



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108366966 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680054186.6

(22)申请日 2016.08.24

(30)优先权数据

62/209,278 2015.08.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/048492 2016.08.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/035278 EN 2017.03.02

(71)申请人 光环生物干扰疗法公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 托德·M·郝瑟尔

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 乔雪微 刘依云

(51)Int.Cl.

A61K 9/14(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

C12N 15/115(2006.01)

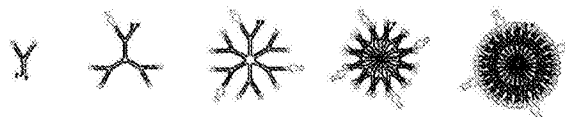
权利要求书1页 说明书78页 附图19页

(54)发明名称

用于调节基因表达的多核苷酸纳米颗粒及其用途

(57)摘要

本发明涉及新型自形成多核苷酸纳米颗粒,以及这种纳米颗粒和包含其的组合物用于各种生物中的基因调节的用途。



显示增加的多个MV-RNA组合物的单链MV-RNA纳米颗粒

1. 一种大约40nm直径的分离的多核苷酸纳米颗粒,所述多核苷酸纳米颗粒在外表面上的茎比率是在中心处的至少两倍,所述多核苷酸纳米颗粒包含两个或更多个连接的MV-RNA序列,每个MV-RNA序列通过连接元件分开。
2. 一种大约100nm直径的分离的多核苷酸纳米颗粒,所述多核苷酸纳米颗粒在外表面上的茎比率是在中心处的至少四倍,所述多核苷酸纳米颗粒包含三个MV-RNA的堆叠的集合,其中每个堆叠的MV-RNA集合通过连接元件分开。
3. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒含有在一个或多个表面环上的适体或细胞摄取序列。
4. 根据权利要求1所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒具有图1-3的任何一个中所示的一般结构。
5. 根据权利要求1所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒包含(i) 充当闭合序列的单个MV-RNA的5'末端和同一MV-RNA的3'末端,或(ii) 充当闭合序列的dsRNA。
6. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述连接元件包含:(i) 茎环结构、或(ii) 二核苷酸、或(iii) 可被核酸内切酶切割的单核苷酸。
7. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒包含天然或合成的RNA或DNA。
8. 根据权利要求1-12中任一项所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述可切割的连接序列是3-12个核苷酸。
9. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒是用核酶切割环化的单个多核苷酸纳米颗粒。
10. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒在选自植物细胞或人细胞或酵母细胞或细菌细胞的宿主细胞内表达或体外转录表达。
11. 根据权利要求1或2所述的分离的多核苷酸纳米颗粒,其中所述多核苷酸纳米颗粒在宿主细胞内表达并且靶向除所述宿主外的基因。
12. 一种组合物,所述组合物包含与生理上可接受的赋形剂组合的权利要求1-9中任一项所述的分离的多核苷酸纳米颗粒。

用于调节基因表达的多核苷酸纳米颗粒及其用途

[0001] 优先权声明

[0002] 本专利申请要求于2015年8月24日提交的美国临时申请号62/209,278的优先权,所述美国临时申请整体包括附图以引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 基于双链RNA的干扰(dsRNAi)已成为用于逆向功能基因组学的重要工具(Fire 1998)。RNAi是在真核生物中高度保守的天然存在的防御机制。RNAi保护基因组免受可移动遗传元件(例如转座子、病毒和其他高度重复的基因组序列)的入侵,并且还控制真核生物中发育程序的功能(Sidahmed 2010)。

[0004] RNAi涉及通过称为Dicer的RNase III型酶将双链RNA(dsRNA)切割成小干扰RNA(siRNA),所述siRNA然后通过与其的互补RNA序列结合且通过降解触发其消除或通过诱导翻译抑制,来指导序列特异性、同源性依赖性、转录后基因沉默(Fire 1998;Meister 2004)。

[0005] 多价RNA(MV-RNA)代表连接类别的RNA分子,其并非经典dsRNA,但具有与上述基于dsRNA的RNAi分子类似的作用模式。独特地,MV-RNA显示出同时切割在相同或不同基因上的多个位点以及利用与dsRNAi不同的预加工途径的能力(美国专利公开号2011/0159586和PCT公开号W02012/014155)(图15)。

[0006] RNAi分子如siRNA、shRNA、miRNA或MV-RNA与Ago、PAZ和PIWI结构域相互作用,作为装载到RNA诱导沉默复合物(RISC)内的初始步骤。因此,通过沉默复合物(即RISC)或甚至Dicer控制RNAi分子的5'和3'末端的可接近性将增强特异性。另外,通过Dicer从更长dsRNA的生物生成产生多个siRNA分子是从单个转录物产生多重siRNA分子的手段。dsRNA RNAi前体由Dicer或Drosha核酸内切酶的切割在植物、动物和人是常见的。然而,由于负面免疫应答,长dsRNA在哺乳动物中是弱RNAi触发剂,在几乎所有用途中都快速降解,并且确实支持从单个转录物精确产生多重短RNAi分子,如MV-RNA。

[0007] RNA纳米技术本身自1998年以后就已存在。多年来已作出许多努力来克服RNA对核酸酶降解、结构灵活性、血清不稳定性和RNase敏感性的易感性,并且在用RNA构建具体形状时,对于大多数商业用途仍然存在挑战。几种核酸自组装方法包括使用结构DNA支架已用于生成用于体内递送的含有siRNA的纳米结构。

[0008] 利用RNA的分子间相互作用,已尝试了纳米颗粒的不同RNA组装。pRNA二聚体、三聚体和六聚体形成(Guo 1987,1988;Shu 2004,2007,2011,Haque 2012)也已得到充分研究。pRNA分子在其核心处含有细菌噬菌体phi29,以及在3向连接的每个末端处的一个至多个活性调节分子。体外和体内结果已显示pRNA底物可由RNA、DNA适体或肽配体导向,并且可通过附加的siRNA、shRNA、核酶、肽或抗体进行基因调节。基于RNAI/II逆向吻合复合物(inverse kissing complex)的RNA纳米环(Yingling和Shapiro 2007;Afonin等人2011;Grabow等人2011);HIV RNA的吻合环(Chang和Tinoco 1994;Bindewald等人2008)和果蝇bicoid mRNA的手臂相互作用(hand-in-arm interaction)(Wagner等人2004);(2)回文序列介导的pRNA

二聚体、四聚体和阵列形成 (Shu等人2004); (3) 作为LEGO小片的RNA基序,以经由非模板化组装(包括tecto-RNA、双向连接(2WJ)、3WJ和四向连接(4WJ))以及通过coIE1吻合环相互作用的自组装来构建四级结构(Prats等人1990;Clever等人1996;Mujeeb等人1998;Jaeger和Leontis 2000;Lilley 2000;Shu等人2011a;Haque等人2012); (4) 热力学稳定核心的臂的延伸,以携带多种治疗性小RNA(Shu等人2011a;Haque等人2012); (5) 使用RNA结合蛋白,以充当用于形成纳米结构的支架,例如等边三角形构建体,其中三种蛋白质结合含有用于蛋白质结合的扭结转角基序(kink-turn motif)的RNA支架(Schroeder等人2010;Ohno等人2011)。

[0009] 尽管有接近30年的研究,每个RNA纳米颗粒由于使得商业使用困难的特征而有缺陷。纳米环依赖非共价吻合环相互作用,所述非共价吻合环相互作用可容易在温度梯度中变性;不能在体内有效地形成;并且合理的组装可为可变的。pRNA克服了纳米环的稳定性问题,但由于受到三种活性分子的限制而缺乏摩尔浓度,并且也缺乏核酸酶降解的合理控制。事实上,上文几乎所有的纳米颗粒都受到非共价键合、摩尔浓度限度或缺乏核酸酶控制的限制。

[0010] 先前显示RNA微海绵颗粒可通过体外滚环转录来制备,并且甚至用于具有很小毒性或没有毒性的RNAi中(Hammond 2012)。通过利用作为单链多联体重复表达的经典shRNA结构,形成2 μ M的球形颗粒,然后通过PEI处理凝结至~200纳米。Hammond示出了成千上万的shRNA的转录形成片层,其最终坍塌成球形-称为“微海绵”。这些微海绵也显示是活性RNAi触发剂。然而,在2014年,Hammond证明了这样的球形形成与RNA本身无关,而是在T7转录反应期间RNA与纳米晶体焦磷酸镁结合的结果。虽然这样的RNA微海绵可形成且甚至用于RNAi中,但缺乏产生更小尺寸的程序化组合物的能力以及在体内这样实现的能力。

[0011] 最近还已公开了球形核酸(SNA)纳米颗粒缀合物(Zheng 2012,2013;Zhou 2013,Jensen 2013,Ding 2014),其显示了在金颗粒周围球形排列的缀合siRNA。金纳米颗粒提供活性核酸分子的共价和非共价附着两者。该排列堆叠在金颗粒中心周围。虽然由于核酸的球形排列和细胞渗透,该方法已被证明是活性的,但它仍然是合成(无机)递送载体。

[0012] 病毒外壳蛋白或衣壳蛋白在核酸的运输和保护中起作用。半个世纪以前显示在混合外壳蛋白和RNA的水溶液时,螺旋对称的感染性病毒颗粒自组装(H.Fraenkel-Conrat, 1955)。在大多数情况下,这个保护层是由于外壳蛋白的多个拷贝的存在,所述外壳蛋白的多个拷贝自组装成围绕核酸通常为杆状或球状形状的那种。虽然围绕自发自组装过程的许多细节仍不明确,但最近的数据(参见引用文献“Coat Protein References”)提示至少蛋白质-蛋白质相互作用和核酸特征决定了结构结果。在豇豆褪绿斑点病毒(CCMV)的情况下,证据提示直径受核苷酸长度控制。研究人员确定,当与6:1的蛋白质/RNA质量比组合时,小于3000nt的长度导致~24-26nm的外壳蛋白(CP)直径,并且当长度大于4,500nt时,导致~30nm的外壳蛋白(CP)直径。尽管CP在体外和体内的使用已证实封装核酸,但这种RNA长度对于CP的相依性对于长dsRNA使用是无效的,并且对于没有预包装的短RNAi触发剂(即脂质)是不可能的。

[0013] 仍然需要允许自形成多核苷酸纳米颗粒用于基因调节的方法和组合物,所述自形成多核苷酸纳米颗粒具有可编程的直径、核酸酶稳定性、摩尔浓度、细胞特异性、摄取和活性触发剂的可靠的核酸酶生物生成-其对于转基因和外源用途两者是有用的。本发明解决

了这种需要,并且可应用于人、动物、植物、昆虫和真菌中。

发明内容

[0014] 本发明一般涉及用于自形成基于多核苷酸的RNA干扰(RNAi)纳米颗粒的组合物和方法。更具体地,本发明呈现了关于利用单链多核苷酸内的多个MV-RNA分子的方法和组合物,所述单链多核苷酸自形成为致密球形、铁饼样或杆状纳米颗粒。所得到的纳米颗粒显示出细胞摄取和核酸酶稳定性的独特性质,并且递送高摩尔的RNAi触发剂。

[0015] 本文公开的多核苷酸纳米颗粒提供了新型组合物和方法,其可用于用纳米颗粒同时在一个或多个生物中同时特异性调节一种或多种基因的基因表达,所述纳米颗粒具有可编程直径、细胞递送和摄取、以及通过核酸内切酶消化的精确触发剂释放。本发明的这种自形成多核苷酸纳米颗粒显示出高触发剂摩尔浓度、体外和体内生产、核酸酶抗性和多生物使用。

[0016] 本文提供的纳米颗粒的特征在于在纳米颗粒的表面附近是在纳米颗粒的核心处大约两倍频繁的RNA茎的一般比率。

[0017] 本文提供了包含两个或更多个连接的MV-RNA分子的分离的多核苷酸纳米颗粒,每个MV-RNA分子通过可被核酸内切酶切割的至少一个连接核苷酸分开,其中一旦被核酸内切酶切割,两个或更多个连接的MV-RNA分子就分离,从而暴露至少一个生物活性RNAi分子。

[0018] 在某些实施例中,纳米颗粒由2、3、6、9、12、15、27个或超过27个分开的MV-RNA分子组成,所述MV-RNA分子通过连接核苷酸连接成单链自形成多核苷酸盘状或球状纳米颗粒结构。

[0019] 在另外其他实施例中,纳米颗粒由27个或更多个分开的MV-RNA分子组成,所述MV-RNA分子通过将分子连接成单链自形成多核苷酸球状纳米颗粒结构而连接。

[0020] 在某些实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒具有在图1-3的任何一个中所示的一般结构中的多个MV-RNA。

[0021] 在某些实施例中,纳米颗粒中的第一MV-RNA通过含有多核苷酸纳米颗粒序列的5'和3'两者来闭合纳米颗粒。在更具体的实施例中,MV-RNA的第一引导链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且第二引导链部分和第三引导链部分代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端。在甚至更具体的实施例中,具有其连接环的MV-RNA的第一引导链和第二引导链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且仅第三引导链代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端。

[0022] 在某些实施例中,线性寡核苷酸的第一链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且关于第一寡核苷酸的反向互补体代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端,从而在两个线性寡核苷酸杂交后封闭MV-RNA的基团以形成茎。

[0023] 在其他实施例中,多核苷酸纳米颗粒不被互补序列封闭。这样的实施例依赖于反向平行二级结构的转录,以通过滚动单个MV-RNA(图3A)或堆叠的MV-RNA(图3B)的转录来产生球体。

[0024] 在另外其他实施例中,在由核酸内切酶切割连接核苷酸后,两个或更多个连接的MV-RNA分子作为分开的实体释放,其中分开的MV-RNA引导链是RNA诱导沉默复合物(RISC)的底物。在具体的实施例中,连接核苷酸由核酸内切酶的切割控制分开的MV-RNA序列对RNA诱导沉默复合物(RISC)的可接近性。在其他具体的实施例中,切割连接核苷酸提供其为RNA

诱导沉默复合物 (RISC) 的底物的每条MV-RNA引导链的5'末端和3'末端。

[0025] 在另外其他实施例中,在由核酸内切酶切割连接核苷酸后,两个或更多个连接的MV-RNA分子作为分开的实体释放,其中分开的MV-RNA引导链是微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的底物。在具体的实施例中,连接核苷酸由核酸内切酶的切割控制分开的MV-RNA序列对微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的可接近性。在其他具体的实施例中,切割连接核苷酸提供其为微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的底物的每条MV-RNA引导链的5'末端和3'末端。

[0026] 两个或更多个MV-RNA分子可为相同或不同的,并且可例如选自含有适体、配体、连接核苷酸、环、ssRNA末端或其组合的MV-RNA分子。

[0027] 在某些实施例中,连接核苷酸是1、2、3个或更多个核苷酸。

[0028] 在某些其他实施例中,连接核苷酸形成茎环,所述茎环在特定的pH范围下变性或再退火,从而引起多核苷酸纳米颗粒改变直径。

[0029] 在其他具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒在选自人细胞或动物细胞或植物细胞或酵母细胞或昆虫细胞或细菌细胞的宿主细胞内表达,或者通过体外转录表达。

[0030] 在其他具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒决定了围绕本发明的外壳蛋白的直径(图18)。

[0031] 在其他具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒靶向生物中除宿主的那些外的基因。可通过MV-RNA与靶基因的互补性和细胞摄取信号如适体、配体、连接核苷酸、环、长dsRNA、ssRNA末端或其组合来确定生物特异性。

[0032] 在某些具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒通过经由启动子的植物内转录(转基因)产生,或者在图1-3、8-10和18的任何一个中所示的一般结构中的体外转录之后,局部应用于植物(外源)。

[0033] 在某些实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒通过使用在图1-3、8-10和18的任何一个中所示的一般结构,靶向昆虫、或病毒、或真菌、或动物、或人、或宿主植物(图24)、其他植物或其任何组合的基因。

[0034] 在另外其他具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒是用可切割的核酶环化的单个多核苷酸纳米颗粒(图5和13)。

[0035] 在另外其他具体的实施例中,多核苷酸纳米颗粒包含天然或合成的RNA或DNA。

[0036] 在另外其他具体实施例中,多核苷酸纳米颗粒包含天然或合成的RNA或DNA、2'修饰的核苷酸、锁定核苷酸或未锁定核苷酸。

[0037] 根据本发明的另一个方面,提供了组合物,所述组合物包含与生理上可接受的赋形剂组合、如本文任何实施例中所述的一种或多种分离的多核苷酸纳米颗粒。

[0038] 根据本发明的另外一个方面,提供了用于将两种或更多种RNA分子递送至靶细胞的方法,所述方法包括使靶细胞与本文所述的分离的多核苷酸纳米颗粒或组合物接触。

[0039] 根据本发明的再另外一个方面,如本文任何实施例中所述,通过增加每个MV-RNA的端对端多个或通过堆叠的MV-RNA的端对端排列(通过与3'的5'互补性来闭合或不闭合),比率或表面与核心茎与纳米颗粒的直径成比例地扩大。

附图说明

- [0040] 图1:随着增加的多个MV-RNA,自形成、自递送~40nm MV-RNAi纳米颗粒的例子。
- [0041] 图2:具有SEQ ID NO:39-52的增加的多个MV-RNA的多核苷酸纳米颗粒家族的RNA折叠二级结构,以及指示增加的多个对触发剂摩尔浓度(即效力)、范围(spectrum)和核酸酶稳定性的作用的图表。
- [0042] 图3:指示(1)核心茎区域和(2)表面茎区域的(A)40nm和(B)100nm多核苷酸纳米颗粒结构。40nm和100nm球体的核心茎与表面比分别为1:2和1:4。
- [0043] 图4:多核苷酸纳米颗粒的使用开放/闭合MV-RNA的合理组装。(1)闭合MV-RNA 5'前导序列(黑色), (2)一个或多个端对端MV-RNA的示例区(浅灰色), (3)闭合MV-RNA的3'末端(黑色);以及(4)高度复数的端对端MV-RNA的另外示例区(浅灰色)。
- [0044] 图5:通过转录自组装纳米颗粒。可使用以(1)线性或(2)通过核酶形式环化的启动子从DNA转录整个纳米颗粒。
- [0045] 图6: MV-RNA纳米颗粒形成合理的结构和大小。图6A显示了根据一个实施例的单链多核苷酸纳米颗粒。图6B显示了具有多个三MV-RNA的纳米颗粒的原子力显微镜检查(AFM),三MV-RNA以本文所述的方式开放和闭合,并且导致具有预测结构的~40nm纳米颗粒。图6C显示了提供了具有尾部12单位纳米颗粒的AFM,并且指示相同的直径,尽管组合中MV-RNA的数量更高并且RNA转录物更长。图6D显示了经由CryoEM在溶液中观察到的16单位MV-RNA。
- [0046] 图7:单链纳米颗粒生物生成。包含多重端对端MV-RNA((1)、(2)和(3))和靶向适体的单链纳米颗粒导致在Dicer或Dicer样生物生成后的多重MV-RNA。
- [0047] 图8:TRI多个纳米颗粒。
- [0048] 图9:SEXA多个纳米颗粒。
- [0049] 图10:十二面体和更高的多个纳米颗粒。
- [0050] 图11:纳米颗粒转录物的大小比较。具有增加的多个的示例纳米颗粒的2%琼脂糖凝胶电泳:(1,2)环化的“UNI”,(3)线性的“TRI”,(4)环化的“TRI”,(5)线性的“SEXA”,(6)环化的“SEXA”,(7)线性的“NONA”,以及(8)环化的“NONA”。
- [0051] 图12:环化的自形成MV-RNA纳米颗粒的分离。(1)在转录过程中环化核酶的产物的所有转录,(2)下部级分,(3)上部级分,和(4-5)通过核酸外切酶消化抗性确认的环化的RNA纳米颗粒。
- [0052] 图13:环化转录物的示例RNA折叠,每个具有增加的多个。
- [0053] 图14:具有dsRBD信号的自形成~40nm MV-RNAi纳米颗粒。
- [0054] 图15:单个MV-RNA模块的概述(美国专利公开号2011/0159586和PCT公开号W02012/014155,其以引用的方式并入)。(A)、(B)、(C)对应于MV-RNA内的三条引导链。
- [0055] 图16:单链多核苷酸模块的Dicer生物生成。(A1)、(A2)、(B1)、(B2):Dicer切割位点。
- [0056] 图17:与长dsRNA相比,在生长多个中的每个多核苷酸纳米颗粒的Dicer生物生成时间过程。
- [0057] 图18: MV-RNA纳米颗粒的外壳蛋白包封。(1):外壳或衣壳蛋白。
- [0058] 图19:关于重复多个的转录取向。示出了如何可将单个MV-RNA序列重新定向用于在多核苷酸纳米颗粒中的重复表达,用于基于有效转录的RNA折叠。(1)MV-RNA序列内的个别MV-RNA引导链取向。(2)在转录物序列内的多个中的个别MV-RNA引导链取向。

[0059] 图20:西方玉米根虫中的体内活性。与H₂O对照相比,ISH染色显示摄取以两种不同浓度的本文提供的多核苷酸纳米颗粒后,西方玉米根虫中的靶基因的基因沉默效应。

[0060] 图21:图21A显示了与缺乏纳米颗粒的局部处理和未经处理的植物相比,在本文提供的PDS-1多核苷酸纳米颗粒的局部应用后九天,长芒苋(Palmer Amaranth)中的八氢番茄红素去饱和酶(Phytoene Desaturase)(PDS)靶基因的基因沉默效应。图21B显示了在对分生组织处理后七天对未经处理的叶的作用。图21C显示了关于经处理的叶的五天时间过程,显示一些细胞的光漂白。

[0061] 图22:与长dsRNA相比,均质化玉蜀黍组织中的多核苷酸纳米颗粒的核酸外切稳定性。

[0062] 图23:唾液中的核酸内切降解速率。电泳显示在1-30分钟时RNA的降解产物。将由长dsRNA产生的短降解产物与由本文提供的两种不同纳米颗粒产生的短降解产物进行比较,每种纳米颗粒具有增加的多个。

[0063] 图24:靶向害虫的纳米颗粒的植物内转录。纳米颗粒在植物中稳定表达。

[0064] 图25:显示了由6个重复MV-RNA相对于相同靶位点的单个MV-RNA组成的MV-RNA纳米结构的等摩尔效力益处的qRT-PCR图。

[0065] 图26:具有pH响应性连接的多核苷酸纳米颗粒。在pH 6-8下处于天然状态(左)以及在较低pH下处于扩展状态(右和(3))的pH响应性连接(1)和吻合环(2)。

具体实施方式

[0066] 如下文详细描述,已构建了一组新的自形成多核苷酸纳米颗粒,并且发现其出乎意料地有效降低一种或多种基因的靶基因表达。这些多核苷酸纳米颗粒具有用于各种用途的最佳特征,所述各种用途包括但不限于医药、生物除草剂和生物杀虫剂用途。像这样,本文提供了多核苷酸纳米颗粒、包含这些多核苷酸纳米颗粒的组合物和制剂、以及使用这些多核苷酸纳米颗粒的方法。

[0067] 本文公开的多核苷酸纳米颗粒提供了超过先前描述的RNAi技术的显著优点,包括优良的大小/摩尔浓度、大小/电荷和大小/核酸酶抗性比率,高触发剂摩尔浓度,简单的体内和体外生产,核酸酶抗性,同时调节多重基因表达的能力,以及跨越多重生物调节表达的能力。所公开的多核苷酸纳米颗粒也优于用于RNAi的传统dsRNA分子,因为它们基本上消除了与dsRNA分子相关的脱靶抑制,并且提供了用于转基因用途的自形成纳米颗粒。本文提供的多核苷酸纳米颗粒的设计允许纳米颗粒具有可编程的直径、细胞递送和摄取,以及通过核酸内切酶消化的精确触发剂释放。

[0068] 在某些实施例中,本文公开的多核苷酸纳米颗粒可用于同时调节多重基因或途径的表达。这些多重基因或途径都可与特定的表型或多种表型相关。在某些实施例中,本文公开的多核苷酸纳米颗粒可用于治疗与一种或多种基因的异常表达(即过表达或表达不足)或者一种或多种途径的异常活性相关的状况。例如,本文公开的多核苷酸纳米颗粒可通过调节与癌症相关的一种或多种基因的表达用于治疗癌症。

[0069] 本文提供的多核苷酸纳米颗粒可通过在纳米颗粒的表面附近是在纳米颗粒的核心处大约两倍频繁的RNA茎的一般比率而与现有技术分子区分。这种基础的大小/茎环比率导致了含有高摩尔浓度的活性触发剂的紧凑和核酸酶降解抗性纳米颗粒,而不使用化学品

来使RNA进一步紧凑。实际上,本发明的自形成纳米颗粒对于胞饮作用和/或内吞作用足够小(40-100纳米的范围),并且对于仅在转录之后直接的有效体内循环足够大(大于20纳米)(参见图11)。

[0070] 本文提供的多核苷酸纳米颗粒包含两个或更多个连接的MV-RNA,各自通过一个或多个核苷酸分开,从而在核酸内切酶生物生成之后导致至少一个生物活性MV-RNA分子。通过Dicer或Dicer样核酸酶切割从纳米颗粒取出的每个MV-RNA能够装载到下游沉默复合物(包括但不限于RNA诱导沉默复合物(RISC)和miRNA诱导沉默复合物(miRISC))内。取出的MV-RNA也可在下游免疫刺激事件中起作用。在单个纳米颗粒内的基因抑制和免疫刺激剂特征两者的可能性提供了在某些癌症中抑制关于免疫监视的拮抗剂的能力,同时刺激对该特定细胞的免疫应答。以这种方式,本文提供的多核苷酸纳米颗粒充当用于RNA干扰、miRNA干扰或免疫疗法的独特的单链和纯RNA纳米颗粒前体-其可含有高度可缩放的活性触发剂摩尔浓度。

[0071] 在某些实施例中,本文提供的多核苷酸纳米颗粒包含2、3、6、9、12、15、16、27个或超过27个分开的MV-RNA分子,所述MV-RNA分子通过连接核苷酸连接成单链自形成多核苷酸纳米颗粒。在其他实施例中,多核苷酸纳米颗粒由27个或更多个分开的MV-RNA分子组成,所述MV-RNA分子通过将分子连接成单链自形成多核苷酸纳米颗粒而连接。在某些实施例中,本文提供的多核苷酸纳米颗粒具有在图1-3的任何一个中所示的一般结构中的多个MV-RNA。在某些实施例中,单个多核苷酸纳米颗粒内的多个MV-RNA全都不同。在其他实施例中,单个多核苷酸纳米颗粒内的两个或更多个MV-RNA可为相同的。在这些实施例中,在多核苷酸纳米颗粒内重复的MV-RNA可处于相同或不同的取向。

[0072] 在某些实施例中,纳米颗粒中的第一MV-RNA通过含有多核苷酸纳米颗粒序列的5'和3'两者来闭合纳米颗粒。在更具体的实施例中,MV-RNA的第一引导链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且第二引导链部分和第三引导链部分代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端。在甚至更具体的实施例中,具有其连接环的MV-RNA的第一引导链和第二引导链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且仅第三引导链代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端。

[0073] 在某些实施例中,线性寡核苷酸的第一链代表多核苷酸纳米颗粒的5'末端,并且关于第一寡核苷酸的反向互补体代表多核苷酸纳米颗粒的3'末端,从而在两个线性寡核苷酸杂交后封闭MV-RNA的基团以形成茎。

[0074] 在其他实施例中,多核苷酸纳米颗粒不被互补序列封闭。这样的实施例依赖于反向平行二级结构的转录,以通过滚动单个MV-RNA(图3A)或堆叠的MV-RNA(图3B)的转录来产生球体。

[0075] 在另外其他实施例中,在由核酸内切酶切割连接核苷酸后,两个或更多个连接的MV-RNA分子作为分开的实体释放,其中分开的MV-RNA引导链是RNA诱导沉默复合物(RISC)的底物。在具体的实施例中,连接核苷酸由核酸内切酶的切割控制分开的MV-RNA序列对RNA诱导沉默复合物(RISC)的可接近性。在其他具体的实施例中,切割连接核苷酸提供其为RNA诱导沉默复合物(RISC)的底物的每条MV-RNA引导链的5'末端和3'末端。

[0076] 在另外其他实施例中,在由核酸内切酶切割连接核苷酸后,两个或更多个连接的MV-RNA分子作为分开的实体释放,其中分开的MV-RNA引导链是微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的底物。在具体的实施例中,连接核苷酸由核酸内切酶的切割控制分开的MV-RNA

序列对微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的可接近性。在其他具体的实施例中,切割连接核苷酸提供其为微RNA诱导沉默复合物(miRISC)的底物的每条MV-RNA引导链的5'末端和3'末端。

[0077] 两个或更多个MV-RNA分子可为相同或不同的,并且可例如选自含有适体、配体、连接核苷酸、环、ssRNA末端或其组合的MV-RNA分子。

[0078] 本文公开的多核苷酸纳米颗粒中的连接核苷酸可包含1、2、3或超过3个核苷酸。在某些实施例中,连接核苷酸是3-12个核苷酸并且形成茎环,所述茎环在特定的pH范围下变性或复性,从而引起多核苷酸纳米颗粒改变直径。

[0079] 在某些实施例中,本文提供的多核苷酸纳米颗粒在选自人、非人动物、植物、酵母、昆虫或细菌细胞的宿主细胞内表达,或者通过体外转录表达。

[0080] 在某些情况下,多核苷酸纳米颗粒决定了围绕本发明的外壳蛋白的直径(图18)。

[0081] 本文提供的多核苷酸纳米颗粒可包含在表面上表现的单个或多重RNA序列(适体、长dsRNA、ssRNA),从而允许来自单个RNA纳米颗粒的高摩尔细胞摄取和/或细胞特异性,而不损害一般RNAi活性。

[0082] 在其他具体的实施例中,分离的多核苷酸纳米颗粒靶向生物中除宿主的那些外的基因。可通过MV-RNA与靶基因的互补性和细胞摄取信号如适体、配体、连接核苷酸、环、长dsRNA、ssRNA末端或其组合来确定生物特异性。

[0083] 本文提供的多核苷酸纳米颗粒在用于转录的通常离子条件下,通过体内或体外表达,经由沃森-克里克碱基配对成~40、~80、~100或~130纳米的稳定二级结构而天然折叠(参见例如图6)。

[0084] 通过转基因表达产生的这种自形成单链纳米颗粒提供了在降解抗性、效力、Dicer生物生成特异性、触发剂摩尔浓度、内源基因调节机制的宿主相关竞争以及跨界(trans-kingdom)应用方面,超过基于线性dsRNA的RNAi方法的优点(参见例如图17、23、25)。

[0085] 与需要通过合成的化学修饰或脂质型包封用于稳定性和递送的其他RNAi纳米颗粒组合物方法相比,通过转录产生的这些单链多核苷酸纳米颗粒提供了更简单的方法和极大降低的成本。

[0086] 这种自形成纳米颗粒可与有机化合物、无机化合物、肽或衣壳蛋白组合,从而导致从农业到人治疗剂的广谱外源用途。

[0087] 本文在某些实施例中提供了涉及通过精确结构化的单一转录物的受控核酸内切酶介导的生物生成原位生产多重或重复MV-RNA的组合物和方法。还提供了精确结构化的转录物,其允许以特异性和选择性方式的转录物的受控生物生成。结构化纳米颗粒转录物的核酸内切酶生物生成可通过暴露RNAi分子的优选5'和3'末端来控制RNA诱导沉默复合物(RISC)的可接近性。因此,在某些实施例中,本公开内容提供了含有多重RNAi序列或MV-RNA前体序列的单链自形成多核苷酸纳米颗粒分子,其在原位核酸内切酶切割后,作为多重生物活性RNA分子释放,从而允许在相同基因内的多重位点处和/或在不同靶基因上的一个或多个位点处同时靶向抑制基因表达。这些实施例的非限制性例子显示于图7和16中。

[0088] 在某些实施例中,本文提供的分离的多核苷酸纳米颗粒包含自形成多核苷酸纳米颗粒。

[0089] 本文提供的多核苷酸纳米颗粒提供了许多重要的优点,包括核酸酶抗性、增强的

摩尔浓度、增强的范围、电荷分布、由单一转录物产生多重新型MV-RNA触发剂、用于摄取的最佳大小活性关系 (SAR), 并且允许小RNA分子在植物中表达 (尽管植物启动子的长转录物需求), 并且支持对于线性dsRNA不可能的酶促产生的分子。此外, 具有以下能力是有利的: 使前体分子稳定, 然后以受控方式使得以单或多价高摩尔形式的多个活性RNAi分子原位可获得。

[0090] 在某些实施例中, 本文提供的多核苷酸纳米颗粒通过经由启动子的植物内转录 (转基因) 产生, 或者在图1-3、8-10和18的任何一个中所示的一般结构中的体外转录之后, 局部应用于植物 (外源)。

[0091] 在某些实施例中, 本文提供的多核苷酸纳米颗粒以同界 (cis-kingdom) 或跨界的方式或者其在图1-3、8-10和18的任何一个中所示的一般结构内的任何组合, 靶向昆虫或病毒或真菌或宿主植物的基因。

[0092] 在另外其他具体的实施例中, 本文提供的多核苷酸纳米颗粒是通过可切割的核酶环化的单个多核苷酸纳米颗粒, 从而导致不含5'磷酸端或3'羟基端的纳米颗粒 (图5和13)。

[0093] RNAi分子的设计特征和生产技术是一般已知且已建立的。相应地, 根据本公开内容, 将理解如何产生如本文所述的含有通过连接核苷酸分开的多重MV-RNA前体序列的分离的多核苷酸纳米颗粒, 使得在核酸内切酶切割后, 所需多个生物活性RNAi分子从原始单个多核苷酸纳米颗粒转录物原位释放。

[0094] 如上所述, 在实施例中, 存在于本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒中的两个或更多个RNAi序列是MV-RNA前体。包含在本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒内的此类前体是单价、二价和/或多价的, 如例如在美国专利公开号2011/0159586和PCT公开号W02012/014155中描述的, 所述专利的内容整体以引用的方式并入本文。

[0095] 用于分离本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒中的MV-RNA序列的连接核苷酸或茎环连接元件一般包含 (i) 1、2、3个核苷酸, 或 (ii) 3-12个核苷酸的茎环 (实例1b)。

[0096] 包含在分离的多核苷酸纳米颗粒中的单独MV-RNA内的细胞特异性适体 (图1) 或长dsRNA元件 (图10) 可促成细胞特异性或细胞摄取。

[0097] 在进入靶细胞内之后, 从内体的逃出也可通过适体促进 (实例1a、2、3), 或者在内体老化期间由pH梯度引起纳米颗粒的物理变化 (实例1b.)。在某些实施例中, 当pH变得更酸性时, 本发明的纳米颗粒扩大内体内的直径 (参见例如图26)。在某些其他实施例中, 本发明的纳米颗粒改变构象, 因此促成它包封在其中的衣壳蛋白的内体膜破裂特征。

[0098] RNase III内切核糖核酸酶通常落入四个种类之一 (参见例如Lamontagne 2004)。I类RNase III在很大程度上在细菌和细菌噬菌体中发现, 并且包括具有经典核酸酶结构域和dsRNA结合结构域两者的所有细菌酶。示例性的I类RNase III内切核糖核酸酶包括来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的rnc。

[0099] II类酶通常通过N末端延伸的存在与I类酶区分开。II类内切核糖核酸酶的例子包括来自粟酒裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*) 的PacI和来自酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的Rnt1p。

[0100] III类酶通常具有两个核酸酶结构域, 并且包括植物和脊椎动物酶两者。III类酶的例子包括Drosha蛋白 (参见例如Filippov 2000)。Drosha酶通常负责起始微RNA (miRNA) 或由细胞天然表达的短RNA分子的加工, 所述短RNA分子通过与RISC复合物相互作用以诱导

互补mRNA的切割来调节广泛多样的其他基因。Drosha作为称为微处理器复合物的蛋白质复合物的部分存在,所述蛋白质复合物还含有双链RNA结合蛋白Pasha(也称为DGCR8;参见Denli 2004),其对于Drosha活性是必需的,并且能够结合正确加工所需的pri-miRNA的单链片段(Han 2006)。Drosha和Pasha两者均定位至细胞核,在该处发生pri-miRNA至pre-miRNA的加工。这后面一种分子然后在细胞质中被RNase DICER进一步加工为成熟miRNA。

