



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109701019 B

(45) 授权公告日 2021.07.16

(21) 申请号 201910006848.8

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.04

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

JP 2018157786 A, 2018.10.11

申请公布号 CN 109701019 A

CN 103038343 A, 2013.04.10

WO 2015171457 A1, 2015.11.12

(43) 申请公布日 2019.05.03

CN 104955940 A, 2015.09.30

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学

Juan Liu et al..CCR7 Chemokine

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

Receptor-Inducible lnc-Dpf3 Restrains

(72) 发明人 刘娟 曹雪涛

Dendritic Cell Migration by Inhibiting

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

HIF-1 $\alpha$ -Mediated Glycolysis.《Immunity》

务所(普通合伙) 31268

.2019,第50卷第600-615页.

代理人 赵青

审查员 李恩

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表13页 附图2页

(54) 发明名称

一种新的长链非编码RNA即lnc-Dpf3、其序列、免疫效应及用途

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体是一种新的长链非编码RNA、其序列、免疫效应及用途,本发明涉及SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA(即lnc-Dpf3)或其互补或同源RNA序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂在调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能中的应用、或在制备调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能药物或试剂盒中的应用。本发明可应用于调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,和/或进一步用于调控机体免疫应答及稳态平衡、防治接触性皮炎等过敏性疾病、结肠炎等自身免疫性疾病、肿瘤免疫治疗方案选择和/或预后评估,具有广泛的应用前景。

1. SEQ ID NO: 1所示的长非编码RNA或其表达产物、或其抑制剂或增效剂在制备调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的药物或试剂盒中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述树突状细胞趋化能力选自:体外树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下发生趋化、体内由外周皮肤组织向刺激淋巴结发生趋化性迁移;趋化性树突状细胞状态选自:树突状细胞表面MHCII、CD11c、CD40、CCR7的表达、缺氧诱导因子HIF1 $\alpha$ 的活化、乳酸脱氢酶LDHA的表达、乳酸的产生;所述功能选自:趋化性树突状细胞诱导T细胞活化,介导炎症性免疫应答。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述RNA序列或其表达产物、或其增效剂抑制树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能;所述RNA序列或其表达产物的抑制剂促进树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述RNA序列或其表达产物、或其增效剂选自:包含所述序列的表达载体、所述序列的外源性表达产物、促使所述序列高表达的试剂;所述RNA序列或其表达产物的抑制剂选自:针对所述序列的RNAi、反义寡核苷酸、用于阻碍或降低所述序列表达和/或其功能的特异性抑制剂和/或分子化合物。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述RNA序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂进一步用于调控机体免疫应答及稳态平衡、防治过敏性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤免疫治疗方案选择和/或预后评估。

6. 一种调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的药物或试剂盒,其特征在于,包含:

- i) 有效量的SEQ ID NO: 1所示的长非编码RNA或其表达产物、或其抑制剂或增效剂;
- ii) 药学或免疫学上可接受的载体或辅料。

## 一种新的长链非编码RNA即lnc-Dpf3、其序列、免疫效应及用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和医学领域,具体地说,是一种长链非编码RNA——lnc-Dpf3,其在调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能中的应用。

### 背景技术

[0002] 哺乳动物基因组可转录多种长非编码RNA(long noncoding RNA,lncRNA),然而其中仅有少数lncRNA的序列和功能被明确。近年来,lncRNA在生命生理过程以及疾病进程中的作用不断受到关注,但是关于lncRNA与免疫系统之间的研究并不多,尤其是lncRNA在树突状细胞的报道几乎空白。

[0003] 树突状细胞是连接天然免疫和适应性免疫的关键桥梁,在激活机体抗病原体免疫应答及维持自身免疫耐受过程中发挥关键性调控作用。树突状细胞的功能调控决定了免疫应答的整体平衡。树突状细胞广泛分布于非淋巴组织及淋巴组织,树突状细胞的体内迁移对于其成熟活化及功能调控至关重要。然而,越来越多的研究表明树突状细胞迁移的紊乱可能导致树突状细胞在炎症部位的过度聚集及活化,导致组织过度炎症,甚至引发自身免疫性疾病的发生。树突状细胞相关趋化因子及趋化因子受体已成为自身免疫性疾病的潜在诊断标识和治疗靶点。

[0004] DC迁移受到趋化因子、细胞因子及其他炎症介质的共同调控。分布于外周的未成熟DC通过其表面模式识别受体感知危险信号,摄取病原体后成熟活化,上调趋化因子受体CCR7表达。由淋巴结基质细胞所分泌的CCL19/CCL21作用于DC表达的CCR7,促进DC向次级淋巴器官的T细胞区迁移,启动并调控T细胞介导的适应性免疫应答。DC趋化过程中糖酵解水平明显上升,表现出转录因子缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1alpha,HIF1α)活化增强,糖酵解酶乳酸脱氢酶LDHA表达上升,乳酸产生量增加。CCL19/CCL21被证明与多种自身免疫性疾病如多发性硬化(multiple sclerosis,MS)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)及炎症性肠病(inflammatory bowel diseases,IBD)等的发生发展密切相关。CCL19/CCL21或其受体CCR7的基因缺失小鼠中实验性自身免疫性脑脊髓炎、抗原诱导的关节炎发病明显减弱,且DC介导的Th1及Th17细胞活化显著降低。因此CCL19/CCL21依赖的DC迁移及功能活化对于维持免疫应答及免疫调控的动态平衡发挥关键作用。

[0005] 但是,目前为止没有报道过参与调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的特异性长链非编码RNA,因此尚不清楚长链非编码RNA对趋化性树突状细胞免疫功能调控的作用机制。为方便临床和科研应用,本领域中迫切需要研究和开发出可调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的特异性分子。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的物质:lnc-Dpf3及其杂交或同源序列、其表达产物、或它们的抑制剂或增效

剂。本发明的另一目的在于提供以上物质在调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能中的应用以及相应的药物和试剂盒。

[0007] 本发明从小鼠Dpf3的基因第一个内含子中筛选出了由树突状细胞或趋化性树突状细胞特异性表达的长链非编码RNA(long noncoding RNA,lncRNA)分子lnc-Dpf3(Noncode database ID:n274819,GenBank No:AK140952.1,SEQ ID NO:1)。lnc-Dpf3在树突状细胞中特异性高表达,在树突状细胞受趋化因子CCL19和CCL21刺激后表达上调、在树突状细胞由外周组织向淋巴结迁移后表达上调、在趋化性树突状细胞中比非趋化性树突状细胞表达更高。在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化减弱、乳酸脱氢酶LDHA表达降低、乳酸产生下降;在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3表达,则导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化增强、体内由外周皮肤向刺激淋巴结组织的趋化增强、转录因子HIF1 $\alpha$ 活化增强、乳酸脱氢酶LDHA表达升高、乳酸产生升高、在接触性皮炎中诱导T细胞活化增强、炎症性免疫应答和组织损伤增强。

[0008] 本发明中进一步提供了长链非编码RNA lnc-Dpf3有效调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的新用途。lnc-Dpf3表达量的检测可应用于免疫相关疾病中免疫功能的检测,对疾病的诊断治疗和预后等给出提示或指导信息。针对lnc-Dpf3表达量的调控,包括干扰抑制表达和高表达等一切影响lnc-Dpf3表达量的干预手段,可应用于免疫相关疾病的治疗。本发明可以辅助完成调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,通过实现对免疫应答的正向或负向的调控,发挥抑制炎症性疾病炎症损伤、阻断自身免疫性疾病进展或增强树突状细胞肿瘤疫苗的效果,从而达到治疗疾病的目的。在此基础上,完成了本发明。

[0009] 本发明的第一方面,提供选自下组的RNA序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂在调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能中的应用:

[0010] (a) SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA;

[0011] (b) 在严格条件下与(a)限定的序列杂交的序列;

[0012] (c) 与(a)或(b)中序列具有90%以上序列相同性的RNA序列;和

[0013] (d) (a)或(b)中序列在非小鼠哺乳动物中的同源序列。

[0014] 本发明的第二方面,提供选自下组的序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂在制备调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的药物或试剂盒中的应用:

[0015] (a) SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA;

[0016] (b) 在严格条件下与(a)限定的序列杂交的序列;

[0017] (c) 与(a)或(b)中序列具有90%以上序列相同性的RNA序列;和

[0018] (d) (a)或(b)中序列在非小鼠哺乳动物中的同源序列。

[0019] 在本发明的优选实施方式中,所述RNA序列是SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述树突状细胞和/或其分化而成的趋化性树突状细胞来源于哺乳动物,优选小鼠、人、大鼠、犬、猴、猩猩、猪、马、牛或羊,更优选小鼠。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述树突状细胞趋化能力选自:树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下发生趋化(体外)、由外周皮肤组织向刺激淋巴结发生趋化性

