg gcgugccccc 240

gcaagacugc uagccgagua guguugggue gcgaaaggcc uuugugguacu gccacuaucg 300

gugcuugcga gugccccggg aggucucgua gaccgugcac caugagcacg aauccuaaac 360

cucaaagaaa aaccaaacgu aac 383

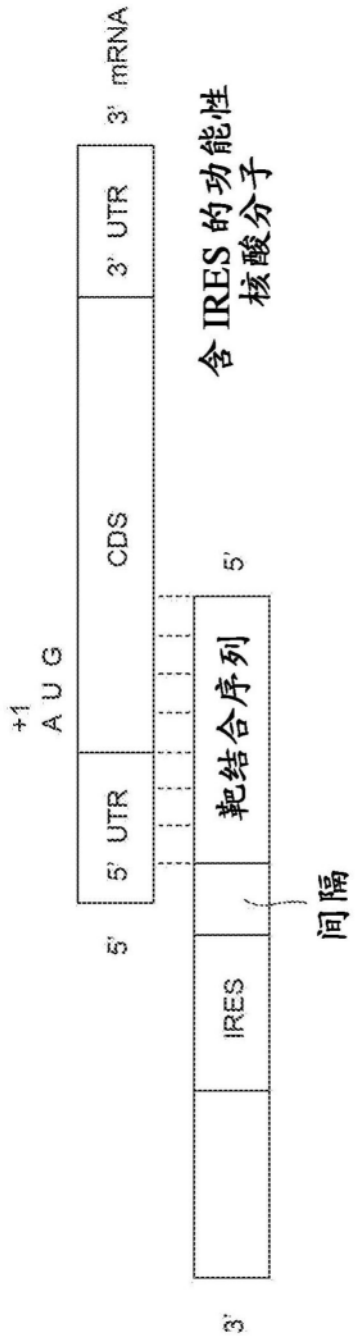


图1

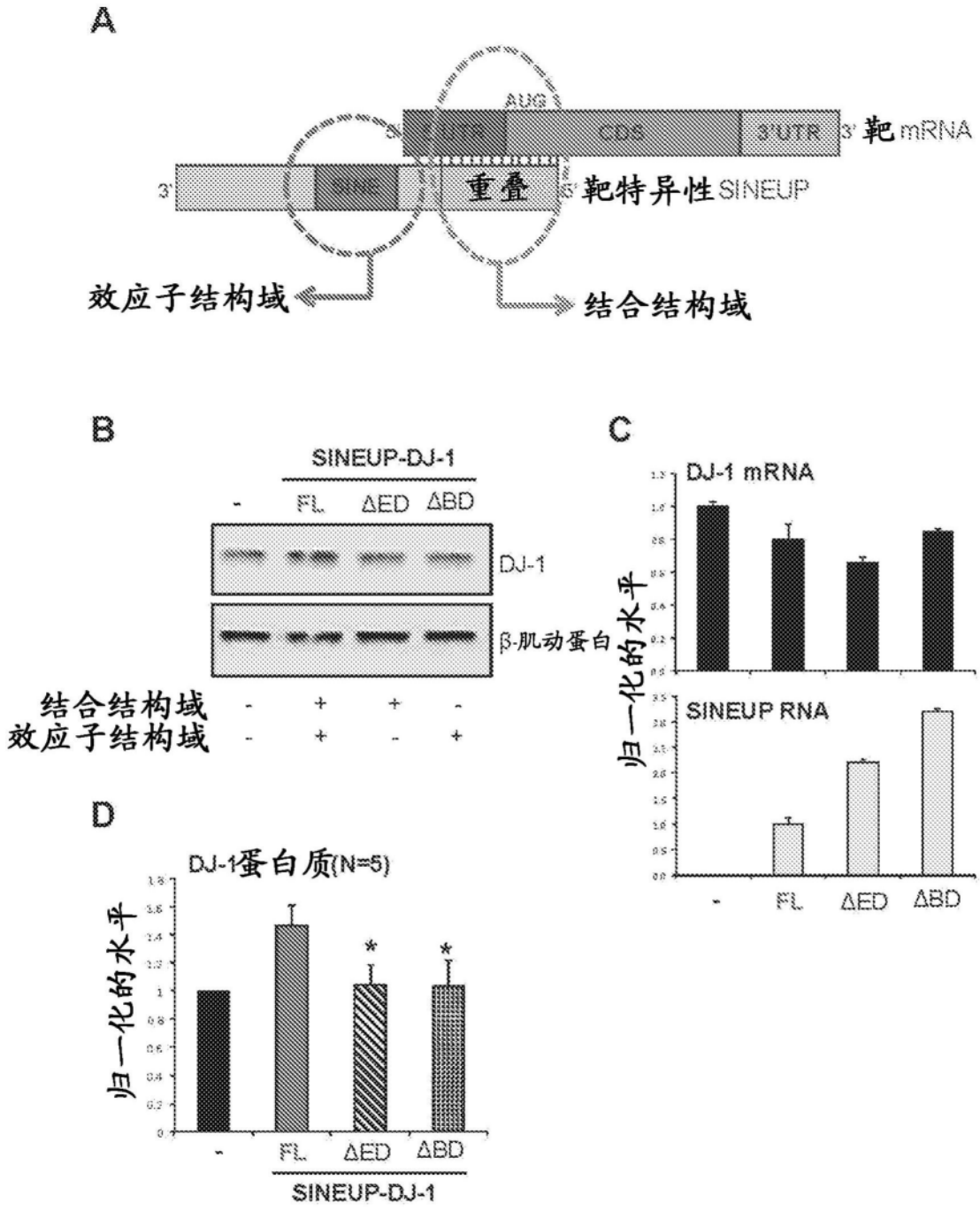

A
AUG
CDS
3'UTR
3' 靶 mRNA
重叠
5' 靶特异性 SINEUP
效应子结构域
结合结构域
B
SINEUP-DJ-1
-
FL
ΔED
ΔBD
DJ-1
β-肌动蛋白
结合结构域 - + + -
效应子结构域 - + - +
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
- FL ΔED ΔBD
D
DJ-1蛋白质(N=5)
归一化的水平
- FL ΔED ΔBD
SINEUP-DJ-1

图2

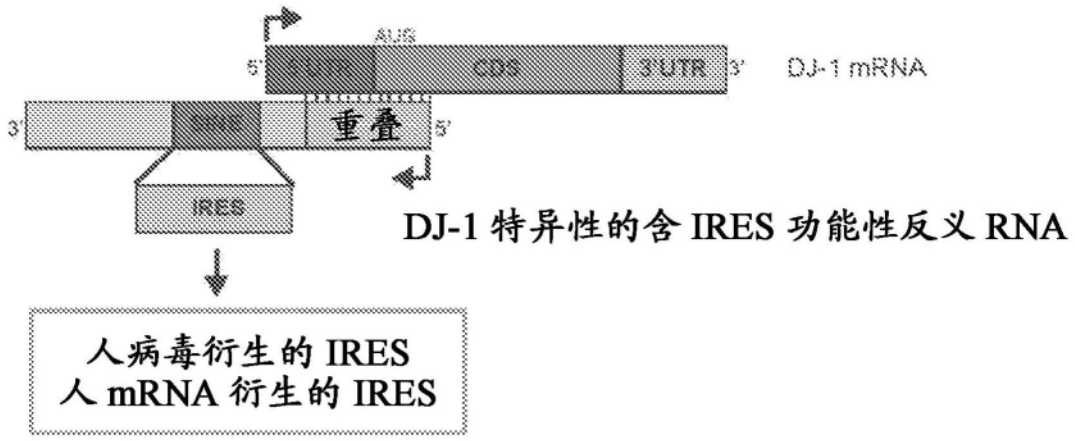

AUG
5'
5'UTR
CDS
3'UTR
3'
DJ-1 mRNA
3'
重叠
5'
IRES
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
人病毒衍生的 IRES
人 mRNA 衍生的 IRES

图3

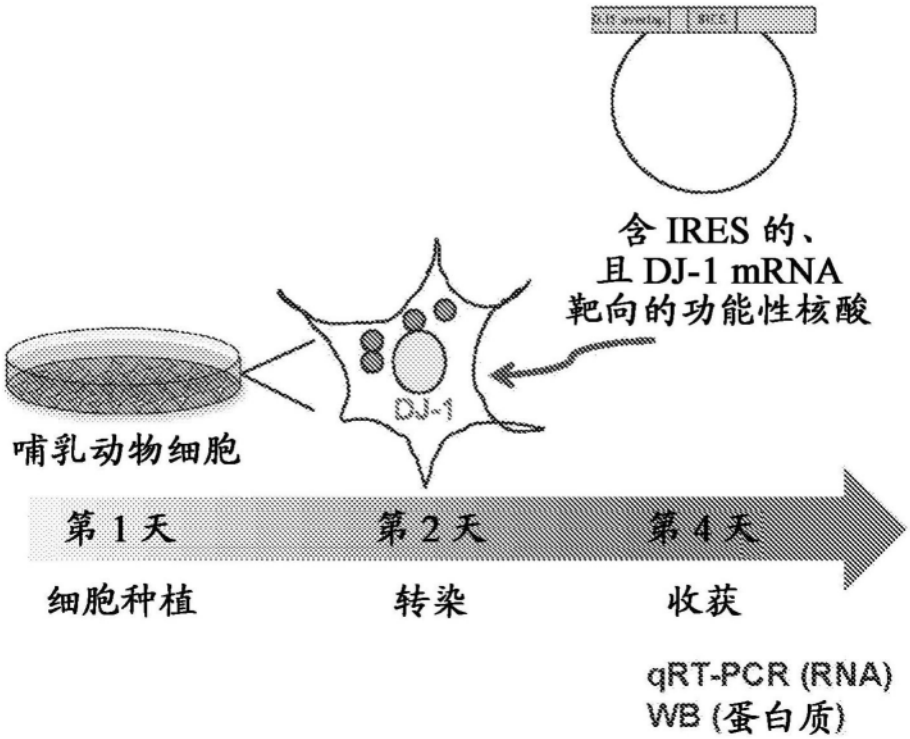

含 IRES 的、
且 DJ-1 mRNA
靶向的功能性核酸
DJ-1
哺乳动物细胞
第 1 天
第 2 天
第 4 天
细胞种植
转染
收获
qRT-PCR (RNA)
WB (蛋白质)

图4

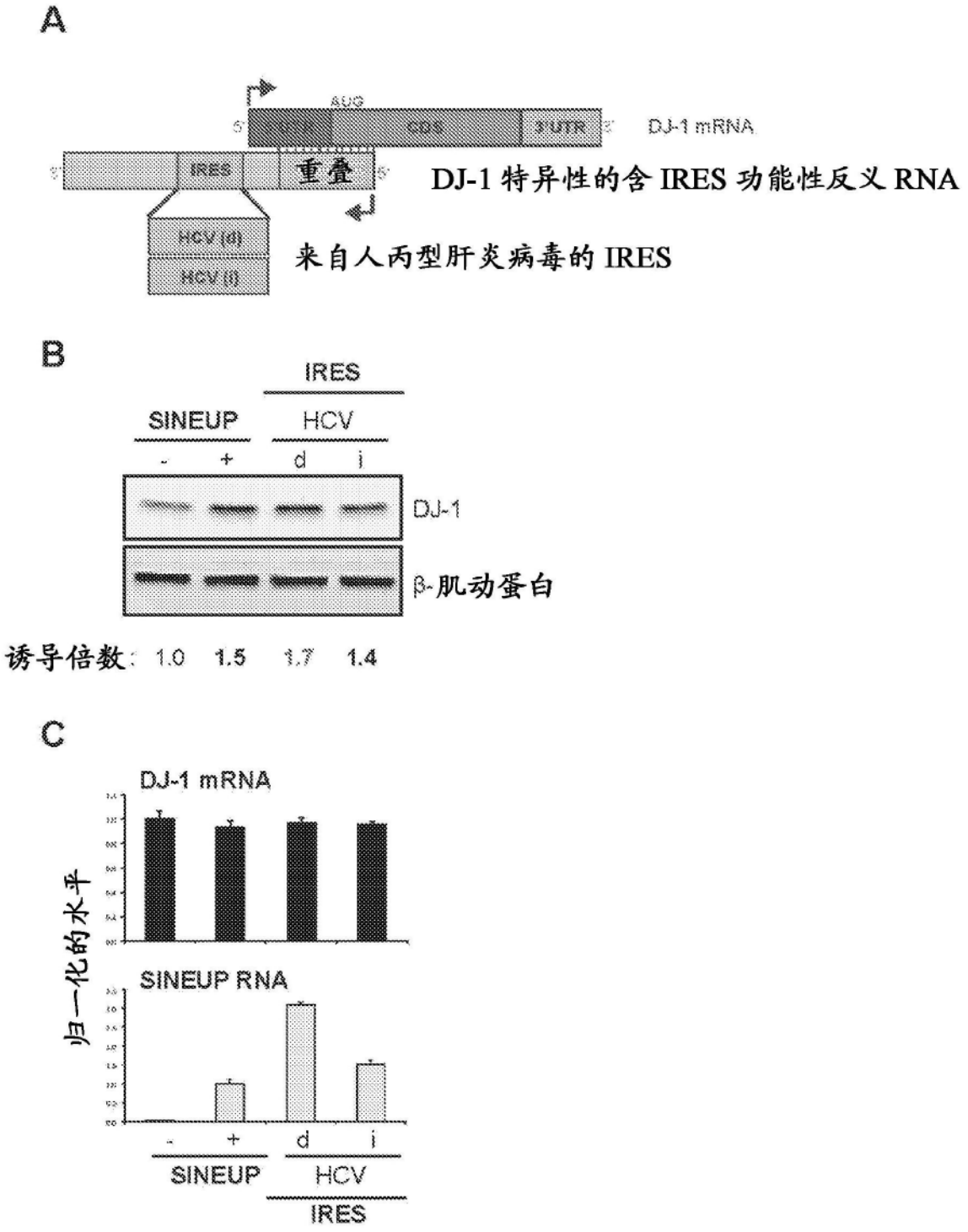

A
AUG
5'
5'UTR
CDS
3'UTR
3'
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
HCV (d)
HCV (i)
来自人丙型肝炎病毒的 IRES
B
IRES
SINEUP
HCV
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.5 1.7 1.4
C
DJ-1 mRNA
归一化的水平
SINEUP RNA
-
+
d
i
SINEUP
HCV
IRES

