



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110144350 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910404445.9

(22)申请日 2019.05.15

(71)申请人 基诺泰康生物科技(北京)有限公司

地址 100102 北京市朝阳区朝外大街怡景园北里5号楼15B

(72)发明人 王万恒

(74)专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

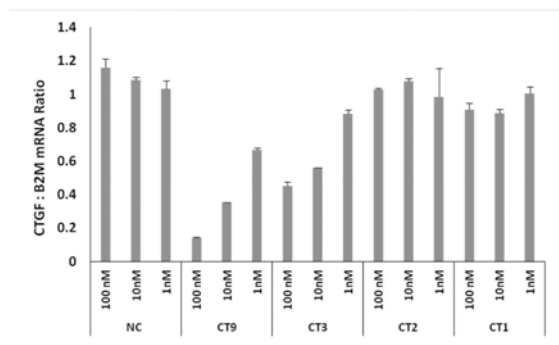
权利要求书1页 说明书6页
序列表6页 附图2页

(54)发明名称

一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用。所述siRNA包括完全互补的正义链和反义链,所述siRNA正义链的核苷酸序列为SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17中的任意一条;所述siRNA反义链的核苷酸序列为与正义链分别对应的SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18。本发明的siRNA分子能够特异性抑制人和动物细胞中CTGF基因的表达,抑制或减少瘢痕的形成。



1. 一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述siRNA包括完全互补的正义链和反义链,所述siRNA正义链的核苷酸序列为SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37中的任意一条;所述siRNA反义链的核苷酸序列为与正义链分别对应的SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38。

2. 根据权利要求1所述的一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述siRNA的正义链和反义链中至少一条单链的3'末端还连接有1至3个额外的核苷酸,从而在siRNA正义链和反义链互补配对后形成至少一个由1至3个核苷酸构成的3'突出端。

3. 根据权利要求2所述的一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述3'突出端为连续的2个尿嘧啶核苷酸UU。

4. 根据权利要求2所述的一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述siRNA正义链和反义链都含有3'突出端。

5. 一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述siRNA包括完全互补的正义链和反义链,所述siRNA正义链的核苷酸序列为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17中的任意一条;所述siRNA反义链的核苷酸序列为与正义链分别对应的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18。

6. 一种权利要求1-5所述特异性抑制CTGF基因表达的siRNA在抑制瘢痕形成中的用途。

7. 根据权利要求6所述的一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA在抑制瘢痕形成中的用途,其特征在于,所述siRNA通过特异性抑制人和动物细胞中CTGF基因的表达,从而抑制或减少瘢痕的形成。

一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地是一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用。

背景技术

[0002] 我国每年因创伤就医高达6200万人,毁容性瘢痕患者多达1200万人,全国2014年住院手术人次为4382.92万人次;人体皮肤外伤/战后创伤、切割伤、烧伤、皮肤感染、外科手术等皮肤创伤愈合过程中必然产生瘢痕,瘢痕是上述原因引起的正常皮肤组织外观形态和组织病理学改变。创伤愈合过程反应异常、过度增生形成病理性瘢痕。而面颈部及四肢关节部位的病理性瘢痕不仅影响外观甚至毁容,还可能引发功能障碍,常伴有瘙痒、疼痛、感染等并发症,是烧(创)伤、手术后最常见的并发症之一,给患者身心健康带来极大伤害,是创伤科、整形外科和皮肤科面临的难题之一。