[0101] IV类RNase III内切核糖核酸酶包括已知在RNA干扰(RNAi)中起作用的DICER和DICER样的酶家族。DICER是RNase III家族中的内切核糖核酸酶,其将双链RNA(dsRNA)和pre-microRNA(miRNA)切割成短双链RNA片段(Bernstein 2001)。这些短的双链RNA片段通常被称为小干扰RNA(siRNA),其通常长约20-25个核苷酸,并且通常在3'末端上含有两碱基突出端。DICER酶含有双重RNase III结构域/基序和一个PAZ结构域(关于PAZ结构域的结构,参见Song 2003),并且分子的这两个区域之间的距离由连接子螺旋的长度和角度决定,并且决定它产生的siRNA的长度(Macrae 2006)。DICER催化RNA干扰途径中的第一步,并且起始RISC的形成,所述RISC的催化组分argonaute是能够降解信使RNA(mRNA)的核酸内切酶,所述mRNA具有与siRNA引导链序列互补的序列,或靶基因序列(Jaronczyk 2005)。

[0102] 在另外其他具体的实施例中,多核苷酸纳米颗粒减慢核酸内切酶降解,包括IV类Dicer。

[0103] 在另外其他具体的实施例中,多核苷酸纳米颗粒包含天然或合成的RNA或DNA。

[0104] 在另外其他具体的实施例中,多核苷酸纳米颗粒包含天然或合成的RNA或DNA、2'修饰的、锁定的或未锁定的核苷酸。

[0105] 根据本发明的另一个方面,多核苷酸纳米颗粒提供了组合物,所述组合物包含与生理上可接受的赋形剂组合、如本文任何实施例中所述的一种或多种分离的多核苷酸纳米颗粒。

[0106] 根据本发明的另外一个方面,多核苷酸纳米颗粒提供了用于用单个靶摄取细胞事件递送相同或不同的两个或更多个MV-RNA分子的方法,所述靶摄取细胞事件包括使靶细胞与本文所述的分离的多核苷酸纳米颗粒或组合物接触。

[0107] 根据本发明的再另外一个方面,如本文任何实施例中所述,通过增加每个MV-RNA的端对端多个或通过堆叠的MV-RNA的端对端排列(通过与3'的5'互补性来闭合或不闭合),比率或表面与核心茎与纳米颗粒的直径成比例地扩大。

[0108] 本发明的多核苷酸纳米颗粒可包含天然或合成的RNA或DNA、或肽核酸、或这些类型分子中的任何或全部的组合。另外,多核苷酸纳米颗粒可包含经修饰的核酸、或者核酸的衍生物或类似物。

[0109] 在优选实施例中,本发明的多核苷酸纳米颗粒由天然存在的RNA、DNA、2'氟RNA、2'-OMe RNA类似物或与转录相容的其他核苷酸部分组成。

[0110] 在本发明的上下文中,术语分离的指至少部分地不含在材料的天然状态下通常伴随材料的组分材料。分离意味着与原始源或环境的分开程度。如本文使用的,例如与DNA相关的分离指基本上远离其他编码序列的多核苷酸纳米颗粒,并且纳米颗粒不包含大部分无关RNA或DNA,例如大的染色体片段或其他功能基因或多肽编码区。当然,这指如最初分离的DNA分子,并且不排除后来通过人工加入区段的基因或编码区。

[0111] 可对本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒进行的核酸修饰的例子包括但不限于生

物素标记、荧光标记、将伯胺引入多核苷酸纳米颗粒内的氨基修饰剂、磷酸基、脱氧尿苷、卤代核苷、硫代磷酸酯、2'-OMe RNA类似物、嵌合RNA类似物、摆动基团和脱氧肌苷。

[0112] 如本文使用的,术语“类似物”指保留与本文中的多核苷酸纳米颗粒相同的结构和/或功能(例如与靶结合)的分子、化合物或组合物。类似物的例子包括拟肽、肽核酸以及小的和大的有机或无机化合物。

[0113] 如本文使用的,术语“衍生物”或“变体”指通过一个或多个核酸缺失、添加、取代或侧链修饰而与天然存在的序列(例如靶基因序列)不同的序列。在某些实施例中,变体与靶基因序列的区域具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。因此,例如,在某些实施例中,本发明的纳米颗粒可包括与靶基因序列的变体互补的区域。

[0114] 关于靶向序列,本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒一般含有与靶基因或多核苷酸纳米颗粒序列(或其变体)的一个或多个区域互补,并且更优选完全互补的序列区域。在某些实施例中,与靶基因(或mRNA)互补的序列区的选择基于所选靶序列的分析以及二级结构、 T_m 、结合能和相对稳定性的确定。这样的序列可基于其相对无形成二聚体、发夹或者降低或阻止宿主细胞中与靶mRNA的特异性结合的其他二级结构的能力来选择。mRNA的高度优选的靶区域包括在AUG翻译起始密码子处或AUG翻译起始密码子附近的那些区域,以及与mRNA的5'区域基本上互补的那些序列,与mRNA的编码区基本上互补的序列,或与mRNA的3'区域基本上互补的那些序列。这些二级结构分析和靶位点选择考虑可例如使用OLIGO引物分析软件的v.4和/或BLASTN 2.0.5算法软件(Altschul等人,Nucleic Acids Res.1997,25(17):3389-402)或Oligoengine Workstation 2.0来执行。

[0115] 在一个实施例中,靶位点优先不位于5'和3'非翻译区(UTR)或者接近起始密码子(在约75个碱基内)的区域内,因为结合调节区的蛋白质可干扰多核苷酸纳米颗粒的结合。另外,可将潜在的靶位点与适当的基因组数据库比较,如在www.ncbi.nlm处的NCBI服务器上可用的BLASTN 2.0.5,并且消除与其他编码序列具有显著同源性的潜在靶序列。

[0116] 在另一个实施例中,靶位点位于5'或3'非翻译区(UTR)内。另外,自形成多核苷酸纳米颗粒的自互补可由在靶的mRNA中发现的特定序列组成。

[0117] 在另外一个实施例中,一个或多个靶位点位于非编码基因或外源引入的RNA上。

[0118] 在另一个实施例中,与靶位点的互补性含有在引导链的3'末端处与靶的优选错配或摆动。在这样的实施例中,可控制来自扩增过程的次级RNAi触发剂的产生。

[0119] 在另一个实施例中,环区可设计为与在自形成多核苷酸纳米颗粒的靶基因或二级靶基因的5'或3'非翻译区(UTR)中发现的确定环区形成吻合环相互作用。

[0120] 靶基因或mRNA可来自任何物种的生物,包括例如植物、动物(例如哺乳动物)、原生动物、病毒、细菌或真菌。

[0121] 如上所述,多核苷酸纳米颗粒的靶基因序列和互补区可为彼此的完全互补体,或者它们可小于完全互补,即部分互补,只要这些链在生理条件下彼此杂交。

[0122] 调节基因表达的方法

[0123] 靶基因可为已知的基因靶,或可替代地,靶基因可为未知的,即可使用随机序列。在某些实施例中,一种或多种,优选两种或更多种靶mRNA的靶mRNA水平降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0124] 在本发明的一个实施例中,靶基因表达(即mRNA表达)的抑制水平为至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或几乎100%,并且因此细胞或生物实际上将具有与基因的所谓“敲低”等同的表型。然而,在一些实施例中,可能优选仅实现部分抑制,使得表型与基因的所谓“敲低”等同。敲低基因表达的这种方法可用于治疗或用于研究(例如,生成疾病状态的模型,检查基因的功能,评价药剂是否作用于基因,验证用于药物开发的靶)。

[0125] 本发明进一步提供了本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒的阵列,包括微阵列。微阵列是尺寸通常在微米至毫米范围内的微型装置,用于执行化学和生物化学反应,并且特别适合于本发明的实施例。可使用半导体工业和/或生物化学工业中已知和可用的基本上任何和所有技术,经由微电子和/或微制造来构建阵列,条件仅是这些技术顺应多核苷酸纳米颗粒序列的设置和/或筛选,并且与多核苷酸纳米颗粒序列的设置和/或筛选相容。

[0126] 本发明的微阵列对于多重自形成多核苷酸纳米颗粒的高流通量分析是特别期望的。微阵列通常用包含本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒的离散区域或斑点构建,每个斑点包含一个或多个自形成多核苷酸纳米颗粒,优选在阵列表面上的可寻址位置处。本发明的阵列可通过本领域可用的任何方法来制备。例如,通过将固相光化学合成与光刻制造技术组合,由Affymetrix开发的光引导化学合成工艺(参见美国专利号5,445,934和5,856,174)可用于在芯片表面上合成生物分子。由Incyte Pharmaceutical开发的化学沉积方法使用预合成的cDNA探针用于在芯片表面上的定向沉积(参见例如美国专利号5,874,554)。

[0127] 在某些实施例中,使用本领域可广泛获得的技术,将本发明的多核苷酸纳米颗粒合成为自形成多核苷酸纳米颗粒。在其他实施例中,使用适当且广泛已知的技术在体外或体内表达。相应地,在某些实施例中,本发明包括包含本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒的序列的体外和体内表达载体或序列。本领域技术人员众所周知的方法可用于构建含有编码自形成多核苷酸纳米颗粒的序列以及适当的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。这样的技术例如在Sambrook, J. 等人(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. 和Ausubel, F.M. 等人(1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York, N.Y. 中描述。

[0128] 表达载体通常包括调节自形成多核苷酸纳米颗粒的表达的调节序列。存在于表达载体中的调节序列包括载体的那些非翻译区,例如增强子、启动子、5'和3'非翻译区,其与宿主细胞蛋白相互作用以进行转录和翻译。这些元件在其强度和特异性方面可不同。取决于所利用的载体系统和细胞,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。另外,也可使用组织或细胞特异性启动子。

[0129] 为了在哺乳动物细胞中表达,来自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子一般是优选的。另外,许多基于病毒的表达系统是一般可用的。例如,在其中腺病毒用作表达载体的情况下,可将编码目的多肽的序列连接到由晚期启动子和三联前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合物内。在病毒基因组的非必需E1或E3区中的插入可用于获得能够在受感染的宿主细胞中表达多肽的活病毒(Logan 1984)。另外,转录增强子如劳斯肉瘤病毒(RSV)增强子可用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0130] 在某些实施例中,本发明提供了自形成多核苷酸纳米颗粒的条件表达。各种条件表达系统是本领域中已知的并且可用于细胞和动物两者中,并且本发明考虑使用任何这样

的条件表达系统来调节自形成多核苷酸纳米颗粒的表达或活性。在本发明的一个实施例中,例如,使用REV-TET系统实现诱导型表达。该系统的组分和使用该系统来控制基因表达的方法在文献中得到充分记录,并且表达四环素控制的反式激活因子(tTA)或反向tTA(rtTA)的载体是商购可得的(例如pTet-Off、pTet-On和ptTA-2/3/4载体,Clontech, Palo Alto, CA)。例如在美国专利号5,650,298、6,271,348、5,922,927和相关专利中描述了这样的系统,所述专利整体以引用的方式并入本文。

[0131] 在一个特定的实施例中,使用载体系统来表达多核苷酸纳米颗粒,所述载体系统包含pSUPER载体主链和对应于待表达的自形成多核苷酸纳米颗粒的另外序列。pSUPER载体系统已显示可用于表达siRNA试剂和下调基因表达(Brummelkamp 2002a, Brummelkamp 2002b)。pSUPER载体从OligoEngine, Seattle, WA商购可得。

[0132] 本发明的多核苷酸纳米颗粒可用于各种目的,所有这些一般都与其抑制或降低靶基因表达的能力有关。相应地,本发明提供了减少一种或多种靶基因表达的方法,所述方法包括将本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒引入含有靶基因或其同源物、变体或直向同源物的细胞内。另外,自形成多核苷酸纳米颗粒可用于间接地减少表达。例如,自形成多核苷酸纳米颗粒可用于减少驱动第二基因表达的反式激活因子的表达,由此减少第二基因的表达。类似地,自形成多核苷酸纳米颗粒可用于间接地增加表达。例如,自形成多核苷酸纳米颗粒可用于减少抑制第二基因表达的转录阻遏物的表达,由此增加第二基因的表达。

[0133] 在各种实施例中,靶基因是来源于将导入自形成多核苷酸纳米颗粒的细胞的基因、内源基因、外源基因、转基因或存在于其转染后的细胞中的病原体的基因。取决于特定的靶基因和递送到细胞中的自形成多核苷酸纳米颗粒的量,本发明的方法可引起靶基因表达的部分或完全抑制。含有靶基因的细胞可来源于或包含在任何生物(例如植物、动物、原生动物、病毒、细菌或真菌)中。

[0134] 靶基因表达的抑制可通过包括但不限于以下的手段加以验证:使用本发明领域的技术人员已知的技术,观察或检测由靶基因编码的蛋白质水平、和/或来自靶基因的mRNA产物、和/或与基因表达相关的表型的不存在或可观察的降低。

[0135] 可检查以确定由引入本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒引起的效应的细胞特征的例子包括细胞生长、细胞凋亡、细胞周期特征、细胞分化和形态学。

[0136] 自形成多核苷酸纳米颗粒可直接引入细胞(即细胞内),或细胞外引入腔内、细胞间隙、生物循环内,经口引入,通过表达宿主的摄入,通过在含有自形成多核苷酸纳米颗粒的溶液中浸浴生物,或通过足以将自形成多核苷酸纳米颗粒递送到细胞内的一些其他手段。

[0137] 另外,可将经工程改造以表达自形成多核苷酸纳米颗粒的载体引入细胞内,其中所述载体表达自形成多核苷酸纳米颗粒,由此将其引入细胞内。将表达载体转移到细胞内的方法是本领域广泛已知并且可用的,包括例如转染、脂质转染、刮擦装载、电穿孔、显微注射、感染、基因枪和反转录转座。一般地,基于载体的类型和细胞的类型以及本领域广泛可用的教导,将载体引入细胞内的合适方法通过本领域技术人员容易地确定。感染剂可通过本领域容易获得的各种手段引入,包括例如鼻吸入。

[0138] 使用本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒抑制基因表达的方法可与其他敲低和敲除方法(例如基因靶向、反义RNA、核酶、双链RNA(例如shRNA和siRNA))组合,以进一步减少

靶基因的表达。

[0139] 在不同的实施例中,本发明的靶细胞是原代细胞、细胞系、永生化细胞或转化细胞。靶细胞可为体细胞或生殖细胞。靶细胞可为非分裂细胞,例如神经元,或者它可能能够在合适的细胞培养条件下在体外增殖。靶细胞可为正常细胞,或它们可为患病细胞,包括含有已知基因突变的那些细胞。本发明的真核靶细胞包括哺乳动物细胞,例如人细胞、鼠细胞、啮齿类动物细胞和灵长类动物细胞。在一个实施例中,本发明的靶细胞是干细胞,其包括例如胚胎干细胞,例如鼠胚胎干细胞。

[0140] 本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒和方法可用于调节植物中的基因,例如通过提供用于全身性或非全身性基因调节的RNA。

[0141] 本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒和方法可用于调节植物害虫或病原体的内源基因。

[0142] 本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒和方法可用于治疗广泛多样的疾病或病症中的任一种,包括但不限于炎症性疾病、心血管疾病、神经系统疾病、肿瘤、脱髓鞘疾病、消化系统疾病、内分泌系统疾病、生殖系统疾病、血液和淋巴系统疾病、免疫性疾病、精神障碍、肌肉骨骼疾病、神经性疾病、神经肌肉疾病、代谢疾病、性传播疾病、皮肤和结缔组织疾病、泌尿系疾病和感染。

[0143] 在某些实施例中,该方法对动物,在特定实施例中对哺乳动物,以及在某些实施例中对人进行实践。

[0144] 相应地,在一个实施例中,本发明包括使用自形成多核苷酸纳米颗粒用于治疗或预防与基因失调、过表达或突变相关的疾病的方法。例如,可将自形成多核苷酸纳米颗粒引入癌细胞或肿瘤内,并且由此抑制致癌/致瘤表型的维持所需或与致癌/致瘤表型的维持相关的基因的表达。为了预防疾病或其他病理状况,可选择例如对于疾病/病理状况的引发或维持所需的靶基因。治疗可包括与疾病相关的任何症状或与病理状况相关的临床适应症改善。

[0145] 另外,本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒用于治疗与基因突变相关的疾病或病症。在一个实施例中,自形成多核苷酸纳米颗粒用于调节突变的基因或等位基因的表达。在这样的实施例中,突变的基因是自形成多核苷酸纳米颗粒的靶,其将包含与突变的基因的区域互补的区域。该区域可包括突变,但它不是必需的,因为该基因的另一个区域也可被靶向,从而导致突变型基因或mRNA的表达降低。在某些实施例中,该区域包含突变,并且在相关实施例中,所得到的自形成多核苷酸纳米颗粒特异性抑制突变型mRNA或基因、而不是野生型mRNA或基因的表达。这种自形成多核苷酸纳米颗粒在例如其中一个等位基因突变而另一个不突变的情况下特别有用。然而,在其他实施例中,该序列不一定包含突变并且因此可仅包含野生型序列。这种自形成多核苷酸纳米颗粒在例如其中所有等位基因都突变的情况下特别有用。本领域已知各种疾病和病症与基因突变相关或由基因突变引起,并且本发明涵盖用自形成多核苷酸纳米颗粒治疗任何此类疾病或病症。

[0146] 在某些实施例中,病原体的基因被靶向用于抑制。例如,该基因可直接引起宿主的免疫抑制,或者对于病原体的复制、病原体的传播或感染的维持是必需的。另外,靶基因可为病原体基因或宿主基因,其负责病原体进入其宿主内、通过病原体或宿主的药物代谢、病原体基因组的复制或整合、宿主中感染的建立或传播、或下一代病原体的组装。本发明中包

括预防(即,预防或降低感染风险)以及降低与感染相关症状的频率或严重程度的方法。例如,通过引入根据本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒,可靶向处于被病原体感染的风险中的细胞或已经受感染特别是人免疫缺陷病毒(HIV)感染的细胞用于治疗。

[0147] 在其他具体实施例中,本发明用于治疗或开发用于任何类型的癌症的治疗。可使用本文描述的方法治疗的肿瘤的例子包括但不限于神经母细胞瘤、骨髓瘤、前列腺癌、小细胞肺癌、结肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、脑肿瘤、乳腺癌、白血病、淋巴瘤及其他。

[0148] 自形成多核苷酸纳米颗粒和表达载体(包括病毒载体和病毒)可在体外或离体引入细胞内,然后置于动物内以影响治疗,或者它们可通过体内施用直接引入患者。因此,在某些实施例中,本发明提供了基因治疗的方法。本发明的组合物可以许多方法中的任一种施用于患者,所述方法包括肠胃外、静脉内、全身、局部、经口、瘤内、肌内、皮下、腹膜内、吸入、或任何这样的递送方法。在一个实施例中,组合物肠胃外,即关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用。在一个具体实施例中,脂质体组合物通过静脉内输注或通过弹丸注射腹膜内施用。

[0149] 本发明的组合物可配制为适合于递送至受试者的药物组合物。本发明的药物组合物经常还包含一种或多种缓冲液(例如中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖、右旋糖或右旋糖酐)、甘露醇、蛋白质、多肽或氨基酸例如甘氨酸、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂例如EDTA或谷胱甘肽、佐剂(例如氢氧化铝)、溶质(其致使制剂与接受者的血液等渗、低渗或弱高渗)、悬浮剂,增稠剂和/或防腐剂。可替代地,本发明的组合物可配制为冻干产物。

[0150] 施用于患者的自形成多核苷酸纳米颗粒的量可由医生基于各种因素容易地确定,所述因素包括例如疾病以及从使用的载体表达的自形成多核苷酸纳米颗粒的水平(在其中施用载体的情况下)。施用的量/剂通常选择为在最小治疗剂量以上但在毒性剂量以下。量/剂的选择将取决于许多因素,例如患者的医疗史、其他疗法的使用以及疾病的性质。另外,根据患者对治疗的应答和任何治疗相关副作用的存在或严重程度,可在治疗始终调整施用的量。

[0151] 本发明还包括鉴定生物中的基因功能的方法,所述方法包括使用自形成多核苷酸纳米颗粒来抑制先前未知功能的靶基因的活性。代替传统基因筛选的耗时和费力分离突变体,功能基因组学设想了通过采用本发明减少靶基因活性的量和/或改变靶基因活性的时机来确定未表征基因的功能。本发明可用于确定药剂学的潜在靶,了解与发育相关的正常和病理事件,确定负责出生后发育/衰老的信号传导途径等等。从基因组和表达的基因源(包括酵母、黑腹果蝇(*D.melanogaster*)和秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)基因组的总序列)获取核苷酸序列信息的速度增加可与本发明结合,以确定生物(例如线虫)中的基因功能。不同生物使用特定密码子的优先选择、在序列数据库中搜索相关基因产物、将遗传性状的连锁图与核苷酸序列由其衍生的身体图相关联、以及人工智能方法可用于限定来自在这样的测序项目中获取的核苷酸序列的假定开放读码框。

[0152] 在一个实施例中,基于可从表达的序列标签(EST)获得的部分序列,自形成多核苷酸纳米颗粒用于抑制基因表达,例如以便确定基因的功能或生物学活性。生长、发育、代谢、疾病抗性或其他生物过程中的功能改变将指示EST基因产物的正常作用。

[0153] 可将自形成多核苷酸纳米颗粒引入含有靶基因的完整细胞/生物体的容易性允许将

本发明用于高通量筛选 (HTS) 中。例如, 含有能够抑制不同被表达基因的自形成多核苷酸纳米颗粒的溶液可作为有序阵列放置在位于微量滴定板上的个别孔内, 并且可测定每个孔中的完整细胞/生物由于抑制靶基因活性在行为或发育中的任何改变或修饰。当基因活性受到抑制时, 靶基因的功能可从它对细胞/生物具有的作用来测定。在一个实施例中, 本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒用于化学基因组学筛选, 即, 测试化合物逆转由使用本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒减少基因表达建模的疾病的能力。

[0154] 如果生物的特征通过RFLP或QTL分析确定为与多态性遗传连锁, 则本发明可用于了解该遗传多态性是否可直接负责该特征。例如, 可扩增限定遗传多态性或这种遗传多态性附近的序列的片段以产生RNA, 可将自形成多核苷酸纳米颗粒引入生物中, 并且可确定特征中的改变是否与抑制相关联。

[0155] 本发明还可用于允许抑制必需基因。这些基因仅在发育的特定阶段或细胞区室处可能是细胞或生物活力所需的。条件突变的功能等价物可通过在它并非活力所需的时候或地方抑制靶基因的活性来产生。本发明允许在生物的特定发育时间和位置处加入自形成多核苷酸纳米颗粒, 而无需将永久性突变引入靶基因组内。类似地, 本发明考虑使用仅在需要时才表达自形成多核苷酸纳米颗粒的诱导型或条件型载体。

[0156] 本发明还涉及验证基因产物是否是用于药物发现或开发的靶的方法。将靶向对应于用于降解的基因的mRNA的自形成多核苷酸纳米颗粒引入细胞或生物内。在其中发生mRNA降解的条件下维持细胞或生物, 从而导致基因表达降低。确定基因的表达降低是否对细胞或生物具有作用。如果该基因的表达降低具有作用, 则该基因产物是用于药物发现或开发的靶。

[0157] 设计和生产自形成多核苷酸纳米颗粒的方法

[0158] 本发明的自形成多核苷酸纳米颗粒包含作为MV-RNA的一组新型和独特的功能序列, 其以端对端的方式排列, 以便在转录期间一般采用球状二级结构, 这赋予了多核苷酸纳米颗粒的优点。相应地, 在某些实施例中, 本发明包括设计本发明的多核苷酸的方法。这样的方法通常涉及包含在多核苷酸纳米颗粒内的各种MV-RNA组分的适当取向。

[0159] 在产生本发明的分离的多核苷酸纳米颗粒的一个举例说明性例子中, 然后使用将具有“连接”(I)的“分子”交错到单一分离的寡核苷酸序列内的5'至3'模式(所述单一分离的寡核苷酸序列任选以下文部分“IV”中所述的方式闭合), 将下文部分“III”中所示形式的个别MV-RNA分子序列邻接到两个或更多个MV-RNA分子的链中。以这种方式生产的MV-RNA纳米颗粒的非限制性例子显示于图4和6中。

[0160] 所得到的寡核苷酸使用给定重复(多个)MV-RNA的线性或环状模式来构建。任选地, 通过将(IV)的分离的寡核苷酸序列插入(V)的反向核酶序列(a)和(b)之间可产生完全环化的(缺乏5'磷酸)形式。

[0161] 纳米颗粒组装的特征是:

[0162] I. 举例说明性连接特征:

[0163] 用于在真核生物和原核生物中表达的用于本发明的分离的多核苷酸中的连接特征在下文举例说明性地阐述:

[0164] a. 单一连接: <单核苷酸>

[0165] b. 双重连接: <二核苷酸>

- [0166] c.pH-连接:<pH-连接>
- [0167] II. 举例说明性MV-RNA环特征:
- [0168] 用于在真核生物和原核生物中表达的用于本发明的分离的多核苷酸中的MV-RNA内的环特征在下文举例说明性地阐述:
- [0169] a.dicer1:<5-12nt环>
- [0170] b.rnt1:<13nt茎、四环>
- [0171] c.适体:<适体>
- [0172] III. 举例说明性MV-RNA分子特征:
- [0173] 用于本发明的分离的多核苷酸中的特征在下文举例说明性地阐述:
- [0174] a.靶向MV-RNA I:<初级引导><环><次级引导><适体><关键引导>
- [0175] b.靶向MV-RNA II:<初级引导><适体><次级引导><环><关键引导>
- [0176] c.靶向MV-RNA III:<初级引导><适体><次级引导><适体><关键引导>
- [0177] d.非靶向MV-RNA II:<初级引导><环><次级引导><环><关键引导>
- [0178] IV. 举例说明性纳米颗粒开放/闭合特征:
- [0179] 用于闭合本发明的分离的多核苷酸的5'至3'末端的特征通过限定“开放序列”和“闭合序列”在下文举例说明性地阐述:
- [0180] a.开放MV-RNA片段:<初级引导><环><次级引导>
- [0181] b.闭合MV-RNA片段:<关键引导>
- [0182] c.开放MV-RNA片段II:<初级引导>
- [0183] d.闭合MV-RNA片段II:<次级引导><环><关键引导>
- [0184] e.开放RNA片段:<ssRNA 1-400nt>
- [0185] f.闭合RNA片段:<与上文“c”部分至完全互补的ssRNA 1-400nt>
- [0186] V. 将MV-RNA分子连接到纳米颗粒形式内的举例说明性设计:
- [0187] a.5'至3'一般模式:对于线性,重复<RNAi分子1><连接><RNAi分子2><连接>……。对于环状,重复<开放序列><RNAi分子1><连接><RNAi分子2><连接>……,<闭合序列>
- [0188] b.堆叠的MV-RNA纳米颗粒的例外(图3B):堆叠MV-RNA分子具有独特的模式,以确保结构化转录物的完整性并且产生较高的表面/核心茎比。一般而言,在P链突出端之后和在S链之前,将另外的MV-RNA序列插入先前的MV-RNA的环内,并且在S链突出端之后和在K链之前,插入另外的MV-RNA。重复<MV-RNA_1初级链><2nt OH><MV-RNA_2><2nt OH><MV-RNA_1次级链><2nt OH><MV-RNA_3><2nt OH><MV-RNA_1关键链><连接>……。当连接相同序列的多个版本时,可在交错RNAi分子时转换(P、S、K或S、K、P或K、P、S)的序列取向。这将帮助在转录期间的最近邻沃森-克里克相互作用超过可导致交替结构的分子内键。
- [0189] V. 多核苷酸纳米颗粒的基于核酶的环化:
- [0190] 通过使用本领域中描述的方法(Perriman 1998),可原位环化RNA转录物作为转录反应的部分。对于5'磷酸的去除以及纳米颗粒的完全环化,将使用上文基序设计的纳米颗粒序列插入在下文的“Cir_5”和“Cir_3”序列之间,以限定整个转录物:
- [0191] a.Cir_5:
- [0192] GAAAATTTCTGCTGGATTAGTTACTTATCGTGTAAAATCTGATAAATGGAATTGGTTCTACATAAATGCCTAACGAC

TATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGAAACGATAGACAACCTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACATGCAGCTGGATATAATCCGGGGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACATAATGCTA (SEQ ID NO:1)

[0193] b.Cir_3:

[0194]

CAGGTCAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAACTCTATCTAAACGGGGAACCTCTCTAGTAGACAATCCCCTGCTAAATTGTAGGACTGCCCTTTAATAAATACTTCTATATTTAAAGAGGTATTTATGAAAAGCGGAATTTATCAGATTAATAAATACTTTCT (SEQ ID NO:2)

[0195] IV. 验证连接RNAi分子:

[0196] 一旦使用上述模式之一设计全序列,在计算机程序如共折叠(cofold)、Vienna RNAfold、mFold或专门的Multivalent RNAi Cloud中折叠RNA计算地验证二级结构的完整性。所得到的折叠符号或记号(art)将游离的核苷酸指示为“.”,并且将结合的核苷酸指示为“(“或”)”。相对自由能和熔融温度也将给出关于精确转录物的稳定性的指示。可查看代表精确结构化转录物的所得到的记号。

[0197] 本文还提供了计算机程序,以及包含这些程序的计算机可读介质和计算机,以及其基于本文所述的互补性特征来选择纳米颗粒的MV-RNA序列的用途。在某些实施例中,用户向计算机提供关于靶基因的序列、位置或名称的信息。计算机在本发明的程序中使用该输入来鉴定以MV-RNA形式靶向的靶基因的一个或多个适当区域,并且输出或提供互补序列用于组装本发明的多核苷酸纳米颗粒。通常,程序将选择不与基因组序列包括靶基因或与靶基因互补的多核苷酸纳米颗粒的区域互补的一系列序列。需要时,程序还提供间隙区域的序列、折叠符号和折叠记号。在选择适当的MV-RNA取向、多个、适体、环、连接、开放/闭合序列、克隆位点和必需的转录元件之后,计算机程序向用户输出或提供该信息。

[0198] 本发明的程序还可使用关于含有靶基因的生物的基因组序列(例如公共或私人数据库)的输入,以及预测特定序列的二级结构和/或杂交特征的另外程序,以便确保多核苷酸纳米颗粒采用正确的二级结构(即,mFold、RNAfold、共折叠),并且不与非靶基因杂交(BLASTn)。

[0199] 本发明的实践将采用在本领域技术范围内的细胞生物学、分子生物学、微生物学和重组DNA的各种常规技术。这些技术在文献中充分描述。参见例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第2版,由Sambrook、Fritsch和Maniatis编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989);以及DNA Cloning,卷I和II(D.M.Glover, IRL Press,1985)。

[0200] 提供下述实例以更好地举例说明本发明,并且下述实例不被解释为限制本发明的范围。就提及具体材料的程度,这仅用于举例说明的目的,而不预期限制本发明。本领域技术人员可开发等价手段或反应物,而不需要发明能力的训练并且不偏离本发明的范围。应理解,可在本文描述的程序中做出许多变化,同时仍然保留在本发明的范围内。本发明人的意图是这样的变化被包括在本发明的范围内。

[0201] 实例1:用于治疗人前列腺癌的自形成单链多核苷酸MV-RNA纳米颗粒

[0202] 该实例描述了根据本发明的纳米颗粒序列的组装,所述纳米颗粒序列靶向促成人去势抗性前列腺癌的多重基因。每个纳米颗粒利用关于细胞特异性摄取的PSMA靶向适体序列和关于内体运动的网格蛋白-小窝内吞适体序列。整个纳米颗粒递送多重活性MV-RNA

RNAi触发剂/内吞作用,并且可通过增加纳米颗粒多核苷酸内的多个MV-RNA扩大。两个多基因途径通过这个例子靶向:(1)人AKT (SEQ ID NO:89)、人MAP3K (SEQ ID NO:90;NM_005921) 和人PLK1 (SEQ ID NO:91;NM_005030);和(2)人雄激素受体 (SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93 (变体转录物))/cMET (SEQ ID NO:94;X54559)。每个靶组可代表在广谱的靶向MV-RNA或重复多个中的本发明的纳米颗粒的部分或全部,以增加高度有效的MV-RNA触发剂的摩尔浓度。

[0203] 选择的MV-RNA含有各种Dicer环和靶向适体序列,其在挑选靶位点时被分配。这样的环在下文每个MV-RNA序列中以粗体显示。这些环序列可容易地四处移动,同时组装纳米颗粒序列以任何优选方式分布靶向适体。每个MV-RNA还含有3'“UU”突出端,其可变成“AG”,以便较不易受ssRNA核酸内切酶的影响,或者变成“AC”、“GC”、“AU”或“GU”,以便增加在突出端的第二个核苷酸后的ssRNA核酸内切酶切割的概率。

[0204] 在所选择的MV-RNA中的环:

[0205] 环Dicer 1:UCAAGAAAC (SEQ ID NO:3)

[0206] 环Dicer 2:GGAUCUUAUU (SEQ ID NO:4)

[0207] 环Dicer 3:UUCAUAGAGA (SEQ ID NO:5)

[0208] 环PSMA:

[0209]

GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGA (SEQ ID NO:6)

[0210] 环网格蛋白-小窝:UUCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAU (SEQ ID NO:7)

[0211] 下文阐述了两种途径各自的所选实例MV-RNA。“项目#”指来自Multivalent RNAi Cloud软件应用的项目编号。每个MV-RNA序列被指定三数字序列,从而指示在靶链上的每条引导链的结合位点。

[0212] AR(目的初级途径):

[0213] 雄激素受体/cMET,项目#P00900:

[0214] MV-RNA 1269/2030/2896:

[0215]

CGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUGGGAUCUUAUUCAAGGUGCAGC
UCUCAUUUCCUUGGGAUCUUAUUAAGGAAGUGAGAACUUCUCGGCG

[0216] (SEQ ID NO:8,环Dicer 2为粗体)

[0217] MV-RNA 5124/3363/4456:

[0218]

CACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCUUAUUUUCGUCCACAU
CGAGCACUUUAUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCA
CUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAUAAGGUGC
UUGUGGCUUCAGUG (SEQ ID NO:9,环Dicer 2为粗体,环PSMA加下划线)

[0219] MV-RNA7276/4095/6235:

[0220]

CCUUUCUCAGAGUAAGGGAGAAGGAUCUUAUUUUCUCCCUUGC
AACAAAGUAAGACGGAUCUUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGU
U (SEQ ID NO:10,环Dicer 2为粗体)

[0221] 雄激素受体V.1-2,项目#P00901:

[0222] MV-RNA 2854/1186/9722:

[0223]

CAGCUUCCACAUGUGAGAGAGCUC**CAAGAAACGCUCUCUCGCAA**
UAGGCUGCUUGUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGU
AGCUUAUGUGGGAGCUG (SEQ ID NO:11,环Dicer 1为粗体,环网格蛋白-小窝加
下划线)

[0224] MV-RNA 298/585/1473:

[0225]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUC**UCAAGAAACGAUGGGCUGACA**
UUCAUAGCCGU**UCAAGAAACGC**GGCUGUGAAGGUUGCUUUUG (SEQ
ID NO:12,环Dicer 1为粗体)

[0226] Hs雄激素受体,项目#P00963:

[0227] MV-RNA 6820/7230/9832:

[0228]

GUGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUC**UCAAGAAACGAACCACCAG**
AGAAACAGUGUAGUUGAC**UCAAGAAACGUC**AAUUAUUGGCUAG
AACAUAC (SEQ ID NO:13,环Dicer 1为粗体)

[0229] 开放/闭合MV-RNA

[0230] MV-RNA 3900/3304:

[0231]

GGGAAAUAGGGUUUCCAUGCUUUGC**UCAAGAAACGCAAAGU**
AUUGGAGCCACACCAACCAG**UCAAGAAACCU**GGUUGGUGUGGAACC
CUAUUUCCC (SEQ ID NO:14,环Dicer 1为粗体)

[0232] 雄激素受体/cMetII,项目#P00962

[0233] MV-RNA 392/2356/375:

[0234]

GGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGC**UCAAGAAACGCAAACUC**
AGUUGAAAUGGUUGCGCU**UCAAGAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCU**
CUCGGCC (SEQ ID NO:15,环Dicer 1为粗体)

[0235] MV-RNA 936/1727/7518:

[0236]

AAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUACCGUUCAUAGAGACGUGAUC
 UUCUUCCCAGUGAUACCUUUCAAGAAACAAGGUGUCACUGGGUUG
 UACGGGACUUU (SEQ ID NO:16,环Dicer 3和环Dicer 1为粗体)

[0237] MV-RNA 1826/3186/4274:

[0238]

CUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGAAACC
 AUUUCUGUAGUUGACAGAUCAAGAAACUCUGUCAAUUACAUUGGC
 GACGCCAAGUU (SEQ ID NO:17,环Dicer 1为粗体)

