用于治疗血小板减少症的核酸分子及其应用

技术领域

本发明属于核酸技术领域，具体来讲，涉及基因激活相关的双链核酸分子，例如小激活核酸分子，和小激活核酸分子在激活/上调促血小板生成素（Thrombopoietin，*THPO*，*TPO*）基因转录中的应用，以及其在与 THPO 蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况，如血小板减少症治疗中的应用。

背景技术

血小板（thrombocyte）是外周血中血液成分之一，衍生自骨髓中巨核细胞，无细胞核(Machlus, Thon, and Italiano 2014)。血小板的功能主要是促进止血和加速凝血，同时血小板还有维护毛细血管壁完整性的功能，在生理性止血和病理性血栓形成中起重要作用(Laki 1972)。

血小板减少症是一种外周血液中血小板数量异常减少的疾病，常见的临床特点是皮肤瘀斑，粘膜出血或颅内出血，严重者会危及生命。采用血小板直接计数法显示血小板浓度低于 100×10^9/L 时，则认为患有血小板减少症(Kuter 2009)。血小板浓度低于 50×10^9/L 时，会频繁出现自发性出血，表现为皮下紫癜。血小板浓度低于 20×10^9/L 时，患者会有生命危险，尤其是受到外伤或是突发性颅内出血、消化道大出血等会严重威胁患者的生命。

血小板减少症按照发病机制可分为 3 类：骨髓生成血小板减少、外周血血小板破坏增加及脾脏扣留血小板（splenic sequestration） (Seo et al. 2017)。导致血小板产生减少的因素包括先天性（遗传性）和获得性血小板减少症。目前的研究发现，至少 *MPL*、*GP1BA*、*GP1BB*、*GP9*、*MYH9*、*FLI1*、*NBEAL2*、*WAS*、*GATA1*、*PRKACG*、*GFI1b*、*STIM1*、*FYB*、*SLFN14*、 *ETV6*、*DIAPH1* 和 *SRC* 等基因的突变可导致遗传性血小板减少。获得性因素导致的血小板减少症包括再生障碍性贫血（aplastic anemia）、骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndromes）、白血病、药物、感染、肿瘤疾病、放疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病等引起的血小板减少，免疫性血小板减少症（immune thrombocytopenia， ITP）。 导致血小板破坏过多的因素有血栓性血小板减少、 肝素诱发的血小板减少、药源性血小板减少、ITP 及血栓性血小板减少性紫癜（thrombotic thrombocytopenia purpur, TPP）等(Hassan and Waller 2015)。脾脏增大扣留血小板及输注血小板含量少的库存血等也会引起血小板减少。

促血小板生成素(Thrombopoietin, THPO)，又称巨核细胞生长和发育因子（megakaryocyte growth and development factor，MGDF) 或 C-MPL 配体，是一种人体内由 *THPO* 基因编码的类激素，其化学本质为糖蛋白，主要由肝脏和肾脏产生和分泌(de Sauvage et al. 1994)。人体内的 *THPO* 基因位于第 3 号染色体长臂上(3q26.3-3q27.2)，编码含有 353 个氨基酸分子量为 36 kDa 的前体蛋白。在去除含 21 个氨基酸的信号肽后，余下的 332 个氨基酸经糖基化形成一个 95 kDa 的糖蛋白，随后释放到机体循环中，与其在巨核细胞及血小板上的 C-MPL 受体结合后刺激巨核细胞的形成和分化，进而促进血小板的生成(Bartley et al. 1994)。小鼠 *Thpo*

基因（亦称 *Ml*、*Tpo*、*Mgdf*、*Mpllg*）为人 *THPO* 的同源性基因，编码小鼠血小板生成素。C-MPL 最早是在感染了骨髓增生性白血病病毒（MPLV）的小鼠中发现，随后人 *C-MPL* 基因也被克隆 (Mignotte et al. 1994)。

临床治疗血小板减少症的一线治疗主要是通过静脉注射糖皮质激素（大剂量的地塞米松或泼尼松）和丙种球蛋白（IVIg）。若一线治疗失败或不能维持，则选择药物治疗或者脾脏切除等二线疗法。但由于脾切除手术易感染，远期复发，住院期延长，死亡风险高 (Provan et al. 2010)，药物治疗为目前常用的治疗方法。

目前用于治疗血小板减少症的药物主要是促血小板生成药，它们通过补充或者模拟 THPO 的功能而刺激巨核细胞生长、成熟和产生血小板，主要包括两类，即重组人血小板生成素（rhTHPO）和 C-MPL 受体激动剂（C-MPL-RA）。早期与内源性 THPO 具有同源性的肽（第一代促血小板生成剂）在初期临床试验中对于血小板减少症患者有良好的效果，但是后期临床试验发现机体可产生与内源性 THPO 具有交叉反应的中和性抗体，导致持久性血小板减少(Basser 2002; Solberg 2005) 。此外，由于体外重组的 THPO 无法完全糖基化，其促血小板生成功能有限。第二代促血小板生成剂主要为 C-MMPL-RA，包括 2008 年获得 FDA 批准用于 ITP 的治疗的艾曲波帕(Eltrombopag)和罗米司亭（Romiplostim）和 2018 年 FDA 获批上市用于治疗 ITP 的 Avatrombopag。C-MPL 激动剂类药物虽有一定的疗效，但存在各种并发症及停药反应。