图5

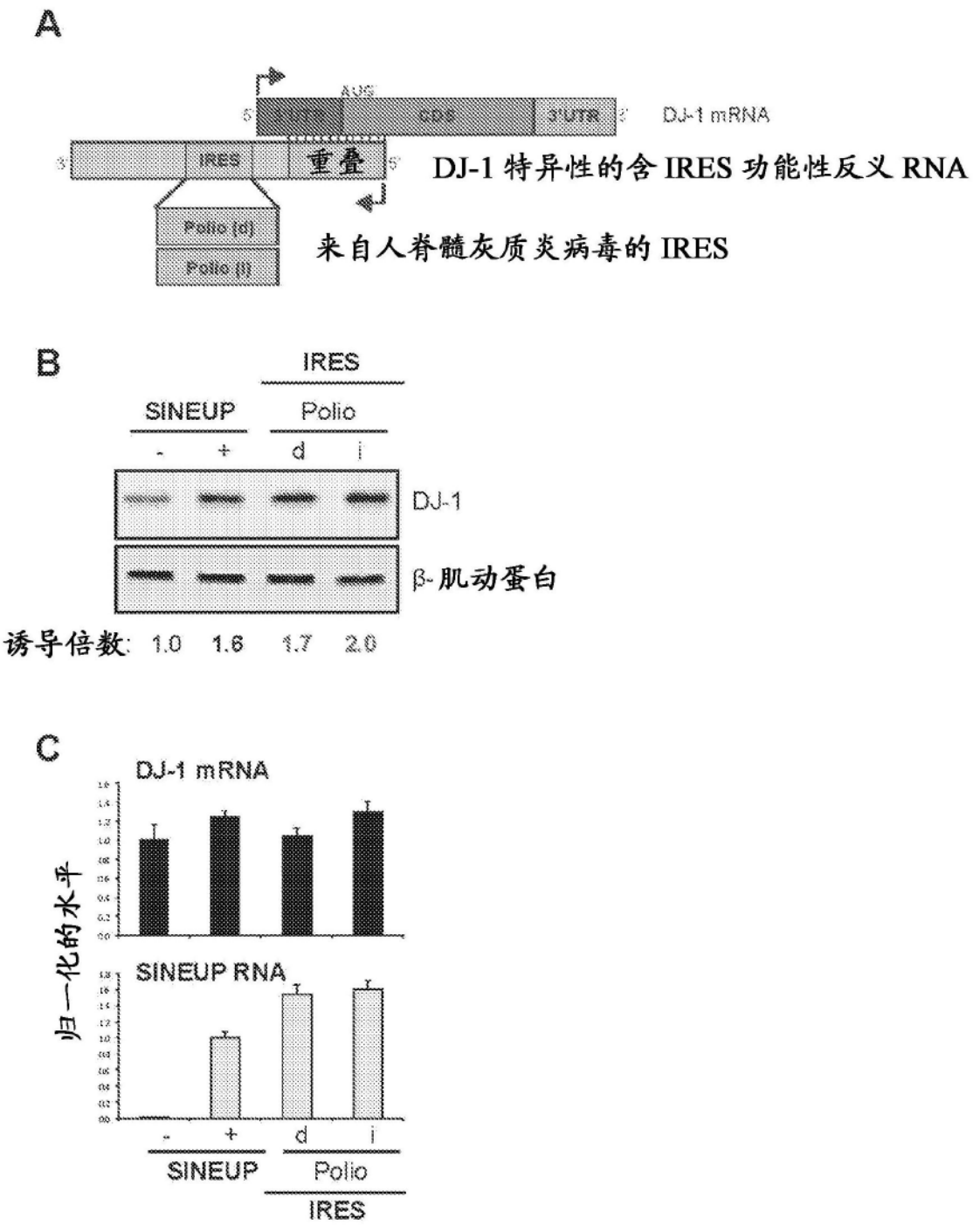

A
AUG
5'UTR
CDS
3'UTR
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
Polio (d)
Polio (i)
来自人脊髓灰质炎病毒的 IRES
B
IRES
SINEUP
Polio
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.6 1.7 2.0
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
-
+
d
i
SINEUP
Polio
IRES

图6

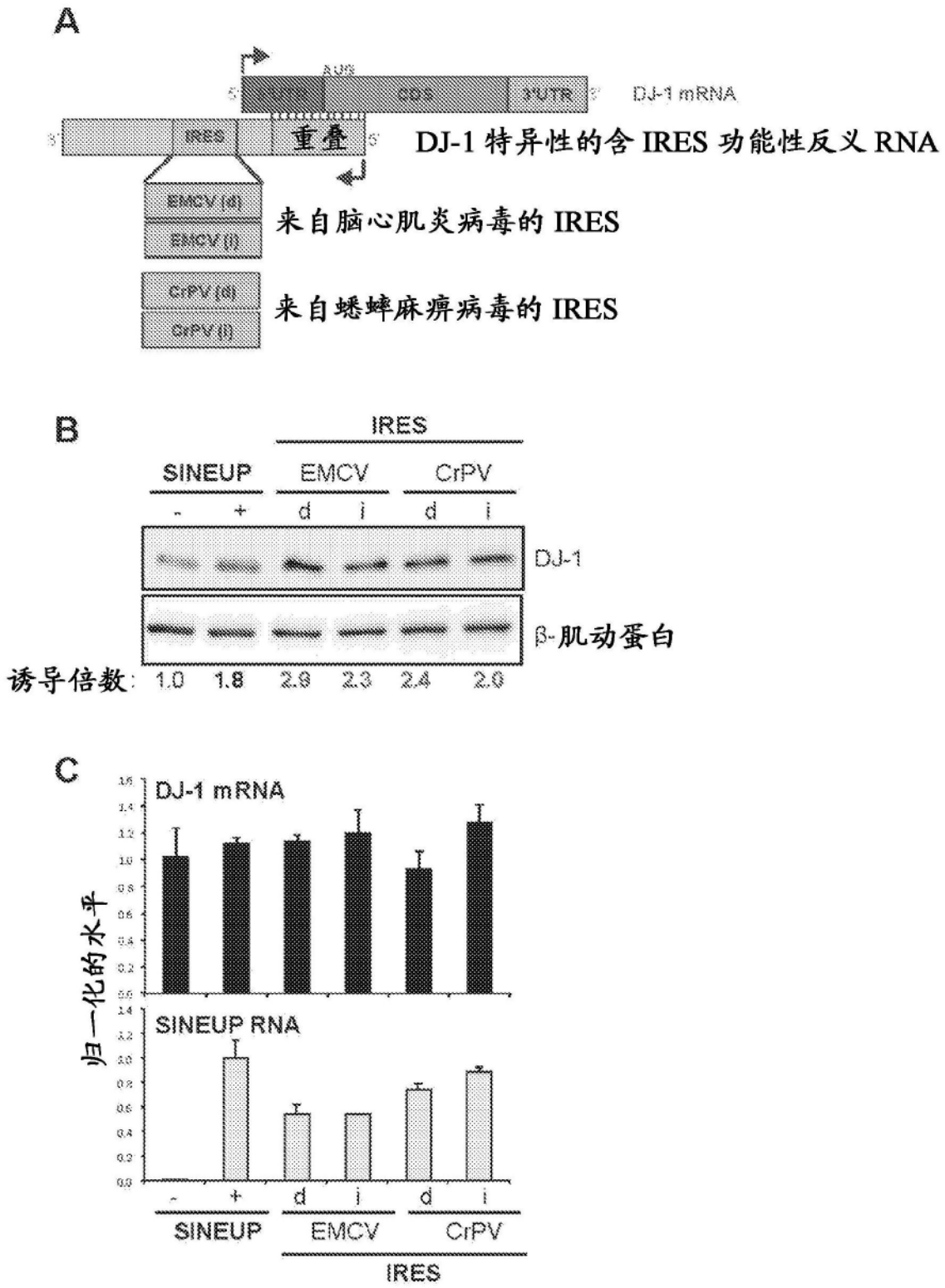

A
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
EMCV (d)
EMCV (i)
来自脑心肌炎病毒的 IRES
CrPV (d)
CrPV (i)
来自蟋蟀麻痹病毒的 IRES
B
IRES
SINEUP
EMCV
CrPV
- + d i d i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.8 2.9 2.3 2.4 2.0
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
- + d i d i
SINEUP
EMCV
CrPV
IRES

图7

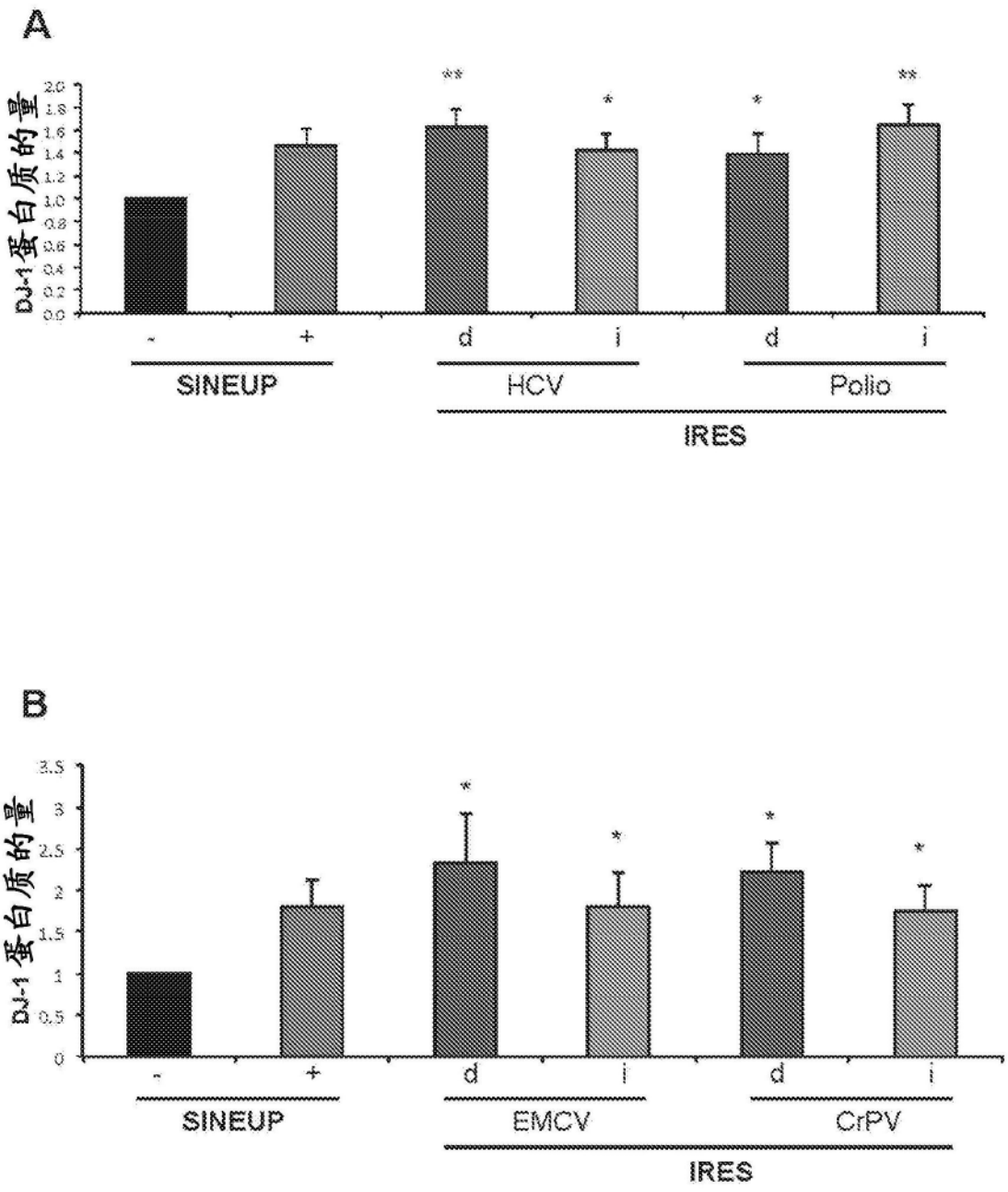

A
DJ-1蛋白质的量
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
*
*
**
-
+
d
i
d
i
SINEUP
HCV
Polio
IRES
B
DJ-1 蛋白质的量
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
*
-
+
d
i
d
i
SINEUP
EMCV
CrPV
IRES