[0239] PI3K/AKT/MTOR (目的次级途径):

[0240] AKT1/MAP3K/PLK1, 项目#P00840

[0241] 有效的PLK1位点

[0242] MV-RNA 153/1425/1504:

[0243]

CUGCUUCUUGAGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGCGGU
 UUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCA
CUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGGAAA
 UAUUUAAGGAGCGG (SEQ ID NO:18,环Dicer 1为粗体,环PSMA加下划线)

[0244] MV-RNA 481/1478/1802:

[0245]

AGAGGCGGUCGUGGGUCUGGCUCUCAAGAAACGAGUUAGGCC
 UAUCUGCUGCGCUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGC
 GUAGCGGAGCCGGCUGCCUCU (SEQ ID NO:19,环Dicer 1为粗体,环网格蛋白-
 小窝加下划线)

[0246] 该实例的纳米颗粒可通过使用T7聚合酶的体外转录由消化用于脱落转录 (fall-off transcription) 的DNA模板产生。

[0247] 用靶向适体组装十二面体多核苷酸纳米颗粒

[0248] 使用上文列出的12个MV-RNA (SEQ ID NO:8-19), 可通过限定开放/闭合MV-RNA和一系列连接的MV-RNA作为核心来制备本发明的纳米颗粒。多个的范围可为2到基因合成或转录环境的上限。该实例组装了12单位(十二面体)纳米颗粒作为简化模型。

[0249] 纳米颗粒的“连接”、“开放”、“闭合”和“核心”组分如下:

[0250] 连接组分:AC

[0251] 开放组分:

[0252]

GGGAAAUAGGGUUUCCAAUGCUUUGCUCAAGAAACGCAAAGU
 AUUGGAGCCACACCAACCAGAC (SEQ ID NO:20,环Dicer 1为粗体,连接组分为
 斜体)

[0253] 由上文具有连接的MV-RNA组装的前列腺癌纳米颗粒核心组分(不包括开放/闭合MV-RNA序列):

[0254]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACA
 UUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGC
 UGUGAAGGUUGCUUUUGACCGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUGGGAUC
 UUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAG
 UGAGAACUUCUCGGCGACCCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCU
 UAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUGCGGAUCA
 GCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUC
 GCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGCUCAGUGACCCUUUCUCAGAGUAA
 GGGAGAAGGAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAUC
 UUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCCAGCUUCCACAUGUGAG
 AGAGCUCAAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGUUCCUCUAU
 CCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACG
 UGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCACCAGAGA
 AACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUCAAUACAUUGGCUAGAAC
 AUACACCCUGCUUCUUGAGGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGC
 [0255]

GGUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACG
 UCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGG
 AAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCU
 CAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAG
 UGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGC
 UCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCC
 GUUCUAAACGCUUUAUGAUGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACA
 AAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUACGUUCAUAGAGACGUGAUCUUC
 UUCCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUAC
 GUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGU
 GUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGU
 UUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAUCAAG
 AAACUCUGUCAAUACAUUGGCGACGCCAAGUUAC (SEQ ID NO:21; 环
 Dicer 1、环Dicer 2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为

斜体)。

[0256] 闭合组分: CUGGUUGGUGUGGAACCCUAUUUCCC (SEQ ID NO: 22)

[0257] 通过将序列转换为DNA, 加入5' T7转录起始位点 (AATTAATACGACTCACTATAGGN; SEQ ID NO: 23, “N” 指示T7转录物的起始核苷酸, 优选“G”), 可将最终的多核苷酸序列转换成体外转录模板, 然后为用于克隆的限制性酶位点。在该实例中, 通过将该片段克隆到EcoRI、XbaI位点内, pUC57 (Genscript, NJ) 载体用于基因合成和模板扩增。

[0258] 克隆到pUC57内用于转录上文设计的十二面体纳米颗粒(前列腺癌纳米颗粒)的DNA转录模板的最终核苷酸序列:

[0259]

AATTAATACGACTCACTATAGGGGAAATAGGGTTTCCAATGCTTTGC
TCAAGAAACGCAAAGTATTGGAGCCACACCAACCAGACCAAAGGCAG
CCGTCAGTCCATCTCAAGAAACGATGGGCTGACATTCATAGCCGTTTC
CTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGATGCGGCTGTGAAGGTTGCTTTTGA
CCGCCGGGAGGTGCTGCGCTTTGGGATCTTATTCAAGGTGCAGCTCTC
ATTCCTTGGATCTTATTAAGGAAGTGAGAACTTCTCGGCGACCACTG
AGGTCAATGTGGACGGAGGATCTTATTTTCGTCCACATCGAGCACTTT
ATGGGAGGACGATGCGGATCAGCCATGTTTACGTCACTCCTTGTCATC

[0260]

CTCATCGGCAGACGACTCGCCCGAATAAGGTGCTTGTGGCTTCAGTGA
CCCTTTCTCAGAGTAAGGGAGAAGGATCTTATTTTCTCCCTTGCAACA
AGTAAGACGGATCTTATTGTCTTGTGGTTCTGAGAGAGGACCAGCTT
CCACATGTGAGAGAGCTCAAGAAACGCTCTCTCGCAATAGGCTGCTTG
TTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGATTAAGTAGCTTATGTGGGAGC
TGACGTGTGTTCTAGTCTTTGGTGGTTCTCAAGAAACGAACCACCAGA
GAAACAGTGTAGTTGACTCAAGAAACGTC AATTACATTGGCTAGAAC A
TACACCTGCTTCTTGAGGCCGTCGTGTTTCAAGAAACAACACGGCGGT
TTGTTTCCGCAGGGGAGGACGATGCGGATCAGCCATGTTTACGTC ACT
CCTTGTC AATCCTCATCGGCAGACGACTCGCCCGATTGCGGAAATATTT
AAGGAGCGGACGGCTGAGAGTAGCCGACTGAGTTTGCTCAAGAAACG
CAAACTCAGTTGAAATGGTTGCGCTTCAAGAAACAGTGCAATCATTTC**
TGCTCTCGGCCACAGAGGCCGTCGTGGGTCTGGCTCTCAAGAAACGA
GTTAGGCCCTATCTGCTGCGCTTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATG
**ATGGCGTAGCGGAGCCGGCTGCCTCTacAAAGTCTCGTGCAGAAGAAG
ATCACGTT**CATAGAGACGTGATCTTCTTCCCAGTGATACCTTGGGAGG**
ACGATGCGGATCAGCCATGTTTACGTC ACTCCTTGTC AATCCTCATCGG
CAGACGACTCGCCCGAAAGGTGTC ACTGGGTTGTACGGGACTTTACCT
TGGCGTTGTCAGAAATGGTTTCAGTCAAGAAACTTGAAACCATTTCTG
TAGTTGACAGATCAAGAAACTCTGTCAATTACATTGGCGACGCCAAGT
TACCTGGTTGGTGTGGAACCCTATTTCCCT (SEQ ID NO:24;环Dicer 1、环Dicer
2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,EcoRI限制性位点/T7转录起始
位点为斜体和加下划线,并且连接组分为斜体)****

[0261] 本领域的普通技术人员将认识到,这可容易地在不同的启动子下利用,并且像这样,该实例并不意味着是限制性的。例如,通过利用“GGG”作为TATA盒(pSUPER)后的转录起始位点和“TTTTT”作为终止信号,可容易地实现这些相同的实例通过哺乳动物H1启动子的体内表达。

[0262] 具有靶向适体的前列腺癌十二面体多核苷酸纳米颗粒的所得到的RNA转录物:

[0263]

GGGAAAUAGGGUUUCCAAUGCUUUGC**UCAAGAAACGCAAAGU**

[0264]

AUUGGAGCCACACCAACCAGACCAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUC
AAGAAACGAUGGGCUGACAUUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCU
AAACGCUUUAUGAUGCGGCUGUGAAGGUUGCUUUUGACCGCCGGGA
 GGUGCUGCGCUUUG**GGAUCUUAU**UCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCU
 U**GGAUCUUAUUA**AAGGAAGUGAGAACUUCUCGGCGACCACUGAGGU
 CAAUGUGGACGGAG**GGAUCUUAUUU**UCGUCCACAUCGAGCACUUUA
UGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCA
UCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCCGAAUAAAGGUGCUUGUGGGCUUCA
 GUGACCCUUUCUCAGAGUAAGGGAGA**AAGGAUCUUAUUU**UCUCCCU
 UGCAACAAGUAAGAC**GGAUCUUAU**UGUCUUGUUUGUUCUGAGAGA
 GGACCAGCUUCCACAUGUGAGAGAGC**UCAAGAAACGCUCUCUCGCA**
 AUAGGCUGCUUGUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAG
 UAGCUUAUGUGGGAGCUGACGUGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCU
CAAGAAACGAACCACCAGAGAAACAGUGUAGUUGACUCAAGAAAC
 GUCAAUUACAUUGGCUAGAACAUAACACCUGCUUCUUGAGGCCGUCG
 UGUU**UCAAGAAACAAC**ACGGCGGUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACG
AUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGG
CAGACGACUCGCCCCGAUUUGCGGAAAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUG
 AGAGUAGCCGACUGAGUUUGC**UCAAGAAACGCAAACUCAGUUGAA**
 AUGGUUGCGCU**UCAAGAAACAGUGCAAUCAUUU**UCUGCUCUCGGCCA
 CAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGCUC**UCAAGAAACGAGUUAGGCCCUA**
 UCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGCGU
 AGCGGAGCCGGCUGCCUCUACAAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUAC
GUUCAUAGAGACGUGAUCUUCUUCCCAGUGAUACCUUGGGAGGAC
GAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCG
GCAGACGACUCGCCCCGAAAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUUA
 CCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAG**UCAAGAAACUUGAAACCA**
 UUUCUGUAGUUGACAGAU**CAAGAAACUCUGUCAAUUACA**UUGGCG
 ACGCCAAGUUACCUGGUUGGUGUGGAACCCUAUUUCCCU (SEQ ID NO:
 25;环Dicer 1、环Dicer 2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组
 分为斜体)

[0265] 通过重复多个的十二面体多核苷酸纳米颗粒

[0266] 增加高度活性MV-RNA的摩尔浓度的理想方法是在多核苷酸纳米颗粒序列内重复。为了保存基于转录的折叠,在限定纳米颗粒序列时交错几个不同的MV-RNA或改变单个MV-RNA的取向帮助保存二级结构(参见例如图19)。为了确认这种基于转录的结构,建议使用计算机程序,如“cofold”(http://www.e-rna.org/cofold/),而不是使用依靠自由能来预测RNA二级结构的程序。

[0267] 重复交错几个MV-RNA是增加摩尔浓度的有效方式。MV-RNA392/2356/375:

[0268]

GGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCUC**AAGAAACGCAAACUC**
AGUUGAAAUGGUUGCGCU**UCAAGAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCU**
CUCGGCC (SEQ ID NO:15,环Dicer 1为粗体)

[0269] MV-RNA 936/1727/7518:

[0270]

AAAGUCUCGUGCAGAAAGAAGAU**CACGUUCAUAGAGACGUGAUC**
UUCU^UCCCAGUGAUACCU**UCAAGAAACAAGGUGUCACUGGGUUG**
UACGGGACUUU (SEQ ID NO:16,环Dicer 3和环Dicer 1为粗体)

[0271] MV-RNA 1826/3186/4274:

[0272]

CUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUCA**AAGAAACUUGAAACC**
AUUUCUGUAGUUGACAGAU**CAAGAAACUCUGUCAAUUACAUUGGC**
GACCCAAGUU (SEQ ID NO:17,环Dicer 1为粗体)

[0273] 开放组分:

[0274]

GGGAAAUAGGGUUCCAUGCUUUGCUC**AAGAAACGCAAAGU**
AUUGGAGCCACACCA**ACCAGAC** (SEQ ID NO:20,环Dicer 1为粗体,连接组分为斜体)

[0275] 通过重复SEQ ID NO:16、17和20的三个MV-RNA同时交错各自的转录次序生成摩尔浓度增加的纳米颗粒:

[0276]

GGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCUC**AAGAAACGCAAACUC**
AGUUGAAAUGGUUGCGCU**UCAAGAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCU**
CUCGGCC**ACAAAGUCUCGUGCAGAAAGAAGAU**CACGUUCAUAGAGAC****
GUGAUCUUCU^UCCCAGUGAUACCU**UCAAGAAACAAGGUGUCACUG**
GGUUGUACGGGACUUU**ACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUC**

[0277]

AAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGA**UCAAGAAACUCU**
GUCAAUUACA**UUGGCGACGCCAAGUUACA****AAAGUCUCGUGCAGAAGA**
AGAUCACGUUCAUAGAGACGUGAUCUUCU**UCCCAGUGAUACCUUUC**
AAGAAACAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUU**ACCUUGGCGUU**
GUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGU
UGACAGA**UCAAGAAACUCUGUCAAUUACA****UUGGCGACGCCAAGUUACA**
CGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCUCAAGAAACGCAAACUCAG
UUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCUCU
CGGCCACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGA
AACCAUUUCUGUAGUUGACAGA**UCAAGAAACUCUGUCAAUUACA****U**
UGGCGACGCCAAGUUACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCUCA
AGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAGUG
CAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUC
ACGUUCAUAGAGACGUGAUCUUCU**UCCCAGUGAUACCUUUCAAGA**
AACAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUU (SEQ ID NO:26; 环Dicer 1和
 环Dicer 3为粗体, 连接组分为斜体)

[0278] 闭合组分: CUGGUUGGUGUGGAACCCUAAUUUCCC (SEQ ID NO:22)

[0279] 由重复和交错MV-RNA制备的含有“开放”、“闭合”和“核心”序列的纳米颗粒序列的例子:

[0280]

GGGAAAUAGGGUUUCCAAUGCUUUGCUCAAGAAACGCAAAGU
AUUGGAGCCACACCAACCAGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUU
GCUCAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAA
CAGUGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAAAGUCUCGUGCAGAAGA
AGAUCACGUUCAUAGAGACGUGAUCUUCU**UCCCAGUGAUACCUUUC**
AAGAAACAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUU**ACCUUGGCGUU**
GUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGU
UGACAGA**UCAAGAAACUCUGUCAAUUACA****UUGGCGACGCCAAGUUACA**
CAAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUCACGUUCAUAGAGACGUGAUCU
UCU**UCCCAGUGAUACCUUUCAAGAAACAAGGUGUCACUGGGUUGU**
ACGGGACUUU**ACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAA**
CUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGA**UCAAGAAACUCUGUCAAU**

FPLC (Kim 2007) 以mg数量来完成。

[0286] 使用RNA环化酶核酶产生序列片段。使用<5'环化酶核酶序列><多核苷酸纳米颗粒转录物><3'环化酶核酶序列>的模型,可在转录期间或其后利用环化反应制备环化的纳米颗粒。

[0287] 环化酶核酶序列是:

[0288] 5'末端w/T7:

[0289]

*AATTAATACGACTCACTATAGGGGAAAATTTTCGTCTGGATTAGTTACT
TATCGTGTA
AAATCTGATAAATGGAATTGGTTCTACATAAATGCCTAACG
ACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGAAACGATAGACAAC
TTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACATGCAG
CTGGATATAATTCGGGGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACATAATGCT
A* (SEQ ID NO:28;EcoRI限制性位点和T7转录起始位点为斜体)

[0290] 3'末端:

[0291]

CATGTCAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACGGGGAACCTCTCTAGTAGACAAT
CCCGTGCTAAATTGTAGGACTGCCCTTTAATAAATACTTCTATATTTAAAGAGGTATTTATGAAAAGCGGAATTTAT
CAGATTA
AAAAATACTTTCT (SEQ ID NO:29)

[0292] 下述序列代表通过将前列腺癌靶向纳米颗粒插入上文环化酶核酶序列之间生成的前列腺癌靶向圆形十二面体纳米颗粒:

[0293]

AATTAATACGACTCACTATAGGGGAAAATTCGTCTGGATTAGTTACT
TATCGTGTA~~AA~~AATCTGATAAATGGAATTGGTTCTACATAAATGCCTAACG
ACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGA~~CT~~CGAAACGATAGACAAC
TTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACATGCAG
CTGGATATAATTCCGGGGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACATAATGCT
AGGGAAATAGGGTTTCCAATGCTTTGCTCAAGAAACGCAAAGTATTGG
AGCCACACCAACCAGACCAAAGGCAGCCGTCAGTCCATCTCAAGAAA
CGATGGGCTGACATTCATAGCCGTTTCCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTA
TGATGCGGCTGTGAAGGTTGCTTTTGACCGCCGGGAGGTGCTGCGCTT
TGGGATCTTATTCAAGGTGCAGCTCTCATTTCCCTTGGATCTTATTAAG
GAAGTGAGAACTTCTCGGCGACCACTGAGGTCAATGTGGACGGAGGA
TCTTATTTTCGTCCACATCGAGCACTTTATGGGAGGACGATGCGGATCA
GCCATGTTTACGTCACTCCTTGTC AATCCTCATCGGCAGACGACTCGCC
CGAATAAGGTGCTTGTGGCTTCAGTGACCCCTTTCTCAGAGTAAGGGAG
AAGGATCTTATTTTCTCCCTTGCAACAAGTAAGACGGATCTTATTGTC
TTGTTTGTCTGAGAGAGGACCACTTCCACATGTGAGAGAGCTCAAG

[0294]

AAACGCTCTCTCGCAATAGGCTGCTTGTTCCCTCTATCCGTTCTAAACGC
TTTATGATTAAGTAGCTTATGTGGGAGCTG*ACGTGTGTTCTAGTCTTTGG*
TGGTTCTCAAGAAACGAACCACCAGAGAAACAGTGTAGTTGACTCAA
GAAACGTCAATTACATTGGCTAGAACATAC*ACCTGCTTCTTGAGGCCGT*
CGTGTTTCAAGAAACAACACGGCGGTTTGT*TTCCGCAGGGGAGGACG*
ATGCGGATCAGCCATGTTTACGTC*ACTCCTTGTC*CAATCCTCATCGGCAG
ACGACTCGCCCGATTGCGGAAATATTTAAGGAGCGG*ACGGCTGAGAGT*
AGCCGACTGAGTTTGCTCAAGAAACGCAA*ACTCAGTTGAAATGGTTG*
CGCTTCAAGAAACAGTGCAATCATT*TCTGCTCTCGGCCACAGAGGCCG*
TCGTGGGTCTGGCTCTCAAGAAACGAGTTAGGCCCTATCTGCTGCGCT
TTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGATGGCGTAGCGGAGCCGGCTG
CCTCTACAAAGTCTCGTGCAGAAGAAGATCACGTT*CATAGAGACGTGA*
TCTTCTTCCCAGTGATACCTTGGGAGGACGATGCGGATCAGCCATGTTT
ACGTC*ACTCCTTGTC*CAATCCTCATCGGCAGACGACTCGCCCGAAAGGT
GTC*ACTGGGTTGTACGGGACTTTACCTTGCGGTTGTC*CAGAAATGGTTTC
AGTCAAGAAACTTGAAACCATTTCTGTAGTTGACAGATCAAGAAACT
CTGTCAATTACATTGGCGACGCCAAGTTACCTGGTTGGTGTGGAACCCT
ATTTCCCCAUGTCAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTA
ATCTATCTAAACGGGGAACCTCTCTAGTAGACAATCCCGTGCTAAATTG
TAGGACTGCCCTTTAATAAATACTTCTATATTTAAAGAGGTATTTATGAA
AAGCGGAATTTATCAGATTA*AAAAATACTTTCT* (SEQ ID NO:30;环Dicer1为粗
 体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为斜体,EcoRI限制性位点/T7转录起始位
 点为斜体和加下划线)

[0295] 用于增加摩尔浓度的高度结构化的多核苷酸纳米颗粒

[0296] 重复核心可为增加摩尔浓度的有效方式。下文的多核苷酸纳米颗粒在高度填充的球体中形成40-60nm的直径。在该实例中,每个纳米颗粒递送大约48个MV-RNA,其中触发剂各自为一式四份。

[0297] 开放组分:

[0298]

GGGAAAUAGGGUUUCCAAUGCUUUGCUCAAGAAACGCAAAGU
AUUGGAGCCACACCAACCAGAC (SEQ ID NO:20;环Dicer 1为粗体)

[0299] 核心组分(上文连接的MV-RNA的集合):

[0300] 核心1:

[0301]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACA
 UUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGC
 UGUGAAGGUUGCUUUUG_{ac}CGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUG**GGAUC**
UUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAG
 UGAGAACUUCUCGGCGAC**CCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCU**
UAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUGCGGAUCA
GCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUC
GCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGCUUCAGUGACCCUUUCUCAGAGUAA
GGGAGAAGGAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAUC
UUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCAGCUUCCACAUGUGAG
AGAGCUCAAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGUUCCUCUAU
CCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACG
 UGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCACCAGAGA
 AACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUCAAUUACAUUGGCUAGAAC
 AUACACCUGCUUCUUGAGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGC
 GGUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACG
UCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGG
 AAAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCU
CAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAG
 UGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGC
UCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCC
GUUCUAAACGCUUUAUGAUGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACA
 AAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUCAC**GUUCAUAGAGACGUGAUCUUC**
 UUCCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUAC
GUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGU
 GUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGU
UUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAUCAAG
AAACUCUGUCAAUUACAUUGGCGACGCCAAGUUAC (SEQ ID NO:34; 环
 Dicer 1、环Dicer 2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为
 斜体)

[0302] 核心2:

[0303]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACA
 UUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGC
 UGUGAAGGUUGCUUUUG_{ac}CGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUG**GGAUC**
UUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAG
 UGAGAACUUCUCGGCG**ACCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCU**
UAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUGCGGAUCA
GCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUC
GCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGCUUCAGUGACCCUUUCUCAGAGUAA
 GGGAGAAG**GGAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAUCI**
UAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCAGCUUCCACAUGUGAGA
GAGCUCAAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGUUCCUCUAUC
CGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACGU
 GUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCACCAGAGAA
 ACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUCAAUACAUUGGCUAGAACA
 UACACCUGCUUCUUGAGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGCG
 GUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGU
CACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGGA
 AAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCUC
AAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAGU
 GCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGCU
CUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCCG
UUCUAAACGCUUUAUGAUGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACAA
 AGUCUCGUGCAGAAGAAGAUAC**GUUCAUAGAGACGUGAUCUUCU**
 UCCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACG
UCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGUG
 UCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGUU
 UCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAU**CAAGA**
AACUCUGUCAAUUACAUUGGCGACGCCAAGUUAC (SEQ ID NO:35; 环
 Dicer 1和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为斜体)

[0304] 核心3:

[0305]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACA
 UUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGC
 UGUGAAGGUUGCUUUUGACCGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUGGGAUC
UUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAG
 UGAGAACUUCUCGGCGAC**CCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCU**
UAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUGCGGAUCA
GCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUC
GCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGGCUUCAGUGACCCUUUCUCAGAGUAA
 GGGAGAAGGAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAU**C**
UUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCAGCUUCCACAUGUGAG
 AGAGCU**CAAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGU**UCCUCUAU
CCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACG
 UGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCACCAGAGA
 AACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUCAAUACAUUGGCUAGAAC
 AUACACCUGCUUCUUGAGGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGC
 GGUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACG
UCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGG
 AAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCU
CAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAG
 UGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGC
UCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCC
GUUCUAAACGCUUUAUGAUGGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACA
 AAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUCACG**UUCAUAGAGACGUGAUCUUC**
 UUCCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUAC
GUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGU
 GUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGU
UUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAUCAAG
AAACUCUGUCAAUUACAUUGGGCGACGCCAAGUUAC (SEQ ID NO:36; 环
 Dicer 1、环Dicer 2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为
 斜体)

[0306] 核心4:

[0307]

CAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACA
 UUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGC
 UGUGAAGGUUGCUUUUG_{ac}CGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUG**GAUC**
UUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAG
 UGAGAACUUCUCGGCGAC**CCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCU**
UAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUGCGGAUCA
GCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUC
GCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGCUUCAGUGACCCUUUCUCAGAGUAA
 GGGAGAAG**GAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAUC**
UUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGAC**CCAGCUUCCACAUGUGAG**
 AGAGC**UCAAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGU**UCCUCUAU
CCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACG
 UGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCACCAGAGA
 AACAGUGUAGUUGAC**UCAAGAAACGUCAAUACA**UUGGCUAGAAC
 AUACACCUGCUUCUUGAGG**CCGUCGUGUUUCAAGAAACAACACGGC**
 GGUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACG
UCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGG
 AAAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCU
CAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCAAGAAACAG
 UGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGGGUCUGGC
UCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCC
GUUCUAAACGCUUUAUGAUGGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACA
 AAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUCAC**GUUCAUAGAGACGUGAUCUUC**
 UUCCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUAC
GUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGU
 GUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAAUGGU
 UUCAG**UCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAUCAAG**
AAACUCUGUCAAUUACAUUGGGCGACGCCAAGUUAC (SEQ ID NO:37; 环
 Dicer 1、环Dicer 2和环Dicer 3为粗体,环PSMA和环网格蛋白小窝加下划线,连接组分为
 斜体)

[0308] 闭合组分:CUGGUUGGUGUGGAACCCUAUUUCCC (SEQ ID NO:22)

[0309] 由上文重复区和开放/闭合组分组装的最终多核苷酸纳米颗粒:

[0310]

GGGAAAUAGGGUUUCCAUGCUUUGCUCAAAGAAACGCAAAGU
AUUGGAGCCACACCAACCAGACCAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUC
AAGAAACGAUGGGCUGACAUUCAUAGCCGUUUCCUCUAUCCGUUCU
AAACGCUUUAUGAUGCGGCUGUGAAGGUUGCUUUGACCGCCGGGA
GGUGCUGCGCUUUGGGAUUCUUAUUCAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCU
UGGAUCUUAUUAAAGGAAGUGAGAACUUCUCGGCGACCACUGAGGUC
AAUGUGGACGGAGGAUCUUAUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAU
GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUACGUCACUCCUUGUCAAU
CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAUAAGGUGCUUGUGGGCUUCAG
UGACCCUUUCUCAGAGUAAGGGAGAAGGAUCUUAUUUUCUCCCUUG
CAACAAGUAAGACCGGAUCUUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGG
ACCAGCUUCCACAUGUGAGAGAGCUCAAGAAACGCUCUCUCGCAAU
AGGCUGCUUGUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUA
GCUUAUGUGGGAGCUGACGUGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAA
GAAACGAACCACCAGAGAAACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUC
AAUUACAUUGGCUAGAACAUACACCCUGCUUCUUGAGGCCGUCGUGU
UUCAAGAAACAACACGGCGGUUUGUUCCGCAGGGGAGGACGAUG
CGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAG
ACGACUCGCCCGAUUGCGGAAAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGA
GUAGCCGACUGAGUUUGCUCAAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUG
GUUGCGCUUCAAGAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAG
AGGCGGUCGUGGGUCUGGCUCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCU
GCUGCGCUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGCGUAGC
GGAGCCGGCUGCCUCUACAAAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUACGUU
CAUAGAGACGUGAUCUUCUUCCAGUGAUACCUUGGGAGGACGAU
GCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCA
GACGACUCGCCCGAAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCU
UGGCGUUGUCAGAAAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUU
CUGUAGUUGACAGAUCAAGAAACUCUGUCAAUUACAUUGGCGACG

[0311]

CCAAGUUACCAAAGGCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGG
CUGACAUCUAUAGCCGUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGA
UGCGGCUGUGAAGGUUGCUUUUGACCGCCGGGAGGUGCUGCGCUUU
GGGAUCUUUAUUAAGGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUUAUA
AGGAAGUGAGAACUUCUCGGCGACCACUGAGGUCAAUGUGGACGGA
GGAUUCUUUUUUCGUCCACAUCGAGCACUUUAUGGGGAGGACGAUG
CGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAG
ACGACUCGCCCCGAAUAAGGUGCUGUGGGCUUCAGUGACCCUUCUC
AGAGUAAGGGAGAAGGAUCUUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAG
ACGGAUCUUUAUUGUCUUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCAGCUUCCAC
AUGUGAGAGAGCUC AAGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGU
UCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGG
AGCUGACGUGUGUUCUAGUCUUUGGUGGUUCUCAAGAAACGAACCA
CCAGAGAAACAGUGUAGUUGACUCAAGAAACGUCAAUUACAUUGG
CUAGAACAUAACACCGUCUUCUUGAGGCCGUCGUGUUUCAAGAAACA
ACACGGCGGUUUUGUUUCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAU
GUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCG
AUUGCGGAAAUAUUUAAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGA
GUUUGCUC AAGAAACGCAAACUCAGUUGAAAUGGUUGCGCUUCA
GAAACAGUGCAAUCAUUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGCGGUCGUGG
GUCUGGCUCUCAAGAAACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUCC
UCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGGCGUAGCGGAGCCGGCUGC
CUCUACAAAGUCUCGUGCAGAAGAAGAUCACGUUCAUAGAGACGUG
AUCUUCU UCCCAGUGAUACCUUGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAU
GUUUACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCG
AAAGGUGUCACUGGGUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGA
AAUGGUUUCAGUCAAGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAG
AUCAAGAAACUCUGUCAAUUACAUUGGCGACGCCAAGUUACCAAAG
GCAGCCGUCAGUCCAUCUCAAGAAACGAUGGGCUGACAUCUAUAGC
CGUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGCGGCUGUGAAGG
UUGCUUUUGACCGCCGGGAGGUGCUGCGCUUUGGGAUCUUUAUCAA

[0312]

GGUGCAGCUCUCAUUUCCUUGGAUCUUAUUAAGGAAGUGAGAACU
UCUCGGCGACCACUGAGGUCAAUGUGGACGGAGGAUCUUAUUUUCG
UCCACAUCGAGCACUUUAUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUU
UACGUCACUCCUUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAU
AAGGUGCUUGUGGCCUUCAGUGACCCUUCUCAGAGUAAGGGAGAAG
GAUCUUAUUUUCUCCCUUGCAACAAGUAAGACGGAUUCUUAUUGUC
UUGUUUGUUCUGAGAGAGGACCAGCUUCCACAUGUGAGAGAGCUC**A**
AGAAACGCUCUCUCGCAAUAGGCUGCUUGUJCCUCUAUCCGUUCUA
AACGCUUUAUGAUUAAGUAGCUUAUGUGGGAGCUGACGUGUGUUCU
AGUCUUUGGUGGUUC**UCAAGAAACGAACCACCAGAGAAACAGUGU**
AGUUGAC**UCAAGAAACGUCAAUACA**UUGGCCUAGAACA**UACACCUG**
CUUCUUGAGGCCGUCGUGUU**UCAAGAAACAACACGGCGGUUUGUU**
UCCGCAGGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCU
UGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAUUGCGGAAAUUUU
AAGGAGCGGACGGCUGAGAGUAGCCGACUGAGUUUGCU**CAAGAAAC**
GCAAACUCAGUUGAAUUGGUUGCGCU**UCAAGAAACAGUGCAAUCA**
UUUCUGCUCUCGGCCACAGAGGGCGGUCGUGGGGUCUGGCUC**UCAAGA**
AACGAGUUAGGCCCUAUCUGCUGCGCUUUCCUCUAUCCGUUC**UAAA**
CGCUUUAUGAUUGGCGUAGCGGAGCCGGCUGCCUCUACAAGUCUCG
UGCAGAAGAAGAU**CACGUUCAUAGAGACGUGAUCUUCU**UCCCAGU
GAUACCUUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCC
UUGUCAAUCCUCAUCGGCAGACGACUCGCCCGAAAGGUGUCACUGG
GUUGUACGGGACUUUACCUUGGCGUUGUCAGAAUUGGUUU**CAGUCA**
AGAAACUUGAAACCAUUUCUGUAGUUGACAGAUCA**AGAAACUCUG**
UCAAUUACAUUGGCGACGCCAAGUUACCA**AAGGCAGCCGUCAGUCC**
AUC**UCAAGAAACGAUGGGCUGACA**UUCAUAGCCGUUCCUCUAUCC
GUUCUAAACGCUUUAUGAUUGCGGCUGUGAAGGUUGCUUUUGACCGC
CGGGAGGUGCUGCGCUUUG**GAUCUUAU**UCAAGGUGCAGCUCUCA
UUUCCUUG**GAUCUUAUUAAGGAAGUGAGA**ACUUCUCGGCGACCACU
GAGGUCAAUGUGGACGGAG**GAUCUUAUUUUCGUCCACAUCGAGCA**
CUUUAUGGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCU

[0326]

GGTTTCTGGTTTGACTTTCTAGTTCAAAgAACACTAGAAGGTCATGAGAAAGGCGTTCAAAgAACACGCCTTTCTCA
ACCAGAAACCtt (SEQ ID NO:41)

[0327] MV-RNA WCR_RIBOS4_490 (项目#P00953) :

[0328]

TTTCATTCAAATTGTCTTTACTCAAAgAACGTGAAGACAGACAGTATTCTTCTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTT
ATGATGAAGAATACTGTTTGAATGAAAtt (SEQ ID NO:42;环网格蛋白小窝加下划线)

[0329] MV-RNA WCR_SNF7_62 (项目#P00942) :

[0330]

TCCCCAGGACTAGGGCTATTTATCAAAgAACTGAATAGCCTCCCCAGGACTAGGGAGACTTAGGTGGATGTAGGAT
CCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAACCCTAGTCCTGAGTCCTGGGGAtt (SEQ ID NO:43)

[0331] MV-RNA WCR_SNF7_399 (项目#P00942) :

[0332]

GGCTATGTCATCCATGATATCGTTCAAAgAACATGATATCGTGAACATCATCTACTTTCAAAgAACGTAGATGATGT
ATGACATAGCCtt (SEQ ID NO:44)

[0333] MV-RNA WCR_RIBOS4_642 (项目#P00953) :

[0334]

ACATGATGGAATTGAAAATGGAATTCAAAgAACATTCGTTTTTCATTCAAATTGTCTTTTCCTCTATCCGTTCTAAAC
GCTTTATGATAAGACAATTTGAATTCATCATGTtt (SEQ ID NO:45;环网格蛋白小窝加下划线)

[0335] WCR_COPI_1249 (项目#P00950) :

[0336]

ACACAACCTTATATATTAACAGCTCAAAgAACGCTGTTAGTATGGATGCCAGTGGAGACTTAGGTGGATGTAGGATC
CTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAACCACTGGCATCTAAGGTTGTGTtt (SEQ ID NO:46)

[0337] MV-RNA WCR_RIBOS4_593 (项目#P00953) :

[0338]

GAAAGGGAGTAGGTGTATTTACATCAAAgAACTGTAGGTACAAGATGCTAAGAGCTTCAAAgAACAGCTCTTAGCAT
CTACTCCCTTTc (SEQ ID NO:47)

[0339] MV-RNA WCR_SNF7_472 (项目#P00942) :

[0340]

CATCCAGATCGTCGGTGAATTAGTCAAAgAACCTAATTCATCGTCATCCAGATCGTAGACTTAGGTGGATGTAGGAT
CCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAACGATCTGGATCGATCTGGATGtt (SEQ ID NO:48)

[0341] MV-RNA WCR_COPI_780 (项目#P00950) :

[0342]

GAATTTCAAAGAGAAGAAGAATGGATCTTATTATTCTTCTTCTATAATTTAAGCTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCT
TTATGATGCTTAAATTATGGCTTTGAAATTCtt (SEQ ID NO:49;环网格蛋白小窝加下划线)

[0343] MV-RNA WCR_RIBOS4_397 (项目#P00953) :

[0344]

GGTCGTGCATGTTAATTGGTAATCAAAgAACGTTATCAATTGGTCATGTACTTCGTCAAAgAACCGAAGTACATGCA
TGCACGACCtt (SEQ ID NO:50)

[0345] MV-RNA WCR_COPI_125 (项目#P00950) :

[0346]

AGATAGCTACTTTATTCTTTCAAATCAAAGAACTTTGAAAGAGTATGGACTATTTTTCCTCTATCCGTTCTAAACGC
TTTATGATAAATAGTCCATAGTAGCTATCTtt (SEQ ID NO:51;环网格蛋白小窝加下划线)

[0347] MV-RNA WCR_SNF7_300 (项目#P00942):

[0348]

AGTATTTGTGCTAGCTCCTAGTTCAAAGAACTAGGGGCTATCTCTTCCTTTTACTTAGGTGGATGTAGGATCC
TTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAAAAAAGGAAGAGGCACAAATACTtt (SEQ ID NO:52)