虽然上述通过补充 THPO 或者模拟其功能的促进血小板生成药物在临床治疗上有一定的疗效，但这些药物存在一定的缺陷，均属于二线治疗药物，而且主要用于 ITP 的治疗。为了能够有效治疗各种原因导致的血小板减少症，还需要开发基于崭新机制的治疗方法。

发明内容

本发明的一个目标是提供基于 RNA 激活机制的小激活核酸分子，其通过激活/上调 *THPO* 基因转录，增加 THPO 蛋白的表达量来促进血小板生成，或者治疗与 THPO 蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况或因各种原因引起的血小板减少症，如药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症等。

本发明的另一目标是提供包含小激活核酸分子的组合物或制剂。

本发明的又一目标为提供小激活核酸分子或包含其的组合物或制剂在制备用于激活/上调 *THPO* 基因在细胞中的表达的药物中的应用。

本发明的又一目标为提供激活/上调 *Thpo/THPO* 基因在细胞中的表达的方法。

本发明的再一目标为提供小激活核酸分子或包含其的组合物或制剂在制备用于治疗血小板减少症和/或与 THPO 蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况的药物中的应用或治疗血小板减少症和/或与 THPO 蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况的方法。

本发明的另一目标为提供分离的 *Thpo/THPO* 基因小激活核酸分子靶位点，其中所述靶位点包括或选自 SEQ ID NO：2 至 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO：601 至 SEQ ID NO:605 中的任一条序列上的任意连续 16-35 个核苷酸的序列或与上述任意连续 16-35 个核苷酸组成的序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%或 100%的同源性的序列。

技术方案

在本发明的一个方面，提供了小激活核酸分子例如小激活 RNA（small activating RNA, saRNA）分子，其激活或者上调小鼠细胞中 *Thpo* 基因的表达，所述小激活核酸分子的一条链与小鼠 *Thpo* 基因启动子区的任一长度为 16-35 个核苷酸的核酸序列具有至少 75%的同源性或互补性，启动子区是指包括转录起始位点上游的 500 个核苷酸，从而实现所述基因表达的激活或者上调。具体地，小激活核酸分子的一条链包括或选自与 *Thpo* 基因启动子中距转录起始位点上游的-493 至-356 区域（热点 1，SEQ ID NO:2）、-273 至-183 区域（热点 2, SEQ ID NO:3）或-164 至-80 区域（热点 3, SEQ ID NO:4）中的连续 16-35 个核苷酸具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%或 100%的同源性或互补性的核酸序列。更具体地，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性。在一个具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链包括与选自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列。在另一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链由与选自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列组成。在还一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链是与选自 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列。

本发明的小激活核酸分子包括靶向小鼠 *Thpo* 基因启动子区的双链小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子，其包含第一核酸链和第二核酸链，第一核酸链与 *Thpo* 基因启动子中距转录起始位点-493 至-356 区域（热点 1，SEQ ID NO:2）、-273 至-183 区域（热点 2, SEQ ID NO:3）或-164 至-80（热点 3, SEQ ID NO:4）中的任一连续 16-35 个核苷酸具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性，第一核酸链和第二核酸链能通过互补形成双链核酸结构，双链核酸结构能够激活 *Thpo* 基因在细胞中的表达。

在本发明的另一个方面，提供了小激活核酸分子例如小激活 RNA（small activating RNA, saRNA）分子，其激活或者上调人细胞中 *THPO* 基因的表达，所述小激活核酸分子的一条链与人 *THPO* 基因启动子区的任一长度为 16-35 个核苷酸的核酸序列具有至少 75%的同源性或互补性，启动子区是指包括转录起始位点上游的 500 个核苷酸，从而实现所述基因表达的激活或者上调。具体地，小激活核酸分子的一条链包括或选自与 *THPO* 基因启动子中距转录起始位点上游的-1339 至-1044 区域（热点 1，SEQ ID NO:601）、-1027 至-903 区域（热点 2, SEQ ID NO:602）、-861 至-754 区域（热点 3, SEQ ID NO:603）、-728 至-611 区域（热点 4, SEQ ID NO:604）或-593 至-1 区域（热点 5, SEQ ID NO:605）中的连续 16-35 个核苷酸具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%或 100%的同源性或互补性的核酸序列。更具体地，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID

NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性。在一个具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链包括与选自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列。在另一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链由与选自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列组成。在还一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链是与选自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%、例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性的核酸序列。

本发明的小激活核酸分子包括靶向人 *THPO* 基因启动子区的双链小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子，其包含第一核酸链和第二核酸链，第一核酸链与 *THPO* 基因启动子中距转录起始位点-1339 至-1044 区域（热点 1，SEQ ID NO:601）、-1027 至-903 区域（热点 2, SEQ ID NO:602）、-861 至-754 区域（热点 3, SEQ ID NO:603）、-728 至-611 区域（热点 4, SEQ ID NO:604）或-593 至-1（热点 5, SEQ ID NO:605）中的任一连续 16-35 个核苷酸具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同源性或互补性，第一核酸链和第二核酸链能通过互补形成双链核酸结构，双链核酸结构能够激活人 *THPO* 基因在细胞中的表达。