图8

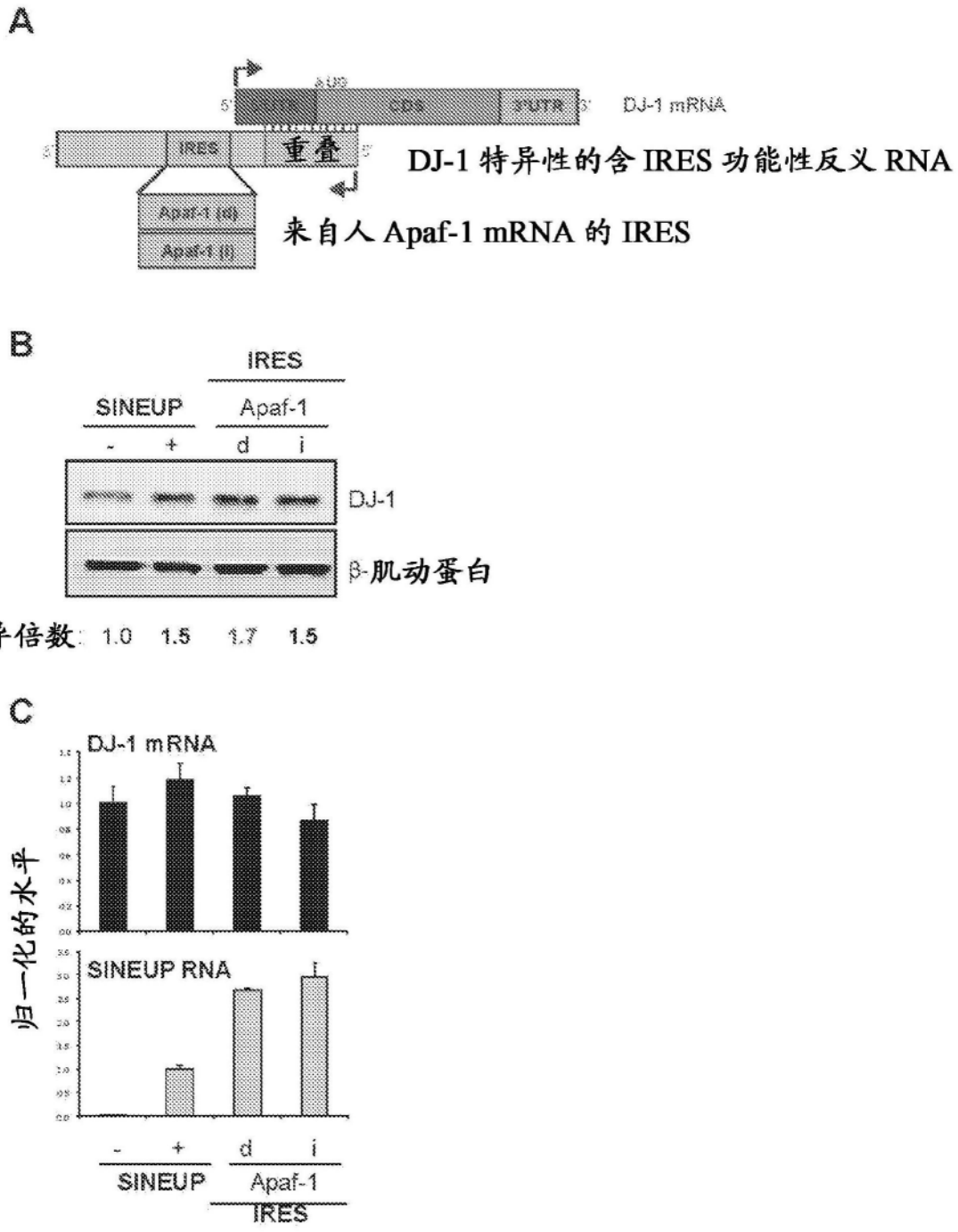

A
5'UTR
CDS
3'UTR
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
Apaf-1 (d)
Apaf-1 (i)
来自人 Apaf-1 mRNA 的 IRES
B
IRES
SINEUP
Apaf-1
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.5 1.7 1.5
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
-
+
d
i
SINEUP
Apaf-1
IRES

图9

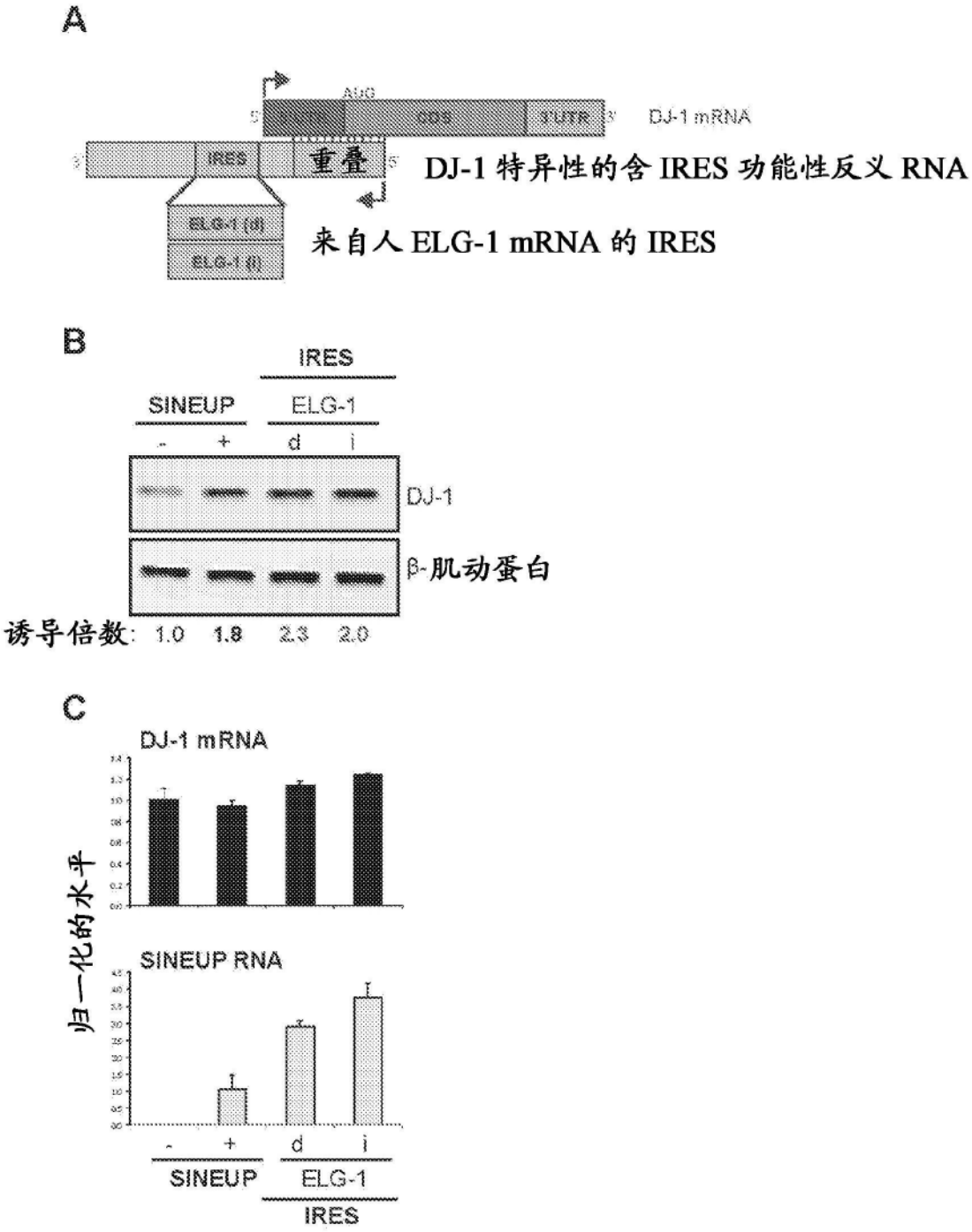

A
AUG
CDS
3'UTR
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
ELG-1 (d)
ELG-1 (i)
来自人 ELG-1 mRNA 的 IRES
B
IRES
SINEUP
ELG-1
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.8 2.3 2.0
C
DJ-1 mRNA
归一化的水平
SINEUP RNA
-
+
d
i
SINEUP
ELG-1
IRES

图10

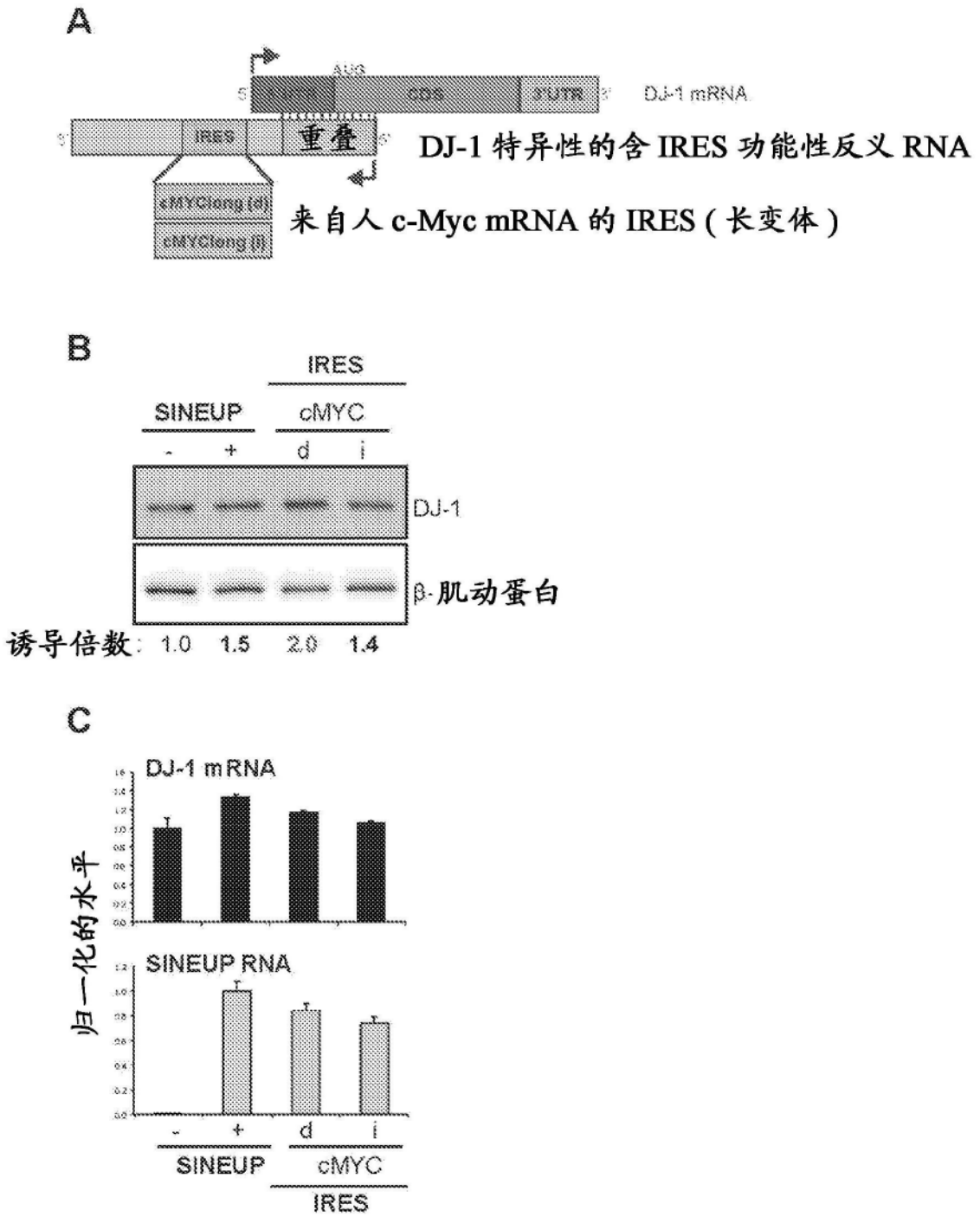

A
AUG
5'
CDS
3'UTR
3'
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
5'
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
cMYCiong (d)
cMYCiong (i)
来自人 c-Myc mRNA 的 IRES (长变体)
B
IRES
SINEUP
cMYC
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.5 2.0 1.4
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
-
+
d
i
SINEUP
cMYC
IRES

图11

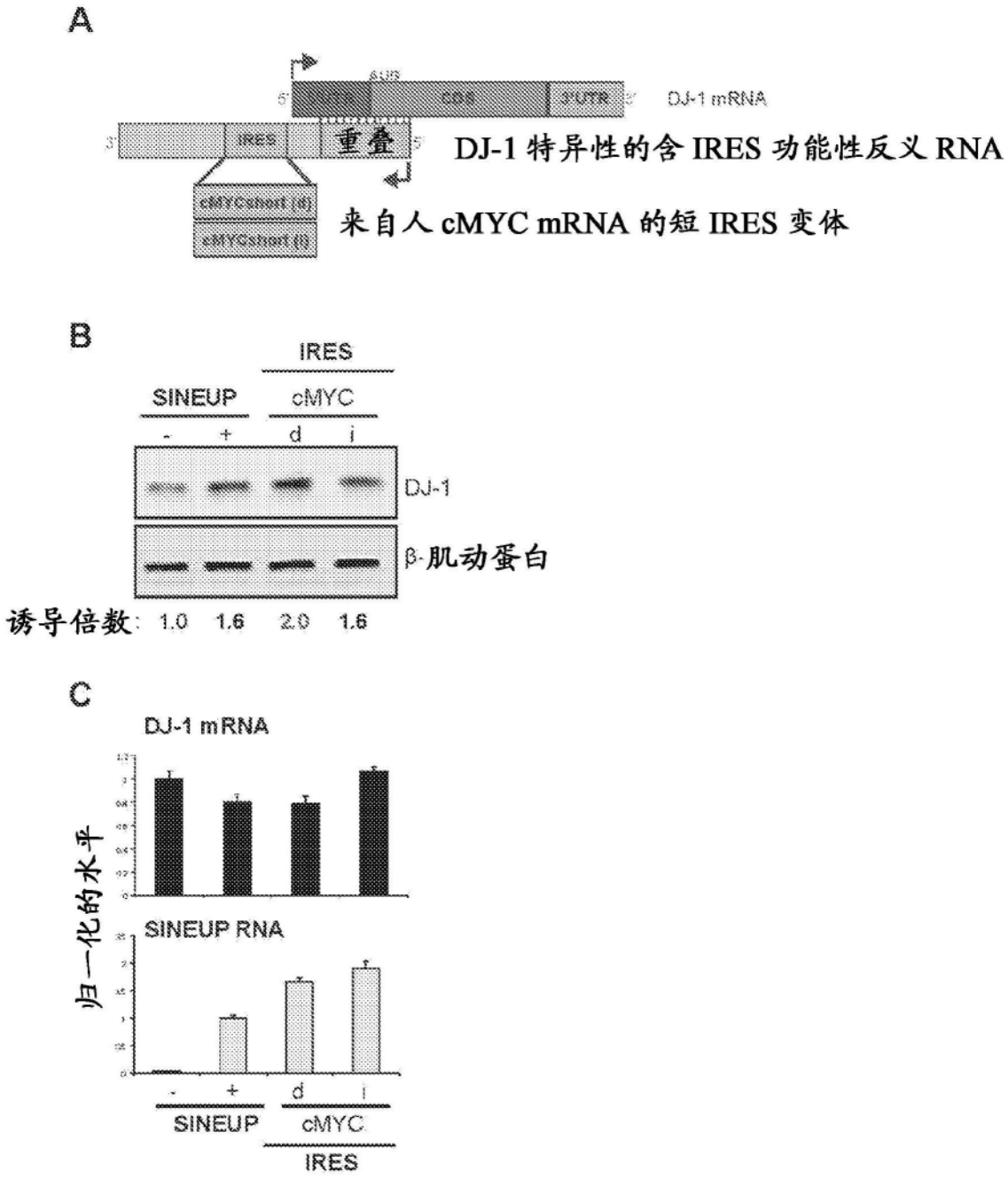

A
5'UTR
CDS
3'UTR
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
cMYCshort (d)
cMYCshort (i)
来自人 cMYC mRNA 的短 IRES 变体
B
IRES
SINEUP
cMYC
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.6 2.0 1.6
C
DJ-1 mRNA
归一化的水平
SINEUP RNA
-
+
d
i
SINEUP
cMYC
IRES