[0003] 目前,治疗瘢痕或者预防手术后瘢痕生长还未确立有效的单一治疗方案,现有的治疗方法主要有物理疗法、手术切除和类固醇类激素/化疗药物/干扰素等普通药物治疗和生长因子相关药物治疗。物理疗法是通过如电、光、磁、声、压力等方式抑制和治疗瘢痕,疗效和风险并存。手术切除常为病理性瘢痕影响功能障碍时采用,复发率较高;对于类固醇激素等药物治疗而言,长期使用类固醇激素治疗会造成皮质类固醇增多症、色素沉着、皮肤溃疡等不良反应,且复发率高;化疗药物毒性可导致贫血、血小板减少症和白细胞减少症等。上述四种治疗方法都会对患者带来不同程度的负面影响且治疗常在瘢痕形成之后,疗效较差。而生长因子相关药物治疗则是通过阻断细胞因子信号通路的传导而抑制瘢痕的生成,在瘢痕形成前发挥作用,从而减少瘢痕的形成,起到治疗的作用。如成纤维细胞生长因子(FGF)、 α -肿瘤坏死因子(TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)、表皮生长因子(EGF)、 β 转化生长因子(TGF- β)等。目前虽有人工合成的转化生长因子TGF- β 阿伏特明(avotermin)已进入III期临床实验阶段,但生长因子相关药物在瘢痕治疗的应用研究尚较少。

[0004] 生长因子在瘢痕形成过程中发挥着重要作用,TGF- β 1是纤维化疾病发生发展过程中最重要的致病因子。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是一种促纤维化的生长因子,通过促进细胞增殖、调节细胞外基质基因表达等作用发挥生物效应,在成人正常皮肤组织中很少能被检测到。CTGF为TGF- β 1的直接下游效应介质,刺激成纤维细胞增殖和以胶原为主的细胞外基质沉积,增殖的成纤维细胞不断分泌CTGF,最终导致纤维化,促进病理性瘢痕形成。而CTGF的生物学功能较单一,特异性高,阻断其表达不易引起创面愈合延迟、炎症反应等一些问题。2008年Sisco M等的研究表明,CTGF体外实验中90% mRNA被抑制,体内瘢痕组织内的实验,55%CTGF mRNA表达被抑制,显著减少CTGF蛋白表达20%,减少大约75% α -SMA阳性的肌腱成纤维细胞数量,同时显著抑制Col I,Col III,纤连蛋白(Fn)和TIMP-1mRNA表达,并最终限制抑制瘢痕形成,同时不影响伤口愈合。

[0005] 小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)是21~25nt大小的短序列双链RNA分

子。转染与目的基因同源的siRNA至靶细胞,通过与目的基因单链mRNA互补结合,启动靶基因降解程序,诱导靶序列的mRNA降解,阻断靶基因表达,细胞表现特定基因的缺陷表型。与常规反义核酸技术相比,siRNA技术简单易行,具备基因抑制率高、特异性强以及浓度低等优势,在基因功能研究领域已得到广泛应用,为肿瘤、遗传性疾病以及病毒感染等提供了基因治疗的新途径。

发明内容

[0006] 本发明就是为了解决上述技术问题,所提出的一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用。

[0007] 本发明是按照以下技术方案实现的。

[0008] 一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,其特征在于:所述siRNA包括完全互补的正义链和反义链,所述siRNA正义链的核苷酸序列为SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37中的任意一条;所述siRNA反义链的核苷酸序列为与正义链分别对应的SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38。

[0009] 进一步的,所述siRNA的正义链和反义链中至少一条单链的3'末端还连接有1至3个额外的核苷酸,从而在siRNA正义链和反义链互补配对后形成至少一个由1至3个核苷酸构成的3'突出端。

[0010] 进一步的,所述3'突出端为连续的2个尿嘧啶核苷酸UU。

[0011] 进一步的,所述siRNA正义链和反义链都含有3'突出端。

[0012] 一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA,所述siRNA包括完全互补的正义链和反义链,所述siRNA正义链的核苷酸序列为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17中的任意一条;所述siRNA反义链的核苷酸序列为与正义链分别对应的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18。