迁移(体内);趋化性树突状细胞状态选自:树突状细胞表面MHCII、CD11c、CD40、CCR7的表达、缺氧诱导因子HIF1 $\alpha$ 的活化、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase A, LDHA)的表达、乳酸的产生;所述功能选自:趋化性树突状细胞诱导T细胞活化,介导炎症性免疫应答。

[0022] 在本发明的一些实施方式中,所述序列或其表达产物、或其增效剂抑制树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,优选与未接触所述序列或其表达产物的增效剂的对照树突状细胞或趋化性树突状细胞相比,抑制树突状细胞趋化能力、乳酸脱氢酶LDHA表达降低、乳酸产生下降。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述序列或其表达产物的抑制剂促进树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,优选与未接触所述序列或其表达产物的抑制剂的对照树突状细胞或趋化性树突状细胞相比,树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化增强、体内由外周皮肤向刺激淋巴结组织的趋化增强、乳酸脱氢酶LDHA表达升高、乳酸产生升高、在接触性皮炎中诱导T细胞活化增强、炎症性免疫应答和组织损伤增强。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,所述序列或其表达产物、或其增效剂选自:包含所述序列的表达载体、所述序列的外源性表达产物、促使所述序列高表达的试剂;所述序列或其表达产物的抑制剂选自:针对所述序列的RNAi、反义寡核苷酸、用于阻碍或降低所述序列表达和/或其功能的特异性抑制剂和/或分子化合物等试剂。

[0025] 在本发明的一些实施方式中,所述序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂进一步用于调控机体免疫应答及稳态平衡、防治接触性皮炎等过敏性疾病、结肠炎等自身免疫性疾病、肿瘤免疫治疗方案选择和/或预后评估。

[0026] 在本发明的优选实施方式中,所述自身免疫性疾病为结肠炎。

[0027] 本发明的第三方面,提供一种调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的药物或试剂盒,其包含:

[0028] i) 有效量的选自下组的序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂:

[0029] (a) SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA;

[0030] (b) 在严格条件下与(a)限定的序列杂交的序列;

[0031] (c) 与(a)或(b)中序列具有90%以上序列相同性的RNA序列;和

[0032] (d) (a)或(b)中序列在非小鼠哺乳动物中的同源序列;

[0033] ii) 药学或免疫学上可接受的载体或辅料。

[0034] 在本发明的一些实施方式中,所述药物或试剂盒还包含:未成熟或成熟的树突状细胞、趋化性或非趋化性树突状细胞、趋化因子CCL19和/或CCL21。

[0035] 本发明的第四方面,提供一种调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能的方法,所述方法包括使选自下组的序列或其表达产物、或其抑制剂或增效剂接触树突状细胞和/或趋化性树突状细胞的步骤:

[0036] (a) SEQ ID NO:1所示的长非编码RNA;

[0037] (b) 在严格条件下与(a)限定的序列杂交的序列;

[0038] (c) 与(a)或(b)中序列具有90%以上序列相同性的RNA序列;和

[0039] (d) (a)或(b)中序列在非小鼠哺乳动物中的同源序列;

[0040] 在本发明的一些实施方式中,所述方法还包括:

[0041] 在所述接触步骤之前、之时或之后,使所述树突状细胞和/或趋化性树突状细胞与趋化因子接触;优选的所述趋化因子为CCL19和/或CCL21。

[0042] 本文中提供的所有数值范围旨在清楚地包括落在范围端点之间的所有数值及它们之间的数值范围。可对本发明提到的特征或实施例提到的特征进行组合。本说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0043] 如本文所用,“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0044] 如本文所用,术语“表达”在描述lnc-Dpf3是指其RNA水平。

[0045] Lnc-Dpf3及其杂交和同源序列

[0046] 如本文所用,术语“lnc-Dpf3”是指(a)由树突状细胞或趋化性树突状细胞特异性表达的长链非编码RNA分子(lncRNA),其序列如SEQ ID NO:1所示;(b)在严格条件下与(a)限定的序列杂交的序列;(c)与(a)或(b)中序列具有90%以上序列相同性的RNA序列;和(d) (a)或(b)中序列在非小鼠哺乳动物中的同源序列。

[0047] 在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2 \times \text{SSC}$ ,  $0.1\% \text{SDS}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ;或(2)杂交时加有变性剂,如 $50\% (\text{v/v})$  甲酰胺,  $0.1\%$  小牛血清/  $0.1\% \text{Ficoll}$ ,  $42^\circ\text{C}$ 等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。

[0048] 本发明的RNA全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。

[0049] 药物或试剂盒

[0050] 本发明还提供了一种药物或试剂盒,其用于调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,和/或进一步用于调控机体免疫应答及稳态平衡、防治接触性皮炎等过敏性疾病、结肠炎等自身免疫性疾病、肿瘤免疫治疗方案选择和/或预后评估。所述药物或试剂盒包含有效量的本发明的选自下组的序列或其表达产物、或其抑制剂或促效剂以及药学上或免疫学上可接受的载体或辅料。

[0051] 所述“药学上或免疫学上可接受的”的成分是适用于人和/或动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即有合理的效益/风险比的物质。所述“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。

[0052] 所述“药学上或免疫学上可接受的载体”指用于治疗剂或疫苗给药的载体,包括各种赋形剂、稀释剂和佐剂。该术语指这样一些药剂或疫苗载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co., N.J.1991)中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。

[0053] 这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物/疫苗制剂应与给药方式相匹配,例如,本发明的组合物可以用生理盐水或含有葡萄

糖和其它辅剂的水溶液通过常规方法进行制备,以制得针剂形式。所述组合物宜在无菌条件下制造。本发明的制剂还可制成缓释制剂。

[0054] 可根据防治、预后的原理和方法,按照需要在本发明的药物和试剂盒中配备试剂或试剂组。例如,本发明的药物或试剂盒中可进一步包含:未成熟或成熟的树突状细胞、趋化性或非趋化性树突状细胞、趋化因子CCL19和/或CCL21。

[0055] 此外,本发明的试剂盒还可根据需要进行包括:容器、对照物(包括阳性或阴性对照)、使用说明书、缓冲剂等,本领域技术人员可根据具体情况对其进行选择。

[0056] 本发明优点在于:

[0057] 1、证明了lnc-Dpf3能够调控树突状细胞的趋化能力,调控趋化性树突状细胞状态和/或功能,并进一步调控树突状细胞依赖的适应性免疫应答及炎症反应;

[0058] 2、为免疫相关性疾病的诊断治疗和预后提供了简便而有效的工具和方法;

[0059] 3、本发明可用于调控树突状细胞趋化能力和/或趋化性树突状细胞状态和/或功能,和/或进一步用于调控机体免疫应答及稳态平衡、防治接触性皮炎等过敏性疾病、结肠炎等自身免疫性疾病、肿瘤免疫治疗方案选择和/或预后评估,具有广泛的应用前景。

## 附图说明

[0060] 图1:lnc-Dpf3的表达特征

[0061] (1a):lnc-Dpf3在各类免疫细胞中的表达量的qRT-PCR检测。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0062] (1b):lnc-Dpf3在树突状细胞在趋化因子CCL19和CCL21刺激不同时间点的表达量的qRT-PCR检测。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0063] (1c):lnc-Dpf3在淋巴结趋化性树突状细胞和非趋化性树突状细胞的流式细胞术检测。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0064] (1d):lnc-Dpf3在树突状细胞由外周向淋巴结迁移过程中的流式细胞术检测。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0065] 图2:在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3导致树突状细胞趋化状态和能力降低

[0066] (2a):在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3的过表达效率。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0067] (2b):在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化减弱。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0068] (2c):在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的乳酸脱氢酶LDHA表达降低。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0069] (2d):在树突状细胞中过表达lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的乳酸产生下降。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0070] 图3:在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3导致树突状细胞趋化状态和能力升高

[0071] (3a):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3表达的敲除效率。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0072] (3b):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化增强。图中所示结果为平均值±标准差(n=3)。

[0073] (3c):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞体内由外周皮肤向刺激淋巴结组织的趋化增强。图中所示结果为一次代表性结果。

[0074] (3d):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下转录因子HIF1 $\alpha$ 活化增强。图中所示结果为一次代表性结果。

[0075] (3e):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下乳酸脱氢酶LDHA表达升高。图中所示结果为平均值 $\pm$ 标准差(n=3)。

[0076] (3f):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下乳酸产生升高。图中所示结果为平均值 $\pm$ 标准差(n=3)。

[0077] (3g):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在接触性皮炎中诱导T细胞活化的能力增强。图中所示结果为平均值 $\pm$ 标准差(n=3)。

[0078] (3h):在树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3,可导致树突状细胞在接触性皮炎中介导的炎症性组织损伤增强。图中所示结果为一次代表性结果。

### 具体实施方式

[0079] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。本领域技术人员可对本发明做出适当的修改、变动,这些修改和变动都在本发明的范围之内。

[0080] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,可采用本领域中的常规方法,例如参考《分子克隆实验指南》(第三版,纽约,冷泉港实验室出版社,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)或按照供应商所建议的条件。DNA的测序方法为本领域常规的方法,也可由商业公司提供测试。