图12

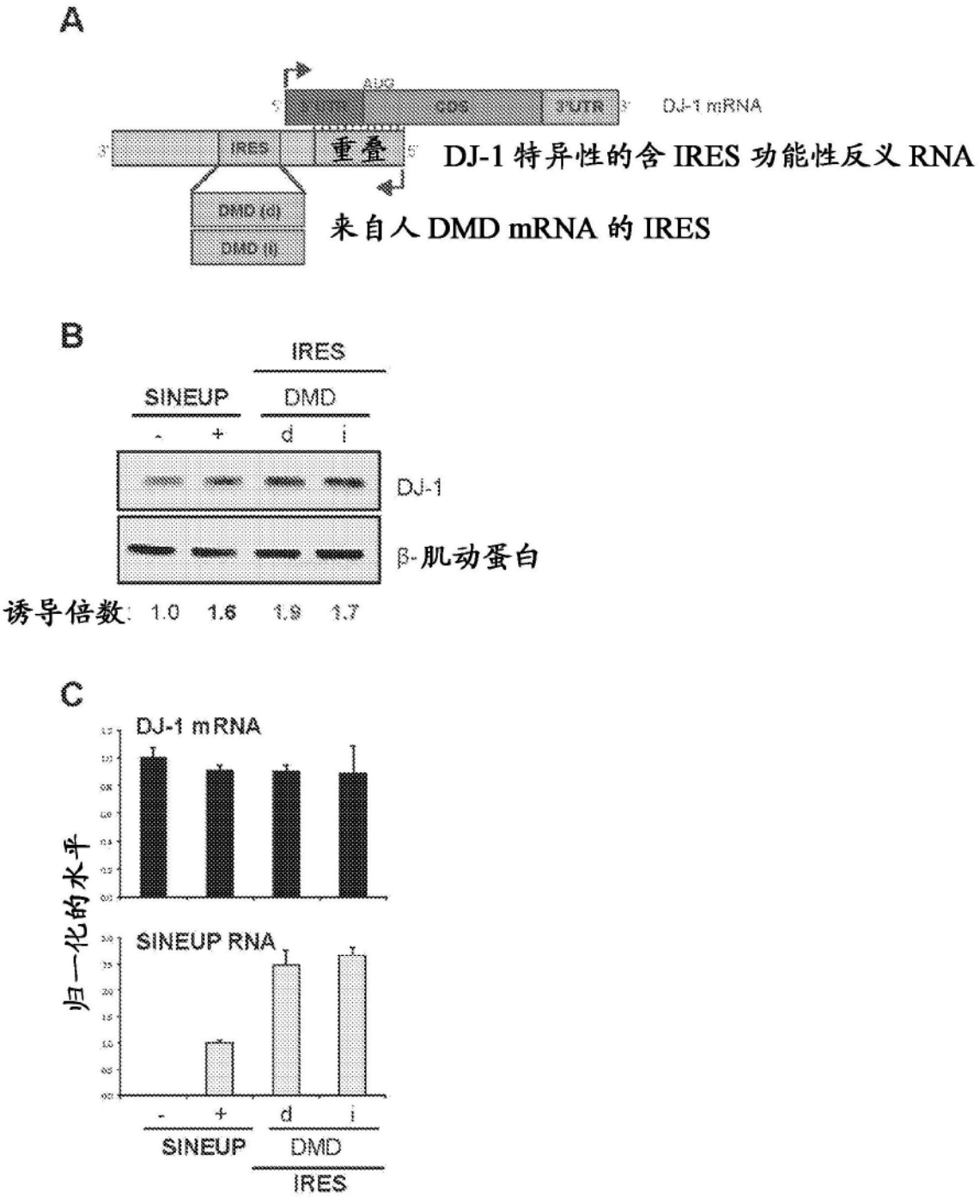
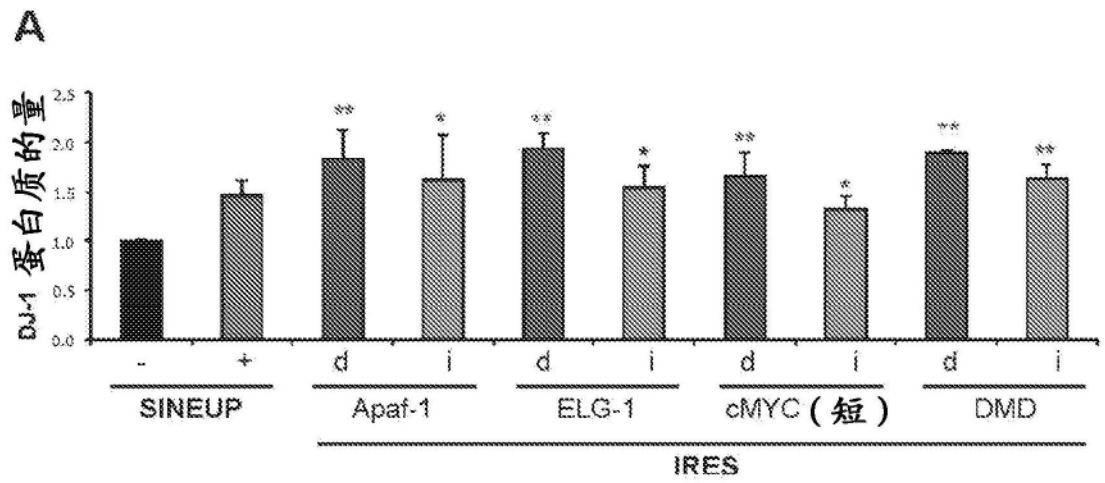

A
AUG
5'UTR
CDS
3'UTR
DJ-1 mRNA
IRES
重叠
DJ-1 特异性的含 IRES 功能性反义 RNA
DMD (d)
DMD (i)
来自人 DMD mRNA 的 IRES
B
IRES
SINEUP
DMD
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.6 1.9 1.7
C
DJ-1 mRNA
SINEUP RNA
归一化的水平
-
+
d
i
SINEUP
DMD
IRES

图13


A
DJ-1 蛋白质的量
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
**
*
**
*
**
**
- + d i d i d i d i
SINEUP
Apaf-1
ELG-1
cMYC（短）
DMD
IRES

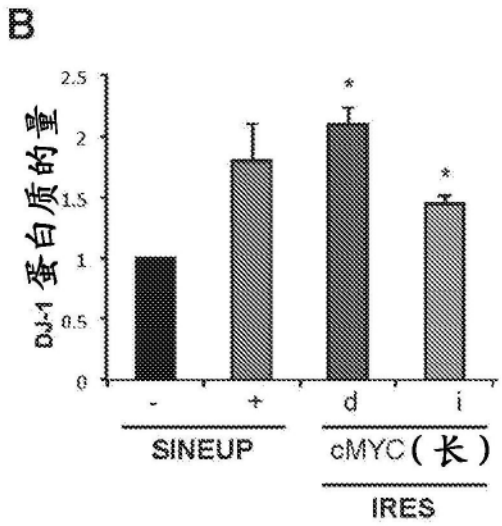

B
DJ-1 蛋白质的量
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
- + d i
SINEUP
cMYC（长）
IRES

图14

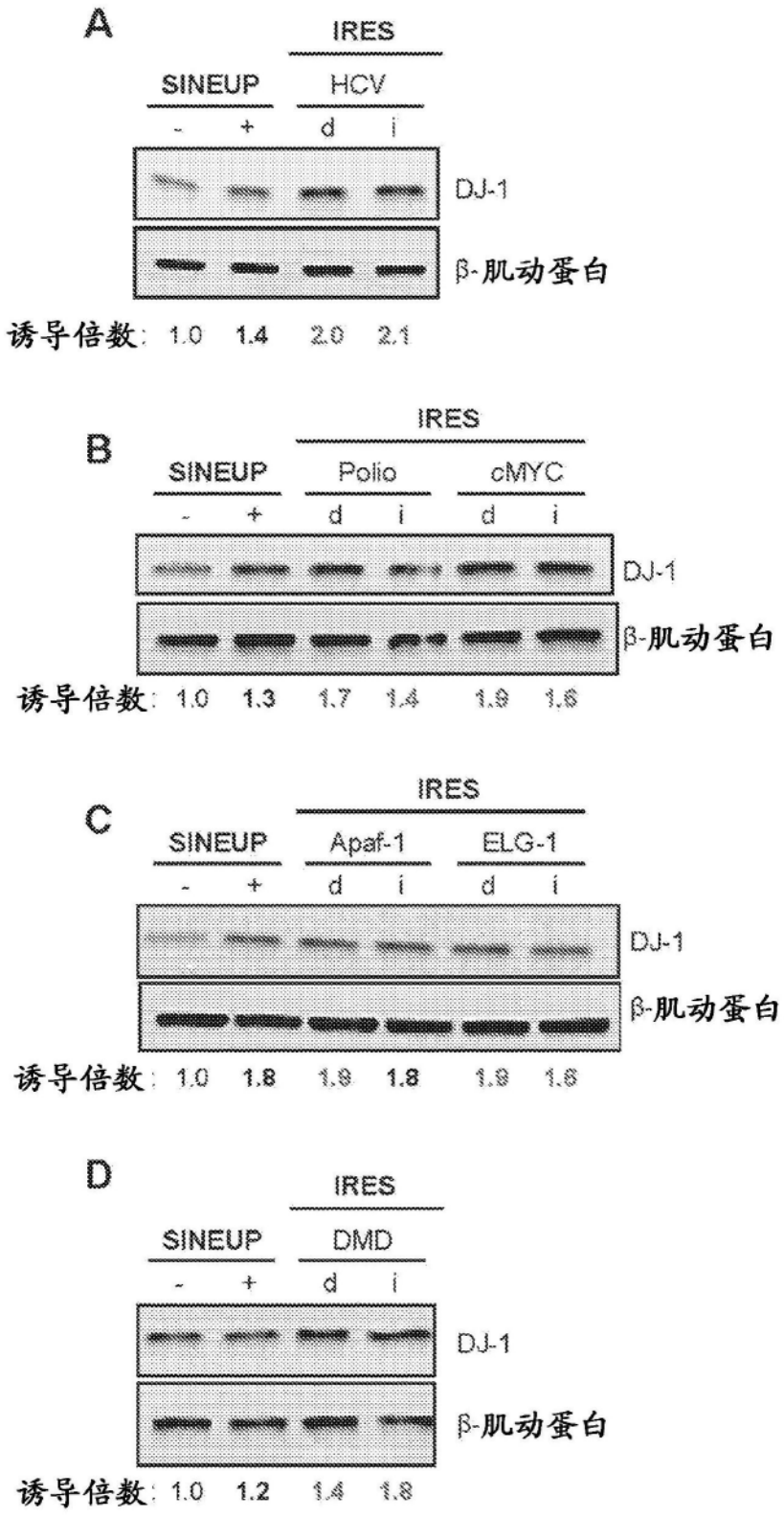

A
IRES
SINEUP
HCV
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.4 2.0 2.1
B
IRES
SINEUP
Polio
cMYC
-
+
d
i
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.3 1.7 1.4 1.9 1.6
C
IRES
SINEUP
Apaf-1
ELG-1
-
+
d
i
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.8 1.9 1.8 1.9 1.6
D
IRES
SINEUP
DMD
-
+
d
i
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.2 1.4 1.8