[0013] 一种上述特异性抑制CTGF基因表达的siRNA在抑制瘢痕形成中的用途。

[0014] 进一步的,所述siRNA通过特异性抑制人和动物细胞中CTGF基因的表达,从而抑制或减少瘢痕的形成。

[0015] 本发明获得了如下有益效果。

[0016] 本发明公开了九组针对CTGF基因表达的干扰RNA的核苷酸序列(siRNA),其能够靶向抑制CTGF基因表达进而用于治疗与CTGF基因异常表达相关的疾病。另外,本发明所述的siRNA序列在不同物种中具有高度同源性,由于这种高度同源性,一方面,在不同物种间的试验可以采用相同序列的siRNA,减少根据不同物种的基因构成而合成不同序列siRNA的过程,可以大大缩短测试不同动物模型时的实验进程,快速完成各种临床前的试验;另一方面,还可避免采用不同序列siRNA所带来的对相应动物CTGF mRNA抑制效率、稳定性的不确定性,从而可以加速后续药物研发进程。

附图说明

[0017] 图1是本发明倒置荧光显微镜对凯肽转染的Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo在三种细胞系中的转染情况图；

[0018] 图2是本发明转染试剂对三种细胞凋亡的影响图；

[0019] 图3是本发明不同CTGF siRNA (CT1,CT2,CT3,CT9) 及其浓度 (1,10,100nM) 对CTGF表达的影响图。

具体实施方式

[0020] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述。

[0021] 实施例1 siRNA序列信息

[0022] 本发明以CTGF mRNA (Genebank注册号: (NM_001901) 为siRNA设计的模板,得到三条物种保守的siRNA,其序列信息见表1。同时,设置正义链核苷酸序列如序列19所示和反义链核苷酸序列如序列20所示的siRNA,编号为NC。NC为与CTGF mRNA无对应靶作用位点的无关序列,作为阴性对照。

[0023] 表1:三条靶向CTGF的siRNA信息

[0024]

siRNA 编号	正义链 /反义 链	序列号	核苷酸序列(5'-3')	对应的 mRNA 上 的靶作用 位点
CT1	正义链	SEQ ID NO:1	CCGGGUUACCAAUGACAACUU	863-881
	反义链	SEQ ID NO:2	GUUGUCAUUGGUAACCCGGUU	
CT2	正义链	SEQ ID NO:3	AGACCUGUGGGGAUGGGCAUUU	838-856
	反义链	SEQ ID NO:4	AUGCCCAUCCACAGGUCUUU	
CT3	正义链	SEQ ID NO:5	CCGACUGGAAGACACGUUUUU	752-770
	反义链	SEQ ID NO:6	AAACGUGUCUUCCAGUCGGUU	
CT4	正义链	SEQ ID NO:7	GCACCAGCAUGAAGACAUAUU	1024-1042
	反义链	SEQ ID NO:8	UAUGUCUUCAUGCUGGUGCUU	
CT5	正义链	SEQ ID NO:9	GAAGACACGUUUGGCCAGUU	759-777
	反义链	SEQ ID NO:10	CUGGGCCAAACGUGUCUUCUU	
CT6	正义链	SEQ ID NO:11	GCUAAAUUCUGUGGAGUAUUU	1047-1065
	反义链	SEQ ID NO:12	AUACUCCACAGAAUUUAGCUU	
CT7	正义链	SEQ ID NO:13	GCGAGGUCAUGAAGAAGAAUU	1135-1153
	反义链	SEQ ID NO:14	UUCUUCUUCAUGACCUCGCUU	
CT8	正义链	SEQ ID NO:15	AAGCUGACCUGGAAGAGAAUU	934-952
	反义链	SEQ ID NO:16	UUCUCUCCAGGUCAGCUUUU	
CT9	正义链	SEQ ID NO:17	CCUAUCAAGUUUGAGCUUUUU	999-1017
	反义链	SEQ ID NO:18	AAAGCUCAAACUUGAUAGGUU	
NC	正义链	SEQ ID NO:19	UUCUCCGAACGUCGCACGU	无
	反义链	SEQ ID NO:20	ACGUGACACGUUCGGAGAA	
CT1	正义链	SEQ ID NO:21	CCGGGUUACCAAUGACAAC	863-881
	反义链	SEQ ID NO:22	GUUGUCAUUGGUAACCCGG	
CT2	正义链	SEQ ID NO:23	AGACCUGUGGGGAUGGGCAU	838-856
	反义链	SEQ ID NO:24	AUGCCCAUCCACAGGUCU	
CT3	正义链	SEQ ID NO:25	CCGACUGGAAGACACGUUU	752-770
	反义链	SEQ ID NO:26	AAACGUGUCUUCCAGUCGG	
CT4	正义链	SEQ ID NO:27	GCACCAGCAUGAAGACAUA	1024-1042
	反义链	SEQ ID NO:28	UAUGUCUUCAUGCUGGUGC	
CT5	正义链	SEQ ID NO:29	GAAGACACGUUUGGCCAG	759-777
	反义链	SEQ ID NO:30	CUGGGCCAAACGUGUCUUC	
CT6	正义链	SEQ ID NO:31	GCUAAAUUCUGUGGAGUAU	1047-1065
	反义链	SEQ ID NO:32	AUACUCCACAGAAUUUAGC	
CT7	正义链	SEQ ID NO:33	GCGAGGUCAUGAAGAAGAA	1135-1153
	反义链	SEQ ID NO:34	UUCUUCUUCAUGACCUCGC	
CT8	正义链	SEQ ID NO:35	AAGCUGACCUGGAAGAGAA	934-952
	反义链	SEQ ID NO:36	UUCUCUCCAGGUCAGCUU	