[0081] 除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0082] 实施例1.树突状细胞的培养过程

[0083] 将小鼠骨髓细胞外加100ng/mL小鼠GM-CSF和10ng/mL小鼠IL-4细胞因子(R&D Systems,Minneapolis,MN)培养在37 $^{\circ}$ C的细胞培养箱中[RPMI-1640(PAA)细胞培养液,其中含10%(v/v)FCS(PAA)]六天,加入LPS(100ng/ml,sigma)刺激24小时后,诱导成熟树突状细胞,再进行抗CD11c磁珠(Miltenyi Biotech)分选。将分选得到的纯化树突状细胞。

[0084] 实施例2:lnc-Dpf3定量实时PCR(qRT-PCR)检测

[0085] 根据文献记载,CCL19和CCL21能够作用于树突状细胞表面CCR7,诱导其发生趋化性迁移(Ohl,L.,Mohaupt,M.,Czeloth,N.,Hintzen,G.,Kiafard,Z.,Zwirner,J.,Blankenstein,T.,Henning,G.,and Förster,R.(2004).CCR7governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.Immunity 21,279-288.)。

[0086] 取实施例1中利用CD11c磁珠分选得到的树突状细胞(图1a)或接受CCL19(50ng/ml)和CCL21(50ng/ml)(R&D)刺激各个时间点的树突状细胞(图1b),采用TRIzol(Invitrogen公司)提取其中的RNA样品。qRT-PCR使用SYBR RT-PCR试剂盒(Takara公司,



SYBR Green Realtime PCR Master Mix Code:QPK-201),并在LightCycler (Roche公司)实时定量PCR仪上进行操作。

[0087] lnc-Dpf3的qRT-PCR检测用的定量引物为:

[0088] 5'-GTGCCACCTACTGTACACCT-3' (上游,SEQ ID NO:2);

[0089] 5'-TGGGCACTCAGGTGCAGTAT-3' (下游,SEQ ID NO:3)。

[0090] 反转录反应参数:42℃20分钟,99℃5分钟。

[0091] qRT-PCR反应参数:95℃15秒,57℃10秒,68℃2秒读板,72℃30秒,40循环。

[0092] RNA的相对定量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 (以U6为内参)。

[0093] U6qRT-PCR检测用的定量引物为:

[0094] 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' (上游,SEQ ID NO:4);

[0095] 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' (下游,SEQ ID NO:5)。

[0096] 测试结果如图1a和图1b所示。

[0097] 图1a中的数据显示:lnc-Dpf3仅在树突状细胞中高表达,而在其它免疫细胞中不表达或表达量很低。

[0098] B细胞是采用抗CD19磁珠 (Miltenyi Biotech) 从小鼠脾脏细胞中分离而出;CD4<sup>+</sup>T细胞是采用抗CD4磁珠 (Miltenyi Biotech) 从小鼠脾脏细胞中分离而出;自然杀伤细胞是采用抗DX5磁珠 (Miltenyi Biotech) 从小鼠脾脏细胞中分离而出。

[0099] 图1b中的数据显示:lnc-Dpf3在树突状细胞受CCL19和CCL21刺激12小时-72小时过程中表达量持续上调,在刺激后96小时达到最高峰,为未刺激树突状细胞中表达量的三倍。

[0100] 实施例3:FITC皮肤刺激后,引流淋巴结趋化性树突状细胞中的lnc-Dpf3表达量的流式细胞术检测

[0101] 涂抹100微升5mg/ml FITC (Invitrogen公司,溶于50:50 (v/v) 丙酮-邻苯二甲酸二丁酯 (Sigma Aldrich公司) 于小鼠去毛的右侧背部皮肤,不同时间点取右侧腹股沟淋巴结,FITC+细胞即为趋化性树突状细胞,FITC-细胞即为非趋化性树突状细胞。以流式细胞术检测FITC涂抹后不同时间点趋化性树突状细胞的比例以及趋化性树突状细胞中lnc-Dpf3表达量。

[0102] 所用细胞流式抗体标记按照其标准操作流程进行。流式细胞检测用的是FACS LSRII流式细胞仪,软件为FACSDiva (BD Biosciences)。具体步骤可参见本实验室之前发表的论文 (Liu,J.等Rhbdd3controls autoimmunity by suppressing the production of IL-6by dendritic cells via K27-linked ubiquitination of the regulator NEMO.Nature Immunology.2014;15:612-622.)。lnc-Dpf3的RNA流式细胞术 (RNAFlow Cytometry) 标记和检测,以lnc-Dpf3特异性探针标记 (LE探针为label extender探针用于信号放大,BL探针为blocker探针,用于防止非特异性信号放大),采用PrimeFlow® RNAAssay Kit (Thermo Fisher公司) 按照其标准操作流程进行。

[0103] lnc-Dpf3的RNAFlow Cytometry检测用的探针为:

[0104] LE探针tcatagatggtctctctatcacttcct (5'-3') (SEQ ID NO:6)

[0105] LE探针aataggttcctgttgagtgaccag (5'-3') (SEQ ID NO:7)

[0106] LE探针ttaactgtaactcagtcacacgtactaag (5'-3') (SEQ ID NO:8)

- [0107] LE探针ggtcacagatggctatagagatgc (5'-3') (SEQ ID NO:9)
- [0108] LE探针gccagagaagcttgtctttgtgat (5'-3') (SEQ ID NO:10)
- [0109] LE探针gcgctgctgtccctgttg (5'-3') (SEQ ID NO:11)
- [0110] LE探针ccgttgatgcccataggtga (5'-3') (SEQ ID NO:12)
- [0111] LE探针cccatcagatcacccctctaactaa (5'-3') (SEQ ID NO:13)
- [0112] LE探针gctgttttggctaaactgatgtg (5'-3') (SEQ ID NO:14)
- [0113] LE探针ggtggagtggaaaagctacttct (5'-3') (SEQ ID NO:15)
- [0114] BL探针aggctggggaggtcatgg (5'-3') (SEQ ID NO:16)
- [0115] BL探针acaaatcaagccaaaagcctg (5'-3') (SEQ ID NO:17)
- [0116] LE探针aggacaaaattcatgtctgggtc (5'-3') (SEQ ID NO:18)
- [0117] LE探针cgctgattatatatttgatacctaatttac (5'-3') (SEQ ID NO:19)
- [0118] BL探针gggggttgaacaactgtttcc (5'-3') (SEQ ID NO:20)
- [0119] LE探针gcatcagtgcagcctgttatg (5'-3') (SEQ ID NO:21)
- [0120] LE探针caagcctgacgagtcaatggt (5'-3') (SEQ ID NO:22)
- [0121] LE探针ctgtgtgtaataatactgcctggc (5'-3') (SEQ ID NO:23)
- [0122] LE探针ggaggagtcatactcagctatggtct (5'-3') (SEQ ID NO:24)
- [0123] LE探针cctaggggagaattcccaaga (5'-3') (SEQ ID NO:25)
- [0124] LE探针cctcggaggtatgcaaggct (5'-3') (SEQ ID NO:26)
- [0125] BL探针aagcttccttcttactggctagc (5'-3') (SEQ ID NO:27)
- [0126] LE探针caggctagacctgggctgg (5'-3') (SEQ ID NO:28)
- [0127] LE探针ccttgattacaggacatgaagaatt (5'-3') (SEQ ID NO:29)
- [0128] BL探针atcaccaaagacaccaatggg (5'-3') (SEQ ID NO:30)
- [0129] BL探针gtagcactagactttattacctaattacct (5'-3') (SEQ ID NO:31)
- [0130] LE探针tgctattagctctgcaccagaacta (5'-3') (SEQ ID NO:32)
- [0131] LE探针ccagaacactacaggaagttgtcac (5'-3') (SEQ ID NO:33)
- [0132] BL探针ggaggtccctgaggccc (5'-3') (SEQ ID NO:34)
- [0133] LE探针actgcctcaccacttggtcag (5'-3') (SEQ ID NO:35)
- [0134] LE探针ccgtaccaggggtgggat (5'-3') (SEQ ID NO:36)
- [0135] LE探针agagccataggttattaaagaaatagtc (5'-3') (SEQ ID NO:37)
- [0136] LE探针atgaggtagataaagatgctccca (5'-3') (SEQ ID NO:38)
- [0137] BL探针ttgcttttcatttttatgtgtttca (5'-3') (SEQ ID NO:39)
- [0138] BL探针aggatattatcagaaaaaaaaaagtag (5'-3') (SEQ ID NO:40)
- [0139] LE探针aaataaactaagtgaatgtataaccct (5'-3') (SEQ ID NO:41)
- [0140] LE探针gcaacttttgggtggagaaaag (5'-3') (SEQ ID NO:42)
- [0141] BL探针agcccaggacacttgaaaa (5'-3') (SEQ ID NO:43)
- [0142] BL探针ccctttataataaaactaaaatataaaagatat (5'-3') (SEQ ID NO:44)
- [0143] LE探针ttcggtaaaaatggctttatatca (5'-3') (SEQ ID NO:45)
- [0144] LE探针cagtagcctcaaagtataatgtgtgc (5'-3') (SEQ ID NO:46)
- [0145] BL探针aggccgtatgggggtgg (5'-3') (SEQ ID NO:47)