图15

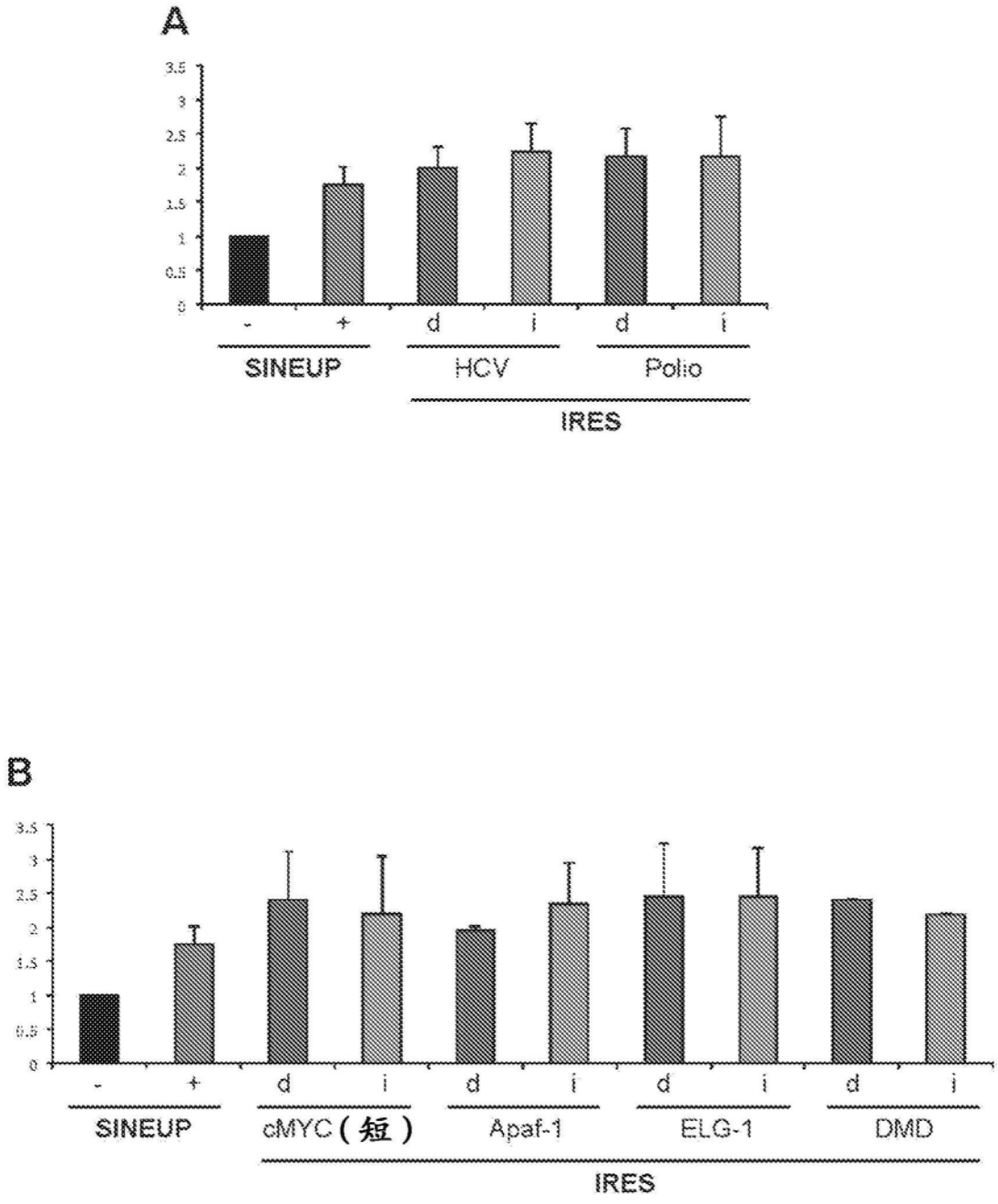

A
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-
+
d
i
d
i
SINEUP
HCV
Polio
IRES
B
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-
+
d
i
d
i
d
i
d
i
SINEUP
cMYC（短）
Apaf-1
ELG-1
DMD
IRES

图16

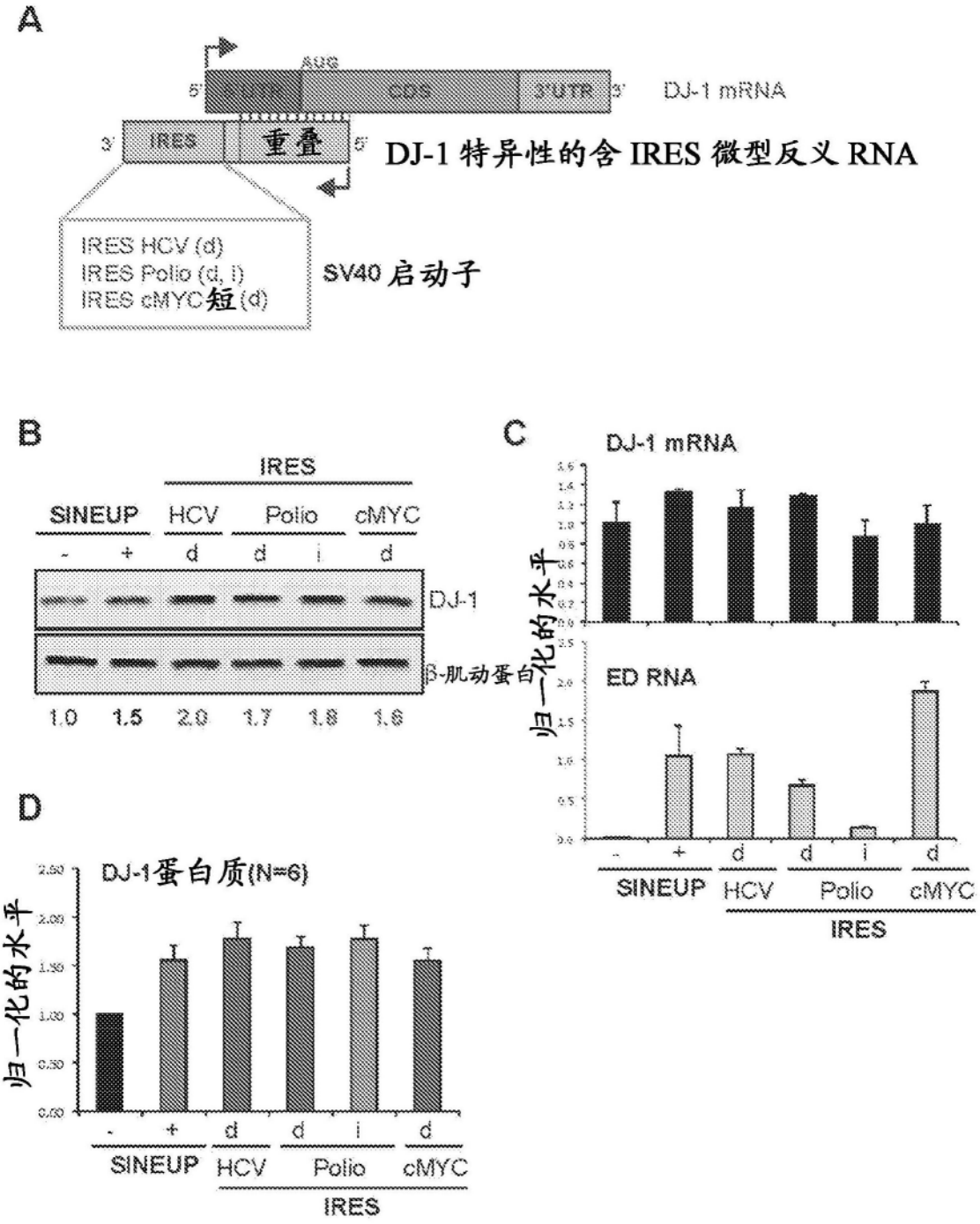

A
AUG
5'
5'UTR
CDS
3'UTR
3'
DJ-1 mRNA
3'
IRES
重叠
5'
DJ-1 特异性的含 IRES 微型反义 RNA
IRES HCV (d)
IRES Polio (d, i)
IRES cMYC短 (d)
SV40 启动子
B
IRES
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
- + d d i d
DJ-1
β-肌动蛋白
1.0 1.5 2.0 1.7 1.8 1.6
C
DJ-1 mRNA
ED RNA
归一化的水平
- + d d i d
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
IRES
D
DJ-1蛋白质(N=6)
归一化的水平
- + d d i d
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
IRES

图17

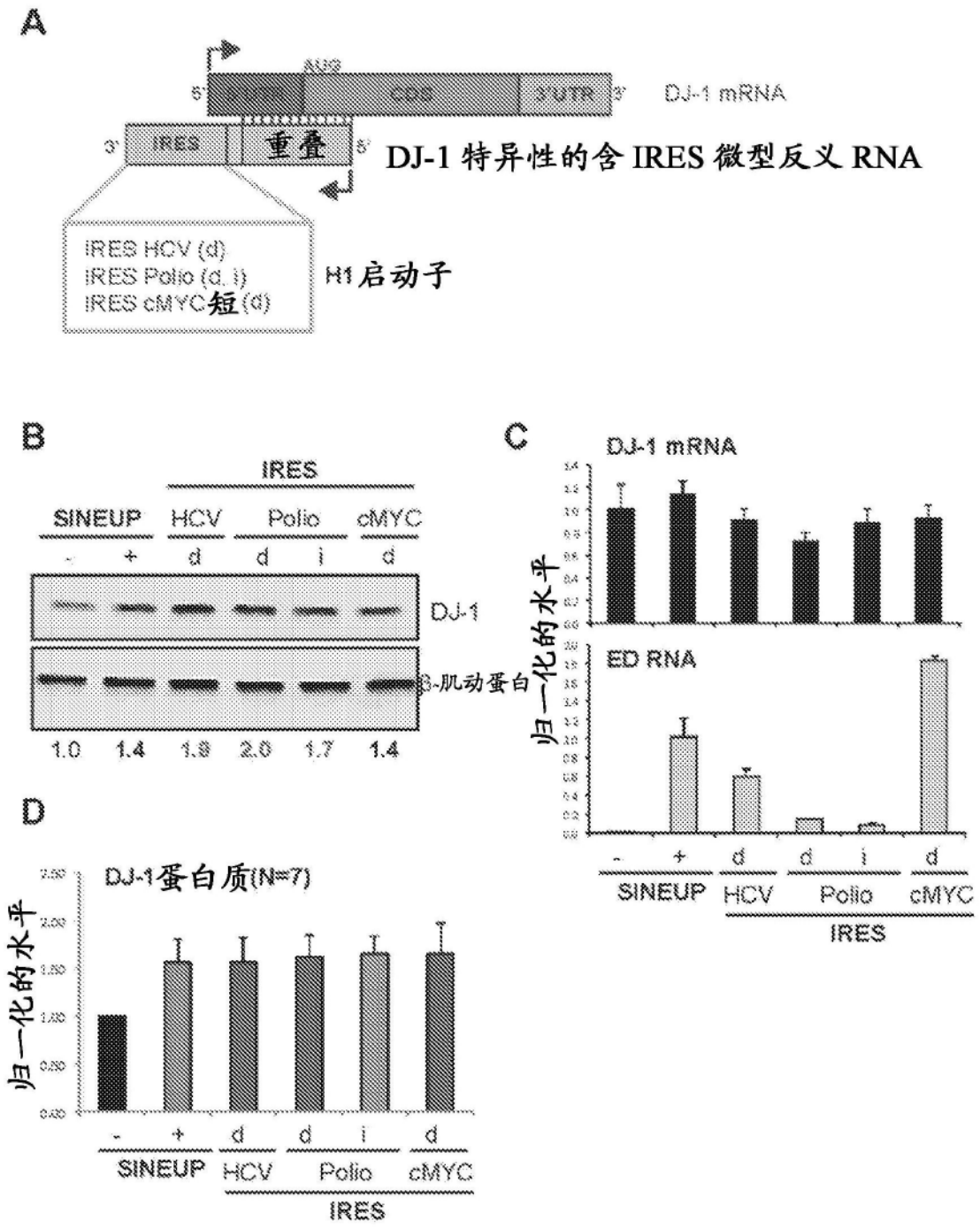

A
AUG
5'
CDS
3'UTR
3'
DJ-1 mRNA
3'
IRES
重叠
5'
DJ-1 特异性的含 IRES 微型反义 RNA
IRES HCV (d)
IRES Polio (d, i)
IRES cMYC短(d)
H1启动子
B
IRES
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
-
+
d
d
i
d
DJ-1
β-肌动蛋白
1.0
1.4
1.9
2.0
1.7
1.4
C
DJ-1 mRNA
ED RNA
归一化的水平
-
+
d
d
i
d
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
IRES
D
DJ-1蛋白质(N=7)
归一化的水平
-
+
d
d
i
d
SINEUP
HCV
Polio
cMYC
IRES