[0025]

CT9	正义链	SEQ ID NO:37	CCUAUCAAGUUUGAGCUUU	999-1017
	反义链	SEQ ID NO:38	AAAGCUCAAACUUGAUAGG	

[0026] 表1中所列的siRNA的正义链和反义链由上海吉玛生物技术有限公司合成。其中，序列SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:18为序列SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:38 3'末端依次对应引入2个尿嘧啶核苷酸而形成。序列SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:18用退火盐溶液溶解等摩尔的正义链和反义链混合物，随后常规退火以形成siRNA双链，其双链的两端分别具有UU的3'突出端。

[0027] 实施例2:转染试剂验证

[0028] 凯肽基因转染试剂(山西国信凯尔生物技术有限公司)为本发明所用转染试剂，本发明首先对凯肽转染siRNA的转染效率和细胞毒性进行验证，排除转染试剂对实验的影响。

[0029] (1) 细胞转染效率

[0030] 将人肺癌细胞(大细胞肺癌)(H460,购自ATCC,BNCC102112)、腺癌肺泡基底上皮细胞(A549细胞)(购自ATCC,BNCC100258)和人支气管上皮样细胞(HBE,购自ATCC,BNCC338600)细胞接种于24孔板,接种密度为 10^5 细胞/孔,用含有F12+10%胎牛血清的细胞培养基置于 37°C 5% CO_2 培养。细胞转染按照凯肽基因转染试剂说明分别转染50nM的BLOCK-iT™Alexa Fluor®Red Fluorescent Oligo(购自invitrogen)到H460、A549和HBE细胞, 37°C 培养。24h后通过倒置荧光显微镜和流式细胞仪检测细胞转染效率,结果表明:在三种细胞系中凯肽转染siRNA的转染效率均大于90%(图1)。

[0031] (2) 细胞毒性

[0032] 将H460、A549和HBE细胞接种于24孔板,接种密度为 10^5 细胞/孔,用含有F12+10%胎牛血清的细胞培养基置于 37°C 5% CO_2 培养过夜。分别用转染效率大于90%的凯肽试剂量处理A549、H460和HBE细胞, 37°C 5% CO_2 培养72h。分别在24h、48h和72h通过Annexin V-EGFP/PI Apoptosis Detection Kit(购自北京全式金生物技术有限公司)和荧光显微镜或流式细胞仪检测细胞存活率。阴性对照是F12+10%胎牛血清的细胞培养基,F12细胞培养液(购自GIBCO),胎牛血清(购自Biological Industries),参比试剂是Lipofectaine RNAiMAX(购自Invitrogen)。结果表明,细胞转染效率在90-99%时,转染后的细胞与未转染的细胞相比,细胞凋亡均无显著性差异,表明凯肽转染试剂几乎无细胞毒性(图2)。