本发明的小激活核酸分子的第一核酸链和第二核酸链可以存在于两条不同的核酸链上，也可以存在于同一条核酸链上。当第一核酸链和第二核酸链分别位于两条链上时，小激活核酸分子的至少一条链可以在 5’端和/或 3’端具有突出或悬垂，例如在 3’端可以具有 0-6 个核苷酸的突出，如，0、1、2、3、4、5 或 6 个核苷酸的突出。优选地，本发明的小激活核酸分子的两条链都具有突出，更优选地，小激活核酸分子的两条链的 3’端均可以具有 0-6 个核苷酸的突出，例如，具有 0、1、2、3、4、5 或 6 个核苷酸的突出，最优选地，具有 2 个或 3 个核苷酸的突出。优选地，突出端的核苷酸可以是 dT。

本发明的小激活核酸分子也可以包括可形成双链区发夹结构的小激活核酸分子，例如单链小激活 RNA 分子。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子包括靶向 *THPO* 基因启动子区的单链小激活 RNA 分子，其中所述单链小激活核酸分子可形成双链区发夹结构。当第一核酸链和第二核酸链存在于同一条核酸链上时，优选地，本发明的小激活核酸分子可以为发夹型单链核酸分子，其中第一核酸链和第二核酸链具有能形成双链核酸结构的互补区域，所述双链核酸结构可以通过例如 RNA 激活机制促进 *THPO* 基因在细胞中的表达。

上述小激活核酸分子中，第一核酸链和第二核酸链的长度可以分别为 16-35 个核苷酸，例如，可以为 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个核苷酸。

在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链与选自 SEQ ID NO：6-102 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、

约 99%、或约 100%的同一性或同源性，并且小激活核酸分子的第二核酸链与选自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链包括与选自 SEQ ID NO：6-102 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由与选自 SEQ ID NO：6-142 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列组成，并且本发明的小激活核酸分子的第二核酸链包括与选自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由与选自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列组成。在具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链可以包括或选自 SEQ ID NO：6-102 的任一核苷酸序列，并且其第二链可以包括或选自 SEQ ID NO：103-199 的任一核苷酸序列。在一个实施方式中，本文所述的小激活核酸分子可以是合成的、体外转录的或者载体表达的。

在另一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链与选自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性，并且小激活核酸分子的第二核酸链与选自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链包括与选自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由与选自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列组成，并且本发明的小激活核酸分子的第二核酸链包括与选自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由与选自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的同一性或同源性的核酸序列组成。在具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一核酸链可以包括或选自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 的任一核苷酸序列，并且其第二链可以包括或选自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 的任一核苷酸序列。在一个实施方式中，本文所述的小激活核酸分子可以是合成的、体外转录的或者载体表达的。

本文所述小激活核酸分子中所有的核苷酸都可以为天然的未经化学修饰的核苷酸，也可以包括至少一种修饰。在一个实施方式中，本文所述的小激活核酸分子中的修饰可以包括化学修饰，如在至少一个核苷酸可以具有化学修饰，本发明使用的化学修饰可以包括或选自如

下修饰中的一种或多种，或其任意组合：

（1）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰；

（2）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的核糖的 2'-OH 的修饰；

（3）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的碱基的修饰；

（4）所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸为锁核酸。

所述化学修饰为本领域技术人员所公知，所述磷酸二酯键的修饰是指对磷酸二酯键中的氧进行修饰，包括但不限于，硫代磷酸修饰和硼烷化磷酸盐修饰。两种修饰都能稳定 saRNA 结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。

核糖修饰是指对核苷酸戊糖中 2'-OH 的修饰，即，在核糖的羟基位置引入某些取代基，例如，包括但不限于，2'-氟代修饰、2'-氧甲基修饰、2'-氧亚乙基甲氧基修饰、2,4'-二硝基苯酚修饰、锁核酸(LNA) 、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰等。

碱基修饰是指对核苷酸的碱基进行修饰，例如，包括但不限于，5′-溴尿嘧啶修饰、5′-碘尿嘧啶修饰、N-甲基脲嘧啶修饰、2,6—二氨基嘌呤修饰等。

这些修饰可以增加小激活核酸分子的生物可利用性，提高与靶序列的亲和性，增强在细胞内抵抗核酸酶水解的能力。

此外，为了促进小激活核酸分子进入细胞，可以在以上修饰的基础上，在小激活核酸分子的第一核酸链和/或第二核酸链的末端引入例如胆固醇等亲脂性基团以利于通过由脂质双分子层构成的细胞膜及核膜与细胞核内的基因启动子区发生作用。

本发明提供的小激活核酸分子在与细胞接触或引入细胞后可有效激活或上调细胞中 *Thpo/THPO* 基因的表达，优选情况下表达至少上调 10%。

本发明的另一方面还涉及编码本文所述的小激活核酸分子的核酸。在一个实施方式中，所述核酸可以是 DNA 分子。

在本发明的另一方面，提供了包含上文所述的小激活核酸分子或编码本文所述的小激活核酸分子的核酸的细胞。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子可以是靶向 *Thpo/THPO* 基因启动子区的双链小激活核酸分子例如双链小激活 RNA（saRNA）分子，其包括第一核酸链和第二核酸链。在另一实施方式中，本发明的小激活核酸分子可以是靶向 *Thpo/THPO* 基因启动子区的单链小激活核酸分子，例如发夹结构的单链核酸，该发夹结构的单链核酸可在导入细胞后在细胞内产生双链小激活 RNA（saRNA）分子。