图18

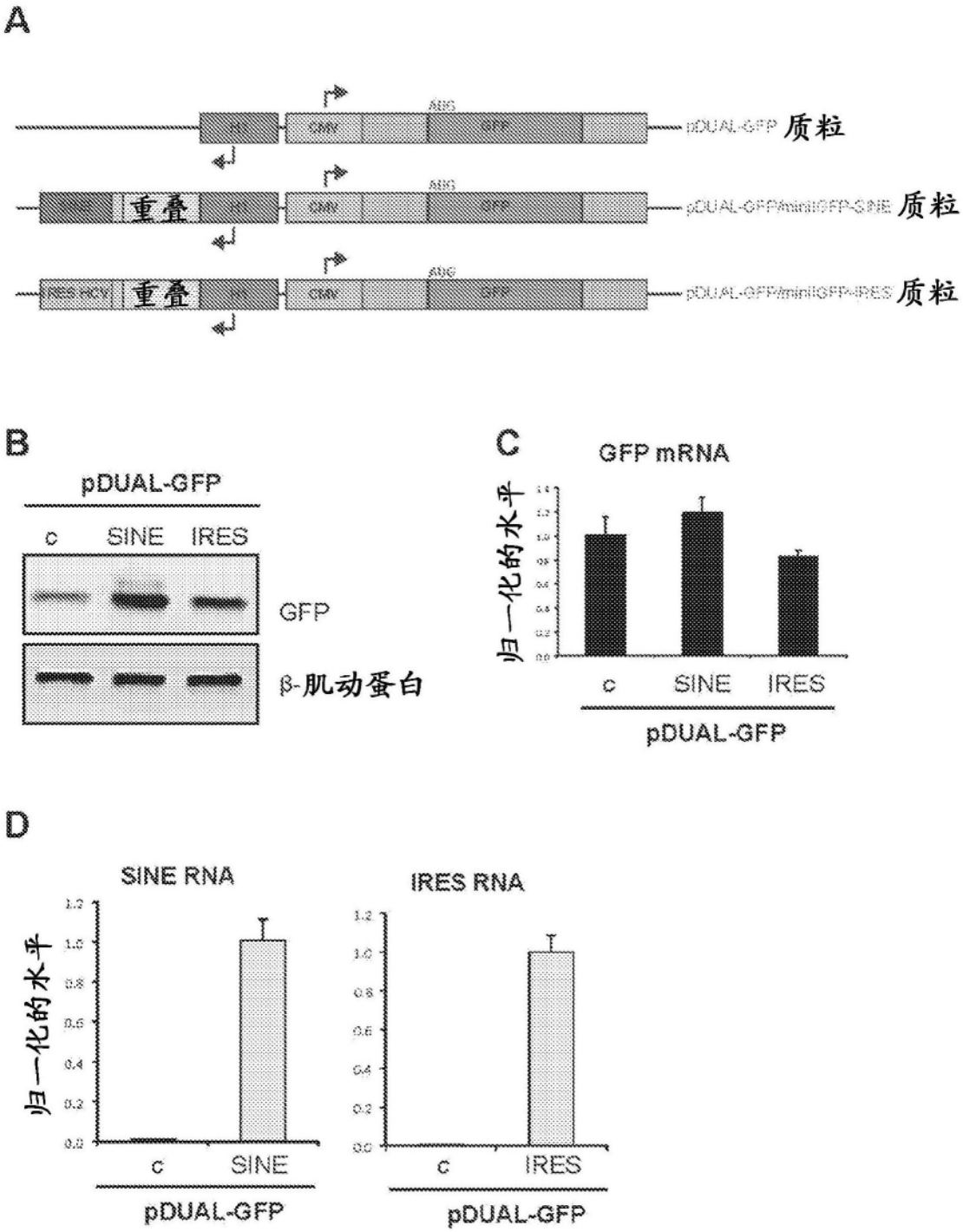
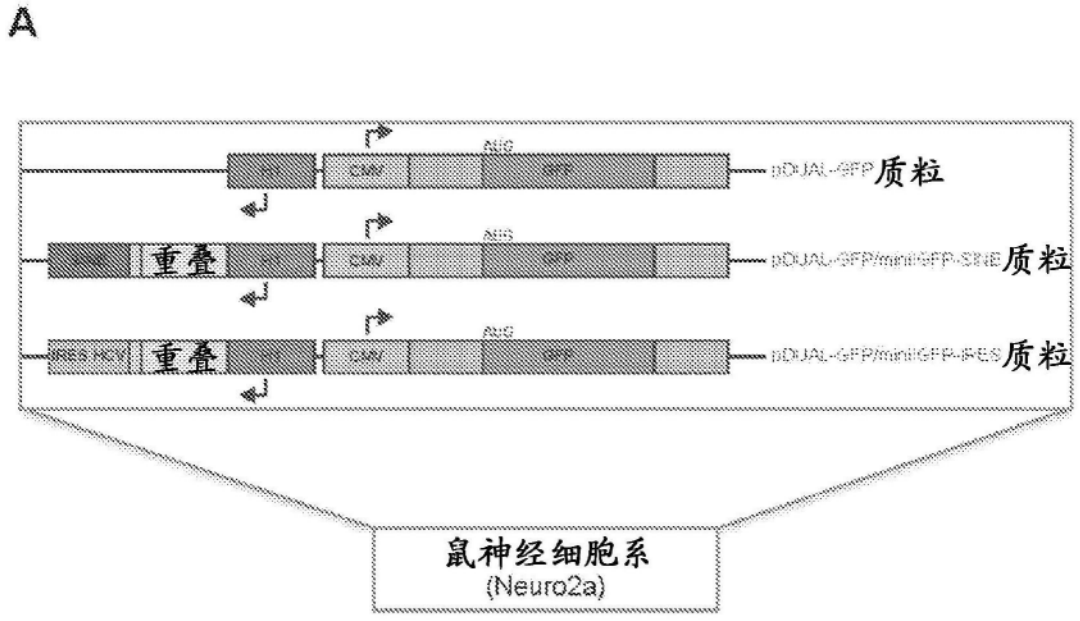

A
pDUAL-GFP 质粒
重叠
pDUAL-GFP/miniIGFP-SINE 质粒
重叠
pDUAL-GFP/miniIGFP-IRES 质粒
B
pDUAL-GFP
c
SINE
IRES
GFP
β-肌动蛋白
C
GFP mRNA
归一化的水平
c
SINE
IRES
pDUAL-GFP
D
SINE RNA
IRES RNA
归一化的水平
c
SINE
pDUAL-GFP
c
IRES
pDUAL-GFP

图19


A
AUG
CMV
GFP
pDUAL-GFP质粒
重叠
pDUAL-GFP/mini-GFP-SINE质粒
IRES HCV
pDUAL-GFP/mini-GFP-IRES质粒
鼠神经细胞系
(Neuro2a)

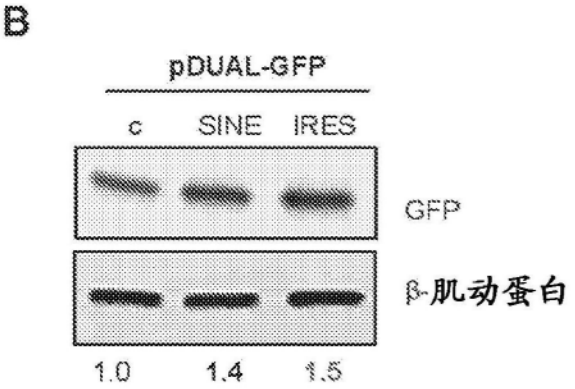

B
pDUAL-GFP
c
SINE
IRES
GFP
β-肌动蛋白
1.0
1.4
1.5

图20

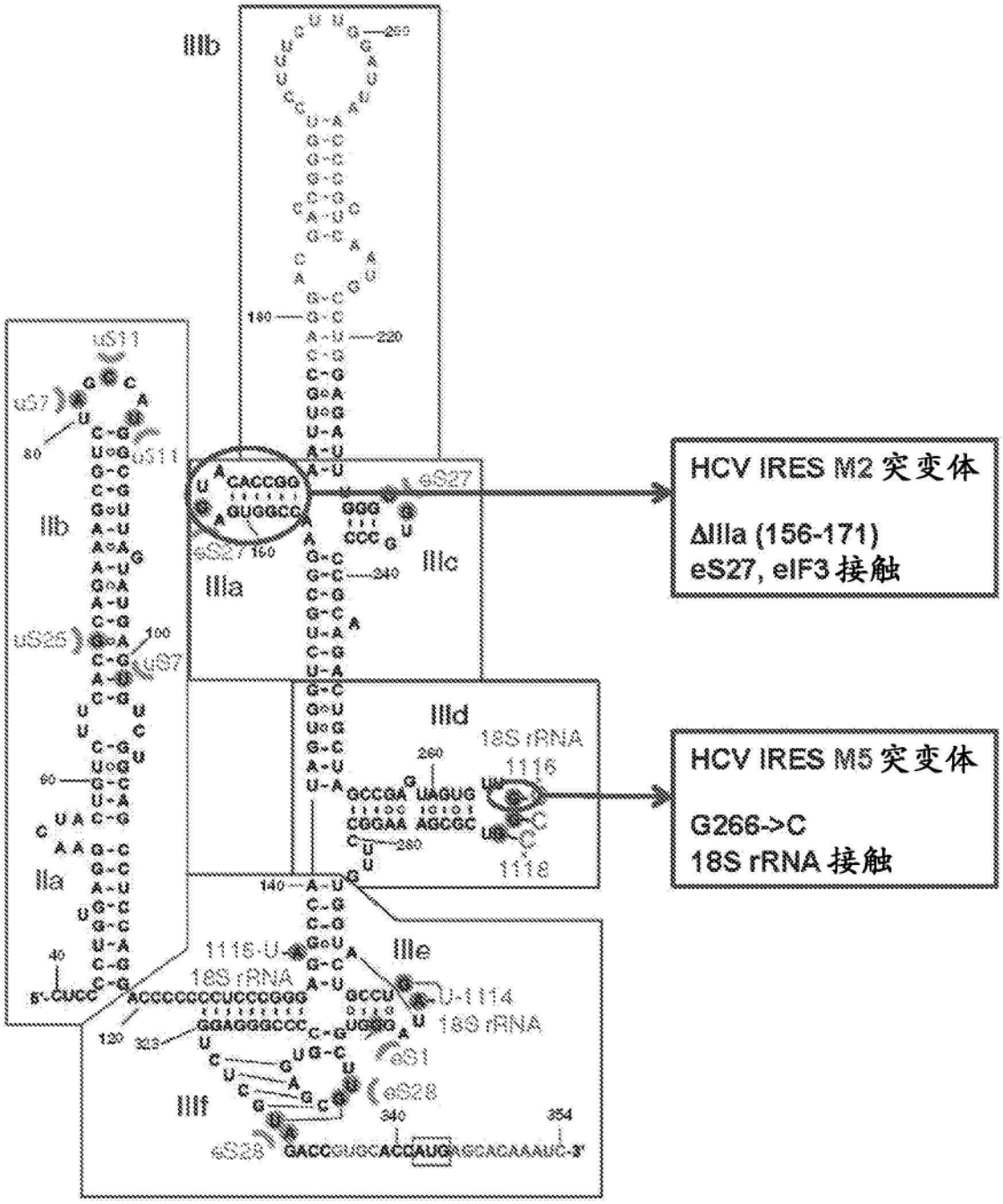

IIIb
uS11
uS7
uS11
IIb
eS27
IIIa
IIIc
uS26
uS7
IIIa
HCV IRES M2 突变体
ΔIIIa (156-171)
eS27, eIF3 接触
IIIb
18S rRNA
1115
1118
HCV IRES M5 突变体
G266->C
18S rRNA 接触
1116-U
18S rRNA
IIIe
U-1114
18S rRNA
eS1
eS28
IIIf
eS28