[0349] 用网格蛋白-小窝和GalNac摄取适体组装WCR靶向多核苷酸纳米颗粒

[0350] 上文的MV-RNA被分组成作为TRI的三个一组(图1、2),其中一个MV-RNA/纳米颗粒靶向靶基因之一。根据本专利申请中的设计指导,将所得到的3个MV-RNA连接成单个多核苷酸序列。三个MV-RNA中的两个在一个环上含有作为“网格蛋白-小窝”或“GalNac”的适体(图1、2)。

[0351] GalNac:

[0352] AGACTTAGGTGGATGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAA (SEQ ID NO:53)

[0353] 网格蛋白-小窝: TTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGAT (SEQ ID NO:54)

[0354] 因为体外T7转录计划用于产生这些RNA纳米颗粒,所以选择以对于T7转录产量最合适的核苷酸(“Gnn”、“GGn”)开始的某些MV-RNA,以根据本发明的该说明书中的指导开放/闭合纳米颗粒。

[0355] 制备下文的每种纳米颗粒用于体外转录,其中添加T7转录起始位点(粗体)和短的随机DNA片段“AATT”,以帮助在模板消化之后的转录。将DNA模板在EcoRI/XbaI位点处克隆到pUC57 (Genscript,NJ)内,扩增,然后在运行体外转录反应之前,用适当的限制性酶消化。可改变3'限制性位点以解释由于特定的限制性酶的核苷酸添加。在这种情况下,去除纳米颗粒的最后一个核苷酸,因为在XbaI消化之后将“T”加回到模板中。

[0356] T7_起始: TAATACGACTCACTATAGGN (SEQ ID NO:23)

[0357] 上文MV-RNA被分组成作为TRI纳米颗粒的三个一组用于喂养WCR幼虫。对于每个TRI纳米颗粒,如上所述基于T7转录选择开放/闭合MV-RNA。

[0358] TRI_c636c596r178:

[0359]

AATTAATACGACTCACTATAGGTATGTTTGGCCACAGAAGATAGTCA
AAAAACCTATCTTCTGTCCAAATAATTTtATTGGTTTAGTAGCAACTGCA
AATTCAAAAAACATTTGTAGTTGGGTCTTTTCCAATAGACTTAGGTGGA
TGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAAATTGGAAAAGA
ACTAAACCAATTTATCAATTGGTCATGTACTTCGTTTCAAAAAACAACG
AAGTACATAACTAGATTCGATTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGAT
TCGAATCTAGTTATCAATTGGTTTAAATTATTGGGCCAGACATACT

[0360] (SEQ ID NO:55;环网格蛋白小窝加下划线,EcoRI限制性位点/T7转录起始位点为斜体)

[0361] TRI_c2422r490s62:

[0362]

*AATTAATACGACTCACTATAGGTTTCTGGTTTGACTTTCTAGTTCAAA
AAACACTAGAAGGTCATGAGAAAGGCGTttTTCATTCAAATTGTCTTTA
CTCaaaaaaCGTGAAGACAGACAGTATTCTTCTTCCTCTATCCGTTCTAAA
CGCTTTATGATGAAGAATACTGTTTGAATGAAATTTCCCCAGGACTAGG*

[0363]

*GGCTATTTATCAAAAACTGAATAGCCTCCCCAGGACTAGGGAGACTT
AGGTGGATGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAACCCTA
GTCCTGAGTCCTGGGGATTACGCCTTTCTCAACCAGAAACCT* (SEQ ID NO:
56; 环网格蛋白小窝加下划线, EcoRI限制性位点/T7转录起始位点为斜体)

[0364] TRI_s399r642c1249:

[0365]

*AATTAATACGACTCACTATAGGCTATGTCATCCATGATATCGTTCAAA
AAACATGATATCGTGAACATCATCTACTTACATGATGGAATTGGAAATG
GAATTCAAAAAACATTCGTTTTTCATTCAAATTGTCTTTTCCTCTATCCGT
TCTAAACGCTTTATGATAAGACAATTTGAATTCCATCATGTTTACACAAC
CTTATATATTAACAGCTCAAAAAACGCTGTTAGTATGGATGCCAGTGGA
GACTTAGGTGGATGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAA
CCACTGGCATCTAAGGTTGTGTTTGTAGATGATGTATGACATAGCCT*

[0366] (SEQ ID NO:57, EcoRI限制性位点/T7转录起始位点为斜体)

[0367] TRI_r593s472c780:

[0368]

*AATTAATACGACTCACTATAGGAAAGGGAGTAGGTGTATTTACATCaa
aaaaCTGTAGGTACAAGATGCTAAGAGCTttCATCCAGATCGTCGGTGAAT
TAGTCAAAAAACCTAATTCATCGTCATCCAGATCGTAGACTTAGGTGGA
TGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAAACGATCTGGATC
GATCTGGATGTTGAATTTCAAAGAGAAGAAGAATGGATCTTATTATTCT
TCTTCTATAATTTAAGCTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGATGCTT
AAATTATGGCTTTGAAATTCTTAGCTCTTAGCATCTACTCCCTTTCT* (SEQ
ID NO:58, EcoRI限制性位点/T7转录起始位点为斜体)

[0369] TRI_r397c125s300:

[0396]

*AATTAATACGACTCACTATAGGGAGGATGGTGACTGGTATGAGACTG
GGCTACATATATTCTTTGGGGCATATCCAAATGTCCAAAATCTATTTGGA
GAACTTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGTATGTTTGGCCACAGAAG
ATAGTCAAAGAACCTATCTTCTGTCCAAATAATTTtATTGGTTTAGTAGC
AACTGCAAATTCAAAGAACATTTGTAGTTGGGTCTTTTCCAATAGACTT
AGGTGGATGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAAATTGG
AAAAGA ACTAAACCAATtATCAATTGGTCATGTA CTTCGTTTCAAAGAA
CAACGAAGTACATAACTAGATTCGATTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTT
ATGATTCGAATCTAGTTATCAATTGGttGGTTTCTGGTTTGACTTTCTAGT
TCAAAGAACACTAGAAGGTCATGAGAAAGGCGTTCAAAGAACACGCCT
TTCTCAACCAGAAACCtTTTCATTCAAATTGTCTTTACTCAAAGAACGT
GAAGACAGACAGTATTCTTCTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGAT
GAAGAATACTGTTTGAATGAAAtTCCCCAGGACTAGGGGCTATTTATCA
AAgAACTGAATAGCCTCCCCAGGACTAGGGAGACTTAGGTGGATGTAG
GATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAACCCTAGTCCTGAGTCCT
GGGGAttGGCTATGTCATCCATGATATCGTTCAAAGAACATGATATCGTGA
ACATCATCTACTTTCAAAGAACGTAGATGATGTATGACATAGCCtACATG
ATGGAATTGGAAATGGAATTCAAAGAACATTCGTTTTTCATTCAAATTGT
CTTTTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGATAAGACAATTTGAATTCC
ATCATGTtACACAACCTTATATATTAACAGCTCAAAGAACGCTGTTAGTA
TGGATGCCAGTGGAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCTTAGACTTAGGT
GGATGTAGGATCCAACCACTGGCATCTAAGGTTGTGTtGAAAGGGAGT
AGGTGTATTTACATCAAAGAACTGTAGGTACAAGATGCTAAGAGCTTCA
AAgAACAGCTCTTAGCATCTACTCCCTTTTctCATCCAGATCGTCGGTGA
ATTAGTCAAAGAACCTAATTCATCGTCATCCAGATCGTAGACTTAGGTG
GATGTAGGATCCTTAGACTTAGGTGGATGTAGGATCCAAACGATCTGGA*

AGCAAACCTCAGTTGCTGGGGAAATATGCATATTTTCTCAGCAGTAACGACTGTTGAAATTCCTCTATCCGTTCTAAA
CGCTTTATGATTTTCAATAGTTGTAAGGGTTTGCTGAAGATCCCAACTTGATGTTGAATTTGTTCAAGAGACAAATT
TAATATTTAGCTGTCGGTTGTTCAAGAGACAGCCGGCAGTTGAGTTGGGATTAAGCTTTCTTAAGGGCATCATCCA
GTCATGTCAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAACTATCTAAACGGGGAACCTCTCTAGTAGACA
ATCCCGTGCTAAATTGTAGGACTGCCCTTTAATAAATACTTCTATATTTAAAGAGGTATTTATGAAAAGCGGAATTT
ATCAGATTAATAACTTTCT (SEQ ID NO:67; 纳米颗粒插入片段加下划线)

[0411] 相同的环化作用可在植物内(体内)表达过程中发生。例如,可选择在玉蜀黍中制备本发明的纳米颗粒。在玉米中表达的这种纳米颗粒已显示在组织内更稳定(图22)-从而导致在害虫摄食期间的更高浓度。在转化到植物内之前,通过将上文的5'环化酶核酶、多核苷酸纳米颗粒序列和3'环化酶核酶插入所需克隆内,可容易地使用启动子例如泛素或CMV。

[0412] 实例3:靶向长芒苋(Amaranthus palmeri)(苋)的自形成单链多核苷酸MV-RNA纳米颗粒:

[0413] 该实例描述了根据本发明的多核苷酸纳米颗粒组装为靶向一种、两种或三种植物基因的稳定和单链RNA纳米颗粒,同时具有增加的摩尔浓度和范围。该实例示出了用于对长芒苋的外源(喷雾或滴落)应用的纳米颗粒的体外生产。

[0414] 益处例如用于扩展谱的生物除草剂的多价性、植物细胞摄取和制剂稳定性通过观察表型应答来实现(图21)。在这种情况下,由于八氢番茄红素去饱和酶(SEQ ID NO:104)的表达降低,光漂白(脱绿)在应用后10天在经处理的植物上可观察到。该实例中另外的长芒苋靶是EPSPS(SEQ ID NO:105)和HPPD(SEQ ID NO:106)。

[0415] 网格蛋白-小窝:TTCCTCTATCCGTTCTAAACGCTTTATGAT (SEQ ID NO:54)

[0416] T7_起始:TAATACGACTCACTATAGGN (SEQ ID NO:23)

[0417] 用于设计多核苷酸纳米颗粒的MV-RNA例子

[0418] 组成纳米颗粒的各个二价MV-RNA:

[0419] PDS二价体:

[0420] MV-RNA 655/1089:

[0421]

**GGUCAUAUGUAUUCUUUAAUUGGAUCUUAUUAUUAAGAAG
AAGCACAAGAUU**<此处的分割序列指示纳米颗粒的5'“开放”和3'“闭合”序列>
UCUUGUGCUUCAACAUAUGACUUU (SEQ ID NO:68; 环Dicer 2为粗体)

[0422] MV-RNA 430/1173:

[0423]

**AUAUAAGGAUGAACUUGGUAUCAAGAAACUACCAAGUUCUCCA
AAUAGAUUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGAUCUA
UUUGGAUCCUUAUAUUU** (SEQ ID NO:69; 环Dicer 1为粗体, 环网格蛋白小窝加下划线)

[0424] MV-RNA 1095/388:

[0425]

UAGAUGGUCAUAUGUAUUCUUU**UCAAGAAACAAAGAAUUAU**
GUAGCCAGUCUCAUCUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAU
CUGAGACUGGGCUAUGACCAUCUA (SEQ ID NO:70;环Dicer 1为粗体,环网格
蛋白小窝加下划线)

[0426] MV-RNA 736/888:

[0427]

GAUGUGUUUAACA**AUAGGCAUUC**AAGAAACAUGCUUAUUGGC
CAUGUCA**AAGU**UCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAU**CUUUGA**
CAUGGCAUAAACACAUCUU (SEQ ID NO:71;环Dicer 1为粗体,环网格蛋白小窝
加下划线)

[0428] EPSPS二价体:

[0429] MV-RNA 1430/989:

[0430]

UGAUCGUCAUAAGUUUCAAGUG**CUCAAGAAACGC**ACUUGAAGC
AUCACCCUCAACUCAAGAAACGUUGAGGGUGAU**AUGACGAUCAU**

[0431] (SEQ ID NO:72;环Dicer 1为粗体)

[0432] MV-RNA 546/1437:

[0433]

UGUCA**AUGGGCGCAUCGCUGAAUGGG**AUCUUAU**UCAUUCGGUG**
AUCGUCAUAAGUUUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUAAC
UUAUGACGGCCAUUGACA**UU** (SEQ ID NO:73;环Dicer 2为粗体,环网格蛋白小
窝加下划线)

[0434] MV-RNA 854/947:

[0435]

UUGUAUUUCUGACCACCUCGAAUG**GGAU**CUUAU**UCAUUCGAGG**
UGCCGU**AUGUUGAUCAAGAAACUCAACA**UACGGUACAGAAAUACA
AUU (SEQ ID NO:74;环Dicer 1和环Dicer 2为粗体)

[0436] MV-RNA 1165/1317:

[0437]

CAGAUGAAUCC**CUGGGUGGUUGCCUCAAGAAACGGCAAUCAUC**
CGUUCGGUUUCCUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGAUGGAA
ACCGAACGGAUUCAUCUGUU (SEQ ID NO:75;环Dicer 1为粗体,环网格蛋白小
窝加下划线)

[0438] HPPD_二价体:

[0439] MV-RNA 492/984:

[0440]

UAAUAUGAUGAAAGUAUGCCAUAUAGAUCAAAAACUCUAAUGGCAUAGGCUGGUGUACAUCCUCUAUCCGUUCUAA
ACGCUUUAUGAUUGUACACCAGCCCCUUAUUAUGUUUU (SEQ ID NO:76;环网格蛋白小窝加下划线)

[0441] *用作颗粒的开放T7转录物起始和闭合序列的“655/1089”。

[0442] 组成纳米颗粒的各个三价MV-RNA:

[0443] MV-RNA792/949/1156:

[0444]

GGAGUAGCCAUGAGAAGUGCAGAUUCAAGAAACA**UUUGUAUU**
UCUGACCACCUAGGGUU<此处的分割序列指示纳米颗粒的5’“开放”和3’“闭合”序
列>**CCCUGGGUGUCCAGUGGCUGUCCUU** (SEQ ID NO:77;环Dicer 1为粗体)

[0445] MV-RNA 263/1112/1521:

[0446]

GUCCGGGAAGGUUUUAAGGGGGUCUCUCAAGAAAC**GAGAUCUC**
UUUGAUGGGUUGUAAGGUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUG
AUACCUUGCAACCCAUCUUCUCGGGCUU (SEQ ID NO:78;环Dicer 1为粗体,
环网格蛋白小窝加下划线)

[0447] MV-RNA 1365/1146/1490:

[0448]

AGAUCCUUCCUCAACUGUUGCUGGAUCAAGAAAC**UCCAGUAAC**
AGUUACACUAUUCUUGGUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGA
UUCAAGGAUAGUGACGGGGAGGGAUCUUU (SEQ ID NO:79;环Dicer 1为粗
体,环网格蛋白小窝加下划线)

[0449] MV-RNA 370/586/958:

[0450]

CAUCACUAUACAGCAAGUUGUGUGCUCAAGAAAC**GCACAUAAC**
UUGAAUUUCCUGGAGUUCAUAGAGAU**UCCAGGAGAUUUGUAUGGU**
GAUGUU (SEQ ID NO:80;环Dicer 1和环Dicer 3为粗体)

[0451] *用作颗粒的开放T7转录物起始和闭合序列的“792/949/1156”。

[0452] PDS三价体:

[0453] MV-RNA 544/1496/1340:

[0454]

GAUAGCCUGUGCACAAAGCUUCAAGGUCAAGAAAC**CCCUUGGAG**
UUUUGACGUUAAAUGGUAUCAAGAAAC**UGCCAUUUAAUGGUGCAG**
GCUGUCUU (SEQ ID NO:81;环Dicer 1为粗体)

[0455] MV-RNA 84/294/538:

[0456]

UCUUUGCUUUGCUCCAUA AACUUAUAUCAAGAAACUAUGGGUU
UGUGACCUGCAUCAUUA AUUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUG
AUUUAAUGGUGCAGGCAGGGUAAAGGUU (SEQ ID NO:82;环Dicer 1为粗体,
环网格蛋白小窝加下划线)

[0457] MV-RNA 93/512/503:

[0458]

CGACUGAAUUCACCGGGAAUGGGCACUCAAGAAACGUGCCCAU
UUCUUUGCUUUGAUUUUCAAGAAACAAAUCAAAAGCGACUGAAUUC
AGUCGUU (SEQ ID NO:83;环Dicer 1为粗体)

[0459] MV-RNA 1185/423/971:

[0460]

CAGCUUCAAGAUGUCAUGCUGGGAUUCAAGAAACAUUCCAGCA
UGGAUCUAUUUGGAGAAUCCUCUAUCCGUUCUAAACGCUUUAUGA
UUUCUCCAAAUAGAUUUUGGAGCUGUU (SEQ ID NO:84;环Dicer 1为粗体,环
网格蛋白小窝加下划线)

[0461] 用于靶向长芒苋八氢番茄红素去饱和酶的局部植物应用的具有网格蛋白-小窝内吞作用信号的TRI多核苷酸纳米颗粒

[0462] PA_pds_TRI DNA模板:

[0463]

*AATTAATACGACTCACTATAGGGTCATATGTATTCTTTAATTGGATCTT
ATTAATTAAGAAGAAGCACAAAGATcATATAAGGATGAACTTGGTATCA*

[0464]

*AGAAACTACCAAGTTCTCAAATAGATTTTTCCTCTATCCGTTCTAAAC
GCTTTATGATGGATCTATTTGGATCCTTATATTcTAGATGGTCATATGTATT
CTTTTCAAGAAACAAAGAATATATGTAGCCCAGTCTCATCTTCCTCTAT
CCGTTCTAAACGCTTTATGATCTGAGACTGGGCTATGACCATCTATcTCT
TGTGCTTCAACATATGACCT* (SEQ ID NO:85;环Dicer 1和环Dicer 2为粗体,环网
格蛋白小窝加下划线)

[0465] 显示二级结构的共折叠输出 (折叠符号):

[0466] ((((((((((..(((((((((((.....)))))))))))).(((((((((((..(((((((((((
(((((((((((.....)))))))))))).(((((((((((..(((((((((((
(((.....))).....))..))))))))))..))))))))))..(((((((((((
(((((((((((.....)))))))))))).(((((((((((..(((((((((((
(((.....))).....))..))))))))))..))))))))))..))))))))))..))))))))))..

[0467] 作为生物除草剂的用于靶向长芒苋PDS、EPSPS和HPPD的局部植物应用的具有网格蛋白-小窝内吞作用信号的TRI多核苷酸纳米颗粒

- [0517] 33.Johnson等人J Gen Virol 19:263-273(1973)
- [0518] 34.Jung等人ACS Nano 5:1243-1252(2011)
- [0519] 35.Kim RNA 13:289-294(2007)
- [0520] 36.Kobayashi&Ehara Ann Phytopathol Soc Jpn 61:99-102(1995)
- [0521] 37.Kroll等人Proc Natl Acad Sci USA 96:13650-13655(1999)
- [0522] 38.Lamontagne J Biol Chem 279:2231-2241(2004)
- [0523] 39.Lavelle等人J Phys Chem B 113:3813-3820(2009)
- [0524] 40.Logan&Shenk Proc Natl Acad Sci USA 81:3655-3659(1984)
- [0525] 41.Lustig等人J Virol 62:2329-2336(1988)
- [0526] 42.Macrae等人Science 311:195-8(2006)
- [0527] 43.Mascotti&Lohman Proc Natl Acad Sci USA 87:3142-3146(1990)
- [0528] 44.Meister&Tuschl Nature 431:343-9(2004)
- [0529] 45.Nugent等人J Virol 73:427-435(1997)
- [0530] 46.Obenauer-Kutner等人Hum Gene Ther 13:1687-1696(2002)
- [0531] 47.Perriman&Ares RNA 4:1047-1054(1998)
- [0532] 48.Pfeifer等人Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 276:99-107(1976)
- [0533] 49.Porterfield等人J Virol 84:7174-7184(2010)
- [0534] 50.Prinsen等人J Phys Chem B 114:5522-5533(2010)
- [0535] 51.Qu&Morris J Virol 71:1428-1435(1997)
- [0536] 52.Rao Annu Rev Phytopathol 44:61-87(2006)
- [0537] 53.Sambrook等人Molecular cloning:a laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(1989)
- [0538] 54.Sidahmed&Bruce Methods Mol Biol 623:3-19(2010)
- [0539] 55.Sikkema等人Org Biomol Chem 5:54-57(2007)
- [0540] 56.Song等人Nat Struct Biol 10:1026-32(2003)
- [0541] 57.Sorger等人J Mol Biol 191:639-658(1986)
- [0542] 58.Speir等人Structure 3:63-78(1995)
- [0543] 59.Sun等人Proc Natl Acad Sci USA 104:1354-1359(2007)
- [0544] 60.Tang等人J Struct Biol 154:59-67(2006)
- [0545] 61.Turner等人Insect Mol Biol 15:383-391(2006)
- [0546] 62.van der Graaf等人Biochem 3:9177-9182(1992)
- [0547] 63.Venter等人J Virol 79:6239-6248(2005)
- [0548] 64.Verduin&Bancroft Virology 37:501-506(1969)
- [0549] 65.Yoffe等人Proc Natl Acad Sci USA 105:16153-16158(2008)
- [0550] 66.Zandi&van der Schoot Biophys J.96:9-20(2009)
- [0551] 67.Zhang等人Virology 279:471-477(2001)
- [0552] 68.Zlotnick等人Virology 277:450-456(2000)
- [0553] SEQ ID NO:89:AKT(X61037关于蛋白激酶B的智人(H.sapiens)mRNA) :
- [0554] ATGAAGACGGAGCGGCCCGGCCCAACACCTTCATCATCCGCTGCCTGCAGTGGACCACTGTCATCGAA

CGCACCTTCCATGTGGAGACTCCTGAGGAGCGGGAGGAGTGGACAACCGCCATCCAGACTGTGGCCGACGGCCTCAA
 GAAGCAGGAGGAGGAGGAGATGGACTTCCGGTCGGGCTACCCAGCGACAACCTCAGGGGCCGAAGAGATGGAGGTGT
 CCCTGGCCAAGCCCAAGCACCGCGTGACCATGAACGAGTTTGAGTACCTGAAGCTGCTGGGCAAGGGCACTTTCGGC
 AAGGTGATCCTGGTGAAGGAGAAGGCCACAGCGTACTACGCCATGAAGATCCTCAAGAAGGAAGTCATCGTGGCCAA
 GGACGAGGTGGCCACACACTCACCGAGAACCGCGTCCAGCAGAACTCCAGGCACCCCTTCTCACTCGCCTGAAGT
 ACTCTTTCAGACCCACGACCGCCTCTGCTTTGTCATGGAGTACGCCAACGGGGGCGAGCTGTTCTCCACCTGTCC
 CGGGAGCGTGTGTTTCGCCGAGGACCGGGCCCGCTTCTATGGCGCTGAGATTGTGTCAGCCCTGGACTACCTGCACCTC
 GGAGAAGAACGTGGTGTACCGGGACCTCAAGCTGGAGAACCTCATGCTGGACAAGGACGGGCACATTAAGATCACAG
 ACTTCGGGCTGTGCAAGGAGGGGATCAAGGACGGTGCACCATGAAGACCTTTTGGCGCACACCTGAGTACCTGGCC
 CCCGAGGTGCTGGAGGACAATGACTACGGCCGTGCAGTGGACTGGTGGGGGCTGGGCGTGGTCATGTACGAGATGAT
 GTGCGGTGCGCTGCCCTTCTACAACCAGGACCATGAGAAGCTTTTGTAGCTCATCCTCATGGAGGAGATCCGCTTCC
 CGCGCACGCTTGGTCCCAGGCCAAGTCCTTGCTTTCAGGGCTGCTCAAGAAGGACCCCAAGCAGAGGCTTGGCGGG
 GGCTCCGAGGACGCCAAGGAGATCATGCAGCATCGCTTCTTACCGGTATCGTGTGGCAGCACGTGTACGAGAAGAA
 GCTCAGCCCACCTTCAAGCCCCAGGTACGTCGGAGACTGACACCAGGTATTTTGTATGAGGAGTTCACGGCCCAGA
 TGATCACCATCACACCACCTGACCAAGATGACAGCATGGAGTGTGTGGACAGCGAGCGCAGGCCCACTTCCCCAG
 TTCTCCTACTCGCCAGCGCGACGGCCTGA

[0555] SEQ ID NO:90:MAP3K (NM_005921 智人促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶1, E3泛素
 蛋白连接酶 (MAP3K1), mRNA):

[0556] CACCAGAAACCAAGTTGGAACATAATTCTTTCTTTCGGAAGGTGCAACTCCCCTCCCGGAGCTCCGCG
 GTGCCGGGCCGAGATTGCCGAGAGGAAGCGGCGCAGCGCTGCCCAAGGCTCCTCCTGTCGCCGGTGCAGCCGGGA
 CTACCTGGCGGGCGCGGCGGTGCAGCGCGCAGAGTCCCGGGAGCCCACGCCTCCGCCTCCGCCCCGCCCCCTCCGC
 CTCCCAGTCCACCTCGCCCCCGCCCTCTCGCCCGGGAGAGCACAGCCCCTCCCTCCACCTGCGGCCGCGGG
 GCGGCCCTCCACCCACACCTCTGCCGAGGCCGAGCCAGTGCGCCCGCCGTCCGTCAGTCCAGGCCAGGCGCCCC
 GCGGGCCGCGCTCACGCAGTTGGCGCAGGAGGCCCTTACGCTGGCGGGCAGTGCCCCCCCCCTGCGCTCTCCCCGC
 CCCTCCCTCCCTCGCAGGGCCGAGCGAATGTAGCCCGGAGAGAAAATGGCGGCGGCGGGGAATCGCGCCTCG
 TCGTCCGGATTCCCGGGCGCCAGGGCTACGAGCCCTGAGGCAGGCGGCGGAGGAGCCCTCAAGGCGAGCAGCGC
 GCCCGCGGCTGCCGCGGACTGCTGCGGGAGGCGGCAGCGGGGCGCGAGCGGGCGGACTGGCGGCGGCGGCAGC
 TGCGCAAAGTGCAGGAGTGTGGAGCTGGACCAGTGCCTGAGCAGCCGCTTCTCCTTGCCGCTCACCGCCGGCCTCC
 TCGACTTCCCCGTGCCGAGCCCGCGGACGACGCGGGGAGTGGGACCGGCTTCCAGCCTGTGGCGGTGCCGCCGCC
 CCACGGAGCCGCGAGCCGCGGCGGCCACCTTACCGAGTCGGTGGCGGCGCCGACAGCGGCGCCTCGAGTCCCG
 CAGCGGCCGAGCCCGGGGAGAAGCGGGCGCCCGCCGAGCCGCTCCTGCAGCGGCCCGCCGTCGTGAGATG
 GAGAATAAAGAAACTCTCAAAGGGTTGCACAAGATGGATGATCGTCCAGAGGAACGAATGATCAGGGAGAAACTGAA
 GGCAACCTGTATGCCAGCCTGGAAGCACGAATGGTTGGAAAGGAGAAATAGGCGAGGGCCTGTGGTGGTAAAACCA
 TCCCAGTTAAAGGAGATGGATCTGAAATGAATCACTTAGCAGCTGAGTCTCCAGGAGAGGTCCAGGCAAGTGCGGCT
 TCACCAGCTTCAAAGGCCGACGAGTCTTCTCCTGGCAACTCCCCATCAGGTCGCACAGTGAATCAGAATCTCC
 AGGAGTAAGGAGAAAAAGAGTTTCCCAGTGCCTTTTCAGAGTGGCAGAATCACACCACCCCGAAGAGCCCCTTAC
 CAGATGGCTTCTACCATATAGCCCTGAGGAAACAAACCGCCGTGTTAACAAAGTATGCGGGCCAGACTGTACTTA
 CTGCAGCAGATAGGGCTAACTCTTTCCTGATTGGAGGAGACAGCCAGACAATAAATACCGGTGTTTATTGGGCC
 TCAGAACTGCAGCTGTGCAGTGAACATTCTGTATTCATCTGCTATTTGTGATGCTCCGGGTGTTTCAACTAGAAC

CTTCAGACCCAATGTTATGGAGAAAACTTTAAAGAATTTTGAGGTTGAGAGTTTGTCCAGAAATATCACAGTAGG
CGTAGCTCAAGGATCAAAGCTCCATCTCGTAACACCATCCAGAAGTTGTTTCACGCATGTCAAATTCTCATACATT
GTCATCATCTAGTACTTCTACGTCTAGTTCAGAAAACAGCATAAAGGATGAAGAGGAACAGATGTGTCTATTTGCT
TGTTGGGCATGCTTGATGAAGAAAAGTCTTACAGTGTGTGAAGACGGCTGCAGGAACAAGCTGCACCACCCTGCATG
TCAATTTGGGCAGAAGAGTGTAGAAGAAAATAGAGAACCCTTAAATATGTCCCCTTTGTAGATCTAAGTGGAGATCTCA
TGATTTCTACAGCCACGAGTTGTCAAGTCTGTGGATTCCCCTTCTCCCCTCAGAGCTGCACAGCAGCAAACCGTAC
AGCAGCAGCCTTTGGCTGGATCACGAAGGAATCAAGAGAGCAATTTTAAACCTTACTCATTATGGAACCTCAGCAAATC
CCTCCTGCTTACAAAGATTTAGCTGAGCCATGGATTCAGGTGTTTGGAAATGGAACCTCGTTGGCTGCTTATTTTCTAG
AAACTGGAATGTGAGAGAGATGGCCCTCAGGCGTCTTCCCATGATGTCAGTGGGGCCCTGCTGTTGGCAAATGGGG
AGAGCACTGGAAATTTCTGGGGCAGCAGTGGAAAGCAGCCGAGTGGGGGAGCCACCAGTGGGTCTTCCCAGACCAGT
ATCTCAGGAGATGTGGTGGAGGCATGCTGCAGCGTTCTGTCAATGGTCTGTGCTGACCCTGTCTACAAAGTGTACGT
TGCTGCTTTAAAAACATTGAGAGCCATGCTGGTATATACTCCTTGCCACAGTTTAGCGAAAGAATCAAACCTCAGA
GACTTCTCCAGCCAGTTGTAGACACCATCCTAGTCAAATGTGCAGATGCCAATAGCCGCACAAGTCAGCTGTCCATA
TCAACACTGTTGGAACCTGTGCAAAGGCCAAGCAGGAGAGTTGGCAGTTGGCAGAGAAATACTAAAAGCTGGATCCAT
TGGTATTGGTGGTGGTATTATGTCTTAAATTTGATTTCTTGGAAACCAAACCTGAATCAAACAATTGGCAAGAACTTC
TTGGCCGCTTTGTCTTATAGATAGACTGTTGTTGGAATTTCTGCTGAATTTTATCCTCATATTGTGAGTACTGAT
GTTTCACAAGCTGAGCCTGTTGAAATCAGGTATAAGAAGCTGCTGTCCCTTTAACCTTTGCTTTGCAGTCCATTGA
TAATTTCCCACTCAATGGTTGGCAAACCTTTCCAGAAGGATCTACTTGAGTTCTGCAAGAATGGTTACTACAGTACCCC
ATGTGTTTTTCAAACCTGTTAGAAATGCTGAGTGTTCAGTTCCACTCACTTCACCAGGATGCGTCGCCGTTTGATG
GCTATTGCAGATGAGGTGGAAATTGCCGAAGCCATCCAGTTGGGCGTAGAAGACACTTTGGATGGTCAACAGGACAG
CTTCTTGCAGGCATCTGTTCCCAACAACCTATCTGAAACCACAGAGAACAGTTCCCCTGAGTGCACAGTCCATTTAG
AGAAAACCTGGAAAAGGATTATGTGCTACAAAATTTGAGTGCCAGTTCAGAGGACATTTCTGAGAGACTGGCCAGCATT
TCAGTAGGACCTTCTAGTTCAACAACAACAACAACAACAACAGAGCAACCAAAGCCAATGGTTCAAACAAAAGG
CAGACCCACAGTCAGTGTGTTGAACTCCTCTCCTTTATCTCATCATTCCCAATTAATGTTTCCAGCCTTGTCACCC
CTTCTTCTTCTACCCCATCTGTACCAGCTGGCACTGCAACAGATGCTCTAAGCATAGACTTCAGGGATTCATTCCC
TGCAGAATACCTTCTGCATCTCCTCAAACACAGCGCAAGTTTTCTCTACAATTCCACAGAACTGTCTGAAAACAA
AGACTCAGATAAACTTTCCCAGTCTTTACTCAGTCAAGACCCTTGCCCTCCAGTAACATACACAGGCCAAAGCCAT
CTAGACCTACCCAGGTAATACAAGTAAACAGGGAGATCCCTCAAAAAATAGCATGACACTTGATCTGAACAGTAGT
TCCAAATGTGATGACAGCTTTGGCTGTAGCAGCAATAGTAGTAATGCTGTTATACCCAGTGACGAGACAGTGTTCAC
CCCAGTAGAGGAGAAATGCAGATTAGATGTCAATACAGAGCTCAACTCCAGTATTGAGGACCTTCTGAAAGCATCTA
TGCCTTCAAGTGATACAAACAGTAACTTTTAAAGTCAGAAGTTGCTGTCTCCTGAAAAGGCTGAAAATGATGAT
ACCTACAAAGATGATGTGAATCATAATCAAAAAGTGCAAAGAGAAGATGGAAGCTGAAGAAGAAGAAGCTTTAGCAAT
TGCCATGGCAATGTCAGCGTCTCAGGATGCCCTCCCCATAGTTCCCTCAGCTGCAGGTTGAAAATGGAGAAGATATCA
TCATTATTCAACAGGATACACCAGAGACTCTACCAGGACATACCAAAGCAAACAACCGTATAGAGAAGACACTGAA
TGGCTGAAAGGTCAACAGATAGGCCCTTGAGCATTCTTCTTGTATCAGGCTCAAGATGTGGGAACTGGAACCTT
AATGGCTGTTAAACAGGTGACTTATGTGAGAAACACATCTTCTGAGCAAGAAGAAGTAGTAGAAGCACTAAGAGAAG
AGATAAGAATGATGAGCCATCTGAATCATCAAACATCATTAGGATGTTGGGAGCCACGTGTGAGAAGAGCAATTAC
AATCTCTTCAATTGAATGGATGGCAGGGGGATCGGTGGCTCATTGCTGAGTAAATATGGAGCCTTCAAAGAATCAGT
AGTTATTAACACTAACTGAACAGTTACTCCGTGGCCTTTCGTATCTCCATGAAAACCAAATCATTACAGAGATGTCA