本发明的另一方面提供了组合物（例如药物组合物），该组合物包含本发明所述的小激活核酸分子或编码本文所述的小激活核酸分子的核酸和任选地，药学上可接受的载体。在一个实施方式中，所述药学上可接受的载体可以包括或选自脂质体、高分子聚合物或多肽。

在本发明的另一方面，提供了制剂，该制剂包括：本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。

在本发明的另一方面，提供了试剂盒，所述试剂盒包括：本发明的小激活核酸分子、编码本文所述的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活

核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物在制备用于激活/上调 *Thpo/THPO* 基因在细胞中的表达的药物或制剂中的应用。

本发明的另一方面还涉及激活/上调 *Thpo/THPO* 基因在细胞中的表达的方法，该方法包括给所述细胞施用本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂。在一个实施方式中，激活/上调 *Thpo/THPO* 基因在细胞中的表达的方法包括给所述细胞施用本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。上述细胞包括哺乳动物细胞，例如来自人体或小鼠的细胞，如人胚肝细胞、人肝癌细胞如 HepG2 细胞、人肝细胞、如小鼠胚胎肝细胞如胚肝细胞系 BNL CL2、小鼠肝癌细胞如肝癌细胞系 LPC-H12-和小鼠原代肝细胞等，上述细胞可以是离体的，也可以存在于哺乳动物体中，如小鼠或人体中。

本发明的小激活核酸分子可以被直接导入细胞中，也可以是将编码本发明的小激活核酸分子的核酸序列导入细胞后在细胞内产生；所述细胞优选为哺乳动物细胞，更优选为小鼠或人类细胞。上述细胞可以是离体的，如细胞系或细胞株等，也可以存在于哺乳动物体中，如小鼠或人体中，更具体地，例如小鼠或人体的肝细胞中。人体可以是具有与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的患者，也可以是各种因素所致的血小板减少症患者。本发明所述的小激活核酸分子可以被施以足够的量以实现对与 THPO 蛋白量的缺乏或与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的治疗。具体情况下，所述与 THPO 蛋白量的缺乏或与 THPO 表达不足或减少相关的疾病或状况可以包括例如血小板减少症等。

本发明另一方面提供了分离的 *Thpo/THPO* 基因小激活核酸分子作用位点，该位点具有 *Thpo/THPO* 基因的启动子区上任意连续的 16-35 个核苷酸的序列，优选情况下，所述作用位点包括或选自 SEQ ID NO：2-4 和 SEQ ID NO：601-605 中的任一条序列上的任意连续 16-35 个核苷酸的序列。具体地，所述作用位点可以包括或选自 SEQ ID NO：200-296 和 SEQ ID NO：606-1047 中的任一核苷酸序列。

本发明的另一方面涉及治疗个体如人或小鼠个体中与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况或血小板减少症的方法，包括给所述个体施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。在一个实施方式中，本发明的治疗个体中血小板减少症和/或与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的方法可以包括给个体施用治疗有效量的本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物和治疗有效量的其它剂，所述其它剂包括例如小分子化合物、抗体、多肽、蛋白等。所述个体可以是哺乳动物，包括例如小鼠或人。本发明中，血小板减少症包括由各种因素所致的血小板减少症，例如，包括但不限于，骨髓生

成血小板减少、外周血血小板破坏增加及脾脏扣留血小板（splenic sequestration）。导致血小板产生减少的因素包括先天性（遗传性）和获得性血小板减少症。在一个实施方式中，导致获得性血小板减少症的因素包括但不限于，再生障碍性贫血（aplastic anemia）、骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndromes）、白血病、药物、感染、肿瘤疾病、放疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病等引起的血小板减少，免疫性血小板减少症（immune thrombocytopenia， ITP）。导致血小板破坏过多的因素包括但不限于，血栓性血小板减少、 肝素诱发的血小板减少、药源性血小板减少、ITP 及血栓性血小板减少性紫癜。在一个实施方案中，血小板减少症与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况相关。在另一个实施方案中，血小板减少症与 THPO 蛋白表达不足或减少不相关。血小板减少症包括药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。本文所述的血小板减少症可以由于各种原因所致，例如在骨髓中血小板生成减少，外周血中破坏过多或者脾脏增大扣留血小板，例如肿瘤放疗、肿瘤化疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病、药源性血小板减少症、免疫性血小板减少症、血栓性血小板减少性紫癜、遗传性血小板减少症等。血小板减少症常见的临床特点是皮肤瘀斑，骨髓中巨核细胞改变，粘膜出血或颅内出血，严重者会危及生命。采用血小板直接计数法显示血小板浓度低于 100×10^9/L 时，则认为患有血小板减少症(Kuter 2009)。血小板浓度低于 50×10^9/L 时，会频繁的出现自发性出血，最常见的就是皮下紫癜。血小板浓度低于 20×10^9/L 时，患者就会变得极其危险，尤其是受到外伤或是突发性颅内出血、消化道大出血等会严重威胁到患者的生命。在本发明的方法中，所述个体中的血小板减少症的特征可以是在血小板直接计数法显示时，血小板浓度低于 100×10^9/L，低于 50×10^9/L 或低于 20×10^9/L。在一个实施方式中，个体中 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况在施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物之后得到缓解、减轻或治愈。