- [0146] LE探针ttatgggagggagagaaagagag (5'-3') (SEQ ID NO:48)
- [0147] LE探针tcaataaaaaagaaaacaaagtgc (5'-3') (SEQ ID NO:49)
- [0148] BL探针ggattgggctgtgggtatattg (5'-3') (SEQ ID NO:50)
- [0149] BL探针ccccctggtactgtgaataaaaag (5'-3') (SEQ ID NO:51)
- [0150] LE探针atattcaaagccttgattcga (5'-3') (SEQ ID NO:52)
- [0151] LE探针ctcatcacgctcttatctaccagc (5'-3') (SEQ ID NO:53)
- [0152] LE探针aagtaggattacaggttgggattatag (5'-3') (SEQ ID NO:54)
- [0153] LE探针catatccacacttgaaataccttattta (5'-3') (SEQ ID NO:55)
- [0154] BL探针tatcaagagaggtgaaattaaataaatta (5'-3') (SEQ ID NO:56)
- [0155] BL探针ggtaagaattgaaaatcatctaaattcc (5'-3') (SEQ ID NO:57)
- [0156] LE探针gcatattcgatttttccattga (5'-3') (SEQ ID NO:58)
- [0157] LE探针gcacacgtgacttatggggaaa (5'-3') (SEQ ID NO:59)
- [0158] LE探针cctgatgactatacatgctaaaaatgg (5'-3') (SEQ ID NO:60)
- [0159] LE探针catacaaacttcagaaataactgagaagt (5'-3') (SEQ ID NO:61)
- [0160] 测试结果如图1c和图1d所示。
- [0161] 图1c中的数据显示:FITC涂抹后,趋化性树突状细胞的lnc-Dpf3表达量比非趋化性树突状细胞明显升高。
- [0162] 图1d中的数据显示:FITC涂抹后,趋化性树突状细胞中lnc-Dpf3表达量在48-72小时持续升高。
- [0163] 图1a-1d的结果表明,lnc-Dpf3在树突状细胞中及趋化性树突状细胞中特异性高表达。
- [0164] 实施例4:树突状细胞的lnc-Dpf3过表达及其过表达效率验证
- [0165] 用表达lnc-Dpf3的腺病毒(Ad-Lnc-Dpf3)及其对照载体(Ad-NC)感染(MOI=50:1)树突状细胞,36小时后检测lnc-Dpf3表达量(方法同实施例2),以证明其过表达效率。
- [0166] 图2a中的数据显示,Ad-Lnc-Dpf3转染后明显提高树突状细胞中lnc-Dpf3的表达量。
- [0167] 实施例5:lnc-Dpf3过表达后,树突状细胞体外趋化能力的检测
- [0168] 取实施例4中获得的树突状细胞培养于24孔transwell培养板上层( $1 \times 10^5$ 细胞每孔,100微升培养基,8微米孔径,Corning,Life Science公司),下层加入含趋化因子CCL19 (50ng/ml)和CCL21 (50ng/ml) (R&D)的600微升培养基或不含趋化因子的同样体积培养基,12小时用流式细胞术对下层细胞进行计数,下层趋化因子组减去下层不含趋化因子组即为受趋化因子趋化的细胞数。
- [0169] 图2b中的数据显示,lnc-Dpf3过表达可明显抑制树突状细胞向CCL19和CCL21趋化因子的趋化能力。
- [0170] 实施例6:lnc-Dpf3过表达后,趋化性树突状细胞LDHA表达量的检测
- [0171] 取实施例4中获得的转染Ad-Lnc-Dpf3或Ad-NC的树突状细胞培养于24孔培养板,加入趋化因子CCL19 (50ng/ml)和CCL21 (50ng/ml) (R&D)刺激,12小时后采用TRIzol (Invitrogen公司)提取其中的RNA样品.qRT-PCR使用SYBR RT-PCR试剂盒(Takara公司,SYBR Green Realtime PCR Master MixCode:QPK-201),并在LightCycler (Roche公司)实

时定量PCR仪上进行操作。

[0172] LDHA的qRT-PCR检测用的定量引物为:

[0173] 5'-GGGCTACAAGCATCTTGAGAG-3' (上游, SEQ ID NO:62);

[0174] 5'-GACACGTTGCACCTGACTG-3' (下游, SEQ ID NO:63)。

[0175] 反转录反应参数:42℃20分钟,99℃5分钟。

[0176] qRT-PCR反应参数:95℃15秒,57℃10秒,68℃2秒读板,72℃30秒,40循环。

[0177] RNA的相对定量使用2- $\Delta\Delta$ Ct法计算(以 $\beta$ -actin为内参)。

[0178]  $\beta$ -actin qRT-PCR检测用的定量引物为:

[0179] 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' (上游, SEQ ID NO:64);

[0180] 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3' (下游, SEQ ID NO:65)。

[0181] 图2c中的数据显示,lnc-Dpf3过表达可明显抑制树突状细胞在CCL19和CCL21趋化因子刺激后的LDHA表达量。

[0182] 实施例7:lnc-Dpf3过表达后,趋化性树突状细胞乳酸产生量的检测

[0183] 取实施例4中获得的转染Ad-Lnc-Dpf3或Ad-NC的树突状细胞培养于24孔培养板,加入趋化因子CCL19 (50ng/ml) 和CCL21 (50ng/ml) (R&D) 刺激,12小时后采用乳酸比色测定试剂盒II (Biovision公司) 进行乳酸生成检测。

[0184] 图2d中的数据显示,lnc-Dpf3过表达可明显抑制树突状细胞在CCL19和CCL21趋化因子刺激后的乳酸产生。

[0185] 图2a-2d的结果表明,lnc-Dpf3过表达可抑制树突状细胞的趋化能力及趋化性树突状细胞的LDHA表达和乳酸产生。

[0186] 实施例8:树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠的构建及其基因敲除效率验证

[0187] 通过同源重组的方法构建树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre+) 及其对照小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre<sup>-</sup>)。取小鼠脾脏,通过CD11c磁珠分选脾脏树突状细胞,检测lnc-Dpf3表达量(方法同实施例2),以证明树突状细胞中的基因敲除效率。

[0188] 图3a中的数据显示,Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre+小鼠树突状细胞中lnc-Dpf3表达量明显低于对照小鼠。

[0189] 实施例9:树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠树突状细胞体外趋化能力检测

[0190] 取树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre+) 及其对照小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre<sup>-</sup>) 骨髓培养的树突状细胞(方法同实施例1),采用transwell培养体系检测树突状细胞体外趋化能力(方法同实施例5)。

[0191] 图3b中的数据显示,树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除可明显增强树突状细胞向CCL19和CCL21趋化因子的趋化能力。

[0192] 实施例10:树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠树突状细胞体内趋化能力检测

[0193] 取树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre+) 及其对照小鼠 (Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>/Cd11c-cre<sup>-</sup>),涂抹100微升5mg/ml FITC (Invitrogen公司,溶于50:50

(v/v) 丙酮-邻苯二甲酸二丁酯(Sigma Aldrich公司)于小鼠去毛的右侧背部皮肤,48小时后右侧腹股沟淋巴结,用流式细胞术检测FITC+细胞占树突状细胞的比例即为趋化性树突状细胞的比例。

[0194] 图3c中的数据显示,树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除可明显增强趋化性树突状细胞的比例。

[0195] 实施例11:树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠趋化性树突状细胞HIF1 $\alpha$ 活化、LDHA表达量和乳酸产生量的检测

[0196] 取树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠(Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>Cd11c-cre+)及其对照小鼠(Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>Cd11c-cre<sup>-</sup>)骨髓培养的树突状细胞(方法同实施例1),加入趋化因子CCL19(50ng/ml)和CCL21(50ng/ml)(R&D)刺激12小时后,1)采用化学发光EMSA试剂盒(Thermo Fisher公司)进行凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA),检测HIF1 $\alpha$ 活化(方法如下,结果见图3d);2)采用qRT-PCR检测LDHA表达量(方法同实施例6,结果见图3e);3)采用乳酸比色测定试剂盒II(Biovision公司)检测乳酸生成(方法同实施例7,结果见图3f)。

[0197] EMSA实验中HIF1 $\alpha$ 探针序列如下:

[0198] 5'-TCTGTACGTGACCACACTCACCTC-3'(SEQ ID NO:66)

[0199] 3'-AGACATGCACTGGTGTGAGTGGAG-5'(SEQ ID NO:67)

[0200] 图3d中的数据显示,树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除可明显增强树突状细胞在CCL19和CCL21趋化因子刺激后的HIF1 $\alpha$ 活化。