AAGGTGCCAATTTGCTAATTGACAGCACTGGTCAGAGACTAAGAATTGCAGATTTTGGAGCTGCAGCCAGGTTGGCA
TCAAAAGGAACTGGTGCAGGAGAGTTTCAGGGACAATTACTGGGGACAATTGCATTTATGGCACCTGAGGTTACTAAG
AGGTCAACAGTATGGAAGGAGCTGTGATGTATGGAGTGTGGCTGTGCTATTATAGAAATGGCTTGTGCAAAACCAC
CATGGAATGCAGAAAAACACTCCAATCATCTTGCTTTGATATTTAAGATTGCTAGTGCAACTACTGCTCCATCGATC
CCTTCACATTTGTCTCCTGGTTTACGAGATGTGGCTCTTCGTTGTTTAGAACTTCAACCTCAGGACAGACCTCCATC
AAGAGAGCTACTGAAGCATCCAGTCTTTCGTACTIONACATGGTAGCCAATTATGCAGATCAACTACAGTAGAAACAGGA
TGCTCAACAAGAGAAAAAACTTGTGGGGAACCACATTGATATTCTACTGGCCATGATGCCACTGAACAGCTATGA
ACGAGGCCAGTGGGGAACCCTTACCTAAGTATGTGATTGACAAATCATGATCTGTACCTAAGCTCAGTATGCAAAAG
CCCAAAGTGTGCAGAACTGTAACTGTGCCTTTCAAAGAACTGGCCCTAGGTGAACAGGAAAACAATGAAGTTTG
CATGACTAAATTGCAGAAGCATAATTTTATTTTTTTGGAGCACTTTTTCAGCAATATTAGCGGCTGAGGGGCTCAGG
ATCTATTTTAAATATTTCAATTATTCTTCCATTTTATATAGTGATCACAAGCAGGGGGTTCTGCAATTCCGTTCAAAT
TTTTTGTCACTGGCTATAAAATCAGTATCTGCCTCTTTTAGGTCAGAGTATGCTATGAGTAGCAATACATACATATA
TTTTTAAAGTTGATACTTCTTTATGACCCACAGTTGACCTTTATTTTCTTAAATACCAGGGCAGTTGTGGCTCATT
GTGCATTTTACTGTTGGCCATTCAATTCGTTTTTGGAAATTATGGTTTTGTATTTTCATGTTTATTTACATTCATT
TTTGTATTTACAGGGAAAGCTGATCTTTTTTCAAACCAGAAAAAAATGAAGTATGAAAGTAGAGTTTCAAT
AAATATCTTGCTATTGTCAGAGTTTTTAAATATAGACTTAATTTTGTTTTTTAAATTGGAATACAATAAAGTACT
ACCTACATTTGAGTCAGTCACCCTCTTATTGTGCAGGTTAAGTACAAGTAACTAAAAATAAAGTGTCTCTCTGG
TGCAACTCACAACCAAGATCAAGATTACCTTAAATTTATTTGAATTTTTTAGATGTTTTGGTTGTCAAAGTGTAGG
AAACTCACAACATTTAAGTCTTACTCTGTATGTAACAATCCATCATTACCTTCACTACTGGTAGTAACATAGAGC
TGCCATTTTCTTTTACCATGCATCATCTCTTACAGTAGGCCTGGCAGATCATTTTTTAAAAAGATTATTCAACTA
CCAATCAGTAATGTTTTTAAACAGTACATTTGCTTTGAACTTGAAAAATGTGTTTCAGAAAGAAAAATGGAATTGAAT
TTCATTTATACTAATTCCTTGGATTTTGCACAGTTACCTAACGGTTTTAGTCTGGAGTTAAATTCAGATGCATGG
AATCCTGAAGGAAAATGGTAGCTTTTTAATCTTTTTGTGTGTGTGTGAGTCTTTTAAATCAAGTACTGATTAAGTAT
TAAGTACAAGTTTGTAGATTTTAGTTTTAACTCTTCAGAAGCCAGTGTGAAATAGAATTGGTTATTCTCAAAGACTCA
GGATAAAGTAAATAAGCTATATATAGAGTACATTTAAATGTACAACACAAATGGAATAAATAAAGTTACAAGAT
AAGTTTACAGGGATATATTGCTTACAATTTTTAAAAGGCAGTTTGTTTTTTATGTGAATATGTTTCTTAGTGAAATT
TTACATTCCTTTGTTTTGGAAGATTGGCGATATTTGAAGAGTTAAAAATAGTACAGAAATGTGAAGTTTGGTATCTC
TAAATGTGTTGACTTGACTTTCTTTTTATTTGTTTTTTTTTTTTTTTTGACTACTTAGAATTTTACAATTTCTAA
TAAGATTGTTTCCAAGTCTCTCATGTGCAAGCTTTAAAGGATGCACTCTTGCCATTTTATGTACTGGAAGATCATTG
GTCAGATGAATACTGTGTCTGACAAAAATGTAACTGTATAAACTGAGGAACCTCAGCTAATCAGTATTACTTTGTA
GATCACCATGCCACCACATTTCAAAGTCAAAGTATCTGTAGATTTCAAATCCATTGTGTTGAGTTTGTGTTGCAG
TTCCCTCAGCTTGCTGGTAATTGTGGTGTGTTTTGTTTTTGTGTTTTTCAATGCAAATGTGATGTAATATTCTTAT
TTTCTTTGGATCAAAGCTGGACTGGAAATTGTATCGTGTAATTATTTTTGTGTTCTTAATGTTATTTGGTACTCAAG
TTGTAATAACGTCTACTACTGTTTATTCCAGTTTCTACTACCTCAGGTGTCCTATAGATTTTTCTTCTACCAAAGT
TCACTTTACAATGAAATTATATTTGCTGTGTGACTATGATTCCTAAGATTTCCAGGGCTTAAGGGCTAACTTCTAT
TAGCACCTTACTGTGTAAGCAAATGTTACAAAAAATCTCTGGGTTAAGAAAATTTGGCTTAAATG
TATCCTTTGTTATTTTAAATATATTGAGATATTTAATTTAAATTTTTACCCATTGAACCGATTTTATAGTATTTG
TACCTATTTTGGTGTGTTTTGTCTTTATAGTAAATAAAAGTTTTTGAACAAAAA

[0557] SEQ ID NO:91:PLK1 (NM_005030 智人 polo 样激酶1) :

[0558] GAGCGGTGCGGAGGCTCTGCTCGGATCGAGGTCTGCAGCGCAGCTTCGGGAGCATGAGTGCTGCAGTGA
 CTGCAGGGAAGCTGGCACGGGCACCGGCCGACCCCTGGGAAAAGCCGGGTCCCCGAGTTGCAGCTCCCGAGCTCCG
 GCGGCGGCTCCACCGCGAAAAGAGATCCCGGAGGTCCTAGTGACCCACGCAGCCGGCGGCGCTATGTGCGGGGCCG
 CTTTTTGGGCAAGGGCGGCTTTGCCAAGTGCTTCGAGATCTCGGACGCGGACACCAAGGAGGTGTTGCGGGCAAGA
 TTGTGCCTAAGTCTCTGCTGCTCAAGCCGCACCAGAGGGAGAAGATGTCCATGGAATATCCATTACCGCAGCCTC
 GCCCACCAGCACGTCGTAGGATTCCACGGCTTTTTCGAGGACAACGACTTCGTGTTGTTGGTGTGGAGCTCTGCCG
 CCGGAGGTCTCTCCTGGAGCTGCACAAGAGGAGGAAAAGCCCTGACTGAGCCTGAGGCCGATACTACCTACGGCAAA
 TTGTGCTTGGGTGCCAGTACCTGCACCGAAAACCGAGTTATTCATCGAGACCTCAAGCTGGGCAACCTTTTCCTGAAT
 GAAGATCTGGAGGTGAAAATAGGGGATTTTGGACTGGCAACCAAAGTGAATATGACGGGGAGAGGAAGAAGACCCT
 GTGTGGGACTCCTAATTACATAGCTCCCGAGGTGCTGAGCAAGAAAGGGCACAGTTTCGAGGTGGATGTGTGGTCCA
 TTGGGTGTATCATGTATACCTTGTAGTGGGCAAACCACCTTTTGGACTTCTTGCCTAAAAGAGACCTACCTCCGG
 ATCAAGAAGAATGAATACAGTATCCCAAGCACATCAACCCCGTGGCCGCTCCCTCATCCAGAAGATGCTTCAGAC
 AGATCCCCTGCCCCCAACCATTAACGAGCTGCTTAATGACGAGTCTTTACTTCTGGCTATATCCCTGCCCGTC
 TCCCCATCACCTGCCTGACCATTCCACCAAGGTTTTCGATTGCTCCCAGCAGCCTGGACCCAGCAACCGGAAGCCC
 CTCACAGTCTCAATAAAGGCTTGGAGAACCCCTGCCTGAGCGTCCCCGGGAAAAAGAAGAACAGTGGTTCGAGA
 GACAGGTGAGGTGGTTCGACTGCCACCTCAGTGACATGCTGCAGCAGCTGCACAGTGTCAATGCCTCCAAGCCCTCGG
 AGCGTGGGCTGGTCAGGCAAGAGGAGGCTGAGGATCTGCCTGCATCCCCATCTTCTGGGTGAGCAAGTGGGTGGAC
 TATTCGGACAAGTACGGCCTTGGGTATCAGCTCTGTGATAACAGCGTGGGGTGTCTTCAATGACTCAACACGCCT
 CATCTCTACAATGATGGTGACAGCCTGCAGTACATAGAGCGTGACGGCACTGAGTCTACCTACCGTGAGTTCCT
 ATCCCAACTCCTTGATGAAGAAGATCACCTCCTTAAATATTTCCGCAATTACATGAGCGAGCACTTGCTGAAGGCA
 GGTGCCAACATCACGCCGCGGAAGGTGATGAGCTCGCCGGCTGCCCTACCTACGGACCTGGTTCCGCACCCGAG
 CGCCATCATCTGCACCTCAGCAACGGCAGCGTGCAGATCAACTTCTTCCAGGATCACACCAAGCTCATCTTGTGCC
 CACTGATGGCAGCCGTGACCTACATCGACGAGAAGCGGGACTTCCGCACATACCGCCTGAGTCTCCTGGAGGAGTAC
 GGCTGCTGCAAGGAGCTGGCCAGCCGGCTCCGCTACGCCGCACTATGGTGGACAAGCTGCTGAGCTCAGCTCGGC
 CAGCAACCGTCTCAAGGCTCCTAATAGCTGCCCTCCCTCCGGACTGGTGCCCTCCTCACTCCCACCTGCATCTGG
 GGCCATACTGGTTGGCTCCCGCGGTGCCATGTCTGCAGTGTGCCCCCAGCCCCGGTGGCTGGGCAGAGCTGCATC
 ATCCTTGAGGTGGGGTTGCTGTGTAAGTTATTTTGTACATGTTCCGGTGTGGGTCTACAGCCTTGTCCCCCTC
 CCCCTCAACCCACCATATGAATTGTACAGAATATTTCTATTGAATTCGGAAGTGTCTTTTCTTGGCTTTATGCAC
 ATTAACAGATGTGAATATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0559] SEQ ID NO:92:雄激素受体变体1 (NM_000044.3智人雄激素受体 (AR), 转录物变体 1) :

[0560] CGAGATCCCGGGGAGCCAGCTTGCTGGGAGAGCGGGACGGTCCGGAGCAAGCCCAGAGGCAGAGGAGGC
 GACAGAGGGAAGGGCCGAGCTAGCCGCTCCAGTGCTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCACGCCAGCCCCAGC
 CCGGCTCCAGCGACAGCCAACGCCTCTTGACAGCGGCGGCTTCGAAGCCGCCCGGAGCTGCCCTTTCCTCTTC
 GGTGAAGTTTTTAAAAGCTGCTAAAGACTCGGAGGAAGCAAGGAAAGTGCCTGGTAGGACTGACGGCTGCCTTTGTC
 CTCCTCTCTCACCCCGCCTCCCCCACCCTGCCTTCCCCCTCCCCGCTTCTCTCCCCGAGCTGCCTCAGTC
 GGCTACTCTCAGCAACCCCTCACCACCTTCTCCCCACCCGCCCCCGCCCCGTCGGCCAGCGCTGCCAGC
 CCGAGTTTGCAGAGAGGTAAGTCCCTTTGGCTGCGAGCGGGCGAGCTAGCTGCACATTGCAAAGAAGGCTCTTAGGA
 GCCAGGCGACTGGGAGCGGCTTCAGCACTGCAGCCACGACCCGCTGGTTAGGCTGCACGCGGAGAGAACCCTCTG

ATGAACTACATCAAGGAACTCGATCGTATCATTGCATGCAAAAAGAAAAATCCCACATCCTGCTCAAGACGCTTCTA
 CCAGCTCACCAAGCTCCTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCACCTTTTGACCTGCTAATCA
 AGTCACACATGGTGAGCGTGGACTTTCGGAAAATGATGGCAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCT
 GGGAAAGTCAAGCCCATCTATTTCCACACCCAGTGAAGCATGGAAAACCCTATTTCCCCACCCCAGCTCATGCCCC
 TTTTCAGATGTCTTCTGCCTGTTATAACTCTGCACTACTCCTCTGCAGTGCCTTGGGGAATTTCTCTATTGATGTAC
 AGTCTGTGCATGAACATGTTCTGAATTCTATTTGCTGGGCTTTTTTTTTCTCTTTCTCTCCTTTCTTTTTCTTCTTC
 CCTCCCTATCTAACCTCCCATGGCACCTTCACTTTGCTTCCCATTGTGGCTCCTATCTGTGTTTTGAATGGTGT
 TGTATGCCTTTAAATCTGTGATGATCCTCATATGGCCCAGTGTCAAGTTGTGCTTGTTTACAGCACTACTCTGTGCC
 AGCCACACAAAACGTTTACTTATCTTATGCCACGGGAAGTTTAGAGAGCTAAGATTATCTGGGGAAATCAAAAACAAAA
 ACAAGCAAAACAAAAAAAAAAGCAAAAAACAAAAACAAAAATAAGCCAAAAACCTTGCTAGTGTTTTTTCTCATAAAA
 AATAATAATAATAATAATAATACGTACATACATACACACATACATAACAAATATAGAAATCCCCAAAGAGGCCAA
 TAGTGACGAGAAGGTGAAAATTGCAGGCCATGGGGAGTTACTGATTTTTTCATCTCCTCCCTCCACGGGAGACTTT
 ATTTTCTGCCAATGGCTATTGCCATTAGAGGGCAGAGTGACCCAGAGCTGAGTTGGGCAGGGGGGTGGACAGAGAG
 GAGAGGACAAGGAGGGCAATGGAGCATCAGTACCTGCCACAGCCTTGGTCCCTGGGGGTAGACTGCTCAACTGTG
 GAGCAATTCATTATACTGAAAATGTGCTTGTGTTGAAAATTTGTCTGCATGTTAATGCCTCACCCCAAAACCCTTT
 TCTCTCTCACTCTCTGCCTCCAACCTCAGATTGACTTTCAATAGTTTTTCTAAGACCTTTGAACTGAATGTTCTCTT
 CAGCCAAAACCTTGGCGACTTCCACAGAAAAGTCTGACCACTGAGAAGAAGGAGAGCAGAGATTTAACCTTTGTAAG
 GCCCCATTTGGATCCAGGTCTGCTTTCTCATGTGTGAGTCAGGGAGGAGCTGGAGCCAGAGGAGAAGAAAATGATAG
 CTTGGCTGTTTCTCCTGCTTAGGACACTGACTGAATAGTTAAACTCTCACTGCCACTACCTTTTCCCCACCTTTAAAA
 GACCTGAATGAAGTTTTCTGCCAAACTCCGTGAAGCCACAAGCACCTTATGTCCTCCCTCAGTGTTTTGTGGGCCT
 GAATTTTCATCACACTGCATTTTCAGCCATGGTTCATCAAGCCTGTTTGCTTCTTTGGGCATGTTTACAGATTCTCTGT
 TAAGAGCCCCACCACCAAGAAGGTTAGCAGGCCAACAGCTCTGACATCTATCTGTAGATGCCAGTAGTCACAAAGA
 TTTCTTACCAACTCTCAGATCGCTGGAGCCCTTAGACAACTGAAAAGAAGGCATCAAAGGGATCAGGCAAGCTGGG
 CGTCTTGCCCTTGTCCCCCAGAGATGATACCCTCCCAGCAAGTGGAGAAGTTCTCACTTCTTTTAGAGCAGCTA
 AAGGGGCTACCCAGATCAGGGTTGAAGAGAAAACCTCAATTACCAGGGTGGGAAGAATGAAGGCACTAGAACCAGAAA
 CCCTGCAAAATGCTCTTCTTGTCAACCAGCATATCCACCTGCAGAAGTCATGAGAAGAGAGAAGGAACAAAGAGGAGA
 CTCTGACTACTGAATTAATACTTTCAGCGGCAAAGCCTAAAGCCAGATGGACACCATCTGGTGAGTTTACTCATCAT
 CCTCCTCTGCTGTGATTCTGGGCTCTGACATTGCCATACTCACTCAGATTTCCCCACCTTTGTTGCTGCCTCTTAG
 TCAGAGGGAGGCCAAACCATTGAGACTTTCTACAGAACCATGGCTTCTTTCGAAAAGGTCTGGTTGGTGTGGCTCCA
 ATACTTTGCCACCCATGAACTCAGGGTGTGCCCTGGGACACTGGTTTTATATAGTCTTTTGGCACACCTGTGTTCTG
 TTGACTTCGTTCTTCAAGCCCAAGTGCAAGGGAAAAATGTCCACCTACTTTCTCATCTTGGCCTCTGCCTCCTTACTT
 AGCTCTTAATCTCATCTGTTGAACTCAAGAAAATCAAGGGCCAGTCATCAAGCTGCCATTTTAATTGATTCACTCTG
 TTTGTTGAGAGGATAGTTTCTGAGTGACATGATATGATCCACAAGGGTTTCCCTCCCTGATTTCTGCATTGATATTA
 ATAGCCAAACGAACCTTCAAAACAGCTTTAAATAACAAGGGAGAGGGGAACCTAAGATGAGTAATATGCCAATCCAAG
 ACTGCTGGAGAAAACCTAAAGCTGACAGGTTCCCTTTTTGGGGTGGGATAGACATGTTCTGGTTTTCTTTATTATTAC
 ACAATCTGGCTCATGTACAGGATCACTTTTACTGTTTAAACAGAAAAAATATCCACCACTCTTTTTCAGTTACAC
 TAGGTTACATTTTAATAGGTCTTTACATCTGTTTTGGAATGATTTTCATCTTTTGTGATACACAGATTGAATTATA
 TCATTTTCATATCTCTCCTTGTAAATACTAGAAGCTCTCCTTTACATTTCTCTATCAAATTTTTTCATCTTTATGGGT
 TTCCCAATTGTGACTCTTGTCTTTCATGAATATATGTTTTTCATTTGCAAAAGCCAAAAATCAGTGAACAGCAGTGT

AATTAAGCAAACTGGATTACTCCAAATTTCCAAATGACAAAAGTGGGAAAAATAGCCTACACAAGCCTTTAG
GCCTACTCTTTCTGTGCTTGGGTTTGAGTGAACAAAGGAGATTTAGCTTGGCTCTGTTCTCCCATGGATGAAAGGA
GGAGATTTTTTTTTCTTTTGGCCATTGATGTTCTAGCCAATGTAATTGACAGAAGTCTCATTTTGCATGCGCTCT
GCTCTACAAACAGAGTTGGTATGGTTGGTATACTGTACTCACCTGTGAGGGACTGGCCACTCAGACCCACTTAGCTG
GTGAGCTAGAAGATGAGGATCACTCACTGGAAAAGTCACAAGGACCATCTCCAAACAAGTTGGCAGTGCTCGATGTG
GACGAAGAGTGAGGAAGAGAAAAAGAGGAGCACCAGGGAGAAGGCTCCGTCTGTGCTGGGCAGCAGACAGCTGCCA
GGATCACGAACCTGTAGTCAAAGAAAAAGAGTCGTGTGGCAGTTTCAGCTCTCGTTCATTGGGCAGCTCGCCTAGGC
CCAGCCTCTGAGCTGACATGGGAGTTGTTGGATTCTTTGTTTCATAGCTTTTTCTATGCCATAGGCAATATTGTTGT
TCTTGGAAAGTTTATTATTTTTTAACTCCCTTACTCTGAGAAAGGGATATTTTGAAGGACTGTCATATATCTTTGA
AAAAAGAAAATCTGTAATACATATATTTTTATGTATGTTCACTGGCACTAAAAATATAGAGAGCTTCATTCTGTCC
TTTGGGTAGTTGCTGAGGTAATTGTCCAGGTTGAAAAATAATGTGCTGATGCTAGAGTCCCTCTCTGTCCATACTCT
ACTTCTAAATACATATAGGCATACATAGCAAGTTTTATTTGACTTGTACTTTAAGAGAAAATATGTCCACCATCCAC
ATGATGCACAAATGAGCTAACATTGAGCTTCAAGTAGCTTCTAAGTGTGTTTCATTAGGCACAGCACAGATGTGG
CCTTTCCCCCTTCTCTCCCTTGATATCTGGCAGGGCATAAAGGCCAGGCACTTCCCTGCCCCCTCCCAGCCCT
GCACCAAAGCTGCATTTTCAGGAGACTCTCTCCAGACAGCCAGTAACTACCCGAGCATGGCCCCCTGCATAGCCCTGG
AAAAATAAGAGGCTGACTGTCTACGAATTATCTTGTGCCAGTTGCCAGGTGAGAGGGCACTGGGCCAAGGGAGTGG
TTTTCATGTTTGACCCACTACAAGGGGTTCATGGGAATCAGGAATGCCAAAGCACCAGATCAAATCCAAAACCTAAAG
TCAAATAAGCCATTCAGCATGTTTCAGTTTCTTGAAAAAGGAAGTTTCTACCCCTGATGCCTTTGTAGGCAGATCTG
TTCTCACCATTAATCTTTTTGAAAATCTTTTAAAGCAGTTTTTAAAAAGAGAGATGAAAGCATCACATTATATAACC
AAAGATTACATTGTACCTGCTAAGATACAAAAATTCATAAGGGCAGGGGGGAGCAAGCATTAGTGCCTCTTTGATA
AGCTGTCCAAAGACAGACTAAAGGACTCTGCTGGTACTGACTTATAAGAGCTTTGTGGGTTTTTTTTCCCTAATA
ATATACATGTTTGAAGAATTGAAAATAATTTCCGGAAAAATGGGATTATGGGTCCCTCACTAAGTGATTTTATAAGC
AGAAGTGGCTTTCCCTTTCTCTAGTAGTTGCTGAGCAAATTGTTGAAGCTCCATCATTGCATGGTTGAAAATGGAGC
TGTTCTTAGCCACTGTGTTTGTAGTGCCCATGTTAGCTTATCTGAAGATGTGAAACCCTTGCTGATAAGGGAGCAT
TTAAAGTACTAGATTTTGCCTAGAGGGACAGCAGGCAGAAATCCTTATTTCTGCCACTTTGGATGGCACAAAAAG
TTATCTGCAGTTGAAGGCAGAAAAGTTGAAATACATTGTAAATGAATATTTGTATCCATGTTTCAAATTTGAAATATA
TATATATATATATATATATATATATATATATATAGTGTGTGTGTGTGTTCTGATAGCTTTAACTTTCTCTGCATC
TTTATATTTGGTTCCAGATCACACCTGATGCCATGTACTTTGTGAGAGAGGATGCAGTTTTGTTTTGGAAGCTCTCTC
AGAACAAAACAAGACACCTGGATTGATCAGTTAACTAAAAGTTTTCTCCCCTATTGGGTTTGACCCACAGGTCCTGTG
AAGGAGCAGAGGGATAAAAAAGAGTAGAGGACATGATACATTGTACTTTACTAGTTCAAGACAGATGAATGTGAAAAG
CATAAAAACTCAATGGAAGTACTGAGATTTACCACAGGGAAGGCCAAACTTGGGGCCAAAAGCCTACCCAAGTGA
TTGACCAGTGGCCCCCTAATGGGACCTGAGCTGTTGGAAGAAGAGAAGTTCCTTGGTCTTACCATCCTTGTGAG
AGAAGGGCAGTTTCTGCATTGGAACCTGGAGCAAGCGCTCTATCTTTCACACAAATTCCTCACCTGAGATTGAGG
TGCTCTTGTTACTGGGTGTCTGTGTGCTGTAATTTCTGGTTTTGGATATGTTCTGTAAAGATTTTGACAAATGAAAAT
GTGTTTTTCTCTGTAAAACTTGTGAGACTAGAAAGTTGTATCTCTGTAGGTGCAGGTCCATTTCTGCCACAGG
TAGGGTGTTTTTCTTTGATTAAGAGATTGACACTTCTGTTGCCTAGGACCTCCCAACTCAACCATTTCTAGGTGAAG
GCAGAAAAATCCACATTAGTTACTCCTCTTCCAGACATTTCCAGCTGAGATAACAAATCTTTTGAATTTTTTACCCA
TAGAAAGAGTGGTAGATATTTGAATTTAGCAGGTGGAGTTTCATAGTAAAAACAGCTTTTGACTCAGCTTTGATTTA
TCCTCATTTGATTTGGCCAGAAAGTAGGTAATATGCATTGATTGGCTTCTGATTCCAATTCAGTATAGCAAGGTGCT

AGGTTTTTTCCTTTCCCCACCTGTCTCTTAGCCTGGGGAATTAATGAGAAGCCTTAGAATGGGTGGCCCTTGTGAC
 CTGAAACACTTCCCACATAAGCTACTTAACAAGATTGTCATGGAGCTGCAGATTCCATTGCCACCAAAGACTAGAA
 CACACACATATCCATACACCAAAGGAAAGACAATTCTGAAATGCTGTTTCTCTGGTGGTCCCTCTCTGGCTGCTGC
 CTCACAGTATGGGAACCTGTACTCTGCAGAGGTGACAGGCCAGATTTGCATTATCTCACAACCTTAGCCCTTGGTGC
 TAACTGTCTACAGTGAAGTGCTGGGGGGTTGTCCTATCCCATAAGCCACTTGGATGCTGACAGCAGCCACCATCA
 GAATGACCCACGCAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAATTAAGTCCCTCACAACCCAGTGACACCTTTCTGCTTTCCCTC
 TAGACTGGAACATTGATTAGGGAGTGCTCAGACATGACATTCTTGTGCTGTCCTTGAATTAATCTGGCAGCAGGA
 GGGAGCAGACTATGTAAACAGAGATAAAAAATTAATTTTCAATATTGAAGGAAAAAGAAATAAGAAGAGAGAGAGAA
 AGAAAGCATCACACAAAGATTTTCTTAAAAAGAAACAATTTTGCTGAAATCTCTTTAGATGGGGCTCATTTCTCACG
 GTGGCACTTGGCCTCCACTGGGCAGCAGGACCAGCTCCAAGCGCTAGTGTCTGTCTCTTTTTGTAATCTTGAAT
 CTTTTGTTGCTCTAAATACAATTAAAAAATGGCAGAACTGTTTGTGGACTACATGTGTGACTTTGGGTCTGTCTC
 TGCCTCTGCTTTCAGAAATGTCATCCATTGTGTAATAATTGGCTTACTGGTCTGCCAGCTAAAACCTGGCCACATC
 CCCTGTTATGGCTGCAGGATCGAGTTATTGTTAACAAAGAGACCCAAGAAAAGCTGCTAATGTCCTTATCATTGT
 TGTTAATTTGTTAAAAACATAAAGAAATCTAAAATTTCAAAAAA

[0561] SEQ ID NO:93:雄激素受体变体2 (NM_001011645.2智人雄激素受体 (AR), 转录物
 变体) :

[0562] GCTGCGAGCAGAGAGGGATTCCTCGGAGGTCATCTGTTCCATCTTCTTGCCTATGCAAATGCCTGCCTG
 AAGCTGCTGGAGGCTGGCTTTGTACCGGACTTTGTACAGGGAACCAGGGAACGAATGCAGAGTGCTCCTGACATTG
 CCTGTCACTTTTTCCCATGATACTCTGGCTTACAGTTTGGAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATT
 ACTTTCCACCCAGAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCATATGGAGCTCTCACATGTGGA
 AGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAAAGAGCCGCTGAAGGGAACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTAT
 TGATAAATTCGAAGGAAAAATTGTCCATCTTGTCTTCCGAAATGTTATGAAGCAGGGATGACTCTGGGAGCCC
 GGAAGCTGAAGAACTTGGTAATCTGAAACTACAGGAGGAAGGAGAGGCTTCCAGCACCACCAGCCCCACTGAGGAG
 ACAACCCAGAAGCTGACAGTGTACACATTGAAGGCTATGAATGTCAGCCATCTTCTGAATGTCCTGGAAGCCAT
 TGAGCCAGGTGTAGTGTGTGCTGGACACGACAACAACCAGCCGACTCCTTTCAGCCTTGTCTCTAGCCTCAATG
 AACTGGGAGAGAGACAGCTTGTACAGTGGTCAAGTGGGCCAAGGCCTTGCCTGGCTTCCGCAACTTACACGTGGAC
 GACCAGATGGCTGTCATTCAGTACTCCTGGATGGGGCTCATGGTGTGTTGCCATGGGCTGGCGATCCTTACCAATGT
 CAACTCCAGGATGCTCTACTTCGCCCTGATCTGGTTTTCAATGAGTACCGCATGCACAAGTCCCGGATGTACAGCC
 AGTGTGTCCGAATGAGGCACCTCTCTCAAGAGTTTGGATGGCTCCAAATCACCCCCAGGAATTCCTGTGCATGAAA
 GCACTGCTACTCTTACAGCATTATCCAGTGGATGGGCTGAAAAATCAAAAATCTTTGATGAACTTCAATGAACTA
 CATCAAGGAACTCGATCGTATCATTGCATGCAAAAAGAAAAATCCCACATCCTGCTCAAGACGCTTCTACCAGCTCA
 CCAAGCTCCTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCATTTTACCTGCTAATCAAGTACAC
 ATGGTGAGCGTGGACTTTCCGAAATGATGGCAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGT
 CAAGCCCATCTATTTCCACACCCAGTGAAGCATTGGAAAACCTATTTCCCCACCCAGCTCATGCCCCCTTTCAGAT
 GTCTTCTGCCTGTTATAACTCTGCACTACTCCTCTGCAGTGCCTTGGGGAATTTCTCTATTGATGTACAGTCTGTC
 ATGAACATGTTCTGAATTCTATTTGCTGGGCTTTTTTTTTCTCTTTCTCTCCTTTCTTTTTCTTCCCTCCCTA
 TCTAACCTCCCATGGCACCTTACAGCTTTGCTTCCATTGTGGCTCCTATCTGTGTTTTGAATGGTGTGTTGATGCC
 TTTAAATCTGTGATGATCCTCATATGGCCAGTGTCAAGTTGTGCTGTTTACAGCACTACTCTGTGCCAGCCACAC
 AAACGTTTACTTATCTTATGCCACGGGAAGTTAGAGAGCTAAGATTATCTGGGGAATCAAAACAAAAACAAGCAA

AAAAAAAAAAAGCAAAAACAAAACAAAAATAAGCCAAAAACCTTGCTAGTGTTTTTTCCTCAAAAATAAATAA
 AATAATAATAATAACGTACATACATACACACATACATACAAACATATAGAAATCCCCAAAGAGGCCAATAGTGACG
 AGAAGGTGAAAATTGCAGGCCCATGGGGAGTACTGATTTTTTTCATCTCCTCCCTCCACGGGAGACTTTATTTTCTG
 CCAATGGCTATTGCCATTAGAGGGCAGAGTGACCCAGAGCTGAGTTGGGCAGGGGGGTGGACAGAGAGGAGAGGAC
 AAGGAGGGCAATGGAGCATCAGTACCTGCCACAGCCTTGGTCCCTGGGGGCTAGACTGCTCAACTGTGGAGCAATT
 CATTATACTGAAAATGTGCTTGTGTGTTGAAAATTTGTCTGCATGTTAATGCCTCACCCCAAACCCTTTTCTCTCTC
 ACTCTCTGCCTCCAACTTCAGATTGACTTTCAATAGTTTTTCTAAGACCTTTGAACTGAATGTTCTCTTCAGCCAAA
 ACTTGGCGACTTCCACAGAAAAGTCTGACCACTGAGAAGAAGGAGAGCAGAGATTTAACCCCTTGTAAAGCCCCATT
 TGGATCCAGGTCTGCTTTCATGTGTGAGTCAGGGAGGAGCTGGAGCCAGAGGAGAAGAAAATGATAGCTTGGCTG
 TTCTCCTGCTTAGGACACTGACTGAATAGTTAAACTCTCACTGCCACTACCTTTTCCCCACCTTTAAAAGACCTGAA
 TGAAGTTTTCTGCCAAACTCCGTGAAGCCACAAGCACCTTATGTCTCCCTTCAGTGTTTTGTGGGCCTGAATTTCA
 TCACACTGCATTTTCAGCCATGGTCATCAAGCCTGTTTGCTTCTTTGGGCATGTTACAGATTCTCTGTTAAGAGCC
 CCCACCACCAAGAAGGTTAGCAGGCCAACAGCTCTGACATCTATCTGTAGATGCCAGTAGTCACAAAGATTTCTTAC
 CAACTCTCAGATCGCTGGAGCCCTTAGACAAAAGTGGAAAGAAGGCATCAAAGGGATCAGGCAAGCTGGGCGTCTTGC
 CCTTGTCCCCCAGAGATGATACCCTCCAGCAAGTGGAGAAGTCTCAGTTCCCTTCTTTAGAGCAGCTAAAGGGCT
 ACCCAGATCAGGGTTGAAGAGAAAAGTCAATTACCAGGGTGGGAAGAATGAAGGCACTAGAACCAGAAACCCTGCAA
 ATGCTCTTCTTGTCAACCAGCATATCCACCTGCAGAAGTCATGAGAAGAGAGAAGGAACAAAGAGGAGACTCTGACT
 ACTGAATTTAAATCTTCAGCGCAAAGCCTAAAGCCAGATGGACACCATCTGGTGAGTTTACTCATCATCCTCCTCT
 GCTGCTGATTCTGGGCTCTGACATTGCCATACTCACTCAGATTTCCCACCTTTGTTGCTGCCTCTTAGTCAGAGGG
 AGGCCAAACCATTGAGACTTTCTACAGAACCATGGCTTCTTTCGAAAGGTCTGGTTGGTGTGGCTCCAATACTTGT
 CCACCCATGAACTCAGGGTGTGCCCTGGGACACTGGTTTTATATAGTCTTTTGGCACACCTGTGTTCTGTTGACTTC
 GTTCTTCAAGCCCAAGTGCAAGGGAAAATGTCCACCTACTTTCTCATCTTGGCCTCTGCCTCCTTACTTAGCTCTTA
 ATCTCATCTGTTGAACTCAAGAAAATCAAGGGCCAGTCATCAAGCTGCCATTTTAATTGATTCACTCTGTTTGTGTA
 GAGGATAGTTTCTGAGTGACATGATATGATCCACAAGGGTTTCCCTCCCTGATTTCTGCATTGATATTAATAGCCAA
 ACGAACTTCAAAAACAGCTTTAAATAACAAGGGAGAGGGGAACCTAAGATGAGTAATATGCCAATCCAAGACTGCTGG
 AGAAAAGTAAAGCTGACAGGTTCCCTTTTTGGGGTGGGATAGACATGTTCTGGTTTTCTTTATTATTACACAATCTG
 GCTCATGTACAGGATCACTTTTAGCTGTTTTAAACAGAAAAAATATCCACCACTCTTTTCAGTTACACTAGGTTAC
 ATTTTAATAGGTCCTTTACATCTGTTTTGGAATGATTTTCATCTTTTGTGATACACAGATTGAATTATATCATTTTC
 ATATCTCTCCTTGAAATACTAGAAGCTCTCCTTTACATTTCTCTATCAAATTTTTCATCTTTATGGGTTTCCCAAT
 TGTGACTCTTGTCTTCATGAATATATGTTTTTCATTTGCAAAAGCCAAAAATCAGTGAAACAGCAGTGTAATTA
 GCAACAAGTGGATTACTCCAAATTTCCAAATGACAAAAGTGGGAAAAATAGCCTACACAAGCCTTTAGGCCTACTC
 TTTCTGTGCTTGGGTTTGGAGTGAACAAAGGAGATTTTAGCTTGGCTCTGTTCTCCCATGGATGAAAGGAGGAGGATT
 TTTTTTTCTTTTGGCCATTGATGTTCTAGCCAATGTAATTGACAGAAGTCTCATTTTGCATGCGCTCTGCTCTACA
 AACAGAGTTGGTATGGTTGGTATACTGTACTCACCTGTGAGGGACTGGCCACTCAGACCCACTTAGCTGGTGAGCTA
 GAAGATGAGGATCACTCACTGGAAAAGTCACAAGGACCATCTCCAAACAAGTTGGCAGTGCTCGATGTGGACGAAGA
 GTGAGGAAGAGAAAAAGAAGGAGCACCAGGGAGAAGGCTCCGTCTGTGCTGGGCAGCAGACAGCTGCCAGGATCACG
 AACTCTGTAGTCAAAGAAAAGAGTCGTGTGGCAGTTTCAGCTCTCGTTCATTGGGCAGCTCGCTAGGCCAGCCTC
 TGAGCTGACATGGGAGTTGTTGGATTCTTTGTTTCATAGCTTTTTCTATGCCATAGGCAATATTGTTGTTCTTGAA
 AGTTTATTATTTTTTTAACTCCCTTACTCTGAGAAAGGATATTTTGAAGGACTGTCATATATCTTTGAAAAAGAA