本发明的另一方面涉及治疗个体中的血小板减少症的方法，包括给所述个体施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。在本发明的方法中，所述个体中的血小板减少症的特征可以是在血小板直接计数法显示时，血小板浓度低于 100×10^9/L，低于 50×10^9/L 或者低于 20×10^9/L。在本发明的方法中，血小板减少症可以包括与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的血小板减少症、药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。本文所述的血小板减少症可以由于各种原因所致的在骨髓中血小板生成减少，外周血中破坏过多或者脾脏增大扣留血小板，例如肿瘤放疗、肿瘤化疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病、药源性血小板减少症、免疫性血小板减少症、血栓性血小板减少性紫癜、遗传性血小板减少症等。在一个实施方式中，本发明的治疗血小板减少症的方法包括给个体施用治疗有效量的本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物和/或上述小激活核酸分子、编码上述小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激

活核酸分子的核酸的细胞、包含本发明的小激活核酸分子的组合物与治疗有效量的其它制剂组成的组合物，所述其它制剂包括例如小分子化合物、抗体、多肽、蛋白等。所述个体可以是哺乳动物，包括例如小鼠或人。在上述方法中，血小板减少症可以包括药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。在上述方法中，个体包括哺乳动物，例如鼠和人。在一个实施方式中，个体中的血小板减少症在施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物之后得到缓解、减轻或治愈。优选地，所述缓解、减轻或治愈可以是在血小板直接计数法显示时，血小板浓度得到提高或恢复到接近正常生理水平如在 100×10^9/L 至 300×10^9/L 的范围内。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物在制备用于治疗血小板减少症和/或与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的药物中的应用。所述个体可以是哺乳动物，例如人。在本发明的应用中，血小板减少症包括由各种因素所致的血小板减少症，例如，包括但不限于，骨髓生成血小板减少、外周血血小板破坏增加及脾脏扣留血小板（splenic sequestration）。导致血小板产生减少的因素包括先天性（遗传性）和获得性血小板减少症。在一个实施方式中，导致获得性血小板减少症的因素包括但不限于，再生障碍性贫血（aplastic anemia）、骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndromes）、白血病、药物、感染、肿瘤疾病、放疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病等引起的血小板减少，免疫性血小板减少症（immune thrombocytopenia， ITP）。导致血小板破坏过多的因素包括但不限于，血栓性血小板减少、 肝素诱发的血小板减少、药源性血小板减少、ITP 及血栓性血小板减少性紫癜。在一个实施方式中，血小板减少症可以包括例如与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的血小板减少症。优选地，血小板减少症可以包括或选自与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的血小板减少症、药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。本文所述的血小板减少症可以由于各种原因例如肿瘤放疗、肿瘤化疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病、患者脾脏增大扣留血小板、输注血小板含量少的库存血和药物导致的血小板消耗增加等引起。在一个实施方式中，血小板减少症可以表现为在血小板直接计数法显示时，血小板浓度低于 100×10^9/L，低于 50×10^9/L 或者低于 20×10^9/L。

在一个实施方式中，提供了本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物可以用于制备治疗血小板减少症和/或与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病的药物。在一个实施方案中，血小板减少症可以包括与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的血小板减少症，优选地，血小板减少症可以包括药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。在一个实施方式中，血小板减少症可以表现为在血小板直接计数法显示时，血小板浓度低于 100×10^9/L，低于 50×10^9/L 或者低于 20×10^9/L。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的

核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂在制备用于治疗血小板减少症的药物或药物组合中的应用。优选地，血小板减少症可以包括或选自与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的血小板减少症或者其他各种原因所致的血小板减少症，如药物源性血小板减少症、免疫性血小板减少症和血栓性血小板减少性紫癜等。本文所述的血小板减少症可以由于各种原因例如肿瘤放疗、肿瘤化疗、骨髓移植、慢性肝脏疾病、患者脾脏增大扣留血小板、输注血小板含量少的库存血和药物导致的血小板消耗增加等引起。在一个实施方式中，血小板减少症可以表现为在血小板直接计数法显示时，血小板浓度低于 100×10^9/L，低于 50×10^9/L 或者低于 20×10^9/L。

在一个实施方式中，提供了本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂在制备用于治疗与 THPO 蛋白表达不足或减少相关的疾病或血小板减少症的药物或药物组合中的应用。

本发明的有益效果

本发明提供的能够激活/上调内源性 *Thpo/THPO* 基因表达的小激活核酸分子，例如小激活 RNA（saRNA），能够特异地激活 *Thpo/THPO* 基因，上调或恢复 *Thpo/THPO* 基因和蛋白的表达并同时具有较低的毒副作用，可用于治疗由于 *Thpo/THPO* 蛋白表达不足及各种原因所致的血小板产生不足或者破坏过多而引起的血小板减少症，或者制备用于治疗血小板减少症的药物或制剂。