[0033] 实施例3:荧光定量实时PCR(qRT-PCR)检测siRNA在体外对CTGF mRNA表达水平的抑制效果。

[0034] 将A549细胞接种于24孔板,接种密度为 10^5 细胞/孔,F12+10%胎牛血清的细胞培养基置于 37°C 5% CO_2 培养过夜。

[0035] 按照凯肽基因转染试剂说明分别转染4种CTGF siRNA(CT1:SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2;CT2:SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4;CT3:SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:6;CT9:SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18)和以无靶向性的阴性对照siRNA(记为NC)到A549细胞,siRNA浓度为1,10和100nM,然后在 37°C 5% CO_2 培养48h。

[0036] 在培养转染的细胞48h后,用Rneasy Mini Kit(Qiagen公司)提取细胞中的总RNA。每个样品取2 μg 总RNA,按照PrimeScript™1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara公司)

的使用方法反转录得到cDNA,利用TaqMan Assay检测试剂盒 (Applied Biosystems公司) 进行荧光定量实时PCR反应。PCR条件如下:95℃预变性10min,进入循环:95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环后,72℃延伸10min。使用人B2microglobulin (B2M) 作为定量PCR反应的内参基因 (Applied Biosystems公司,Catalog number:4310886E),CTGF目的基因表达的Ct值用B2M的Ct值进行标准化,样品扩增的倍数变化的计算采用 $2^{-\Delta\Delta t}$ 法。所用PCR扩增CTGF引物和B2M引物序列如表3所示。

[0037] 表3:定量PCR检测用引物序列

[0038]

名称	上游 (5' -3')	下游 (5' -3')
人-CTGF	CACCCGGGTTACCAATGACA	TCCGGGACAGTTGTAATGGC

[0039] 结果显示,经处理48h的细胞,CT9和CT3对CTGF mRNA的表达有显著的抑制作用,随着其siRNA剂量的增加(1nM、10nM、100nM)CTGF mRNA的表达逐渐降低。如1nM CT9siRNA对CTGF表达抑制率为36%,100nM的处理可提升到88%,而阴性对照siRNA的处理对CTGF的表达没有影响,表明CTGF siRNA转染成功且有效阻抑了CTGF的表达(图3)。

序列表

- <110> 基诺泰康生物科技(北京)有限公司
- <120> 一种特异性抑制CTGF基因表达的siRNA及其在抑制瘢痕形成中的应用
- <160> 38
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
- <400> 1
- ccggguuacc aaugacaacu u 21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
- <400> 2
- guugucuuug gaaacccggu u 21
- <210> 3
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
- <400> 3
- agaccugugg gaugggcauu u 21
- <210> 4
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
- <400> 4
- augcccaucc cacaggucuu u 21
- <210> 5
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
- <400> 5
- ccgacuggaa gacacguuuu u 21
- <210> 6
- <211> 21
- <212> RNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 6
aaacgugucu uccagucggu u 21
<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 7
gcaccagcau gaagacauau u 21
<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 8
uaugucuuca ugcuggugcu u 21
<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 9
gaagacacgu uggcccagu u 21
<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 10
cugggcaaaa cgugucuucu u 21
<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 11
gcuaaaauucu guggaguauu u 21
<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 12
auacuccaca gaauuuagcu u 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 13
gcgaggucau gaagaagaau u 21
<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 14
uucuucuca ugaccucgcu u 21
<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 15
aagcugaccu ggaagagaau u 21
<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 16
uucucuucca ggucagcuuu u 21
<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 17
ccaucaagu uugagcuuuu u 21
<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 18
aaagcucaaa cuugauaggu u 21
<210> 19
<211> 19
<212> RNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 19
uucuccgaac gucgcacgu 19
<210> 20
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 20
acgugacacg uucggagaa 19
<210> 21
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 21
ccggguuacc aaugacaac 19
<210> 22
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 22
guugucauug guaaccgg 19
<210> 23
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 23
agaccugugg gaugggcau 19
<210> 24
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 24
augcccaucc cacaggucu 19
<210> 25
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 25
ccgacuggaa gacacguuu 19