AATCTGTAATACATATATTTTTATGTATGTTCACTGGCACTAAAAAATATAGAGAGCTTCATTCTGTCCTTTGGGTA
GTTGCTGAGGTAATTGTCCAGGTTGAAAAATAATGTGCTGATGCTAGAGTCCCTCTCTGTCCATACTCTACTTCTAA
ATACATATAGGCATACATAGCAAGTTTTATTTGACTTGTACTIONAAGAGAAAATATGTCCACCATCCACATGATGCA
CAAATGAGCTAACATTGAGCTTCAAGTAGCTTCTAAGTGTTTGTTTCATTAGGCACAGCACAGATGTGGCCTTTCCC
CCCTTCTCTCCCTTGATATCTGGCAGGGCATAAAGGCCAGGCCACTTCCCTCTGCCCTTCCCAGCCCTGCACCAAA
GCTGCATTTTCAGGAGACTCTCTCCAGACAGCCCAGTAACTACCCGAGCATGGCCCCCTGCATAGCCCTGGAAAAATAA
GAGGCTGACTGTCTACGAATTATCTTGTGCCAGTTGCCAGGTGAGAGGGCACTGGGCCAAGGGAGTGGTTTTTCATG
TTTGACCCACTACAAGGGGTGATGGGAATCAGGAATGCCAAAGCACCAGATCAAATCCAAAACCTTAAAGTCAAATA
AGCCATTCAGCATGTTTCAGTTTTCTTGAAAAAGAAAGTTTCTACCCCTGATGCCTTTGTAGGCAGATCTGTTCTCACC
ATTAATCTTTTTGAAAACTTTTTAAAGCAGTTTTTAAAAAGAGAGATGAAAGCATCACATTATATAACCAAAGATTA
CATTGTACCTGCTAAGATACCAAAATTCATAAGGGCAGGGGGGAGCAAGCATTAGTGCCTCTTTGATAAGCTGTCC
AAAGACAGACTAAAGGACTCTGCTGGTGACTGACTTATAAGAGCTTTGTGGGTTTTTTTTTCCCTAATAATATACAT
GTTTAGAAGAATTGAAAAATAATTTCCGGAAAAATGGGATTATGGGTCCTTACTAAGTGATTTTATAAGCAGAACTGG
CTTTCCTTTTCTCTAGTAGTTGCTGAGCAAAATGTTGAAGCTCCATCATTGCATGGTTGGAATGGAGCTGTTCTTA
GCCACTGTGTTTGCTAGTGCCCATGTTAGCTTATCTGAAGATGTGAAACCCCTGCTGATAAGGGAGCATTTAAAGTA
CTAGATTTTGCCTAGAGGGACAGCAGGCAGAAATCCTTATTTCTGCCACTTTGGATGGCACAAAAAGTTATCTGC
AGTTGAAGGCAGAAAGTTGAAATACATTGTAATGAATATTTGTATCCATGTTTCAAATTTGAAATATATATATATA
TATATATATATATATATATATATATATAGTGTGTGTGTGTGTTCTGATAGCTTTAACTTCTCTGCATCTTTATATT
TGGTTCCAGATCACACCTGATGCCATGTACTIONTGTGAGAGAGGATGCAGTTTTGTTTTGGAAGCTCTCTCAGAACAAA
CAAGACACCTGGATTGATCAGTTAACTAAAAGTTTTCTCCCCTATTGGGTTTGACCCACAGGTCTGTGAAGGAGCA
GAGGGATAAAAAGAGTAGAGGACATGATACATTGTACTIONTACTAGTTCAAGACAGATGAATGTGGAAGCATAAAAA
CTCAATGGAAGTACTGAGATTTACCACAGGGAAGGCCAACTTGGGGCCAAAAGCCTACCCAAGTGATTGACCAG
TGGCCCCCTAATGGGACCTGAGCTGTTGGAAGAAGAGAACTGTTCCCTGGTCTTACCATCCTTGTGAGAGAAGGGC
AGTTTCTGCAATTGGAACCTGGAGCAAGCGCTCTATCTTTCACACAAATCCCTCACCTGAGATTGAGGTGCTCTTG
TTACTGGGTGTCTGTGTGCTGTAATTTCTGGTTTTGGATATGTTCTGTAAAGATTTTGACAAATGAAAATGTGTTTTT
CTCTGTTAAAACCTTGTGAGAGTACTAGAAGTTGTATCTCTGTAGGTGCAGGTCCATTTCTGCCACAGGTAGGGTGT
TTTTCTTTGATTAAGAGATTGACACTTCTGTGCTTAGGACCTCCCAACTCAACCATTTCTAGGTGAAGGCAGAAAA
ATCCACATTAGTTACTCCTCTTCAGACATTTACAGTGAGATAACAAATCTTTTGAATTTTTTACCCATAGAAAGA
GTGGTAGATATTTGAATTTAGCAGGTGGAGTTTCATAGTAAAAACAGCTTTTGACTCAGCTTTGATTTATCCTCATT
TGATTTGGCCAGAAAGTAGGTAATATGCATTTGATTGGCTTCTGATTTCCAATTCAGTATAGCAAGGTGCTAGGTTTTT
TCCTTTCCCCACCTGTCTTTAGCCTGGGGAATTAATGAGAAGCCTTAGAATGGGTGGCCCTTGTGACCTGAAACA
CTTCCCACATAAGCTACTTAAACAAGATTGTCATGGAGCTGCAGATTTCCATTTGCCACCAAAGACTAGAACACACACA
TATCCATACACCAAAGGAAAGACAATTTCTGAAATGCTGTTTCTCTGGTGGTTCCCTCTCTGGCTGCTGCCTCACAGT
ATGGGAACCTGTACTCTGCAGAGGTGACAGGCCAGATTTGCATTATCTCACAACCTTAGCCCTTGGTGCTAACTGTC
CTACAGTGAAGTGCTGGGGGTTGTCTATCCCATAAGCCACTTGGATGCTGACAGCAGCCACCATCAGAATGACC
CACGCAAAAAAAGAAAAAATAAATAAAGTCCCTCACAACCCAGTGACACCTTTCTGCTTTTCTCTAGACTGG
AACATTGATTAGGGAGTGCTCAGACATGACATTTCTGTGCTGCTTGGAAATTAATCTGGCAGCAGGAGGGAGCAG
ACTATGTAACAGAGATAAAAAATTAATTTCAATATTGAAGGAAAAAAGAAATAAGAAGAGAGAGAGAAAGAAAGCA
TCACACAAAGATTTTCTTAAAAGAAACAATTTGCTTGAATCTCTTTAGATGGGGCTCATTCTCACGGTGGCACT

TGGCCTCCACTGGGCAGCAGGACCAGCTCCAAGCGCTAGTGTCTGTTCTCTTTTTGTAATCTTGAATCTTTTGT
GCTCTAAATACAATTAATAAATGGCAGAACTTGTGTTGGACTACATGTGTGACTTTGGGTCTGTCTCTGCCTCTG
CTTTCAGAAATGTCATCCATTGTGTAAAAATATTGGCTTACTGGTCTGCCAGCTAAAAGTGGCCACATCCCCTGTTA
TGGCTGCAGGATCGAGTTATTGTTAACAAAGAGACCCAAGAAAAGCTGCTAATGTCCTCTTATCATTGTTGTTAATT
TGTTAAAACATAAAGAAATCTAAAATTTCAAAAAA

[0563] SEQ ID NO:94:cMET (X54559关于met原癌基因的智人mRNA) :

[0564] GAATTCGCCCTCGCCGCCGCGGCCCGAGCGCTTTGTGAGCAGATGCGGAGCCGAGTGGAGGGCG
CGAGCCAGATGCGGGGCGACAGCTGACTTGCTGAGAGGAGGCGGGGAGGCGCGGAGCGCGGTGTGGTCCCTTGCGCC
GCTGACTTCTCCACTGGTTCCTGGGCACCGAAAAGATAAACCTCTCATAATGAAGGCCCGCTGTGCTTGACCTGG
CATCCTCGTGTCTCTGTTTACCTTGGTGCAGAGGAGCAATGGGGAGTGTAAAGAGGCACTAGCAAAGTCCGAGATGA
ATGTGAATATGAAGTATCAGCTTCCCAACTTCACCGCGAAACACCCATCCAGAATGTCATTCTACATGAGCATCAC
ATTTTCCTTGGTGCCACTAACTACATTTATGTTTTAAATGAGGAAGACCTTCAGAAGTTGCTGAGTACAAGACTGG
GCCTGTGCTGGAACACCCAGATTGTTTCCATGTCAGGACTGCAGCAGCAAAGCCAATTTATCAGGAGGTGTTTGA
AAGATAACATCAACATGGCTCTAGTTGTCGACACCTACTATGATGATCAACTCATTAGCTGTGGCAGCGTCAACAGA
GGGACCTGCCAGCGACATGTCTTTCCCAACAATCATACTGCTGACATACAGTCGGAGGTTCACTGCATATTCTCCCC
ACAGATAGAAGAGCCCAGCCAGTGTCTGACTGTGTGGTGAGCGCCCTGGGAGCCAAAGTCTTTTCATCTGTAAAGG
ACCGGTTTCATCAACTTCTTTGTAGGCAATACCATAAATCTTCTTATTTCCAGATCATCCATTGCATTGCATATCA
GTGAGAAGGCTAAAGGAAACGAAAGATGGTTTTATGTTTTGACGACCAGTCCTACATTGATGTTTTACCTGAGTT
CAGAGATTCTTACCCCATTAAGTATGTCCATGCCTTTGAAAAGCAACAATTTTATTTACTTCTTGACGGTCCAAAGGG
AAACTCTAGATGCTCAGACTTTTACACAAGAATAATCAGGTTCTGTTCCATAAACTCTGGATTGCATTCTACATG
GAAATGCCTCTGGAGTGTATTCTCACAGAAAAGAGAAAAAGAGATCCACAAAGAAGGAAGTGTTAATATACTTCA
GGCTGCGTATGTCAGCAAGCCTGGGGCCAGCTTGCTAGACAAATAGGAGCCAGCCTGAATGATGACATTCTTTTCG
GGGTGTTTCGACAAAGCAAGCCAGATTCTGCCGAACCAATGGATCGATCTGCCATGTGTGCATTCCCTATCAAATAT
GTCAACGACTTCTTCAACAAGATCGTCAACAAAAACAATGTGAGATGTCTCCAGCATTTTACGGACCCAATCATGA
GCACTGCTTTAATAGGACACTTCTGAGAAATTCATCAGGCTGTGAAGCGCGCCGTGATGAATATCGAACAGAGTTTA
CCACAGCTTTGCGCGCGTTGACTTATTCATGGGTCAATTCAGCGAAGTCTCTTAACATCTATATCCACCTTCATT
AAAGGAGACCTCACCATAGCTAATCTTGGGACATCAGAGGGTCGCTTCATGCAGGTTGTGGTTTCTCGATCAGGACC
ATCAACCCCTCATGTGAATTTTCTCCTGGACTCCCATCCAGTGTCTCCAGAAGTGATTGTGGAGCATACATTAACCC
AAAATGGCTACACACTGGTTATCACTGGGAAGAAGATCACGAAGATCCCATTTGAATGGCTTGGGCTGCAGACATTC
CAGTCTGCAGTCAATGCCTCTCTGCCCCACCTTTGTTTCAGTGTGGCTGGTGCCACGACAAATGTGTGCGATCGGA
GGAATGCCTGAGCGGGACATGGACTCAACAGATCTGTCTGCCTGCAATCTACAAGTTTTCCCAAATAGTGCACCCC
TTGAAGGAGGGACAAGGCTGACCATATGTGGCTGGGACTTTGGATTTCCGAGGAATAATAAATTTGATTTAAAGAAA
ACTAGAGTTCTCCTTGGAAATGAGAGCTGCACCTTGACTTTAAGTGAGAGCACGATGAATACATTGAAATGCACAGT
TGGTCTGCCATGAATAAGCATTTCATATGTCCATAATTTTCAAATGGCCACGGGACAACACAATACAGTACAT
TCTCCTATGTGGATCCTGTAATAACAAGTATTTCCGCCAAAATACGGTCTATGGCTGGTGGCACTTTACTTACTTTA
ACTGGAATTAACCTAAACAGTGGGAATTCAGACACATTTCAATGGTGGAAAAACATGTACTTTAAAAAGTGTGTC
AAACAGTATTCTTGAATGTTATACCCAGCCCAAACATTTCAACTGAGTTTGTGTTAAATTGAAAATTGACTTAG
CCAACCGAGAGACAAGCATCTTCAGTTACCGTGAAGATCCCATTTGTCTATGAAATTCATCCAACCAAATCTTTTATT
AGTGGTGGGAGACAATAACAGGTGTTGGGAAAAACCTGAATTCAGTTAGTGTCCCAGAAATGGTCATAAATGTGCA

TGAAGCAGGAAGGAACTTTACAGTGGCATGTCAACATCGCTCTAATTCAGAGATAATCTGTTGTACCACTCCTTCCC
 TGCAACAGCTGAATCTGCAACTCCCCCTGAAAACCAAAGCCTTTTTCATGTTAGATGGGATCCTTTCCAAATACTTT
 GATCTCATTATGTACATAATCCTGTGTTAAGCCTTTTGAAAAGCCAGTGATGATCTCAATGGGCAATGAAAATGT
 ACTGGAAATTAAGGGAAATGATATTGACCCTGAAGCAGTTAAAGGTGAAGTGTAAAAGTTGGAAATAAGAGCTGTG
 AGAATATACTTACATTCTGAAGCCGTTTTATGCACGGTCCCCAATGACCTGCTGAAATTGAACAGCGAGCTAAAT
 ATAGAGTGGAAAGCAAGCAATTTCTTCAACCGTCCTTGGAAAAGTAATAGTTCAACCAGATCAGAATTTACAGGATT
 GATTGCTGGTGTGTCTCAATATCAACAGCACTGTTATTACTACTGGGTTTTTTCCTGTGGCTGAAAAAGAGAAAGC
 AAATTAAGATCTGGGCAGTGAATTAGTTTCGCTACGATGCAAGAGTACACACTCCTCATTGGATAGGCTTGTAAGT
 GCCCGAAGTGTAAGCCCAACTACAGAAATGGTTTCAAATGAATCTGTAGACTACCGAGCTACTTTTCCAGAAGATCA
 GTTTCCTAATTCATCTCAGAACGGTTCATGCCGACAAGTGCAAGTATCCTCTGACAGACATGTCCCCATCCTAACTA
 GTGGGGACTCTGATATATCCAGTCCATTACTGCAAAAATACTGTCCACATGACCTCAGTGCTCTAAATCCAGAGCTG
 GTCCAGGCAGTGCAGCATGTAGTGATTGGGCCAGTAGCCTGATTGTGCATTTCAATGAAGTCATAGGAAGAGGGCA
 TTTTGGTTGTGTATATCATGGGACTTTGTTGGACAATGATGGCAAGAAAATTCAGTGTGCTGTGAAATCCTTGAACA
 GAATCACTGACATAGGAGAAGTTTCCCAATTTCTGACCGAGGGAATCATCATGAAAGATTTTAGTCATCCCAATGTC
 CTCTCGCTCCTGGGAATCTGCCTGCGAAGTGAAGGGTCTCCGCTGGTGGTCCACCATACATGAAACATGGAGATCT
 TCGAAATTTCAATTCGAAATGAGACTCATAATCCAAGTAAAAGATCTTATTGGCTTTGGTCTTCAAGTAGCCAAAG
 GCATGAAATATCTTGCAAGCAAAAAGTTTGTCCACAGAGACTTGGCTGCAAGAACTGTATGCTGGATGAAAAATTC
 ACAGTCAAGGTTGCTGATTTTGGTCTTGCCAGAGACATGTATGATAAAGAATACTATAGTGTACACAACAAAACAGG
 TGCAAAGCTGCCAGTGAAGTGGATGGCTTTGAAAAGTCTGCAAACTCAAAGTTTACCACCAAGTCAGATGTGTGGT
 CCTTTGGCGTCGTCTCTGGGAGCTGATGACAAGAGGAGCCCCACCTTATCCTGACGTAACACCTTTGATATAACT
 GTTTACTTGTGCAAGGGAGAAGACTCCTACAACCCGAATACTGCCAGACCCCTTATATGAAGTAATGCTAAAATG
 CTGGCACCCCTAAAGCCGAAATGCGCCCATCCTTTTCTGAACTGGTGTCCCGATATCAGCGATCTTCTCTACTTTCA
 TTGGGGAGCACTATGTCCATGTGAACGCTACTTATGTGAACGTAAAATGTGTCGCTCCGTATCCTTCTCTGTTGTCA
 TCAGAAGATAACGCTGATGATGAGGTGGACACAGACCAGCCTCCTTCTGGGAGACATCATAGTGTAGTACTATGT
 CAAAGCAACAGTCCACACTTTGTCCAATGGTTTTTCTACTGCCTGACCTTAAAAGGCCATCGATATTCTTTGCTCC
 TTGCCAAATTGCACTATTAATAGGACTTGTATTGTTATTTAAATTAAGGATTCTAAGGAATTTCTTATCTGACAGA
 GCATCAGAACCAGAGGCTTGGTCCCACAGGCCAGGGACCAATGCGCTGCAG

[0565] SEQ ID NO:95:GFP:

[0566] ATGGGCAAGGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATCCTGGTGGAACTGGATGGTGTGTAAC
 GGGACAAGTTCTCCGTCAGCGGAGAGGGTGAAGGTGATGCCACCTACGGAAAGCTCACCTGAAGTTCATCTGCAC
 TACCGGAAAGCTCCCTGTTCCGTGGCCAACCTCGTCACCACTTTCACCTACGGTGTTCAGTGCTTCTCCCGTACC
 CAGATCACATGAAGCAGCATGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCGAAGGCTACGTGCAAGAAAGGACTATCTTCTTC
 AAGGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCCGAAGTCAAGTTCGAAGGTGATACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA
 AGGTAAGTTTCTGCTTCTACCTTTGATATATATAATAATTATCATTAAATTAGTAGTAATATAATATTTCAAATAT
 TTTTTCAAATAAAAAGAATGTAGTATATAGCAATTGCTTTTCTGTAGTTTATAAGTGTGTATATTTAATTTATAA
 CTTTTCTAATATATGACCAAAAATTTGTTGATGTGCAGGTATCGATTTCAAGGAAGATGGAAACATCCTCGGACACAA
 GCTGGAGTACAACACTACAACCTCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA
 AGATCAGGCACAACATCGAAGATGGAAGCGTCAACTGGCGGACCACTACCAGCAGAACACGCCCATCGGCGATGGC
 CCTGTCTGCTGCCGACAACCAATTACCTGTCCACGCAATCTGCCCTCTCCAAGGACCCCAACGAGAAGAGGGACCA

CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACGGCTGCTGGGATCACGCATGGCATGGATGAACTCTACAAGTGA

[0567] SEQ ID NO:96:玉米根萤叶甲 v. vATPase, CN498337.1:

[0568]

CGGAATATTCCAACCTCTGATGTCATTATCTACGTCGGTTGCGGAGAAAGAGGTAACGAAATGTCTGAAGTATTGAGA
GATTTCCCTGAATTGACTGTTGAAATTGACGGGCACACTGAATCTATTATGAAACGTACCGCATTGGTCGCCAACAC
ATCTAACATGCCTGTAGCTGCTCGTGAAGCTTCTATCTATACTGGnATTACTCTTTCTGAATACTTCCGTGATATGG
GTTACAACGTATCTATGATGGCTGACTCGACATCACGTTGGGCCGAAGCTTTGAGAGAAATTTAGGTCGTTTGGCT
GAAATGCCTGCCGATTCCGGTTATCCGGCTTACTTAGGTGCCCGTTTGGCTTCCTTCTACGAACGTGCTGGTCGCGT
TAAATGTTTATAGTAATCCAGACAGAGAAGGATCCGTTTCAATTGTAGGAGCCGTATCACCTCCTGGTGGTGATTTCT
CAGATCCTGTTACCACTGCTACTCTTGGTATTGTACAGGTGTTCTGGGGTTTGGACAAGAACTTGCCCAACGTAAG
CACTTCCCTTCCAGTAGACTGGCTTGGATCATATTCCAAAATTTAAGAGCATTGGACGACTTTTATGACAAAACTT
CCAAGAGTTTATTCTCTTAGAACCAAAAGTTAAGGAAATTTCTCAGGAAGAAGATGATCTAGCCGAAATTTGTGCAnC
TTGGTAGGTAAGCATCTCTGGCAGAAACGGACAAAATCACCTTGGAAATTGCCAGGCTTCTTnAAGAAAnAATTTCT
TTGCAACAAAATC

[0569] SEQ ID NO:97:玉米根萤叶甲 v. 细胞色素P450:

[0570] ATGGATGTTTTTAAAACTTATCTGCCGTGTTAGCAGCAGTGTTGTTATTTATATTGTTTACAAATTT
TAAAAATACGTAGTGTTTTAAAGAAAAGTTTACAAGTTGCCAGGTCCTCCGAACTTCCGATTTTGGGGAACCTCAA
TGATTTATTCTACTCTGATTCAGTGCAACTATTTAAAAATTTTCGAGAATGGAGTCGAAAATATTCACCACTTTATT
CAGTCGTTGTAAGTACATAACCGTAGTAGTTGTCACTGGACCTGATGAGTTGAAAAATCGCATCTGGATCAAAA
CATATTACCAAAGGAATGATTTACGGTCTTGTAGAACCATGGCTTGGAAAAGGTCTTCTGACAAATTCAGGTTCCCT
GTGGCAACAAAGAAGGAAGATTTTACACCTGCATTTCACTTCCAGTATTCTACAGGAGTTCGTTAAAGTGTTTAATA
AAGAACTGCTAGGTTGGTCGAGACCATCAAACAAGAAAATAAGAAATCAGCAACAAATATAATTCCACTAATTTCT
CAGACCGCTTTAAACACTATTGCAGAAACATCTTTCGGAACAACGCTCGATTTGACCAAAAAAGACGACAAAAATTA
TGTCTCTGCAATTCATGAAATGGGAAAAATCTTGATATATAGAATGGTAAGGCCTTGGTTCTATTCTTTATTTGTAT
TTTATATATTATCTTCTGTTGGCGTAAACTCAAACAAGTCTTATCAACGCTGCATAGCTTTACAGAACGTATTATA
CCAGAACGATCAAAAGATTTTAAACCTTTCGAAAGTAAATACAGATGGCGAAACAAAGAGAAAGAACTAGCTTTTCT
AGATTTATTGTTGAATGCAAACTCTCCAAGGGCATCATCGATGACCAAGGTATTAAGGATGAAGTGAATACATTTA
TGTTTGAAGGACACGATACAACCTGCCACTGGAATATCATGGATTTTACGTC AATTGGCAACACATAGCGAATATCAG
GATCAAAATTTATGAAGAAATCATAACTGTATTAGGAGATGCACAAAAACAGCCAGACCTGAACGACCTAAATGAACT
AAAGGTAATGGAAAGATTTATCAAAGAACTTTACGCTTTTCCCTCCTGTACCATATATAGCAAGGACGTTGGACG
AAGACATTGAGCTGAATGGATATTTGATTCCTAAGGAGGCGTCTATTGATATCTGGATATATGACATTACAGAAAC
CCGAAACATTGGCCAGAACCTGAGAAATTTGATCCGATCGGTTTTTACCTGAAAATTTGTGTTAACAGACATCCATT
TGCTTATGTACCCTTCAGTGTGGACCCAGAAATTCATTGGTCAGAGATTTGCCATGTACGAGATGAAGGCCATTA
TTTGTGGAATTATGCAGAACTTCTCAGTGAAACTCGCTGATAAAAAATGAAAAAGTTGAAATAATGACTGATTTGGTG
CTAAGAAGTGCACACGAAATTAATTTGAACTTCATACCTCGTACTAACTAA

[0571] SEQ ID NO:98:玉米根萤叶甲 v. COPI:

[0572] GCACTGATTCGTTTATTTACCTAGAAGATTGAAAGCCGATTCTACTCCATCATCCGCAACCTGATTGT
TATCTCTGGCTTTTTGAACTTCATCAGAATCATAAGAAAAGAAATAAGTAGCTATCTTCTGTGGCCAAACATACTAAT
TTACCACTATCTGACCAGTAACTGCTTTTGGTTGTATCTCGATTCTTCTGACTAAATCGAGAGTTTCCCAATCATA

GAAAGTCAAACCAGAAACCGATTTGACTCCCAAAAGGTATCCACCGTATATACCTTCAGCTCCAAAATCGGACTTAA
 AATTCTTCTTCTCTTTGAAATTCTTAAAAATTCGTAGTAGATCCGGATTCTCTGATGGCATATTCGCTGGAATCT
 TGAGCCCACACAAATTCTTGTCGCTACCAAACGCTTTGTTTCTTAAAGCCATTGCTGTGTAGATTATGTATTCTCC
 ATCCCCACAGACAACAACAAAACGGCCATTGGGATTGTGTTGAATTGTCTGAGGGTATATCTCGCAAGCACCCATAT
 CTTTTACAGAACTGGAAGGCGTTCTCCATCTCTTATTTCCGCACCTTCAGCTAACGCCTTGAGATTTGCCTGTTGA
 AGTTCAGAGTGTCTGGCCCAAATAATTTTGCCTCCACTGGCATCCATACTAACAGCTGGTTCTTCTCTACCACTTT
 AACCAAAATGCTACCTTCATCATAACCCAATGCCACGTTATTGGATCCCTTTAGGCAGAAAATAGTCCATACTCTTT
 CAAAGCCATAATTTAAGCTACTTTCTAACCTATGGGTGTTGGCATGCCACACTCTGACAGTACCATCTTCACTTCCA
 GTAAGAGCTACAGGAAGTTCTGGATGGAAACATGCAGCGGTTACATTTTGAGCATGTCCTTCCAAAGTTTGAACACA
 AGTTTTGTTTTGATAATCCAGATTTTTACTAATCTATCATCAGCGCTGAGATTAATAAGGTTTATCTCCACCGT
 GATAATAGTCCACACAGTTAACGCCTTTCTCATGACCTTCTAGTGTGAAATTCGCTGTGGACGCTCCCAATTGCCAT
 ACTTTCAATGTTCTATCTAGGGATGCACTGGCAAATGTGTTGTTGCTTTTTGGATTTATGGCGATTTGCATAATATA
 ATGAGTGTGTCCTTCGAAAACCTGCTGACAAGCCCATGCTTTTTCCCAATTCCAAAGCTTGATAAGCATATCATCAC
 TACTTGTTAATATATAAGGTTGTGTAGGGGTACGACAATACATCTCACATAATCCGAATG

[0573] SEQ ID NO:99:玉米根萤叶甲 v. Ribo S4:

[0574] GTGTTTTGGCCTCTTGGGAGTAGTAGCAAAGACGTTCCCTATAAGTTTCCQATGGTGTCTCACCAAGA
 AATTTTGCTTCGACGGAAGAATACTGTCTGTCTTCACTGTTATTCTCTCAACCAACATCCATGCTAACCTCGGAAAC
 GAAGTACATGACCAATTGATAACTAGATTCGAACATTGACTTTGTGGAATTCCTTTCAGCGGTATTCACCAGTCTCT
 GACTTTTCTTGTGAGGATGCTTGTCTCTGCTTAGCTCTTAGCATCTTGTACCTACACTTAATGTAGTATGTTTG
 GGTTTTGGTCCAGATACGGTGAATTCTCAATAGCCATCGACTTACTTTAGTCCCGGTGGATGCTTCAGCAATCCTT
 ACCAATTAACATGCACGACCCAAATTTCTAGAATTTTCAGGGTATCTTTTGGACTCTGGCAAATCTTAATAACATCT
 AATTAATCTTGTCTTAAAGACAATTTGAATGAAAACGAATATCAAAGTCTTCCCTCAAGATGTGGCATCGTACTT
 TGACCTTTAACACATAAATCCTTTGCATAACAGAAAATTAATAACACCTACTCCCTTTCTATTTAACCGATCC
 AGGATGTGATCATAATTTCCAATTCCATCATGTGCAGAGTTGTTTCATAGATAAGCAGGATAGTATTTTTGTGAAA
 TGGTAAAGCCCAATTTGT

[0575] SEQ ID NO:100:玉米根萤叶甲 v. Dvsnf7:

[0576]

ATGAGCTTTTTTGGAAAATTGTTTCGGGGGAAAAAGGAAGAGATAGCCCCTAGTCTGGGGAGGCTATTCAAAAAC
 CAGAGAGACTGAAGAAATGTTAATAAAAAACAGGATTTTTTAGAAAAGAAGATAGAAGAATTTACCATGGTAGCAA
 AGAAAAATGCGTCGAAAAATAAAAGAGTTGCACTCCAAGCCCTCAAAAAGAAGAAACGATTGGAAAAGACCCAACTA
 CAAATAGATGGAACCCTTACAACATTGAAATGCAGAGGGAAGCCCTCGAAGGAGCTAGCACAAATACTGCTGTATT
 AGATTCTATGAAAAATGCTGCAGATGCCCTTAAGAAAAGCTCATAAGAATTTGAATGTAGATGATGTTACAGATATCA
 TGGATGACATAGCCGAACAACACGACATAGCCAACGAAATCACAAACGCTATTAGCAATCCTGTCGGATTACCCGAC
 GATCTGGATGACGATGAATTAGAAAAAGAATTAGAAGAGCTCGAACAAGAAGGATTGGAAGAAGACCTGCTCCAAGT
 GCCAGGTCCAACCTCAACTGCCGGCTGTGCCTGCTGATGCAGTTGCTACTAAACCAATCAAACCAGCAGCTAAAAAAG
 TTGAAGATGATGACGATATGAAAGAATTGGAAGCCTGGGCCTCGTAA.

[0577] SEQ ID NO:101:玉米根萤叶甲 v. ET3:

[0578] ACACACGCTATAATTTGATCTTTGATCGGTCACAAATGTTGTAGTGTTTTTAGTTTATTGTGCCTCGAAG
 AGACAAAATCTAACCATGGCTCATGTGGTGCAACTAGCGGAAGGAAAAATTTCTGGAGGCACTAGGACAGATCTCAA

TGGGGATAAGTTTCATTCGTTTTTATGTATCCCATACGGAAAAGCTCCAGTAGGGCGACCTACGGTTAAGGCGCCAT
TACCTGTTGAACCATGGGAAGGGTAAAAACAAGTTATCACAGAAGACAAAACGCCATTCAGAAGAACATTGTTCTG
AAGGAATATACTGGAGAAGAAGATTGCTTGTCTCTTCATGTATTTACAAAGAACTCCCCATGAAGAATCCAACT
GAAACCTGTGATGGTGTACATTCATGGAGGAGGTTTTATAATGGGATCTCACGAACTACGATGTATGGTCCAGAAT
ACCTTATGACTGAAGACATAGTTCTCGTAAGCATCACTTACCGAGTTGGTCTACTGGGTTTTCTTAGTATAGAAGAC
GAATCACTGGACGTTCTGGAAAATGCAGGTCTAAAAGATCAAGTACTGGCTTTAAAGTGGGTCCAGCGAAACATAAG
AAATTTCAATGGAGATCCCAATAACATTACCATATTTGGAGAAAGTGCGGGAGGGGCATCTGTTGAATTTTTGCTGT
TATCTCCTTCAGCCAAAGGTTTATTTTCATAAAGCCATACTTCAGAGCGGGTCGACTTTAAATCCATGGACTCTTAAA
AACTCCCCAGCAACTGAGTTTGTGAGTTTACCAAACACATAACTGCCTGATATTGACATTTTGAAAAGCTTGAG
GCGTATGACTGTTAGGGAGCTGTACGATCAACAAAATCAATATATTAAGTCTAAGAAGCTATTTGTAGATTTTCGGTC
TAATAACCCAGTGATAGAAAAACCAACCAACAGCATTTTTGACAGAGAAACCTATCGACATCATCCAGTCAGGG
AAATACAACAATGTGCCAGTGATAATGGGTACACCGACAGTGAAGTCTTCTTCTAGACTTCTTGTCCGCACTTGG
AATGAACGGGGCAAAGAGGGAGAAGATATACCTATTGAGCAGATACTACCATACGAGACAAATTTAACAGATGCAC
AACAGTCAAACGATTAGTTGAAAAGTTAAGAAAATTTTTATCGTCCAGAAGCTGATCCGGTTGGACGAATTAATTTA
TCTACGGATGCCTTGTGCGGCTGGAATAATCACTTCTGCAAAAAATCAAGCGAAAGTGTCAAAGAACCCTGTATA
TTTTTATAGATTTTCATTGGACGCAGGCCTTAACATGCTGAAGAAAATGGTGAATGATACACGTCCAGGAGCTTGTC
ACGGGGATGAACTGGGATACCTATTTAAAAACCTTTTGACAACAGACATTGGAGATGAAGATAAAACTTATATACAT
CGAATGGTAACACTATGGACAACTTTGCCAAATATGGAAAATCCAACACCACCAGGAAATAATCTAAACATTGAATG
GAAGCCGATACAGAATGGTCAGTTGAATTTCTTAGATATTGAAAAACAATAAGATGGATGTGAATCCAGACGCTG
ACAGGATGAAAATTTGGAATGAGCTTTACCAGTGAATCCACTGACAGCTAAATATTAATTTGTTTGAACAACCTC
TCAGAAATACATGTTATTATATTTTTATATTATAAAAAATATTTATATCATATTTTAAGACTATACGAATAAAACTG
ATTACTTTATTTTAAATAAAGTTACTACACAAAAA

[0579] SEQ ID NO:102:PIC16005,玉米根萤叶甲v.,vATPase D亚基1的部分:

[0580] AACGGTATTTGGAAGGCCTGTGTCGTGGCTTTAAATGTGGGATCCTGAAACAATCCGATTATTTGAAT
TTGGTCCAGTGTGAACTCTTGAAGATTTAAAACTGCACTTGCAAGGCACTGACTATGAACTTTTTGGCCAATGA
ACCTTCACCTTTGTCAGTATCCGTCATCGATTCAAGACTTCGAGAAAACTCGTGATTGAGTTCCAGCACATGCGTA
ACCAAGCAGTAGAGCCTCTCTCGACATTTATGGACTTCATTACCTACAGTTACATGATCGACAA

[0581] SEQ ID NO:103:PIC17505,玉米根萤叶甲v.vATPase E:

[0582] ACAATAAATTTTCATCGGCGAAGATTTCTCCACAAGAAAAAATAATCTTTTTACATCACATCATCA
AACATCAAATCACGAATATCATTCTTCGAGAAAAAAAATCAAGGTAGTATCAACTCGAAACCTCAATAATTCTTCTC
AAGGATCTTTCAAAAAATATTCTCGCTTCGACAAGGATCACAATTAGGGTAACAACAACTCTAACTCGTTTTAAAT
ACTCTCAAAAAAAGGAATCGGTTTATTATCATCATCATTCGTATCATACATCAGTAGTTTAAAAGGTTTTTCGAAGA
TCTCGTCTAAGCAACCAACAATCGTTTTACAATACTATATAAAATACAGGGAATACACAGTATCCAAAAAATACTTA
ATCAGTGAATTTTCTGGTTGACGTTGCGTCCGAACAGAGCATTACGGATCTGGGGAATCAATTGTTGTGAGATGAGC
TCAAGACGGGCTTCCAGAGTATTGTTGATTTTGATCTTGTCTCAAGGCCAACAGTTCGATTCCTCCGGTGGTTTC
TTGAGAAAGGTGGCTCTCGTCGTCGATTTTAGATTTACGCTTTACCGGTTATGTCCTTGACTTTTGGGAGACGT
TAGGCATGATAGATTTTACCAATTCTCTGTCTGAGGGCGTACTCTAATGGTGTATGTCCTTTTGAAGAGCTGATAG
AGCCCTTGGAGGATGAGACTTTCCAGGATTTGTGTATATTTGCCTGAATCTCTGGTTACCTCACCAAGACGTTTGGC
AGCATCTTCCAAAACGGCACGTACATGGTCTTCCCTTACTTTNCATACCCTTCATCTTGCCTGGTTCAACATGTTTT

GATGATTGGATTTTTTTTCTGGAGTTCTACTTGCTTCTTTTTTCTCGTAGTACTCCAT

[0583] SEQ ID NO:104:长芒苋PDS:

[0584]