附图说明

图 1 为小鼠 *Thpo* saRNA 介导的小鼠 *Thpo* mRNA 表达改变。靶向小鼠 *Thpo* 启动子的 322 个 saRNA 以 10 nM 终浓度转染 BNL.CL2 细胞，转染 72 小时后用一步法 RT-qPCR 分析 *Thpo* mRNA 表达。图示为相对于对照处理（Mock）的 *Thpo* 的 mRNA 表达改变（$\log_2$）从最高到最低排序。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 2 为小鼠 *Thpo* saRNA 在小鼠 *Thpo* 启动子上的热点区域。靶向小鼠 *Thpo* 启动子的 322 个 saRNA 以 10 nM 终浓度转染 BNL.CL2 细胞 72 小时，转染结束后用一步法 RT-qPCR 分析 *Thpo* mRNA 表达。图示为相对于对照处理（Mock）的 *Thpo* 表达改变，按照 saRNA 在 *Thpo* 启动子上的靶点位置从-500 到-0 排序。黑色实心点表示功能性 saRNA，白色空心点表示非功能性 saRNA，虚线条框示 3 个功能性 saRNA 聚集的热点区（H1~H3）。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值。

图 3 为二步法 RT-qPCR 验证小鼠 *Thpo* saRNA HTS 筛选结果。用图 3 所示 saRNA 以 10 nM 终浓度转染 BNL.CL2 细胞 72 小时，转染结束后用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统进行 qPCR 扩增，同时扩增 Tbp 基因作为内参。图示为单个 saRNA 处理细胞后 *Thpo* mRNA 的相对表达值。Mock、dsCon2 和 DS03-432i 分别为空白转染、无关序列双链 RNA 转染及小干扰 RNA 对照转染。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 4 为二步法 RT-qPCR 验证小鼠 *Thpo* saRNA HTS 筛选结果。用图 4 所示 saRNA 以 10 nM 终浓度转染 LPC-H12 细胞 72 小时，转染结束后用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统进行 qPCR 扩增，同时扩增 Tbp 基因作为内参。图示为单个 saRNA 处理细胞后 *Thpo* mRNA 的相对表达值。Mock、dsCon2 和 DS03-432i 分别为空白转染、无关序列双链 RNA 转染及小干扰 RNA 对照转染。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 5 为二步法 RT-qPCR 在原代小鼠肝细胞中验证小鼠 *Thpo* saRNA HTS 筛选结果。用图 5 所示 saRNA 以 10 nM 终浓度转染原代小鼠肝细胞 72 小时，转染结束后用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统进行 qPCR 扩增，同时扩增 *Tbp* 基因作为内参。图示为单个 saRNA 处理细胞后 *Thpo* mRNA 的相对表达值。 Mock、dsCon2 和 DS03-432i 分别为空白转染、无关序列双链 RNA 转染及小干扰 RNA 对照转染。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 6 为小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 Thpo 的浓度。雄性 *Balb/c* 小鼠 15 只，随机分成 3 组，每组 5 只，分别接受尾静脉注射 PBS，LNP 包载的 *Thpo*-siRNA (DS03-432i，5 mg/kg) 和 LNP 包载的 *Thpo*-saRNA (DS03-0024，5 mg/kg)， 72 小时后收集血样并分离血清，用小鼠 **Thpo** ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 **Thpo** 蛋白含量。PBS 和 DS03-432i 分别为空白对照和小干扰 RNA 对照。***P < 0.001。

图 7 为小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 Thpo 的浓度。雄性 *Balb/c* 小鼠 32 只，随机分成 4 组，每组 8 只，分别接受尾静脉注射 PBS 和 LNP 包载的 DS03-0024 (1 mg/kg， 3 mg/kg 和 6 mg/kg)，给药前一天和给药后 2 天分别收集血样并分离血清，用小鼠 **Thpo** ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 **Thpo** 蛋白含量。****P < 0.0001。

图 8 为小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血小板数量。雄性 *Balb/c* 小鼠 32 只，随机分成 4 组，每组 8 只，分别接受尾静脉注射 PBS 和 LNP 包载的 DS03-0024 (1 mg/kg，3 mg/kg 和 6 mg/kg)，给药 6 天后收集血样，用小鼠外周血血小板分离试剂盒收集血小板，以 CD41a-FITC 抗体特异性标记血小板，并用流式细胞仪计数。*P < 0.05。

图 9 为小鼠 *Thpo* saRNA 在给药 9 天引起的小鼠血小板数量改变。雄性 Balb/c 小鼠 32 只，随机分成 4 组，每组 8 只，分别接受尾静脉注射 PBS 和 LNP 包载的 DS03-0024 (1 mg/kg，3 mg/kg 和 6 mg/kg)，给药 17 天后收集血样用小鼠外周血血小板分离试剂盒收集血小板，以 CD41a-FITC 抗体特异性标记血小板，并用流式细胞仪计数。*P < 0.05。

图 10 为人 *THPO* saRNA 介导的人 *THPO* mRNA 表达改变。靶向人 *THPO* 启动子的候选 saRNA 以 25 nM 终浓度转染 HepG2 细胞，转染 72 小时后用一步法 RT-qPCR 分析人 *THPO* mRNA 表达。图示为相对于对照处理（Mock）的 *THPO* 的 mRNA 表达改变（$\log_2$）从最高到最低排序。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 11 为人 *THPO* saRNA 在人 *THPO* 启动子上的热点区域。靶向人 *THPO* 启动子的候选 saRNA 以 25 nM 终浓度转染 HepG2 细胞 72 小时，转染结束后用一步法 RT-qPCR 分析人 *THPO* mRNA 表达。图示为相对于对照处理（Mock）的 *THPO* 表达改变，按照 saRNA 在 *THPO* 启