图21

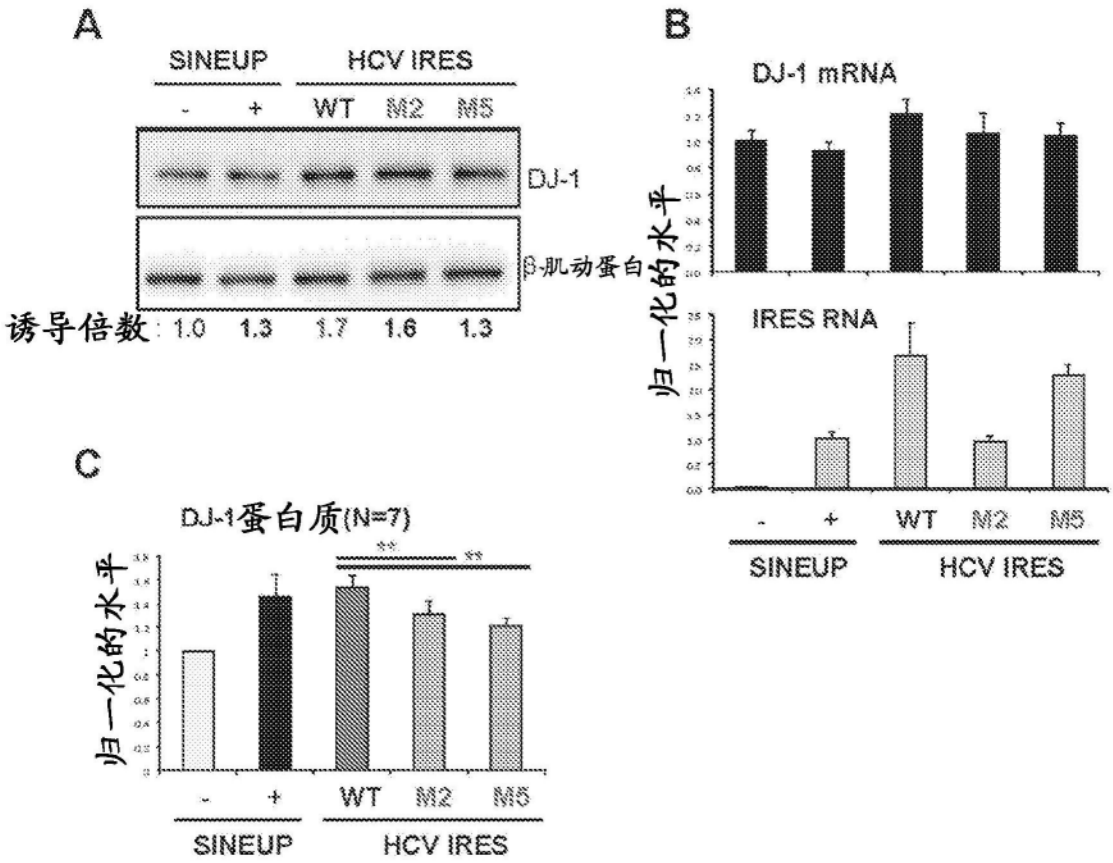
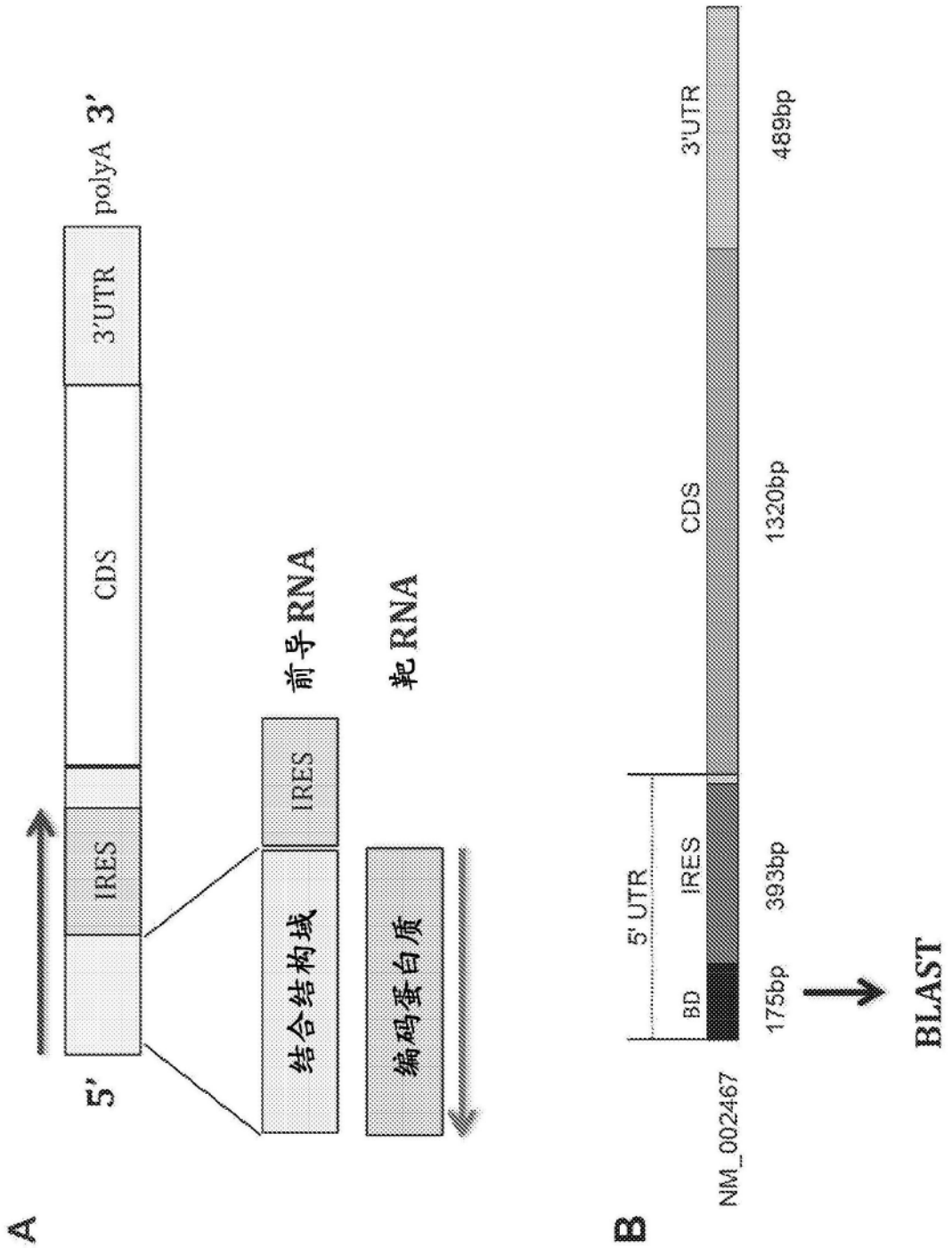
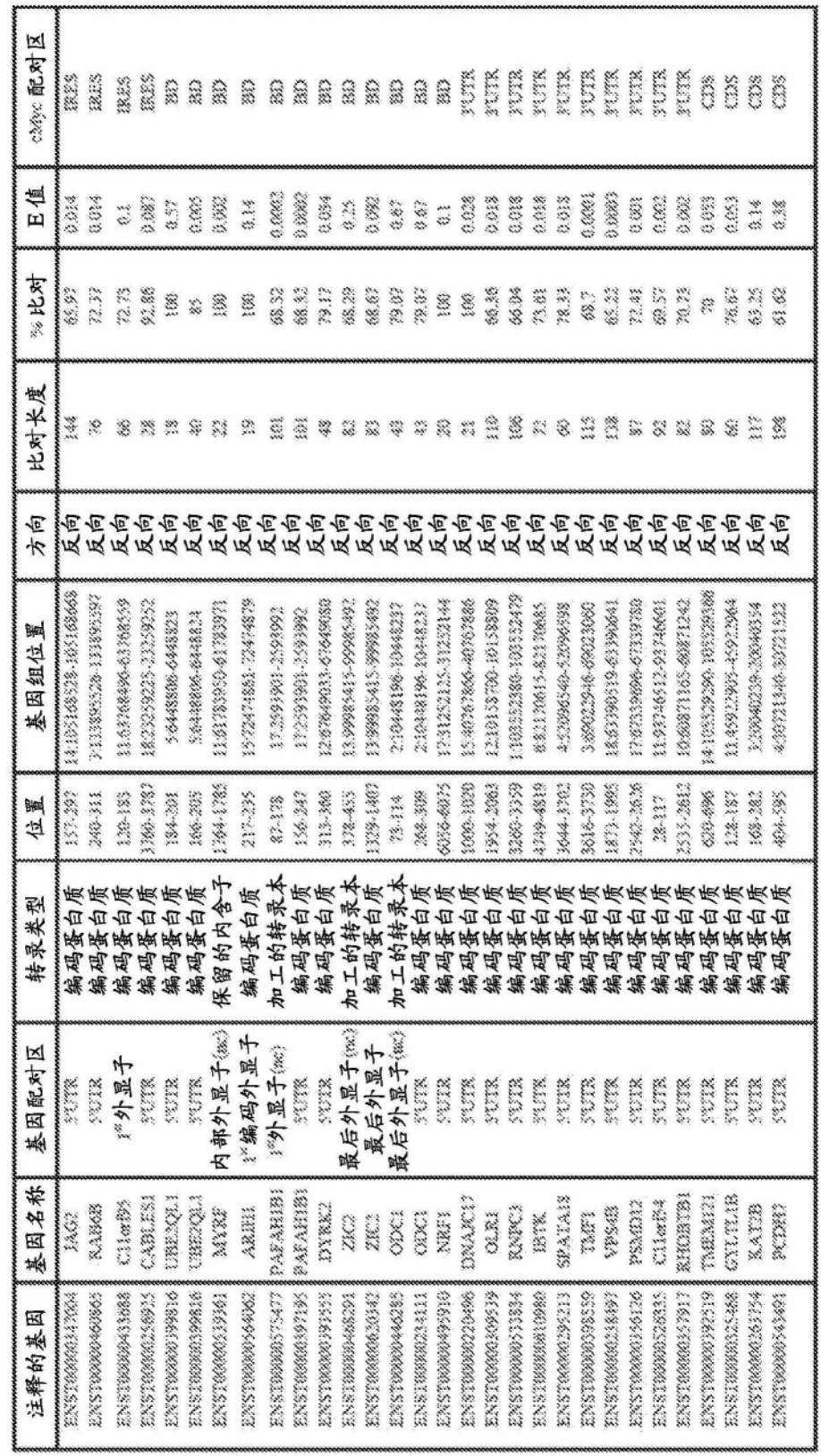

A
SINEUP
HCV IRES
-
+
WT
M2
M5
DJ-1
β-肌动蛋白
诱导倍数: 1.0 1.3 1.7 1.6 1.3
B
DJ-1 mRNA
IRES RNA
归一化的水平
- + WT M2 M5
SINEUP
HCV IRES
C
DJ-1蛋白质(N=7)
**
**
归一化的水平
- + WT M2 M5
SINEUP
HCV IRES

图22

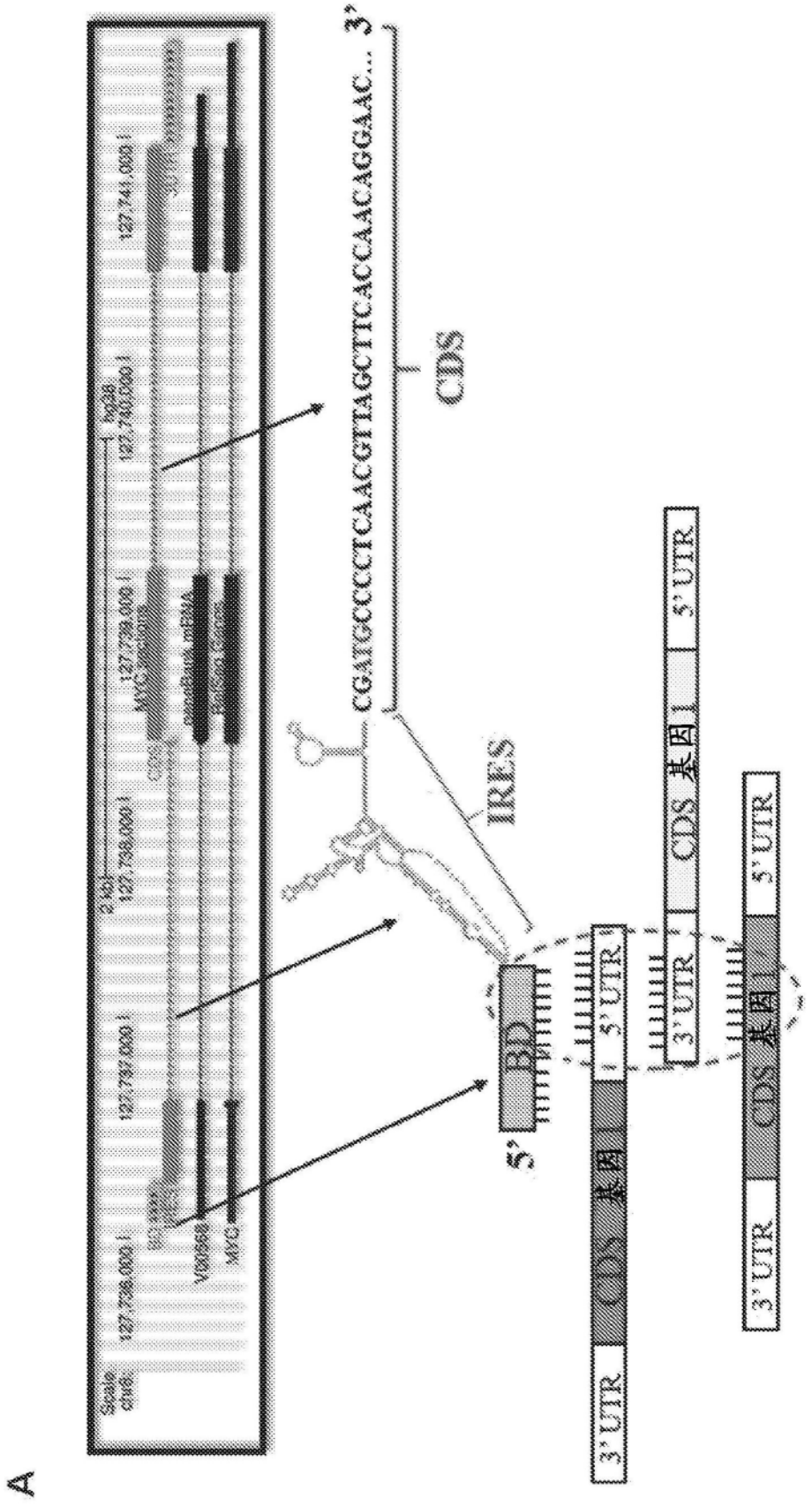

A
5'
IRES
CDS
3'UTR
polyA 3'
结合结构域
IRES
前导RNA
编码蛋白质
靶RNA
B
NM_002467
5'UTR
BD
IRES
CDS
3'UTR
175bp
393bp
1320bp
489bp
BLAST

C



注释的基因	基因名称	基因配对区	转录类型	位置	基因组位置	方向	比对长度	% 比对	E 值	cdyc 配对区
ENST00000343664	JAG2	5'UTR	编码蛋白质	157-297	14:105168328-105168468	反向	144	65.97	0.014	EES
ENST00000460865	RAB6B	5'UTR	编码蛋白质	248-311	7:133895528-133895587	反向	76	72.37	0.014	EES
ENST00000433688	C11orf95	1st外显子	编码蛋白质	120-183	11:63784496-63784559	反向	66	72.73	0.1	EES
ENST00000258935	CABLES1	5'UTR	编码蛋白质	3760-3787	18:23259225-23259252	反向	28	92.86	0.087	EES
ENST00000399816	UBE2Q1	5'UTR	编码蛋白质	184-301	5:64488806-64488923	反向	118	100	0.57	BD
ENST00000399818	UBE2Q1	5'UTR	编码蛋白质	166-205	5:64488806-64488824	反向	40	85	0.005	BD
ENST00000439361	MYRF	内部外显子(ins)	保留的内含子	1764-1785	11:61783950-61783971	反向	22	100	0.002	BD
ENST00000464062	ARHH1	1st编码外显子	编码蛋白质	217-235	19:72474851-72474879	反向	19	100	0.14	BD
ENST00000375477	PAFAH1B1	1st外显子(ins)	加工的转录本	82-178	17:2593903-2593992	反向	101	68.32	0.0003	BD
ENST00000397195	PAFAH1B1	5'UTR	编码蛋白质	156-242	17:2593903-2593992	反向	101	68.32	0.0002	BD
ENST00000392533	DYRK2	5'UTR	编码蛋白质	313-360	12:26769033-26769080	反向	48	79.17	0.034	BD
ENST00000468591	ZIC2	最后外显子(ins)	加工的转录本	378-453	13:99983415-99983492	反向	82	68.29	0.25	BD
ENST00000630342	ZIC2	最后外显子	编码蛋白质	1339-1403	13:99983415-99983492	反向	83	68.67	0.092	BD
ENST00000446285	ODC1	最后外显子(ins)	加工的转录本	78-114	2:10448196-10448237	反向	43	79.07	0.67	BD
ENST00000434111	ODC1	5'UTR	编码蛋白质	268-309	2:10448196-10448237	反向	43	79.07	0.67	BD
ENST00000495910	NRF1	5'UTR	编码蛋白质	6036-6075	7:129232135-129232174	反向	280	100	0.1	BD
ENST00000220496	DNAJC17	5'UTR	编码蛋白质	1000-1020	15:40767866-40767886	反向	21	100	0.028	5'UTR
ENST00000409539	QLI1	5'UTR	编码蛋白质	1994-2083	12:101138700-101138789	反向	110	66.36	0.018	5'UTR
ENST00000333834	RNPC3	5'UTR	编码蛋白质	3285-3359	1:93853380-93853454	反向	168	66.04	0.018	5'UTR
ENST00000610980	IBTK	5'UTR	编码蛋白质	4239-4819	6:8211708815-8211709395	反向	72	75.01	0.018	5'UTR
ENST00000392213	SPATA13	5'UTR	编码蛋白质	3644-3703	4:52996540-52996598	反向	60	78.33	0.013	5'UTR
ENST00000398559	TMF1	5'UTR	编码蛋白质	3616-3730	3:8902259-8902373	反向	115	68.7	0.0001	5'UTR
ENST00000416997	VPS4B	5'UTR	编码蛋白质	1873-1985	18:61390319-61390431	反向	113	65.22	0.0003	5'UTR
ENST00000356126	PSMD12	5'UTR	编码蛋白质	2542-2636	17:67333996-67334090	反向	97	72.41	0.001	5'UTR
ENST00000328835	C11orf54	5'UTR	编码蛋白质	28-117	11:93746612-93746701	反向	92	69.57	0.002	5'UTR
ENST00000357917	KHDRBTB1	5'UTR	编码蛋白质	2535-2612	10:66087165-66087242	反向	82	70.73	0.002	5'UTR
ENST00000392519	TMEM121	5'UTR	编码蛋白质	628-696	14:105529290-105529358	反向	80	70	0.033	CDS
ENST00000325468	GTF2A1L	5'UTR	编码蛋白质	128-187	11:45922905-45922964	反向	60	76.67	0.053	CDS
ENST00000353754	KAT2B	5'UTR	编码蛋白质	168-282	3:53046233-53046347	反向	117	63.25	0.14	CDS
ENST00000343691	PCDH7	5'UTR	编码蛋白质	484-595	4:30721300-30721522	反向	196	61.62	0.38	CDS