[0201] 图3e中的数据显示,树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除可明显增强树突状细胞在CCL19和CCL21趋化因子刺激后的LDHA表达。

[0202] 图3f中的数据显示,树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除可明显增强树突状细胞在CCL19和CCL21趋化因子刺激后的乳酸产生。

[0203] 实施例11:树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠在接触性皮炎中诱导T细胞活化和炎症性组织损伤的检测。

[0204] 取树突状细胞特异性lnc-Dpf3基因敲除小鼠(Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>Cd11c-cre+)及其对照小鼠(Lnc-Dpf3<sup>f1/f1</sup>Cd11c-cre<sup>-</sup>),诱导接触性皮炎:在背部去毛皮肤涂抹50 $\mu$ l溶于丙酮/橄榄油(4:1)的0.5%(wt/vol)2,4-二硝基氟苯(1-fluoro-2,4-dinitrofluorobenzene, Sigma Aldrich公司),5天后进行如下实验:1)取小鼠右侧腹股沟淋巴结细胞,体外培养于24孔板,加入2,4-二硝基苯磺酰基或培养基(对照组)再刺激三天,ELISA方法检测培养上清IFN- $\gamma$ 和IL-17分泌量(R&D公司)(图3g)。2)在小鼠右耳涂抹10 $\mu$ l 0.2%2,4-二硝基氟苯,3天后取右耳(2,4-二硝基氟苯组)和左耳(对照组)进行HE病理检测(图3h)。

[0205] 图3g中的数据显示,树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3可导致树突状细胞在接触性皮炎中诱导T细胞活化的能力增强。

[0206] 图3h中的数据显示,树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3可导致树突状细胞在接触性皮炎中介导的炎症性组织损伤增强。

[0207] 图3a-3h的结果表面,树突状细胞中特异性敲除lnc-Dpf3可导致树突状细胞在趋化因子CCL19和/或CCL21刺激下的趋化增强、体内由外周皮肤向刺激淋巴结组织的趋化增强、转录因子HIF1 $\alpha$ 活化增强、乳酸脱氢酶LDHA表达升高、乳酸产生升高、在接触性皮炎中诱

导T细胞活化增强、炎症性免疫应答和组织损伤增强。

[0208] 综上,lnc-Dpf3是抑制树突状细胞趋化能力和抑制趋化性树突状细胞状态和功能的新颖长链非编码RNA。

[0209] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可做出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

|        |                                                                    |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| [0001] | 序列表                                                                |      |
| [0002] | <110> 中国人民解放军第二军医大学                                                |      |
| [0003] | <120> 一种新的长链非编码RNA即lnc-Dpf3、其序列、免疫效应及用途                            |      |
| [0004] | <130> /                                                            |      |
| [0005] | <160> 67                                                           |      |
| [0006] | <170> SIP0SequenceListing 1.0                                      |      |
| [0007] | <210> 1                                                            |      |
| [0008] | <211> 4076                                                         |      |
| [0009] | <212> DNA                                                          |      |
| [0010] | <213> 小鼠 (Mus musculus)                                            |      |
| [0011] | <400> 1                                                            |      |
| [0012] | ggggagggag gaagcaagag aggattctta atcctgggag caggaatgag tgcagaaaat  | 60   |
| [0013] | gccctgggaa cttagattc ccccggttca tgtcagcgca cagcagccca tatataaccc   | 120  |
| [0014] | tgggcaagct taatcctcgc ttccccggct tatctcagcc tcacattcgt gggtcacca   | 180  |
| [0015] | gcccggagtc tctttggatg ttggccaggc ctgctgggaa tggttaagagc tgagacaggg | 240  |
| [0016] | acagaaactc acgtccttgc atgtttggaat gaggcctcct tcctctccca ctttcttggc | 300  |
| [0017] | cttttagattt tcctcctggc attggcacgt aggtctcctg gcctcacatc tctaattctt | 360  |
| [0018] | tgaagaaggg agactctgat ctcaggtttg caggaggctg tgtcagcgat gcagatgatt  | 420  |
| [0019] | cgaggtgagc agaggcagaa tggtagtagt tgtactttct cttttggttg tttggtgacg  | 480  |
| [0020] | gggtttcaca atccctaact caggctggcc ttgaactctt tatgtagctt gggctgggtc  | 540  |
| [0021] | tgagcttggc aacctcctg ctgccgcttt tggactcggc tccaaatcct gacatttcag   | 600  |
| [0022] | gcttatgcc acaaggctgg cttaggtgtc actttgaaat cccggctgca gtcttgtgag   | 660  |
| [0023] | tttaaaacct tccccgagtt tctcttttcc tagctaactt ggatttttat gaggaatggg  | 720  |
| [0024] | aaggtctcat gagagcaaac gattctggga agctgacaga ggccatgttg gggatcttgg  | 780  |
| [0025] | gcttgtagct gatgtgtggg caggcaggtg gcgcctctat ccttctcctc tctcgccttt  | 840  |
| [0026] | tctctgggtt gggtttacag ctatgacctg ccctcccctg acccctaggt ttccccttta  | 900  |
| [0027] | gaacagctgt aaaggtcaca gcttgctttt gaagatacgt ggtattttcta gaatggcttc | 960  |
| [0028] | cattcttttg acaagaagct gagttgtacc taaccttaac tcccttcctc ttcctctcac  | 1020 |
| [0029] | attctttctg ccccttcctc tgccatgttc cctgacctg gaggaagtga tagagagacc   | 1080 |
| [0030] | atctatgact ggtcactcaa caggaacctt ttcttagtac gtttgactga gttacagtta  | 1140 |
| [0031] | agcatctcta tagccatctg tgaccatcac aaagacaagc ttctctggcc aacagggaca  | 1200 |
| [0032] | gcagcgctca cctatgggca tcaacgggta gttagagggt gatctgatgg gcacatcagt  | 1260 |
| [0033] | ttagccaaaa cagcagaagt agcttttcca ctccaccca tgacctcccc agcctcaggc   | 1320 |
| [0034] | ttttggcttg atttgtgacc cagacatgaa ttttgtcctg taaattaggt atcaaatata  | 1380 |
| [0035] | atcaggcggg aaacagttgt tcaaccccc ataacaggt tgtcactgat gcaccattga    | 1440 |
| [0036] | ctcgtcaggc ttggccagge agtattatta cacacagaga ccatagctga gtatgactcc  | 1500 |
| [0037] | tcctcttggg aattctcccc taggagcctt gcatacctcc gagggctagc cagtaagaag  | 1560 |
| [0038] | gaagcttcca gccaggtct agcctgaatt cttcatgtcc tgtaatcaag gccatttgg    | 1620 |