TCAATTTTCATCTATTGGAAGTGATTTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAAATTCAGTGTTAGTAAAGTTTATGGAGCAAA
GCAAAGAAATGGGCACTGCCCTTTAAAGGTTGTTGTATAGATTATCCTAGGCCAGAGCTTGAAAGTACATCCAATT
TCTTGAAGCCGCTACTTATCTTCTACTTTTCGGAATTCGCCTCGTCCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCT
GGAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGTATTTAGCTGATGCAGGTCACAAACCCATATTGTTGGAAGCAGC
AGATGTTTTAGGAGGAAAGGTTGCAGCGTGAAGGATGAGGATGGTACTGGTATGAGACTGGGCTACATATATTCT
TTGGGGCATATCCAAATGTCCAAATCTATTTGGAGAACTTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACTCT
ATGATTTTTGCAATGCCAGCAAGCCCGGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTTTCCCGAAATCCTGCCTGCACCATTAAA
TGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACCTGGCCAGAAAAAATCAAGTTTGGCATTGGCTTGTTCG
CTGCTATGGCAGGCGGACAGTCATATGTTGAAGCACAAGATGGTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGAGAAAAACAAGGA
GTACCCGATCGTGAAGTATGATGTGTTTATTGCCATGTCAAAGGCACTGAAGTTCATAAATCCCGATGAAGTTTC
AATGCAGTGCATCTTGATTGCTCTGAACCGATTCTGCAGGAGAAACATGGTTCTAAGATGGCCTTCTAGACGGAA
ACCCTCCAGAGAGGCTGTGCATGCCTATTGTTAAACACATCGAGTCACTAGGTGGTGAAGTAAACTTAACTCTCGT
ATACAGATGCCTATGTTTTTGGCAGCCAGTTGACATCTTGAAGCTGTTACTACCTGATACTTGAAGGAAATCTCA
TACTTCaagaaaCTTGAGAAATAGTGGGCGTTCCGTGATTAATGTTACATATGGTTTGACAGAAAATTAAGAA
TACATATGACCATCTACTCTTCAGCAGGAGTCCCTTTTGAGTGTCTATGCTGATATGTCGGAGACATGCAAGGAAT
ATAAGGATCCAAATAGATCCATGCTGGAATTTGGTTTTTGCACCCGCGGAGGAATGGATTCACGAAGCGCACTGAT
ATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCTTGCCAAGCTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGAT
CCTCAAATATCATGTCGTCAAAACTCCAAGGTCGGTTTTATAAGACTGTACCGGATTGTGAACCTTGTCCGCCGCTGC
AAAGATCACCAATAGAGGGTTTCTATTTAGCTGGTGATTACACAAAACAAAAATATTTGGCTTCTATGGAAGGTGCT
GTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGATCTGCTGAGTTCTCGAGCACAAAGAGAATT
GGCG

[0585] SEQ ID NO:105:长芒苋EPSPS:

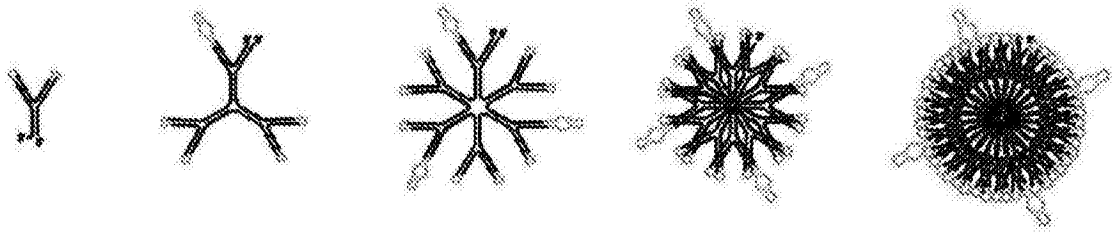
[0586]

ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAACC
CAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTAATTTTTGGATCAAACCTGAGAATTTCTCCAAAGTTCATGTCTTTAACCAA
TAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATCAAGCTTCTGTTGCTGCTGCAGCTGAGAAACCTTCAT
CTGTCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCC
AATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGGCACAACAGTGGTCGACAACCTTGTGTATAGTGATGATATTCT
TTATATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTAGAGG
GTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGAAAAGGAAGAGATTCAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCG
ATGCGCCATTGACAGCTGCGTTGCCGTTGCTGGAGGAAAATCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAG
GGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATT
GCCCTCCTGTTCCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAGCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAA
TATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGCTTGGAGACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCT
TGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACA
GGTTCTACATTCGAGGTGGTCAGAAATACAAATCTCCTGAAAAGGCATATGTTGAGGGTATGCTTCAAGTGCTAGC
TACTTCTAGCCGAGCCGCCGTCCTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGA

TGTA AAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTA ACTGTTACTGGAC
 CACCCAGGGATT CATCTGAAAAGAAACATCTGCGTGTCTATCGACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATG
 ACTCTTG CAGTTGTTGCCTTGATGCAGATGGGCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAAC
 CGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAAGCTTGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGA
 TCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACCGCCATTGAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTT
 GCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGT
 TTTAGAAAAGTTCCGCAAGCATTGA

[0587] SEQ ID NO:106:长芒菟HPPD:

[0588] CGTCGAAGTAGAAGACGCGGAAGCTGCTTTTAACATCAGCGTTTCGCATGGGGCTATTCCCTGTGTTTC
 TCCTATTCAATTGAAAAACGGTGTGTTTTATCTGAGGTTCA TTTATATGGGGATGTTGTGCTTCGGTATGTAAGCT
 ACGGAAATGAATGTGGGGATGTGTTTTTCTTCTGGGTTTGAGGAAATGCCGGAGGAATCATCGTTTAGAGGACTT
 GATTTTGGCATT CGAAGGTTGGATCATGCTGTAGGGAATGTCCCTGAGTTGGCTCCTGCAATTGCTTATTTGAAGAA
 GTTTACTGGGTTTCATGAGTTTGCTGAGTTTACAGCTGAAGATGTTGGGACGAGTGAAGTGGATTGAATTCAGCCG
 TATTGGCAAACAATGATGAAATGGTGTGTTTCCGATGAATGAACCTGTGTATGGGACAAAAAGGAAGAGCCAAATT
 CAAACTTATTTGGAGCATAATGAAGGGGCTGGTGTACAGCATTGGCTTTGATGAGTGAAGACATATTTTGGACTTT
 AAGGGAGATGAGGAAGAGAAGTGTCTTGGTGGGTTGAGTTTATGCCGTCGCCCTCCGACTTATTACCGAATT
 TGAGGAACAGAGCTGCTGATGTATTGAGTGAGGAGCAGATGAAGGAGTGTGAAGAGTTGGGGATTTGGTGGATAAA
 GATGATCAGGGCACTTTGCTTCAAATCTTCACCAAACCTATTGGAGACAGGTAAATTTAATCTTGCTTTCAATTGC
 TTTTGCTTGATGGATTGACTAGCAAATTTGATCGCATTTTGTGCTTATATGACTTGATGATACTTCCTCTGTTTCG
 AAATACTCGCTACATTGCTACATTTTGTGTTTGTGCACTATTCATCGTTCAAGCTTATTTACATATTGCGACTAAT
 GTGTA ACTAAAAATATAGTCAAGTGGGATCTTGTTGAATCGTCTAATGGCATACTTCATCATATTAATTTTAT
 AATTTT TAGATTAGTGTAGTTAAGATATTAATGCTCAAAATGTGCATTGGATTGCGTAAAAAAGTGAATGTAGC
 AAGTATTATGAAA



显示增加的多个MV-RNA组合物的单链MV-RNA纳米颗粒

图1

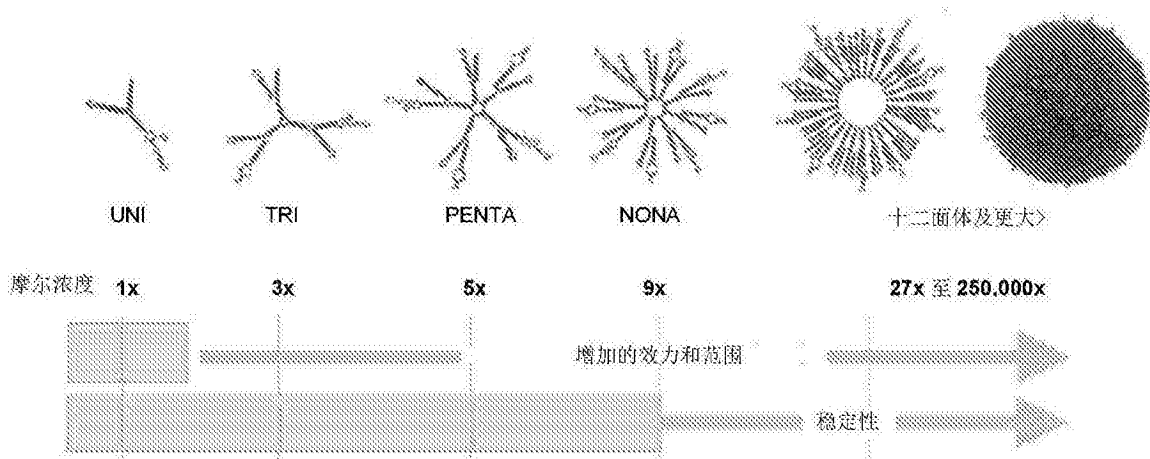
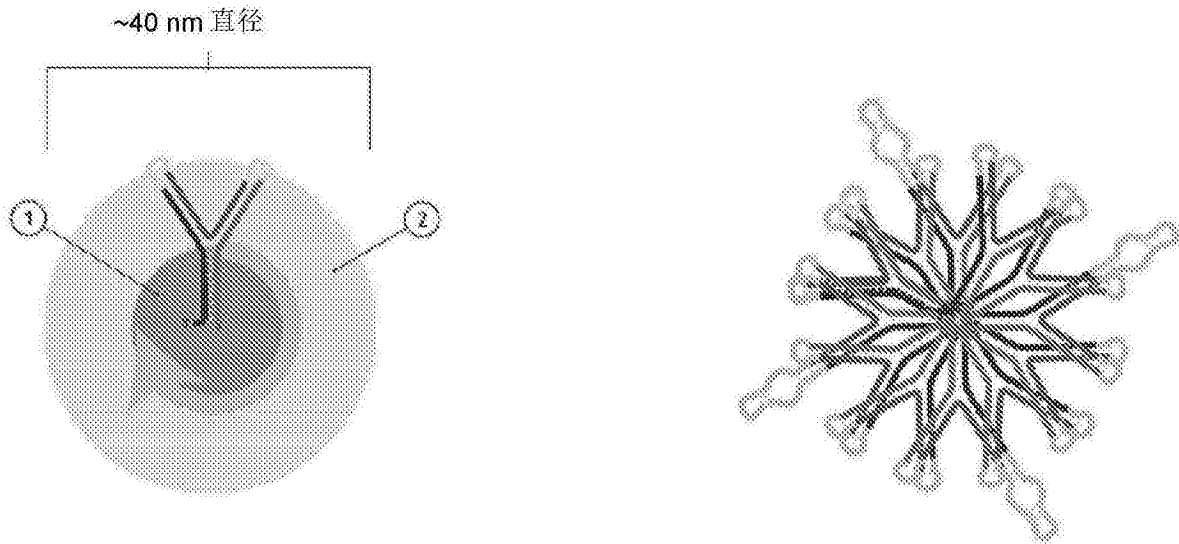
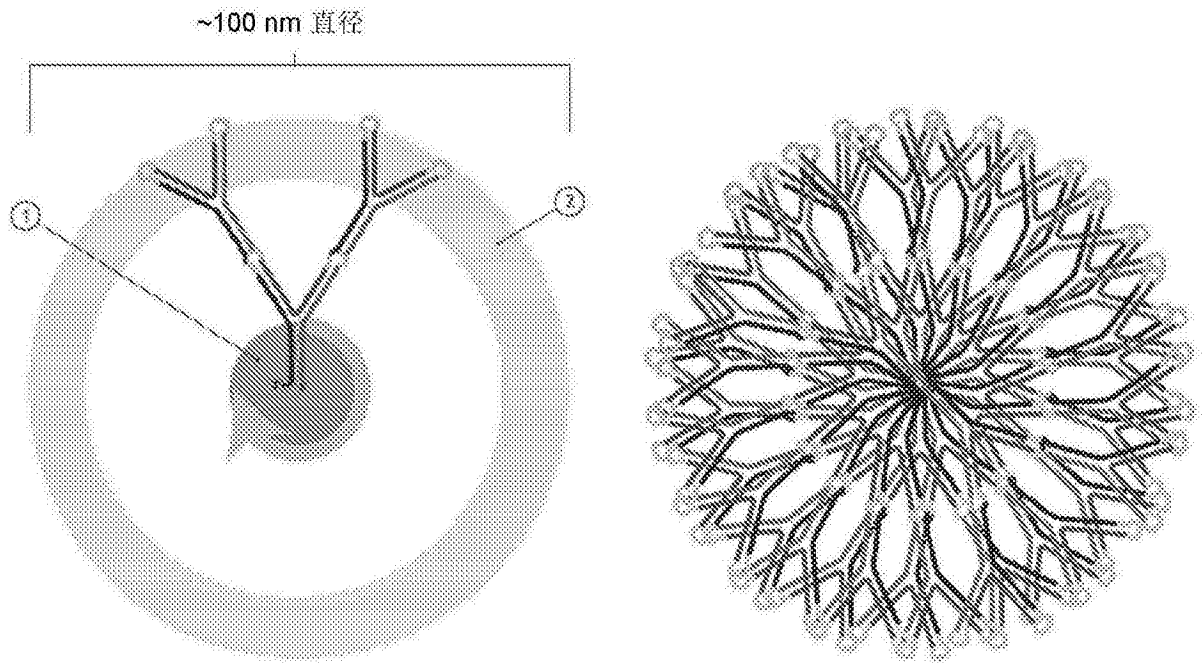


图2



A. 多个单个MV-RNA成为~40nm球体。 1至2的核心茎与表面比



B. 多个堆叠的MV-RNA成为~100nm球体。 1至4的核心茎与表面比

图3

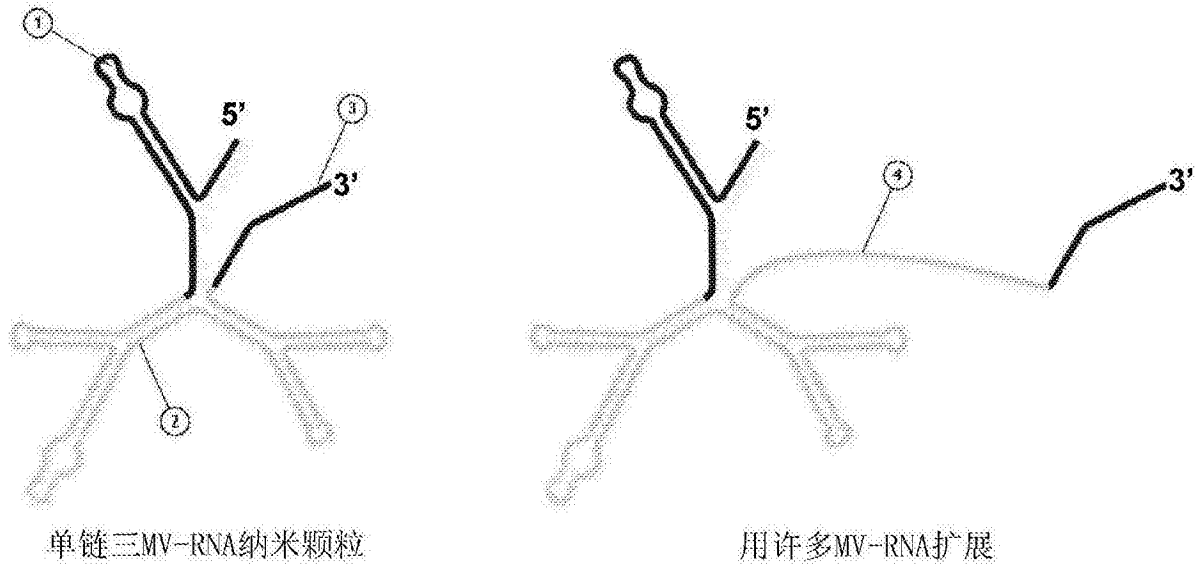
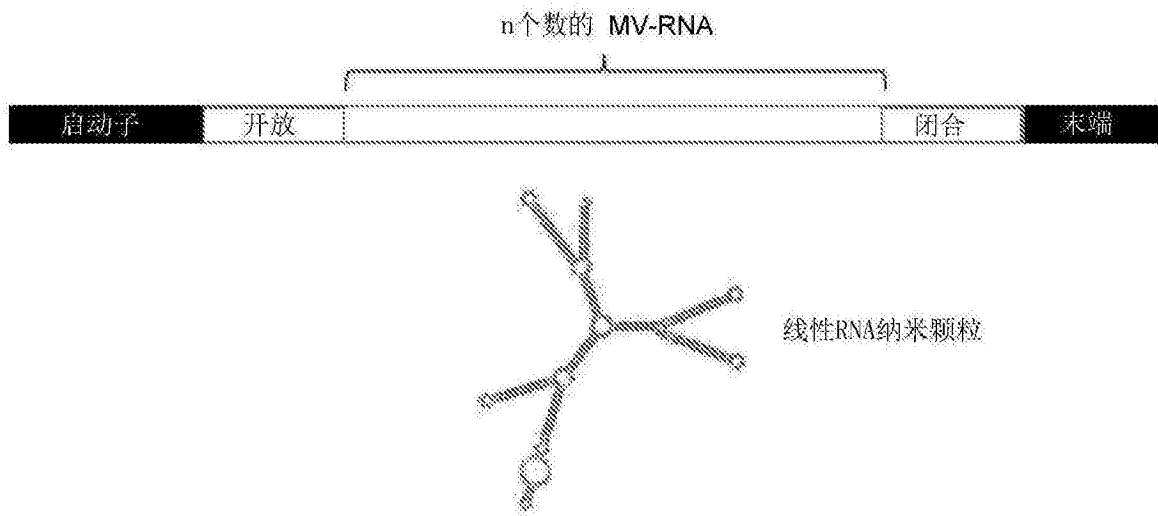


图4

1: 基于MV-RNA的纳米颗粒的线性RNA转录物的例子



2. 来自转录的基于环化MV-RNA的纳米颗粒的例子

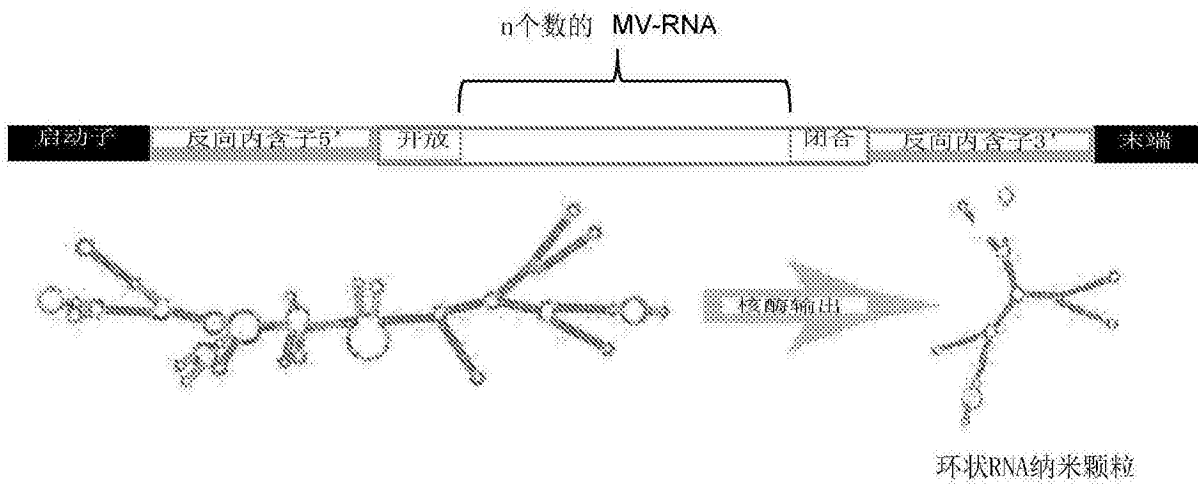
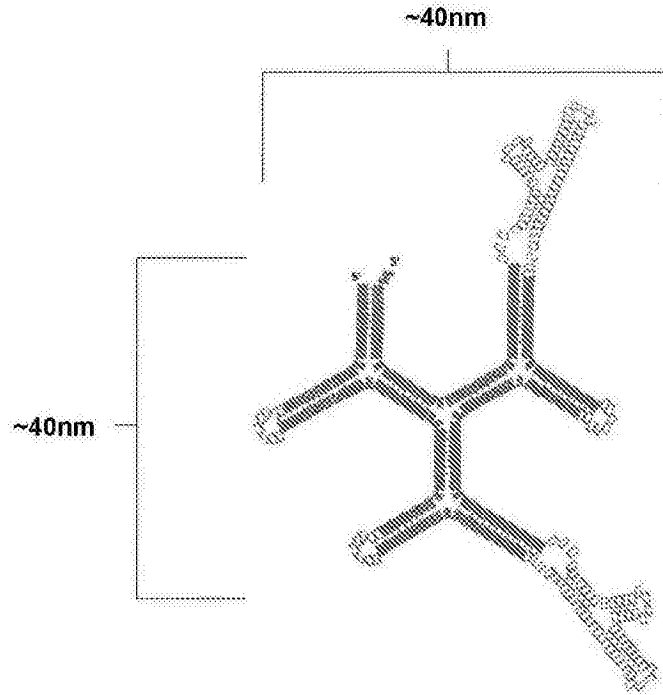
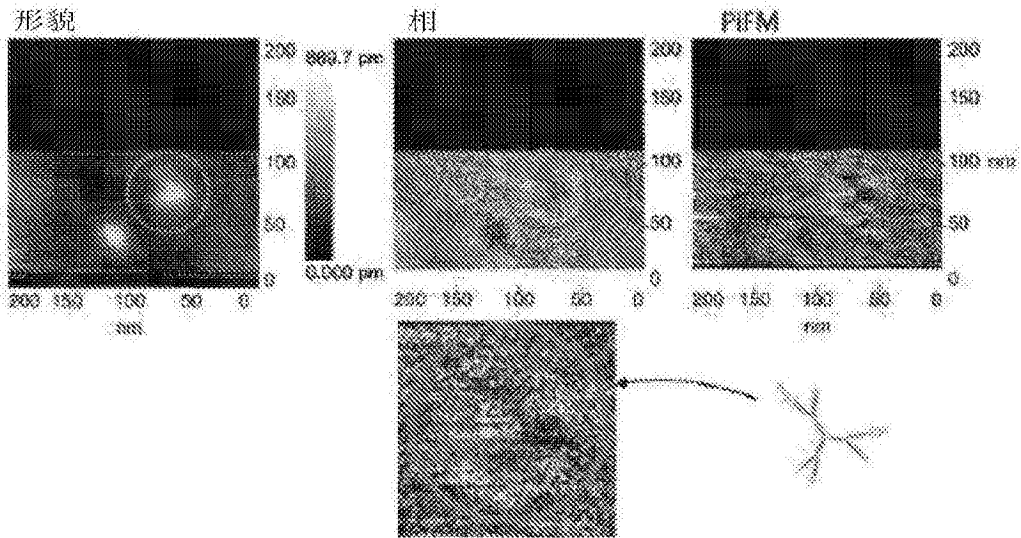


图5

A

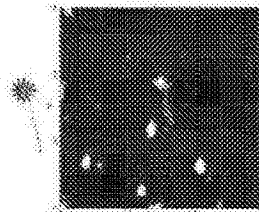


B



C

12单位具有dsRNA尾部



D

16单位CryoEM

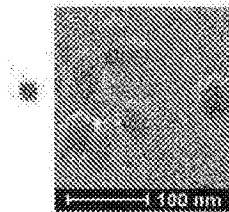


图6

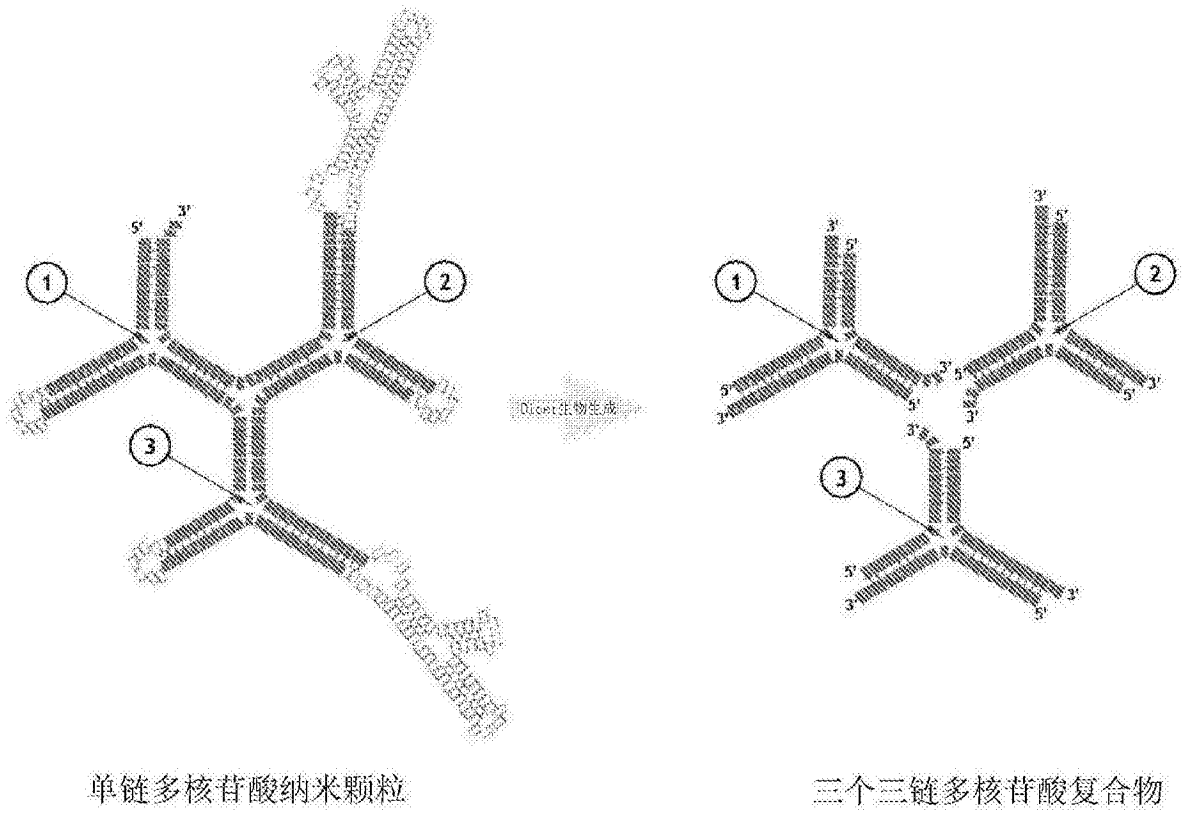
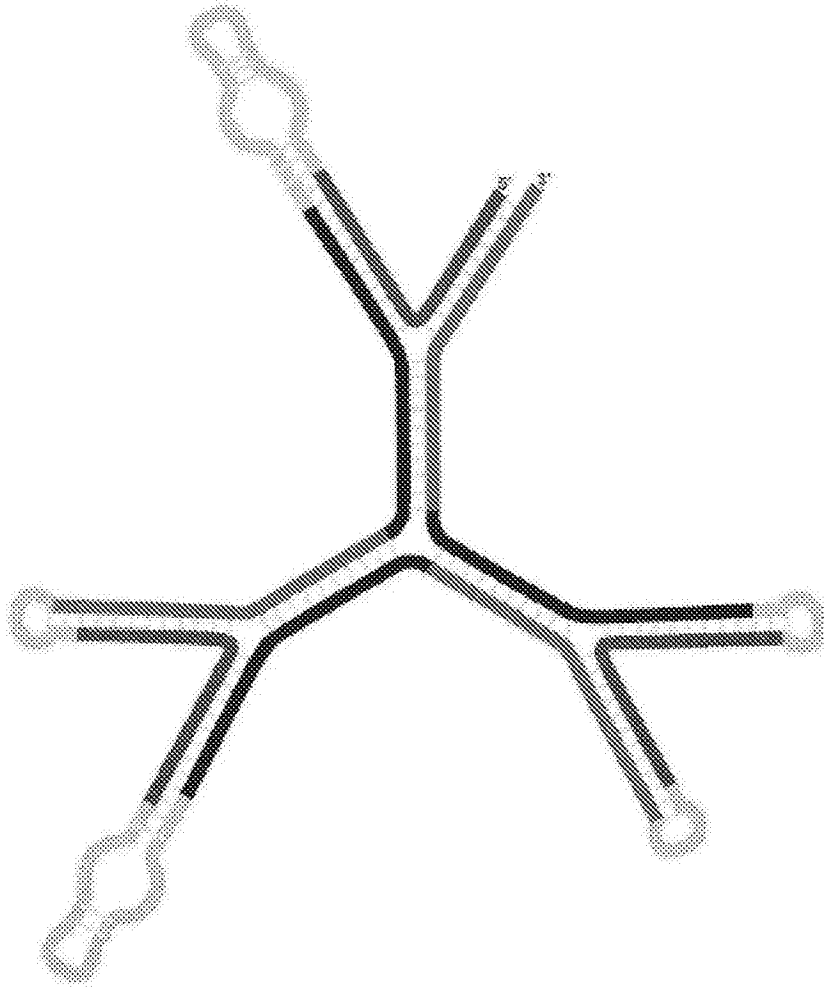