图23


A
CGATGCCCCTCAACGTTAGCTTCACCAACAGGAAC... 3'
CDS
IRES
5'
BD
3'UTR
CDS 基因 I
5'UTR
3'UTR
CDS 基因 I
5'UTR
3'UTR
CDS 基因 I
5'UTR

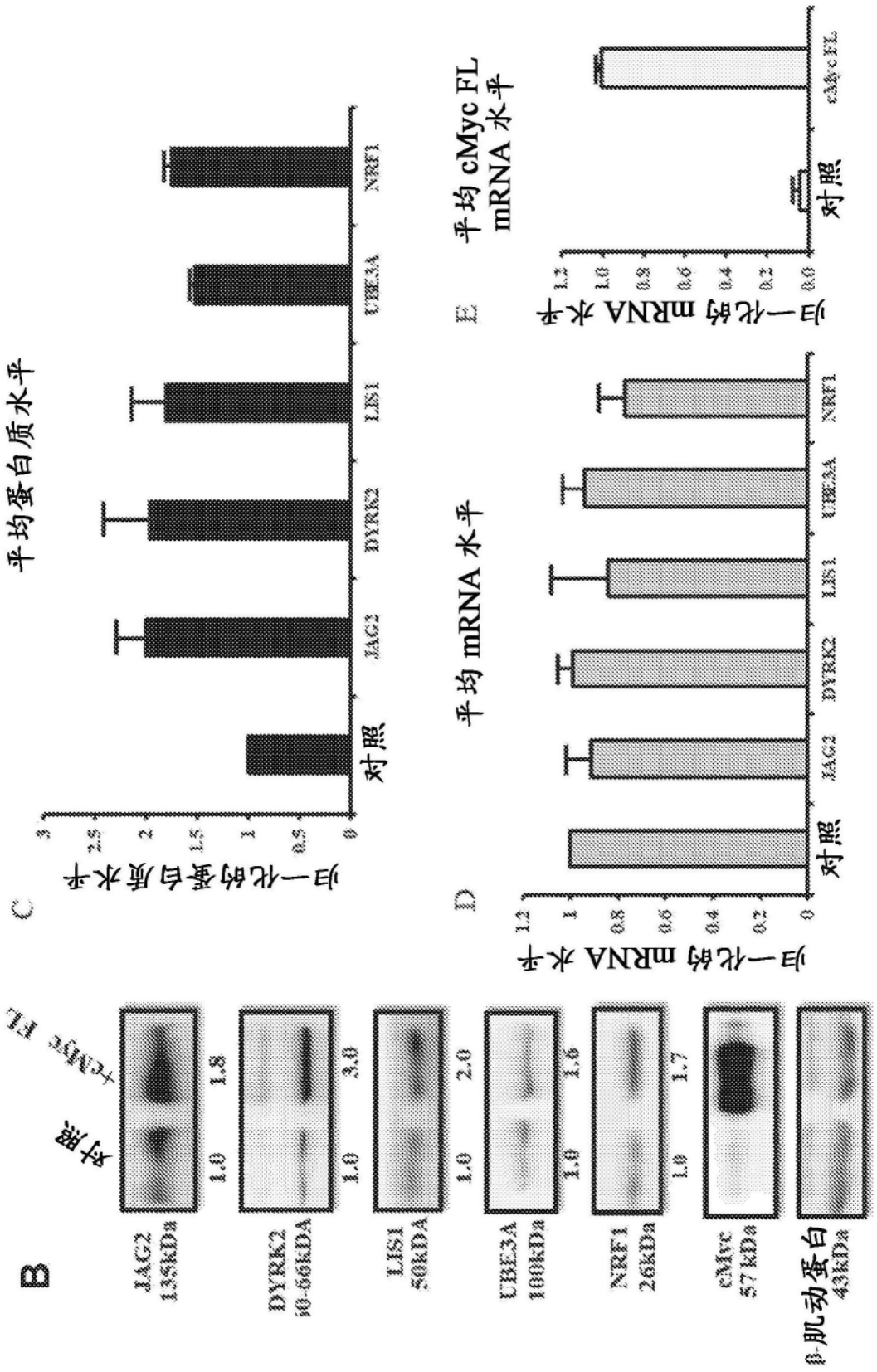
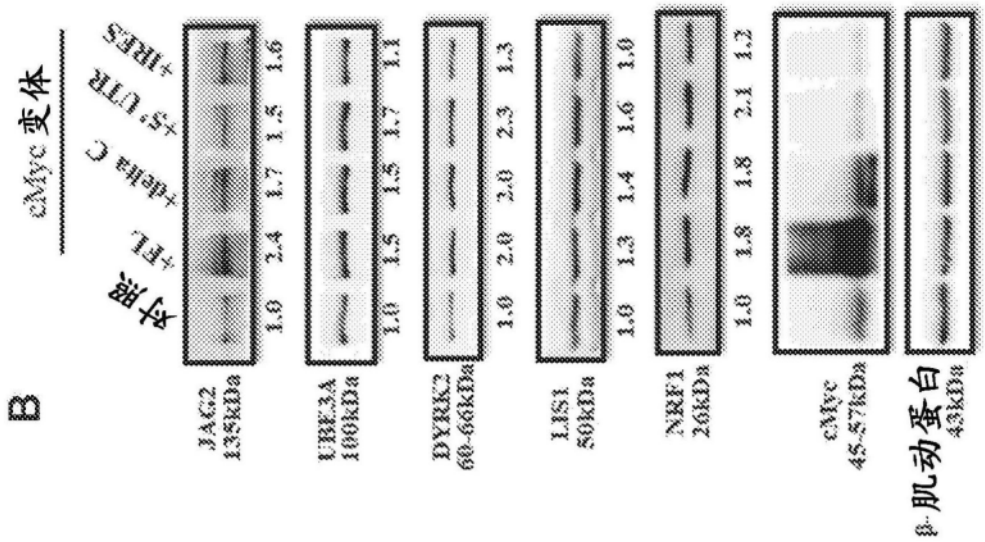
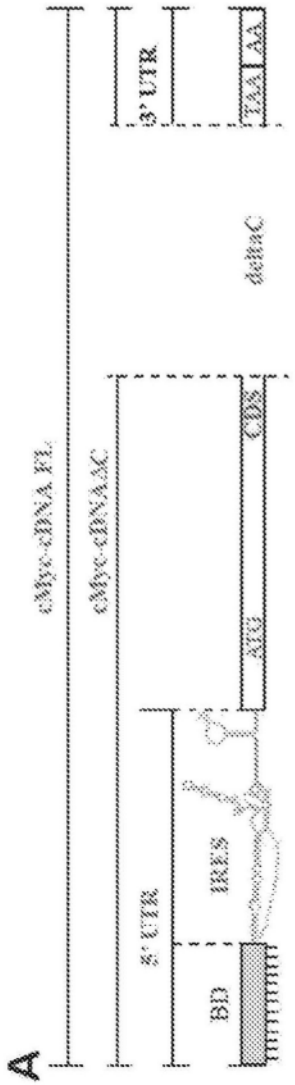

B
对照
cMyc FL
JAG2
135kDa
1.0
1.8
DYRK2
60-66kDA
1.0
3.0
LIS1
50kDA
1.0
2.0
UBE3A
100kDa
1.0
1.6
NRF1
26kDa
1.0
1.7
cMyc
57 kDa
β-肌动蛋白
43kDa
C
平均蛋白质水平
归一化的蛋白质水平
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
JAG2
DYRK2
LIS1
UBE3A
NRF1
D
平均 mRNA 水平
归一化的 mRNA 水平
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照
JAG2
DYRK2
LIS1
UBE3A
NRF1
E
平均 cMyc FL mRNA 水平
归一化的 mRNA 水平
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
对照
cMyc FL

图24


B
cMyc 变体
对照
+FL
+deltaC
+5' UTR
+IRES
JAG2
135kDa
1.0 2.4 1.7 1.5 1.6
UBE3A
100kDa
1.0 1.5 1.5 1.7 1.1
DYRK2
60-66kDa
1.0 2.0 2.0 2.3 1.3
LIS1
50kDa
1.0 1.3 1.4 1.6 1.0
NRF1
26kDa
1.0 1.8 1.8 2.1 1.2
cMyc
45-57kDa
β-肌动蛋白
43kDa


A
cMyc-cDNA FL
cMyc-cDNAΔC
5' UTR
IRES
BD
ATG
CDS
deltaC
3' UTR
TAA
AA

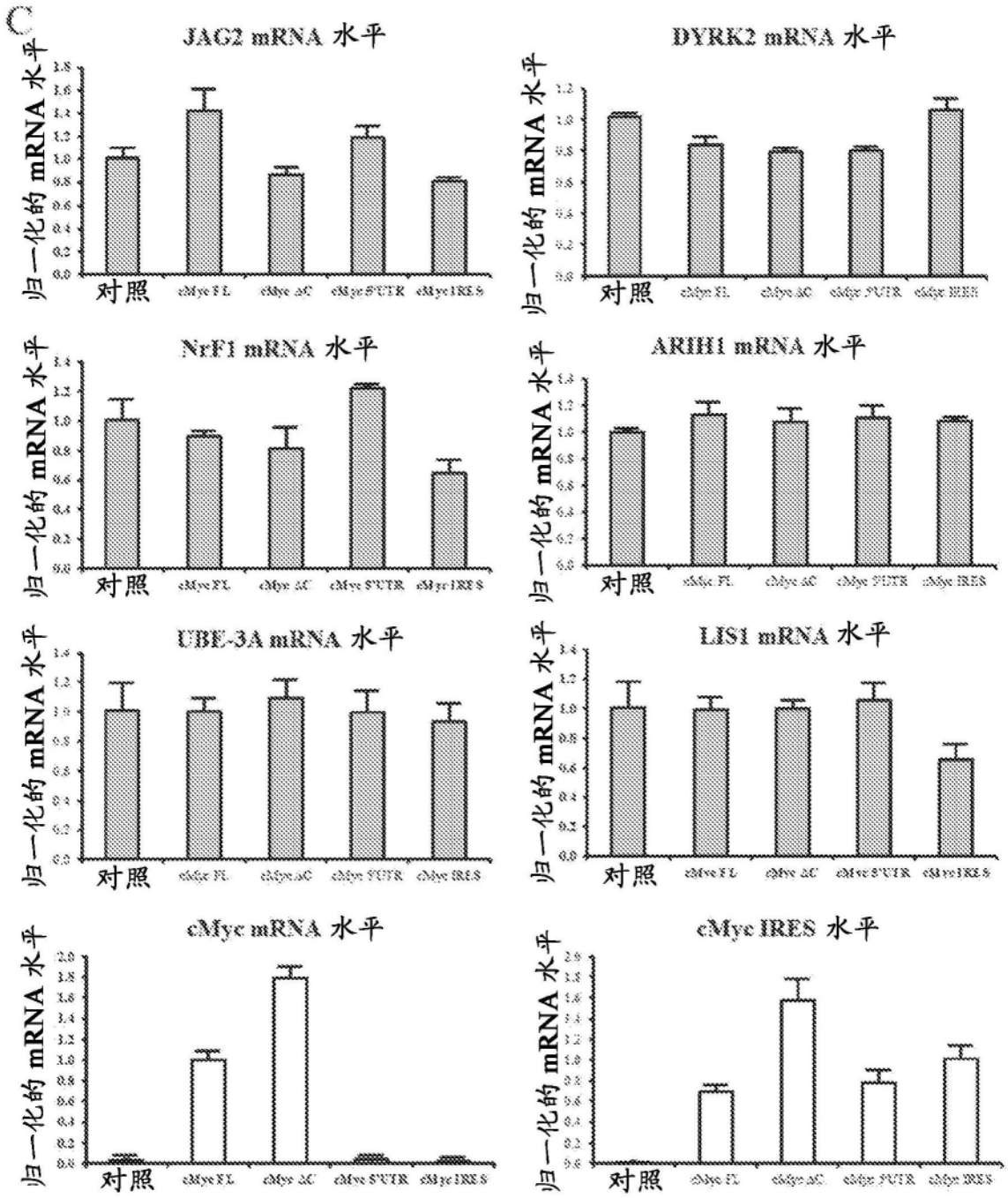

C
JAG2 mRNA 水平
DYRK2 mRNA 水平
NrF1 mRNA 水平
ARIH1 mRNA 水平
UBE-3A mRNA 水平
LIS1 mRNA 水平
cMyc mRNA 水平
cMyc IRES 水平
归一化的 mRNA 水平
对照

图25