动子上的靶点位置排序。黑色实心点表示功能性 saRNA，白色空心点表示非功能性 saRNA，虚线条框示功能性 saRNA 聚集的热点区。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 12 为二步法 RT-qPCR 验证人 *THPO* saRNA HTS 筛选结果。用图 12 所示 saRNA 以 25 nM 终浓度转染 HepG2 细胞 72 小时，转染结束后用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统进行 qPCR 扩增，同时扩增 *TBP* 和 *HPRT1* 基因作为内参。图示为单个 saRNA 处理细胞后 *THPO* 相对 mRNA 的表达值。Mock、dsCon2 和 *siTHPO*（DS3A-365i）分别为空白转染、无关序列双链 RNA 转染及小干扰 RNA 对照转染。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD。

图 13 为 ELISA 方法检测人 *THPO* saRNA 对人 THPO 蛋白表达的作用。用图 13 中所示 saRNA 以 25 nM 终浓度转染 HepG2 细胞 72 小时，转染结束后取培养液，离心去掉死细胞碎片取上清液用 ELISA 试剂盒（R&D Systems，DTP00B）严格按照说明书操作检测分泌到培养液中的 THPO 蛋白的水平。图示为单个 saRNA 处理细胞后 THPO 蛋白的表达值。Mock、dsCon2 和 *siTHPO*（DS3A-365i）分别为空白转染、无关序列双链 RNA 转染及小干扰 RNA 对照转染。纵坐标值代表 2 个重复处理的平均值±SD

具体实施方式

在本发明中，相关术语采用如下定义：

如本文所用的术语“互补”是指两条寡核苷酸链彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的寡核苷酸链中的核苷酸之间通过氢键形成。互补寡核苷酸链可以沃森-克里克（Watson-Crick）方式碱基配对（例如，A-T，A-U，C-G），或以允许形成双链体的任何其他方式（例如 Hoogsteen 型或者反向 Hoogsteen 型碱基配对）进行碱基配对。

互补包括完全互补和不完全互补两种情况。完全互补或 100%互补是指双链寡核苷酸分子的双链区中来自第一条寡核苷酸链的每个核苷酸可以与第二条寡核苷酸链相应位置的核苷酸形成氢键而没有“错配”的情况。不完全互补是指两条链的核苷酸单元不能全部互相氢键结合的情况。例如，对于两条双链区为 20 个核苷酸长度的寡核苷酸链，如果每条链上只有两个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出 10%的互补性。在同一实例中，如果每条链上的 18 个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出 90%的互补性。实质互补是指至少约 75%、约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%、或约 100%的互补。

如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物，包括但不限于 DNA，RNA 或 DNA/RNA 杂交体的单链或双链分子，包括规则地和不规则地交替的脱氧核糖基部分和核糖基部分的寡核苷酸链，以及这些种类的寡核苷酸的修饰和以及天然存在的或非天然存在的骨架。本发明中所述的用于激活靶基因转录的寡核苷酸为小激活核酸分子。

如本文所用的术语“寡核苷酸链”和“寡核苷酸序列”可互换地使用，是指 35 个以下碱基的短链核苷酸的总称（包括脱氧核糖核酸 DNA 或核糖核酸 RNA 内的核苷酸）。在本发明中，寡核苷酸链的长度可以是 16 至 35 个核苷酸的任一长度。

如本文所用，术语“第一核酸链” 可以是正义链也可以是反义链，小激活 RNA 的正义链是指小激活 RNA 双链体中含与靶基因的启动子 DNA 序列的编码链具有同一性的核酸链，反

义链是指小激活 RNA 双链体中与正义链互补的核酸链。

如本文所用，术语“第二核酸链” 也可以是正义链或者反义链。当第一寡核酸链为正义链时，第二寡核酸链为反义链，当第一寡核酸链为反义链时，第二寡核酸链为正义链。

如本文所用的术语“基因”是指编码一条多肽链或转录一条功能 RNA 所需的全部核苷酸序列。“基因”可以是对于宿主细胞而言内源的或完全或部分重组的基因（例如，由于引入编码启动子的外源寡核苷酸和编码序列或将邻近内源编码序列的异源启动子导入宿主细胞）。例如，术语“基因”包括可以由外显子和内含子组成的核酸序列。编码蛋白质的序列是，例如，包含在起始密码子和终止密码子之间的开放阅读框中的外显子内的序列，如本文所用，“基因”可以指包括例如基因调控序列例如启动子，增强子和本领域已知的控制另一基因的转录，表达或活性的所有其他序列，无论另一基因是否包含编码序列或非编码序列。在一种情况下，例如，“基因”可以用于描述包含调控序列例如启动子或增强子的功能性核酸。重组基因的表达可以通过一种或多种异源调节序列来控制。