|        |                                                                      |      |
|--------|----------------------------------------------------------------------|------|
| [0039] | gtcttttggtg ataggtaatt aggtaataaa gtctagtgtct actagtctctg gtgcagagct | 1680 |
| [0040] | aatagcagtg acaacttcct gtagtggttct gggggcctca gggacctccc tgaccaagtg   | 1740 |
| [0041] | gtgaggcagt atcccccccc tgggtacggga ctatttcttt aataacctat ggctcttggg   | 1800 |
| [0042] | agcatcttta tctacctcat tgaacacat aaaaatgaaa agcaacacaa cacacttttt     | 1860 |
| [0043] | tattagtatt tcaaatatca gattccttta tggcaccccc cctccccacc agcttcccc     | 1920 |
| [0044] | ttcctcttgt ctcttgtcc agagttgtgt gacttctttt ctactttttt ttttttctg      | 1980 |
| [0045] | ataatattctt aggggtatac attttcactt agtttatttc ttttctccac ccaaaagttg   | 2040 |
| [0046] | cttttccaag tgccttgggc tatatctttt atattttagt tttattataa agggtgatat    | 2100 |
| [0047] | aaagccattt ttaccgaagc acacattata ctttgaggct actgccaccc ccatacggcc    | 2160 |
| [0048] | tctctcttct tctccctccc ataatgcact ttgttttctt tttatttgac aatataacca    | 2220 |
| [0049] | cagcccaatc cctttttatt cacagtacca gggggtcgaa tccaaggctt tgaatatgct    | 2280 |
| [0050] | gggtagataa gagctgtatg agctataatc ccaacctgta atcctacttt aaataaggta    | 2340 |
| [0051] | tttcaagtgt ggatatgtaa tttatttaaat ttcacctctc ttgataggaa tttagatgat   | 2400 |
| [0052] | tttcaattct tacctcaatg ggaaaaatcg aatatgcttt ccccataagt cacgtgtgcc    | 2460 |
| [0053] | catttttagc atgtatagtc atcaggactt ctgagttatt tctgaagttt gtatgtaata    | 2520 |
| [0054] | tgaagtgagt gaattgaaag atatctgtta tgttcttacc ttggacaaat atggatctct    | 2580 |
| [0055] | gactgttttc ctgatggttt gtttttagatc attttttttt ctttctttct ttctttcttt   | 2640 |
| [0056] | ctttctttct ttcttttttt tttttttttt ttttttggtt tttcgagaca gggtttctct    | 2700 |
| [0057] | ttatagctct gtctgtcctg gagctcactt tgtagaccag gctggcctcg aactcagaaa    | 2760 |
| [0058] | tgctctgcc tccaagtgc tgggattaaa ggcgtgcgc actatgccc gcagatcatt        | 2820 |
| [0059] | tattttttta attgaaaaat aaaaataaaa tttaagtgt taagtatttt gtcttcatgt     | 2880 |
| [0060] | atgtctgtat accacatggg tgcttgggtga ccatgaggcc caaagagtgg catctgatcc   | 2940 |
| [0061] | tctgggacag aaggttgtga gcctctatgt tgggtgctggg aattgaacct gtgtcctctc   | 3000 |
| [0062] | aaagagcagc cagaactctt aaatgcttag ccatctttcc agccctctaa atgatttctt    | 3060 |
| [0063] | gttggtataa atgagtcagt aacaaaagtt gtatgtacat ttctgtctaca tgtctctgca   | 3120 |
| [0064] | catagaggcc agaaggcaac attaggtgtc ttcttcagtc tttctctact ttgagaaaga    | 3180 |
| [0065] | gtctctcact aaactggagc tggctgattt ggctagagta gctgaccagt gagccccagg    | 3240 |
| [0066] | gatctacctg cttatctcct cttctccagc tctgggattg caagtgttcc cgatcatatc    | 3300 |
| [0067] | tggcttttgc aggggtgctg gagaaaggaa cacaggtctt catgcttgga caggaaatat    | 3360 |
| [0068] | tactgacca ggacattctg ctggtcccta aatatectct ttggactggc tegtttttta     | 3420 |
| [0069] | aatcattcct tagcacagtt tcctaaaatt ggcttaacta ttctgaaaat tgctgtatta    | 3480 |
| [0070] | ttaatttctt gttaatggga taaagtactg tgacgaagat aacttgtaga agagagagtt    | 3540 |
| [0071] | tgcatttggg cttatggttc cagagtgggtg agcccatcac cacaggaggg cacggcagca   | 3600 |
| [0072] | agcctccctc atggccacag aagcaggaag ctgagggatc gatcacagct caactgcaag    | 3660 |
| [0073] | cataaagcag agagagctgc aaatcacgtg aggctaacga ttgtgaagct cagtccagct    | 3720 |
| [0074] | gccattcctc tcagcaaggt cacacttccc aagccttccc aaacagtgcc acctactgta    | 3780 |
| [0075] | cacctggtgt tcatgtatct gagcctgtga gggacatgtc tcatttaaat caccacagtc    | 3840 |
| [0076] | tttaaggctc tggaccttta ttgctgattc atagtcagaa tataaaattt ccattcttat    | 3900 |
| [0077] | actgcacctg agtgcctatc tgtccgcatg ctgctaacat tttaccaag acagaaacaa     | 3960 |



|        |                                                                       |      |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|------|
| [0078] | agagggtgctg agatgggtatg tgaacacagtg acttattgta ctaattcttt tagtttagcta | 4020 |
| [0079] | ttatacttgt ttctttacct cgtgaatttc acatcaccca ttccaaaaaa aaaaaa         | 4076 |
| [0080] | <210> 2                                                               |      |
| [0081] | <211> 20                                                              |      |
| [0082] | <212> DNA                                                             |      |
| [0083] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0084] | <400> 2                                                               |      |
| [0085] | gtgccaccta ctgtacacct                                                 | 20   |
| [0086] | <210> 3                                                               |      |
| [0087] | <211> 20                                                              |      |
| [0088] | <212> DNA                                                             |      |
| [0089] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0090] | <400> 3                                                               |      |
| [0091] | tgggcactca ggtgcagtat                                                 | 20   |
| [0092] | <210> 4                                                               |      |
| [0093] | <211> 17                                                              |      |
| [0094] | <212> DNA                                                             |      |
| [0095] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0096] | <400> 4                                                               |      |
| [0097] | ctcgcttcgg cagcaca                                                    | 17   |
| [0098] | <210> 5                                                               |      |
| [0099] | <211> 20                                                              |      |
| [0100] | <212> DNA                                                             |      |
| [0101] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0102] | <400> 5                                                               |      |
| [0103] | aacgcttcac gaatttgcgt                                                 | 20   |
| [0104] | <210> 6                                                               |      |
| [0105] | <211> 27                                                              |      |
| [0106] | <212> DNA                                                             |      |
| [0107] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0108] | <400> 6                                                               |      |
| [0109] | tcatagatgg tctctctatc acttcct                                         | 27   |
| [0110] | <210> 7                                                               |      |
| [0111] | <211> 24                                                              |      |
| [0112] | <212> DNA                                                             |      |
| [0113] | <213> 人工序列(Artificial)                                                |      |
| [0114] | <400> 7                                                               |      |
| [0115] | aataggttcc tgttgagtga ccag                                            | 24   |
| [0116] | <210> 8                                                               |      |

[0117] <211> 29  
[0118] <212> DNA  
[0119] <213> 人工序列(Artificial)  
[0120] <400> 8  
[0121] ttaactgtaa ctcagtcaaa cgtactaag 29  
[0122] <210> 9  
[0123] <211> 24  
[0124] <212> DNA  
[0125] <213> 人工序列(Artificial)  
[0126] <400> 9  
[0127] ggtcacagat ggctatagag atgc 24  
[0128] <210> 10  
[0129] <211> 24  
[0130] <212> DNA  
[0131] <213> 人工序列(Artificial)  
[0132] <400> 10  
[0133] gccagagaag cttgtctttg tgat 24  
[0134] <210> 11  
[0135] <211> 18  
[0136] <212> DNA  
[0137] <213> 人工序列(Artificial)  
[0138] <400> 11  
[0139] gcgctgctgt ccctgttg 18  
[0140] <210> 12  
[0141] <211> 20  
[0142] <212> DNA  
[0143] <213> 人工序列(Artificial)  
[0144] <400> 12  
[0145] ccgttgatgc ccataggtga 20  
[0146] <210> 13  
[0147] <211> 24  
[0148] <212> DNA  
[0149] <213> 人工序列(Artificial)  
[0150] <400> 13  
[0151] cccatcagat caccctctaa ctaa 24  
[0152] <210> 14  
[0153] <211> 23  
[0154] <212> DNA  
[0155] <213> 人工序列(Artificial)

[0156] <400> 14  
[0157] gctgttttgg ctaaactgat gtg 23  
[0158] <210> 15  
[0159] <211> 23  
[0160] <212> DNA  
[0161] <213> 人工序列(Artificial)  
[0162] <400> 15  
[0163] ggtggagtgg aaaagctact tct 23  
[0164] <210> 16  
[0165] <211> 18  
[0166] <212> DNA  
[0167] <213> 人工序列(Artificial)  
[0168] <400> 16  
[0169] aggctgggga ggtcatgg 18  
[0170] <210> 17  
[0171] <211> 21  
[0172] <212> DNA  
[0173] <213> 人工序列(Artificial)  
[0174] <400> 17  
[0175] acaaatacaag ccaaaagcct g 21  
[0176] <210> 18  
[0177] <211> 23  
[0178] <212> DNA  
[0179] <213> 人工序列(Artificial)  
[0180] <400> 18  
[0181] aggacaaaat tcatgtctgg gtc 23  
[0182] <210> 19  
[0183] <211> 29  
[0184] <212> DNA  
[0185] <213> 人工序列(Artificial)  
[0186] <400> 19  
[0187] cgcctgatta tatttgatac ctaatttac 29  
[0188] <210> 20  
[0189] <211> 21  
[0190] <212> DNA  
[0191] <213> 人工序列(Artificial)  
[0192] <400> 20  
[0193] gggggttgaa caactgtttc c 21  
[0194] <210> 21

---

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| [0195] | <211> 23                        |
| [0196] | <212> DNA                       |
| [0197] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0198] | <400> 21                        |
| [0199] | gcatcagtga caagcctggt atg 23    |
| [0200] | <210> 22                        |
| [0201] | <211> 21                        |
| [0202] | <212> DNA                       |
| [0203] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0204] | <400> 22                        |
| [0205] | caagcctgac gagtcaatgg t 21      |
| [0206] | <210> 23                        |
| [0207] | <211> 24                        |
| [0208] | <212> DNA                       |
| [0209] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0210] | <400> 23                        |
| [0211] | ctgtgtgtaa taatactgcc tggc 24   |
| [0212] | <210> 24                        |
| [0213] | <211> 26                        |
| [0214] | <212> DNA                       |
| [0215] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0216] | <400> 24                        |
| [0217] | ggaggagtca tactcagcta tggctc 26 |
| [0218] | <210> 25                        |
| [0219] | <211> 21                        |
| [0220] | <212> DNA                       |
| [0221] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0222] | <400> 25                        |
| [0223] | cctaggggag aattccaag a 21       |
| [0224] | <210> 26                        |
| [0225] | <211> 20                        |
| [0226] | <212> DNA                       |
| [0227] | <213> 人工序列 (Artificial)         |
| [0228] | <400> 26                        |
| [0229] | cctcggaggt atgcaagct 20         |
| [0230] | <210> 27                        |
| [0231] | <211> 23                        |
| [0232] | <212> DNA                       |
| [0233] | <213> 人工序列 (Artificial)         |