图7



单链扩展的转录物视图

图8

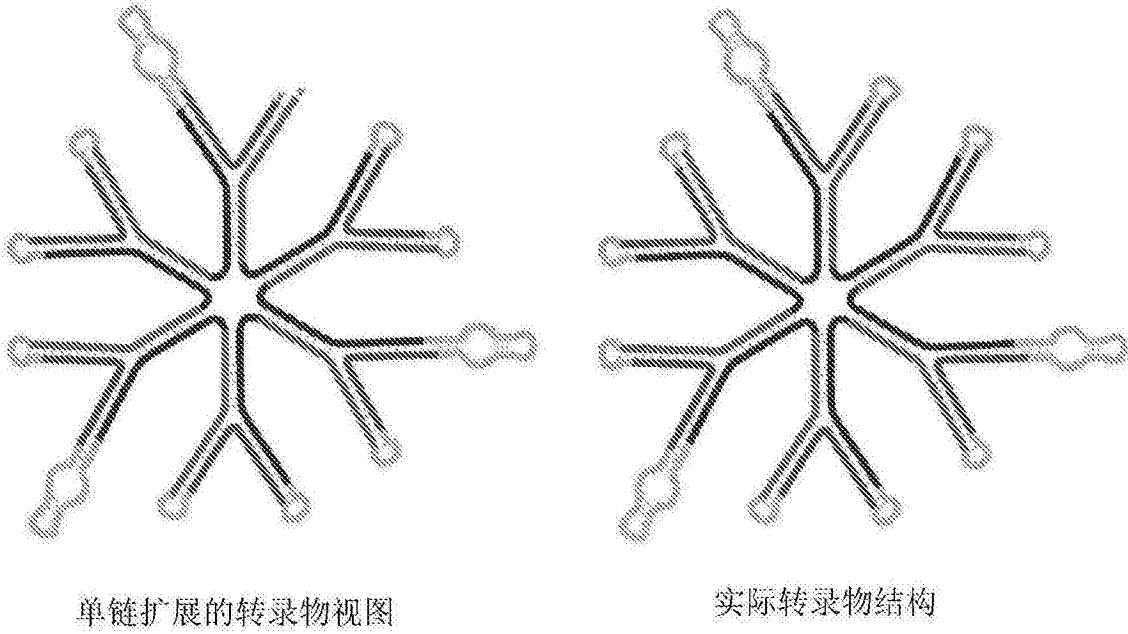


图9

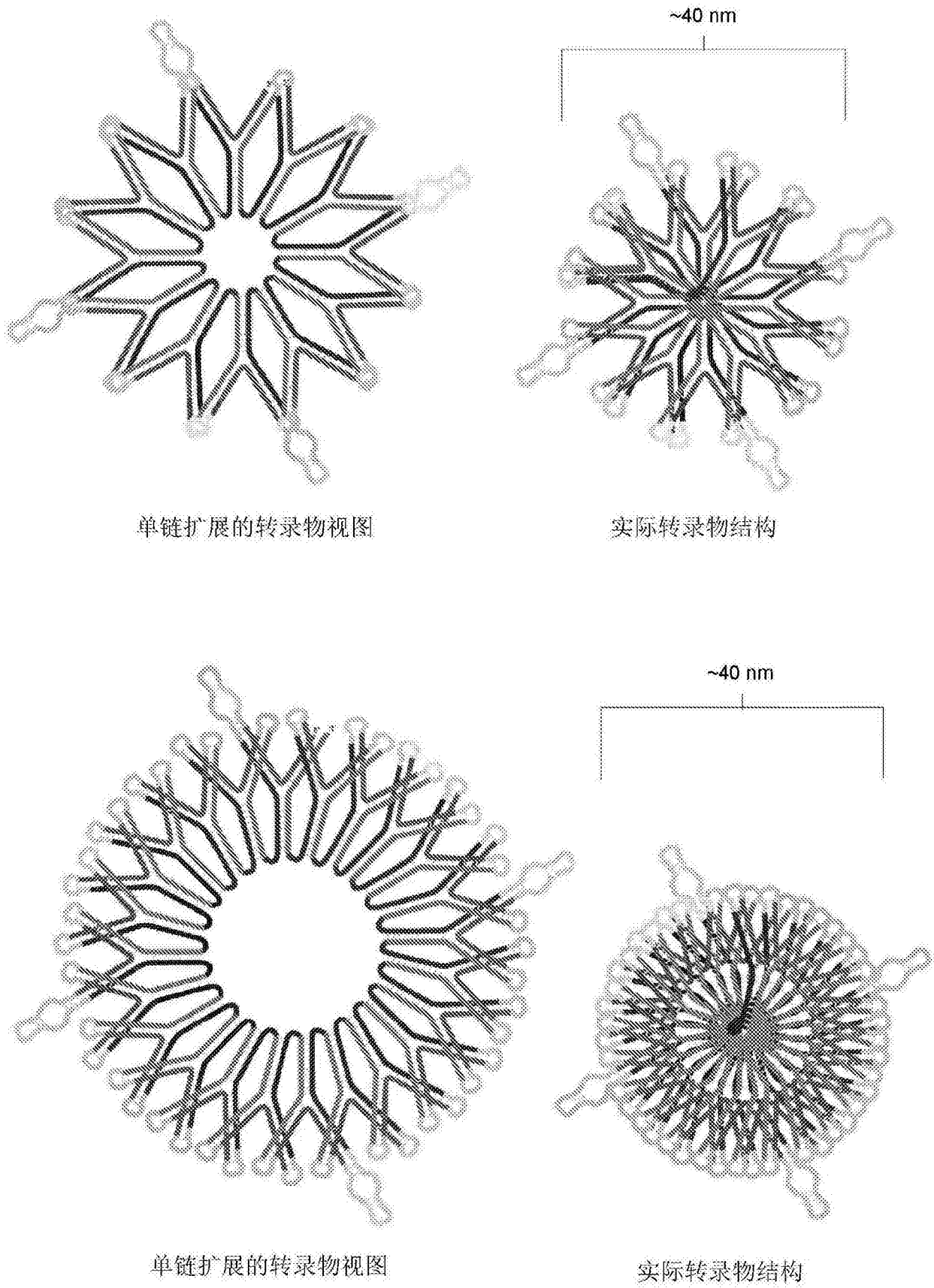


图10

MV-RNA纳米颗粒的电泳
复杂性增加的~400ng TrilliumRNA

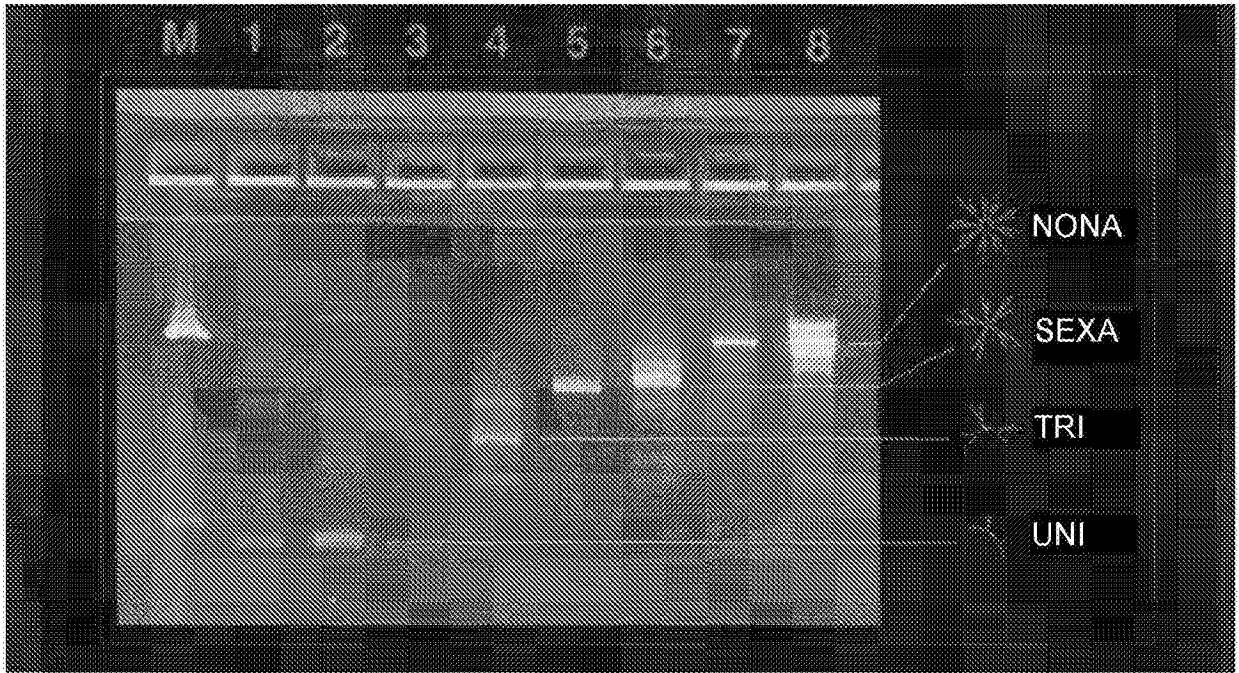


图11

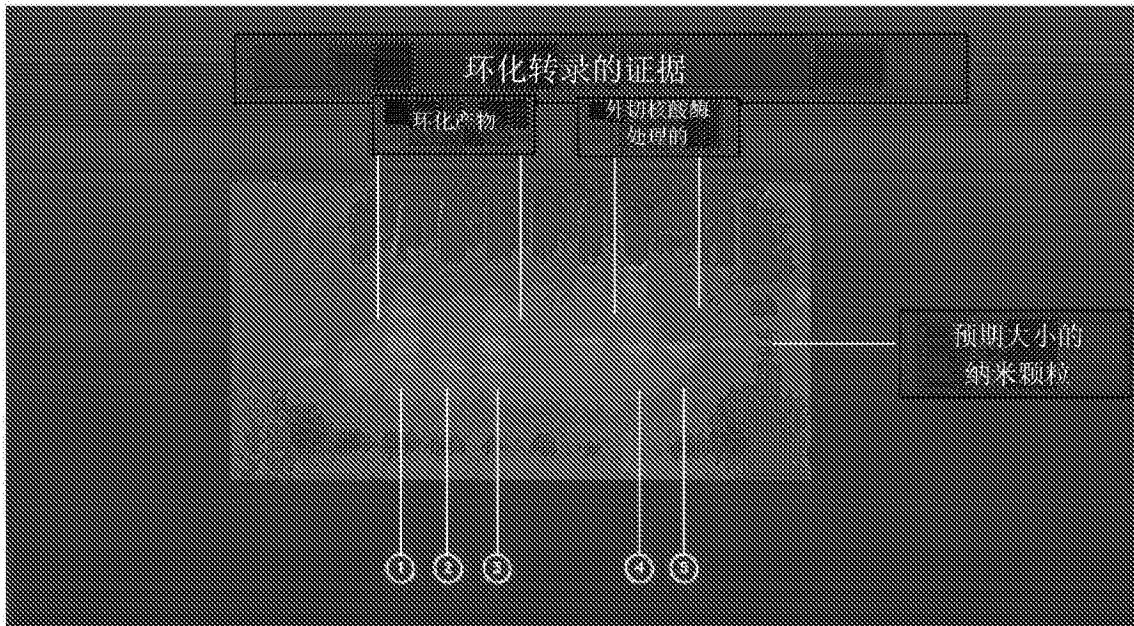


图12

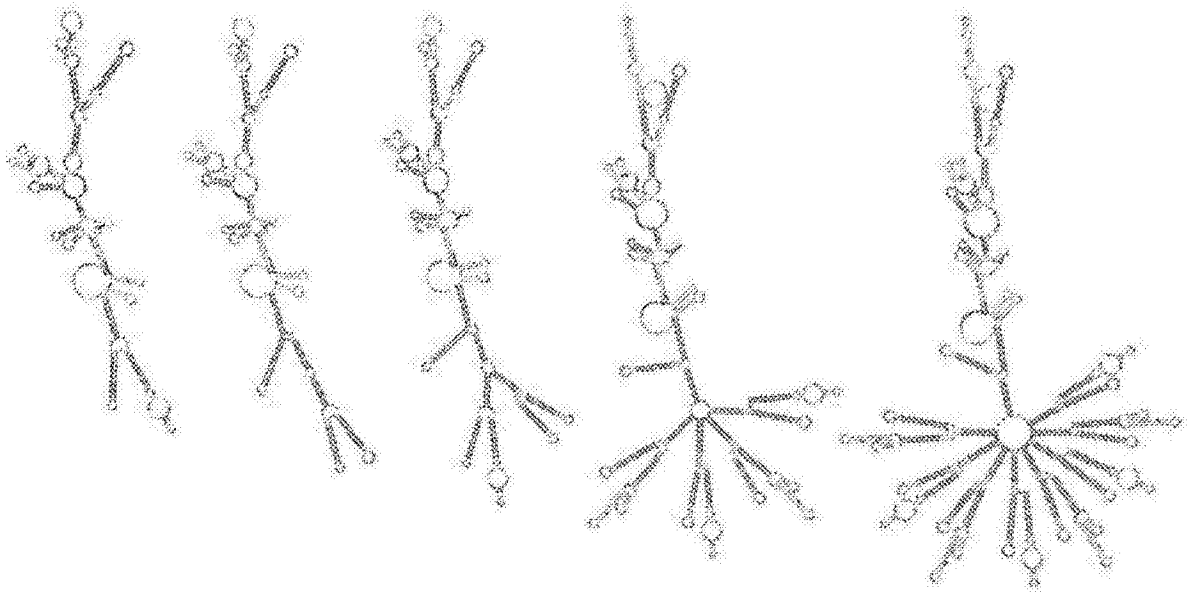
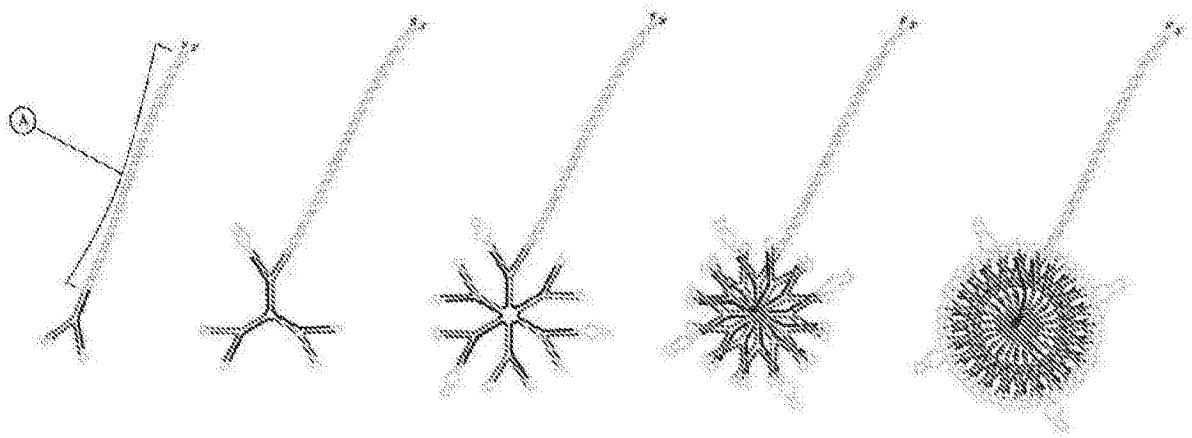


图13



具有长dsRNA摄取信号的单链MV-RNA纳米颗粒

图14

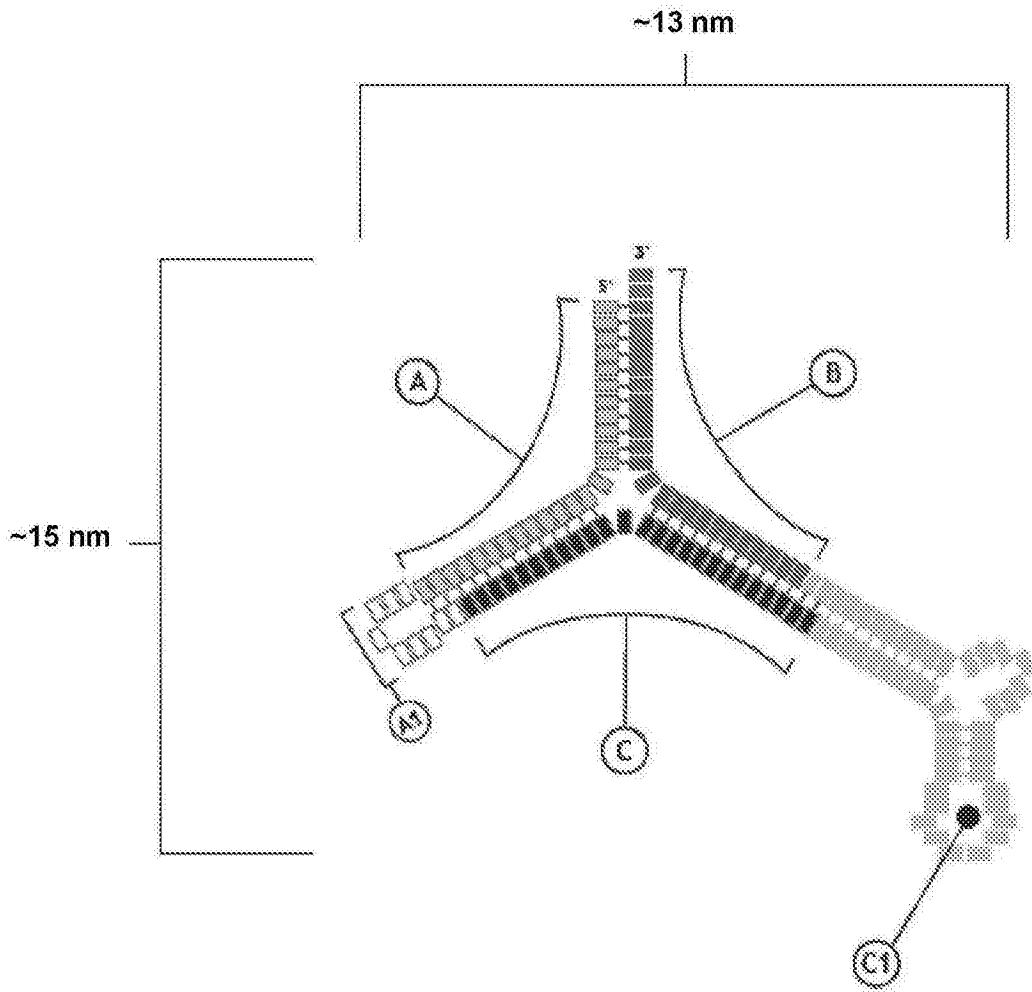


图15

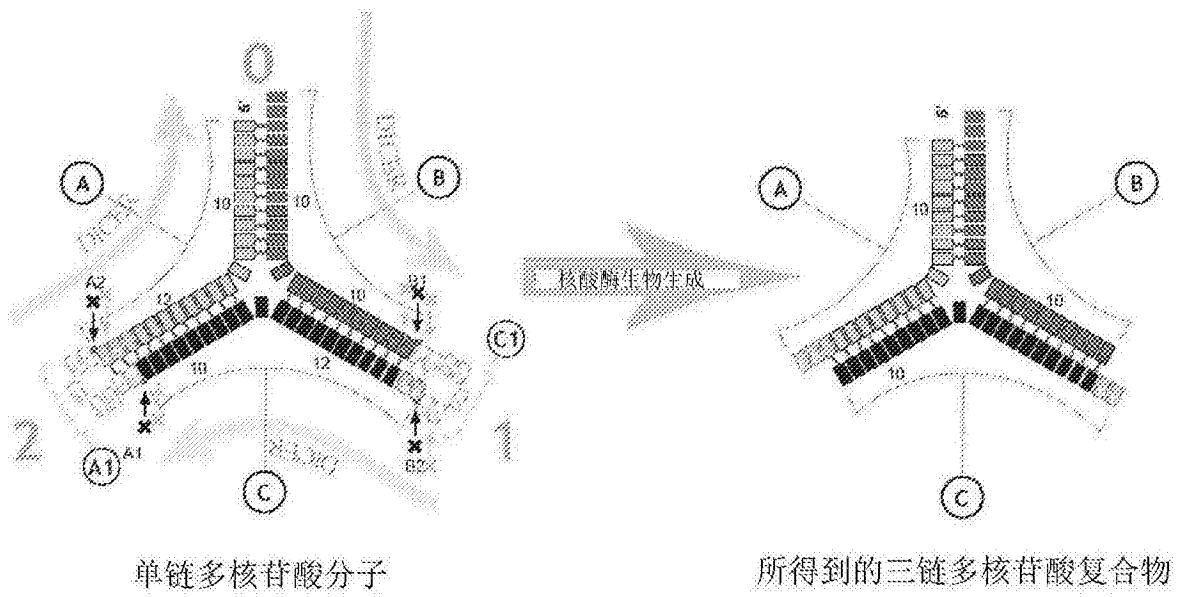


图16

纳米颗粒Dicer生物生成

4%琼脂糖电泳

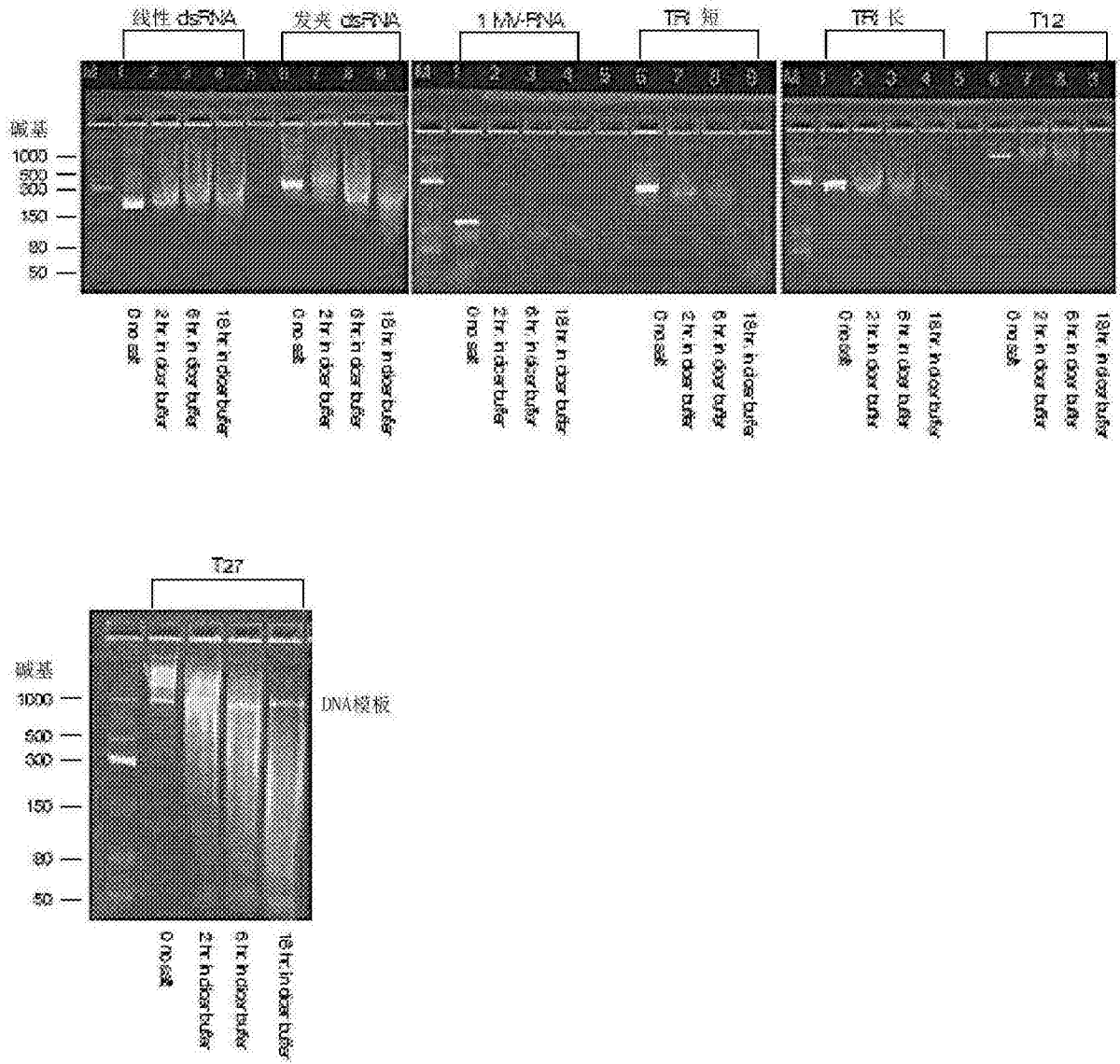
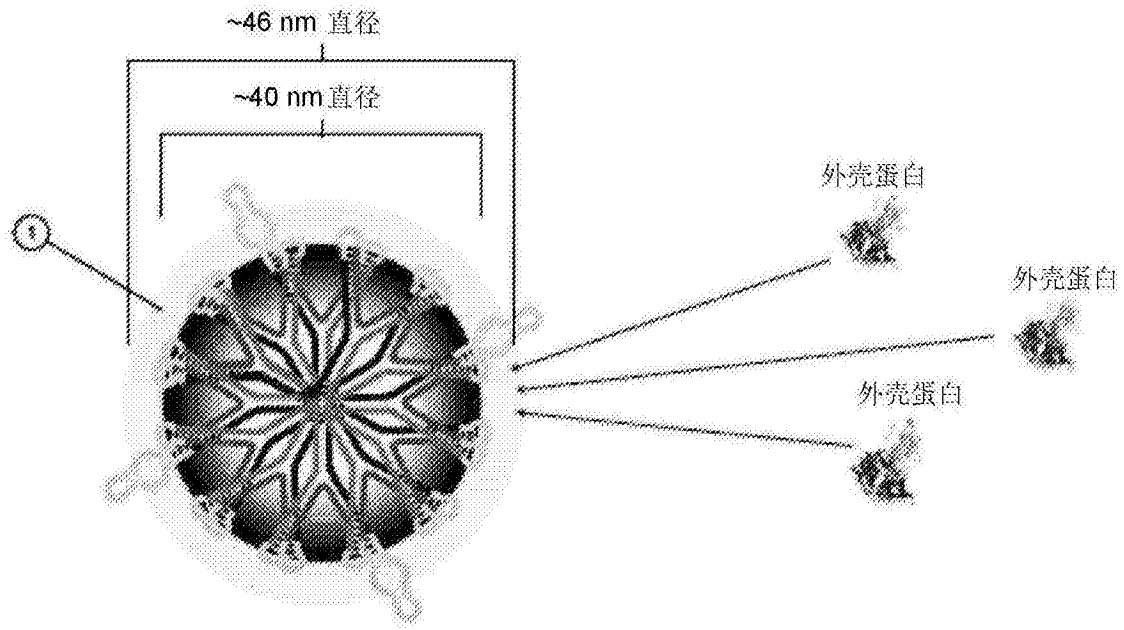


图17



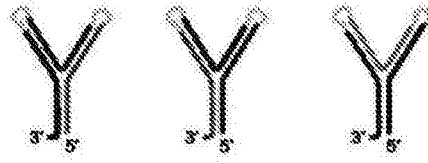
病毒外壳蛋白封装的40 nm自形成纳米颗粒

图18

1. MV-RNA序列内的各个MV-RNA引导链取向

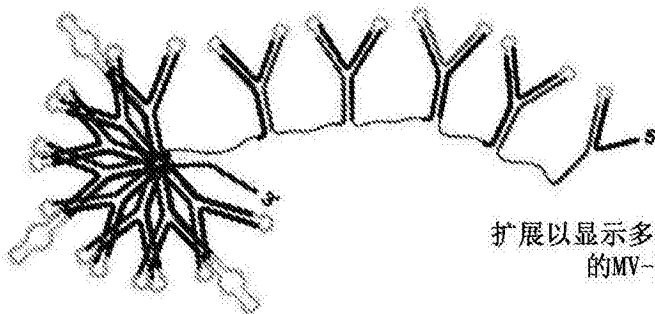


以P/S/K取向的单个MV-RNA



以P/S/K、S/K/P、K/P/S取向的单个MV-RNA

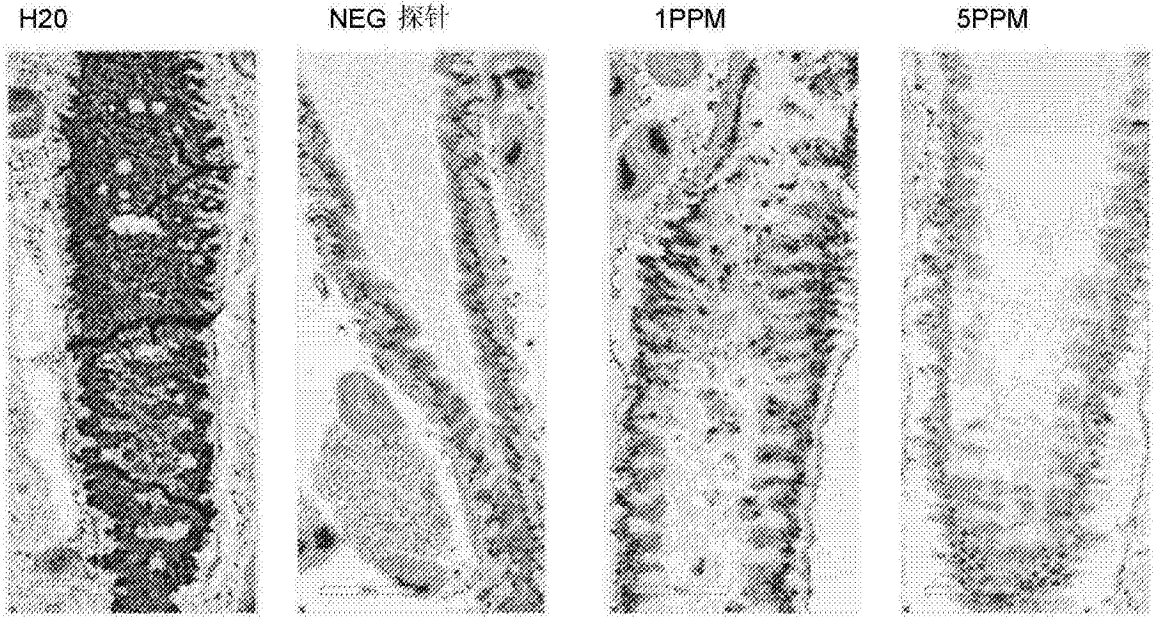
2. 在转录物序列内以多个的各个MV-RNA引导链取向



扩展以显示多核苷酸纳米颗粒转录物内的MV-RNA引导链取向。

图19

WCR前肠(20x) ISH:



WCR前肠(40x) ISH:

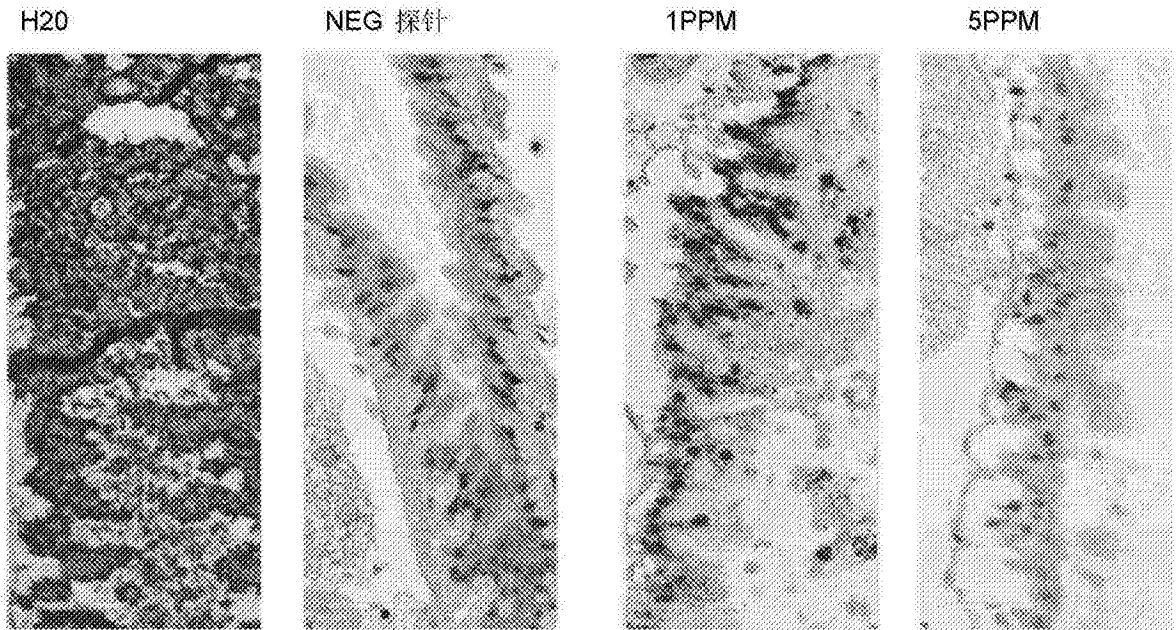


图20

在玉蜀黍组织中的纳米颗粒半衰期

纳米颗粒和dsRNA的等摩尔比较降解

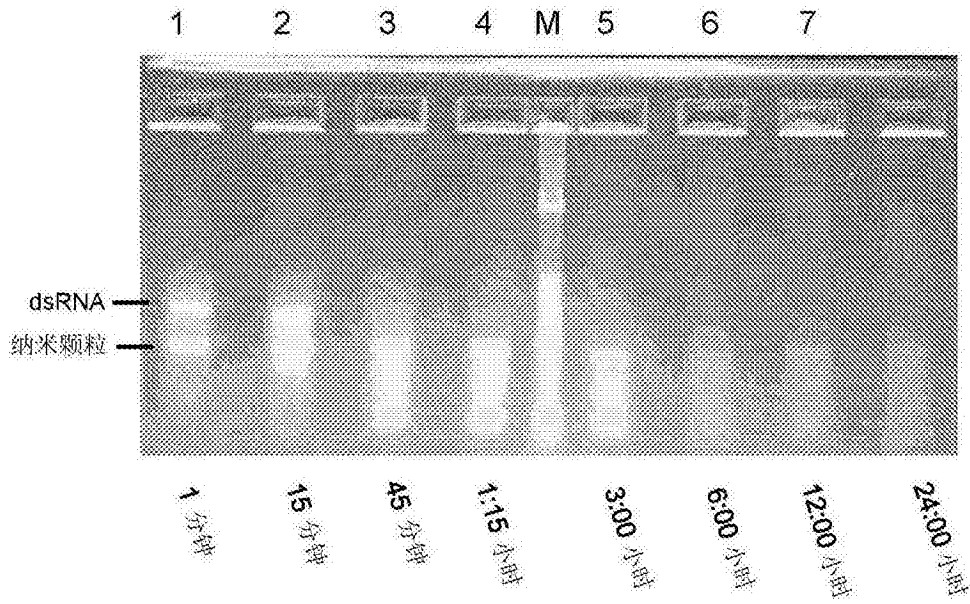


图22

唾液中的比较降解

随着时间过去降解的RNAi触发剂的电泳显现

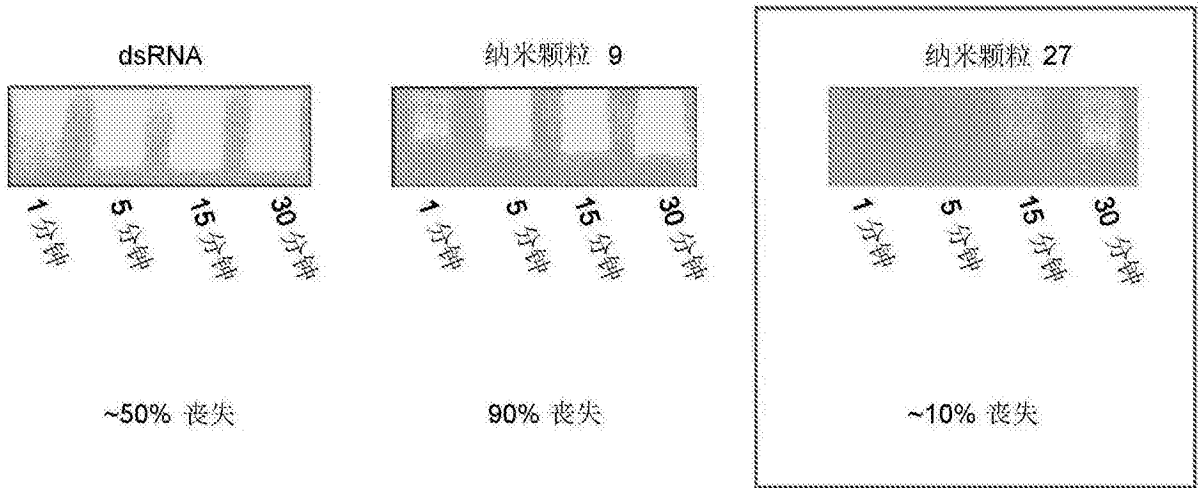


图23

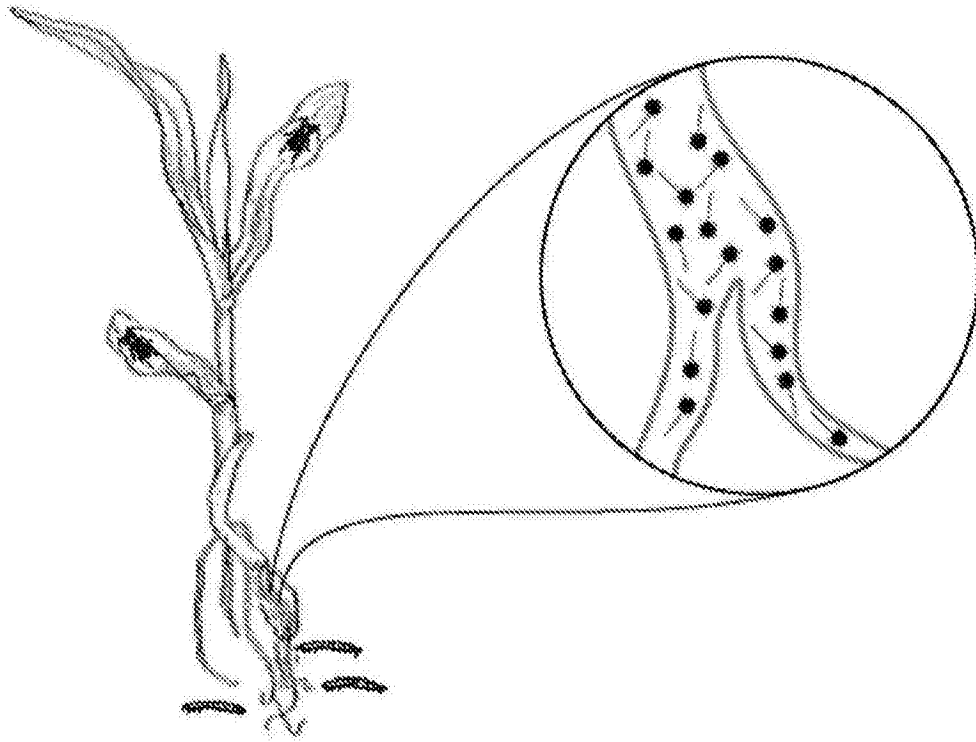


图24

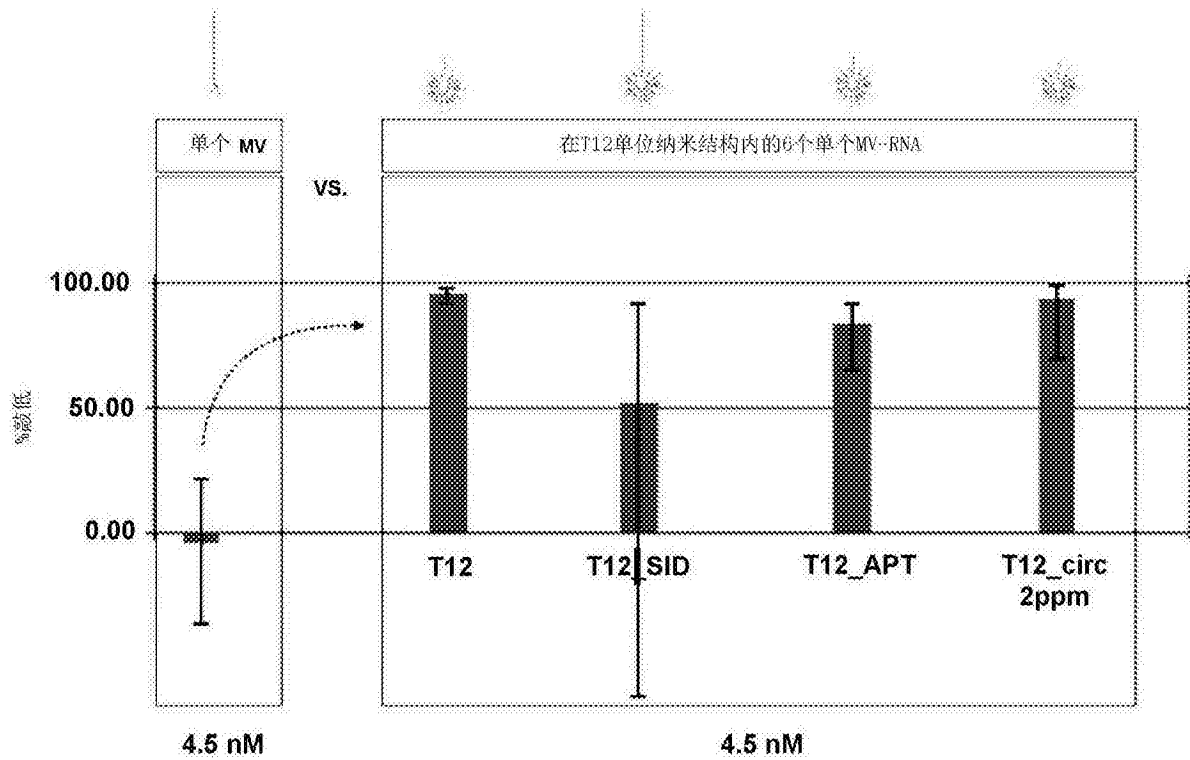


图25

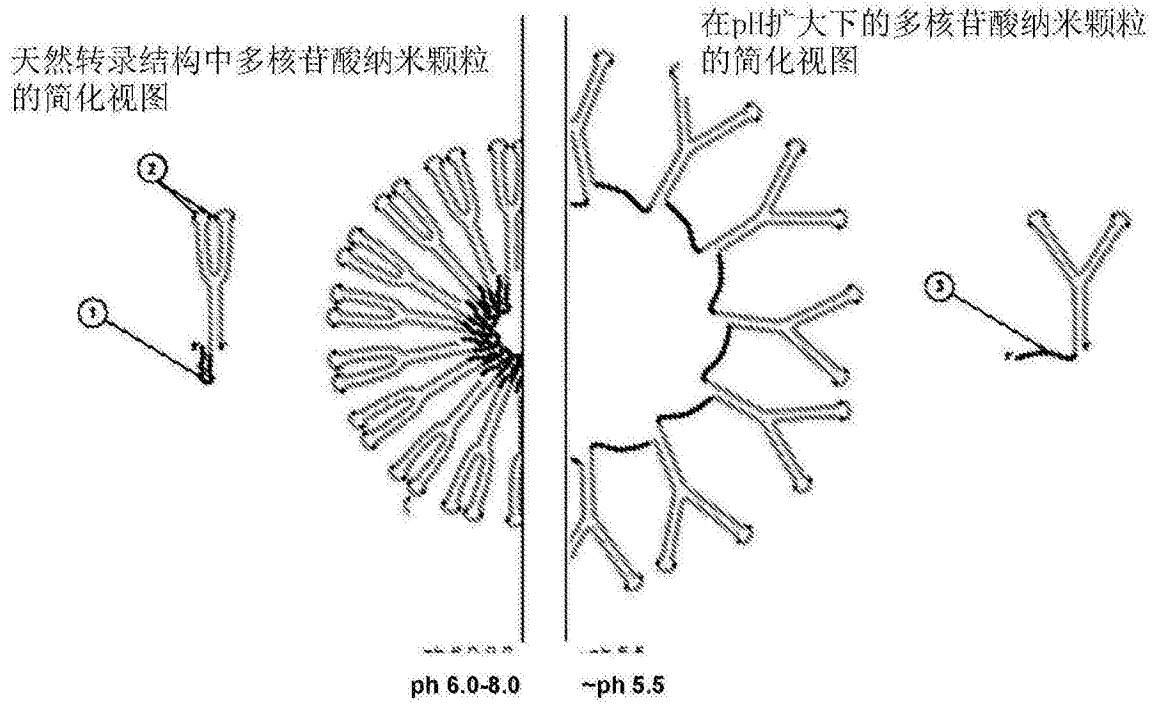


图26