<210> 26
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 26
aaacgugucu uccagucgg 19
<210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 27
gcaccagcau gaagacaua 19
<210> 28
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 28
uaugucuuca ugcuggugc 19
<210> 29
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 29
gaagacacgu uggcccag 19
<210> 30
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 30
cugggcaaaa cgugucuuc 19
<210> 31
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
<400> 31
gcuaaaauucu guggaguau 19
<210> 32
<211> 19
<212> RNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 32
auacuccaca gaauuuagc 19
<210> 33
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 33
gcgaggucou gaagaagaa 19
<210> 34
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 34
uucuucuuca ugaccucgc 19
<210> 35
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 35
aagcugaccu ggaagagaa 19
<210> 36
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 36
uucucuucca ggucagcuu 19
<210> 37
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 37
ccuaucaagu uugagcuuu 19
<210> 38
<211> 19
<212> RNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 38
aaagcucaaa cuugauagg 19

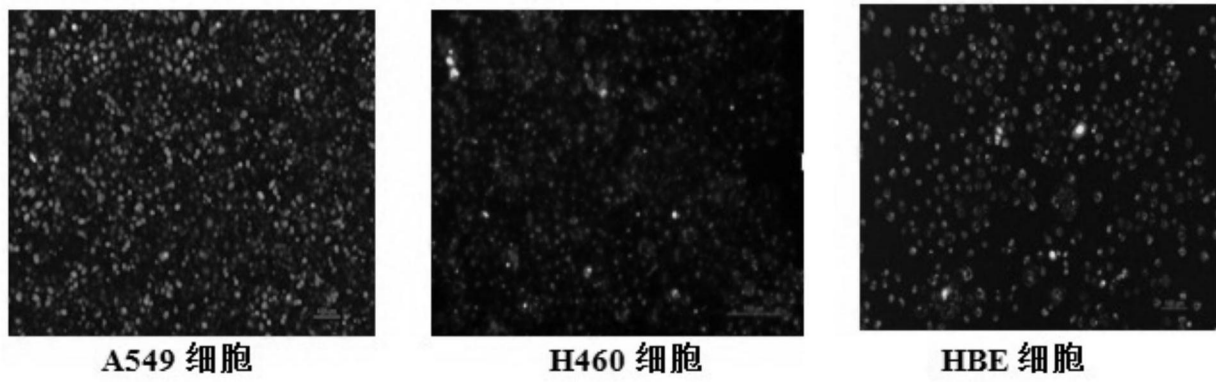


图1

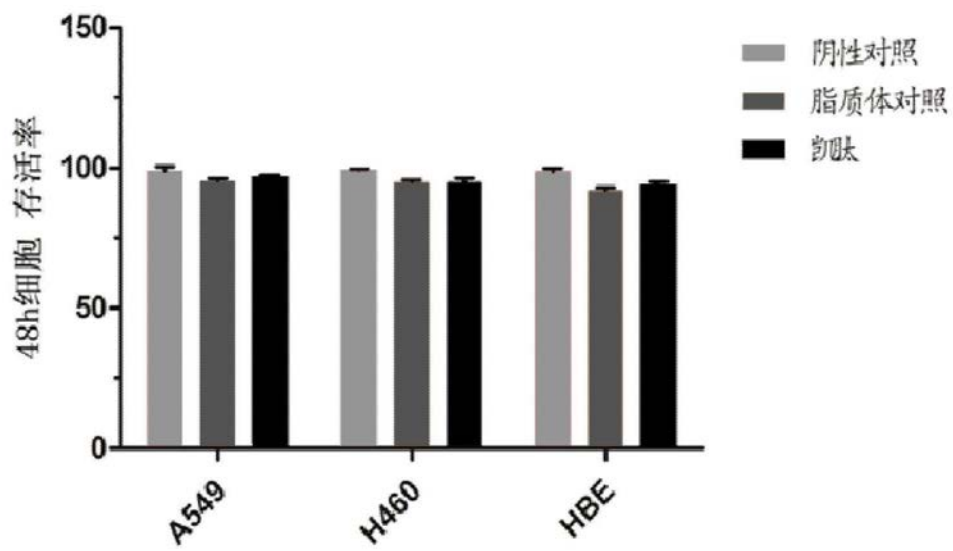


图2

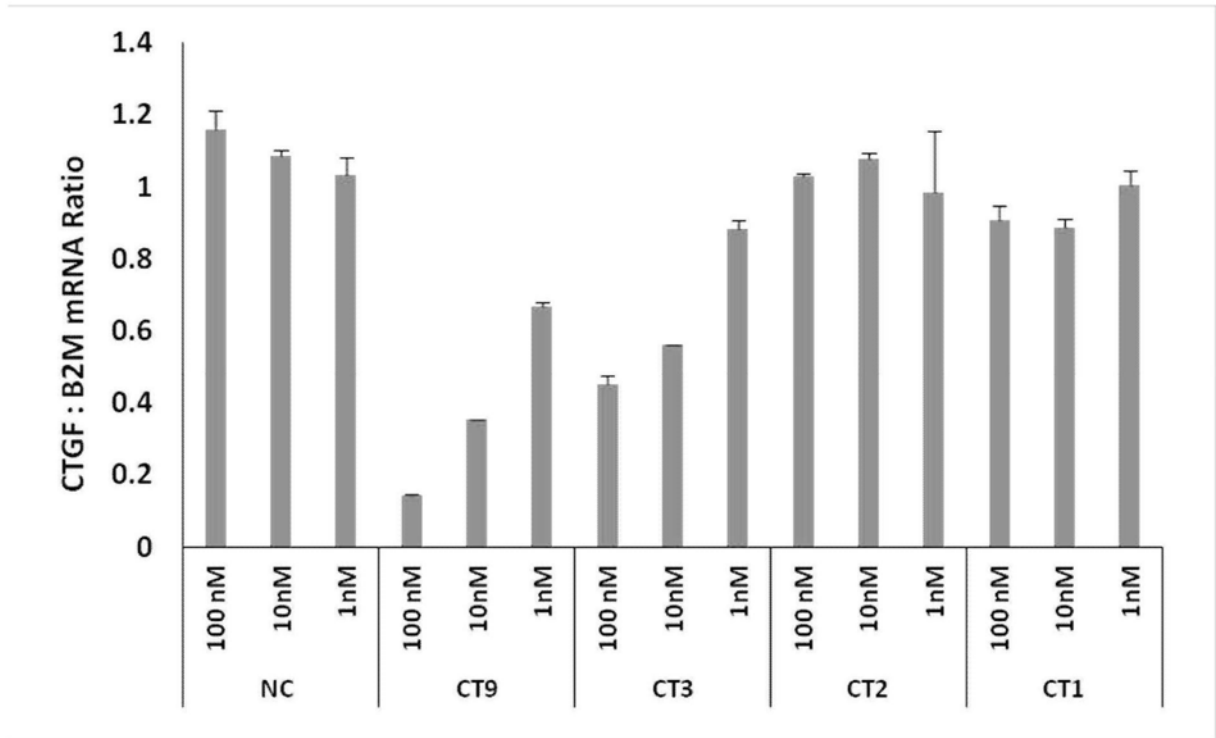


图3