[0234] <400> 27  
[0235] aagcttcctt cttactggct agc 23  
[0236] <210> 28  
[0237] <211> 19  
[0238] <212> DNA  
[0239] <213> 人工序列(Artificial)  
[0240] <400> 28  
[0241] caggctagac ctgggctgg 19  
[0242] <210> 29  
[0243] <211> 25  
[0244] <212> DNA  
[0245] <213> 人工序列(Artificial)  
[0246] <400> 29  
[0247] ccttgattac aggacatgaa gaatt 25  
[0248] <210> 30  
[0249] <211> 21  
[0250] <212> DNA  
[0251] <213> 人工序列(Artificial)  
[0252] <400> 30  
[0253] atcaccaaag acaccaatgg g 21  
[0254] <210> 31  
[0255] <211> 30  
[0256] <212> DNA  
[0257] <213> 人工序列(Artificial)  
[0258] <400> 31  
[0259] gtagcactag actttattac ctaattacct 30  
[0260] <210> 32  
[0261] <211> 25  
[0262] <212> DNA  
[0263] <213> 人工序列(Artificial)  
[0264] <400> 32  
[0265] tgctattagc tctgcaccag aacta 25  
[0266] <210> 33  
[0267] <211> 25  
[0268] <212> DNA  
[0269] <213> 人工序列(Artificial)  
[0270] <400> 33  
[0271] ccagaacact acaggaagtt gtcac 25  
[0272] <210> 34

---

|        |                                   |
|--------|-----------------------------------|
| [0273] | <211> 17                          |
| [0274] | <212> DNA                         |
| [0275] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0276] | <400> 34                          |
| [0277] | ggaggtccct gaggccc 17             |
| [0278] | <210> 35                          |
| [0279] | <211> 21                          |
| [0280] | <212> DNA                         |
| [0281] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0282] | <400> 35                          |
| [0283] | actgcctcac cacttggtca g 21        |
| [0284] | <210> 36                          |
| [0285] | <211> 18                          |
| [0286] | <212> DNA                         |
| [0287] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0288] | <400> 36                          |
| [0289] | ccgtaccagg ggtgggat 18            |
| [0290] | <210> 37                          |
| [0291] | <211> 28                          |
| [0292] | <212> DNA                         |
| [0293] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0294] | <400> 37                          |
| [0295] | agagccatag gttattaaag aaatagtc 28 |
| [0296] | <210> 38                          |
| [0297] | <211> 24                          |
| [0298] | <212> DNA                         |
| [0299] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0300] | <400> 38                          |
| [0301] | atgaggtaga taaagatgct ccca 24     |
| [0302] | <210> 39                          |
| [0303] | <211> 25                          |
| [0304] | <212> DNA                         |
| [0305] | <213> 人工序列 (Artificial)           |
| [0306] | <400> 39                          |
| [0307] | ttgcttttca tttttatgtg tttca 25    |
| [0308] | <210> 40                          |
| [0309] | <211> 29                          |
| [0310] | <212> DNA                         |
| [0311] | <213> 人工序列 (Artificial)           |

[0312] <400> 40  
[0313] aggatattat cagaaaaaaaa aaaaagtag 29  
[0314] <210> 41  
[0315] <211> 29  
[0316] <212> DNA  
[0317] <213> 人工序列(Artificial)  
[0318] <400> 41  
[0319] aaataaacta agtgaaaatg tataaccct 29  
[0320] <210> 42  
[0321] <211> 22  
[0322] <212> DNA  
[0323] <213> 人工序列(Artificial)  
[0324] <400> 42  
[0325] gcaacttttg ggtggagaaa ag 22  
[0326] <210> 43  
[0327] <211> 20  
[0328] <212> DNA  
[0329] <213> 人工序列(Artificial)  
[0330] <400> 43  
[0331] agcccaggac acttgaaaa 20  
[0332] <210> 44  
[0333] <211> 33  
[0334] <212> DNA  
[0335] <213> 人工序列(Artificial)  
[0336] <400> 44  
[0337] ccctttataa taaaactaaa atataaaaga tat 33  
[0338] <210> 45  
[0339] <211> 24  
[0340] <212> DNA  
[0341] <213> 人工序列(Artificial)  
[0342] <400> 45  
[0343] ttcggtaaaa atggctttat atca 24  
[0344] <210> 46  
[0345] <211> 26  
[0346] <212> DNA  
[0347] <213> 人工序列(Artificial)  
[0348] <400> 46  
[0349] cagtagcctc aaagtataat gtgtgc 26  
[0350] <210> 47

---

|        |                                |
|--------|--------------------------------|
| [0351] | <211> 17                       |
| [0352] | <212> DNA                      |
| [0353] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0354] | <400> 47                       |
| [0355] | aggccgtatg ggggtgg 17          |
| [0356] | <210> 48                       |
| [0357] | <211> 23                       |
| [0358] | <212> DNA                      |
| [0359] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0360] | <400> 48                       |
| [0361] | ttatgggagg gagagaaaga gag 23   |
| [0362] | <210> 49                       |
| [0363] | <211> 25                       |
| [0364] | <212> DNA                      |
| [0365] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0366] | <400> 49                       |
| [0367] | tcaaataaaa agaaaacaaa gtgca 25 |
| [0368] | <210> 50                       |
| [0369] | <211> 22                       |
| [0370] | <212> DNA                      |
| [0371] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0372] | <400> 50                       |
| [0373] | ggattgggct gtgggtatat tg 22    |
| [0374] | <210> 51                       |
| [0375] | <211> 24                       |
| [0376] | <212> DNA                      |
| [0377] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0378] | <400> 51                       |
| [0379] | ccccctggta ctgtgaataa aaag 24  |
| [0380] | <210> 52                       |
| [0381] | <211> 22                       |
| [0382] | <212> DNA                      |
| [0383] | <213> 人工序列(Artificial)         |
| [0384] | <400> 52                       |
| [0385] | atattcaaag ccttgattc ga 22     |
| [0386] | <210> 53                       |
| [0387] | <211> 25                       |
| [0388] | <212> DNA                      |
| [0389] | <213> 人工序列(Artificial)         |



[0390] <400> 53  
[0391] ctcatacagc tcttatctac ccagc 25  
[0392] <210> 54  
[0393] <211> 27  
[0394] <212> DNA  
[0395] <213> 人工序列(Artificial)  
[0396] <400> 54  
[0397] aagtaggatt acaggttggg attatag 27  
[0398] <210> 55  
[0399] <211> 28  
[0400] <212> DNA  
[0401] <213> 人工序列(Artificial)  
[0402] <400> 55  
[0403] catatccaca cttgaaatac cttattta 28  
[0404] <210> 56  
[0405] <211> 29  
[0406] <212> DNA  
[0407] <213> 人工序列(Artificial)  
[0408] <400> 56  
[0409] tatcaagaga ggtgaaatta aataaatta 29  
[0410] <210> 57  
[0411] <211> 28  
[0412] <212> DNA  
[0413] <213> 人工序列(Artificial)  
[0414] <400> 57  
[0415] ggtaagaatt gaaaatcatc taaattcc 28  
[0416] <210> 58  
[0417] <211> 23  
[0418] <212> DNA  
[0419] <213> 人工序列(Artificial)  
[0420] <400> 58  
[0421] gcatattcga tttttcccat tga 23  
[0422] <210> 59  
[0423] <211> 22  
[0424] <212> DNA  
[0425] <213> 人工序列(Artificial)  
[0426] <400> 59  
[0427] gcacacgtga cttatgggga aa 22  
[0428] <210> 60

[0429] <211> 27  
[0430] <212> DNA  
[0431] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0432] <400> 60  
[0433] cctgatgact atacatgcta aaaatgg 27  
[0434] <210> 61  
[0435] <211> 29  
[0436] <212> DNA  
[0437] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0438] <400> 61  
[0439] catacaaact tcagaaataa ctgagaagt 29  
[0440] <210> 62  
[0441] <211> 21  
[0442] <212> DNA  
[0443] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0444] <400> 62  
[0445] gggctacaag catcttgaga g 21  
[0446] <210> 63  
[0447] <211> 19  
[0448] <212> DNA  
[0449] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0450] <400> 63  
[0451] gacacgttgc acctgactg 19  
[0452] <210> 64  
[0453] <211> 20  
[0454] <212> DNA  
[0455] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0456] <400> 64  
[0457] aaggccaacc gtgaaaagat 20  
[0458] <210> 65  
[0459] <211> 21  
[0460] <212> DNA  
[0461] <213> 人工序列 (Artificial)  
[0462] <400> 65  
[0463] gtggtacgac cagaggcata c 21  
[0464] <210> 66  
[0465] <211> 24  
[0466] <212> DNA  
[0467] <213> 人工序列 (Artificial)

---

[0468] <400> 66  
[0469] tctgtacgtg accacactca cctc 24  
[0470] <210> 67  
[0471] <211> 24  
[0472] <212> DNA  
[0473] <213> 人工序列(Artificial)  
[0474] <400> 67  
[0475] agacatgcac tgggtgagtg ggag 24

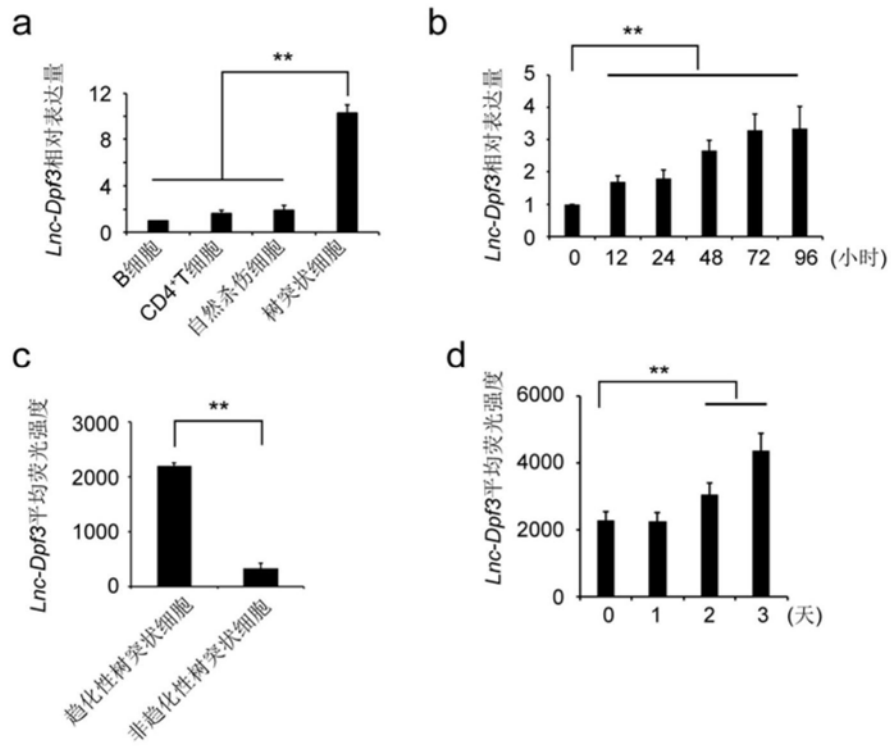


图1

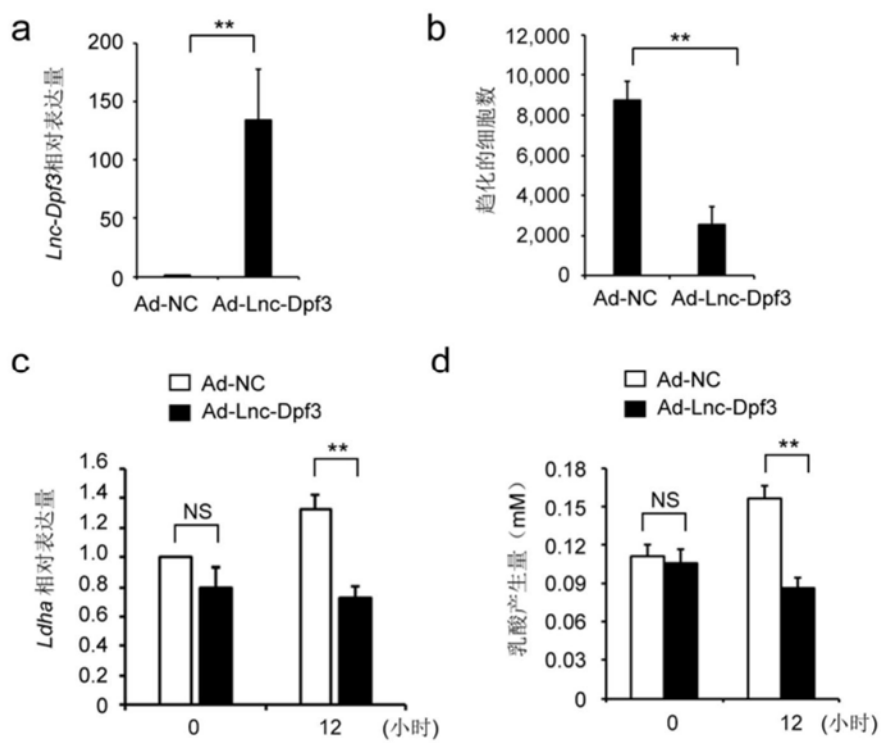


图2

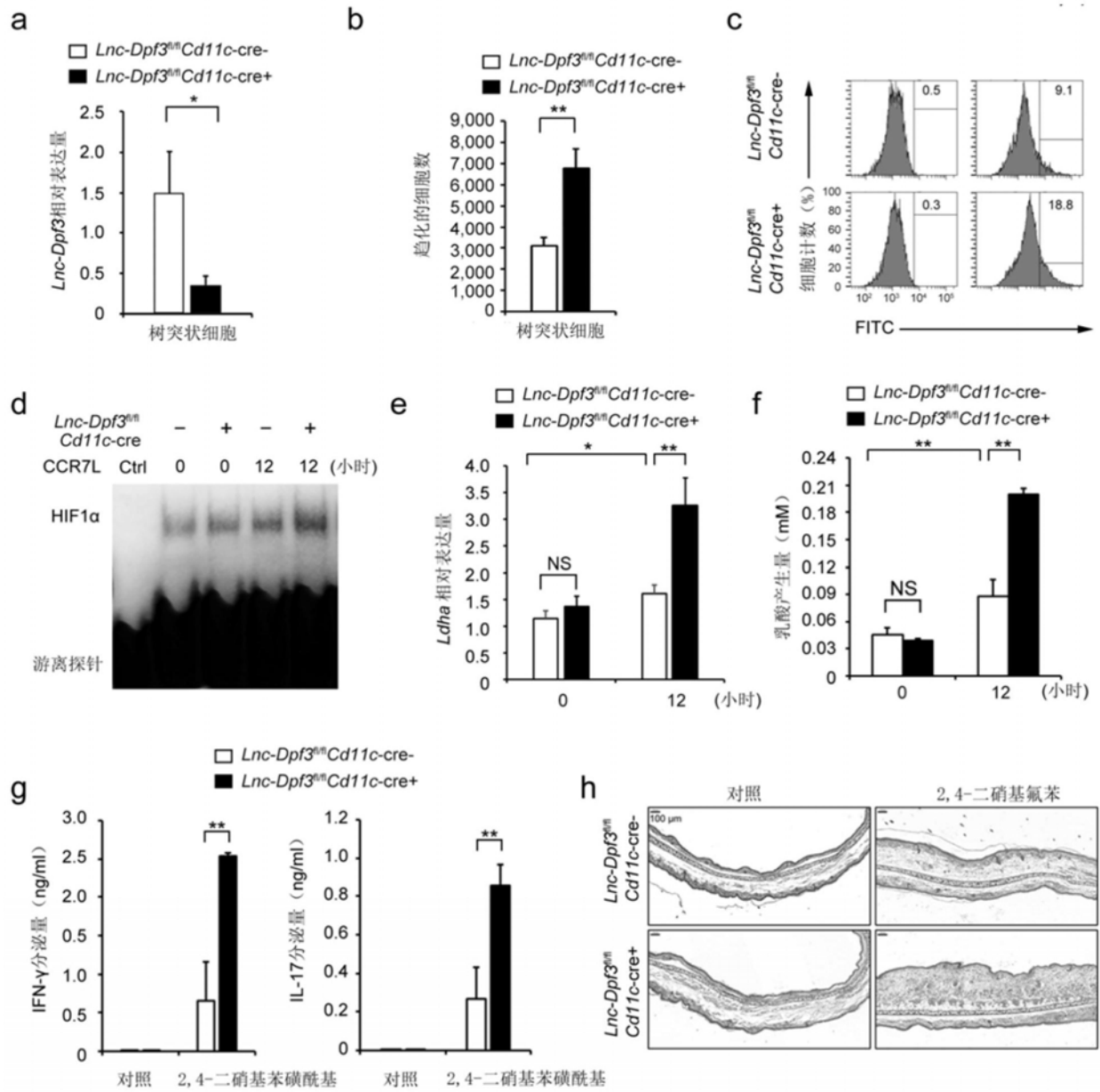


图3