如本文所用的术语“靶基因”可以是天然存在于生物体中的核酸序列、转基因、病毒或细菌序列、染色体或染色体外和/或瞬时或稳定转染或掺入细胞和/或其染色质。靶基因可以为蛋白质编码基因，也可为非蛋白质编码基因（例如微小 RNA 基因、长链非编码 RNA 基因）。靶基因通常含有启动子序列，设计与启动子序列具有同一性（也称同源性）的小激活核酸分子可以实现对靶基因的正向调控，表现为靶基因表达的上调。“靶基因启动子序列”是指靶基因的非编码序列，在本发明中涉及“与靶基因启动子序列互补”中靶基因启动子序列是指该序列的编码链，亦称非模板链，即为与该基因编码序列为同一序列的核酸序列。“靶点”或“靶点序列”是指靶基因启动子序列中小激活核酸分子的正义寡核苷酸链或反义寡核苷酸与之同源或互补的序列片段。

如本文所用，术语“正义链”、“正义核酸链”可互换地使用，小激活核酸分子的正义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中含与靶基因的启动子序列的编码链具有同一性的第一核酸链。

如本文所用，术语“反义链”、“反义核酸链”可互换地使用，小激活核酸分子的反义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中与正义寡核苷酸链互补的第二核酸链。

如本文所用的术语“编码链”是指靶基因中不能进行转录的那一条 DNA 链，该链的核苷酸序列与转录生成的 RNA 的序列一致（在 RNA 中是以 U 取代了 DNA 中的 T）。本发明中所述的靶基因启动子双链 DNA 序列的编码链是指与靶基因 DNA 编码链在同一条 DNA 链上的启动子序列。

如本文所用的术语“模板链”是指靶基因的双链 DNA 中与编码链互补的另一条链，可作为模板转录为 RNA 的那条链，该链与转录的 RNA 碱基互补（A-U，G-C）。在转录过程中，RNA 聚合酶与模板链结合，并沿着模板链的 3'→5'方向移动，按照 5'→3'方向催化 RNA 的合成。本发明中所述的靶基因启动子双链 DNA 序列的模板链是指与靶基因 DNA 模板链在同一条 DNA 链上的启动子序列。

如本文所用的术语“启动子”是指通过与蛋白质编码或 RNA 编码核酸序列在位置上关联

而对它们的转录发挥调控作用的序列。通常，真核基因启动子包含 100~5,000 个碱基对，尽管此长度范围并不意味着限制本文所用的术语“启动子”。虽然启动子序列一般位于蛋白质编码或者 RNA 编码序列的 5'端，但启动子序列也可存在于外显子及内含子序列中。

如本文所用的术语“转录起始位点”是指在基因的模板链上标志转录起始的核苷酸。转录起始位点可出现于启动子区的模板链上。一个基因可以有多于一个的转录起始位点。

如本文所用的术语“同一性”或“同源性”是指小激活 RNA 的其中一条寡核苷酸链（正义链或者反义链）与靶基因的启动子序列的某一区域的编码链或者模板链存在的相似性。在本文中，所述“同一性”或“同源性”可以是至少约 75%、约 79%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 99%或约 100%。

如本文所用的术语“突出”、“overhang”、“悬垂”可互换地使用，是指寡核苷酸链末端（5'或 3'）非碱基配对核苷酸，其是由延伸超出双链寡核苷酸内的其中一条链的另一条链产生的。延伸超出双链体 3'和/或 5'端的单链区域被称为突出。

如本文所用，术语“基因激活”或“激活基因” 或“基因上调”或“上调基因”可互换地使用，是指通过测量基因转录水平、mRNA 水平、蛋白水平、酶活性、甲基化状态、染色质状态或构型、翻译水平、或其在细胞或生物系统中的活性或状态来测定某一核酸转录、翻译或表达或活性的增加。这些活动或状态可以直接或间接的测定。此外，“基因激活”、“激活基因”、“基因上调”、“上调基因”是指与核酸序列相关的活性增加，而不管发生这种激活的机制如何，例如其作为调节序列发挥调控作用、被转录成 RNA，被翻译为蛋白质并增加蛋白质的表达。

如本文所用，术语“小激活 RNA”、“saRNA”、“小激活核酸分子”可互换地使用，是指能够促进基因表达的核酸分子，并且可以由包含与靶基因的非编码核酸序列（例如启动子、增强子等）具有序列同一性或同源性的核苷酸序列的第一核酸片段（反义核酸链，也称反义寡核苷酸链）和包含与第一核酸片段互补的核苷酸序列的第二核酸片段（正义核酸链，也称有义链或正义寡核苷酸链）组成，其中所述第一核酸片段和第二核酸片段形成双链体。小激活核酸分子也可以由合成的或者载体表达的可形成双链区发夹结构的单链 RNA 分子组成，其中第一区域包含与基因的启动子靶序列具有序列同一性的核苷酸序列，第二区域包含的核苷酸序列与第一区域互补。小激活核酸分子的双链体区域长度通常为约 10 至约 50 个碱基对、约 12 个至约 48 个碱基对、约 14 个至约 46 个碱基对、约 16 个至约 44 个碱基对、约 18 个至约 42 个碱基对、约 20 个至约 40 个碱基对、约 22 个至约 38 个碱基对、约 24 个至约 36 个碱基对、约 26 个至约 34 个碱基对、约 28 个至约 32 个碱基对、通常约 10 个、约 15 个、约 20、约 25、约 30、约 35、约 40、约 45、约 50 个碱基对。此外，术语“saRNA”、“小激活 RNA”和“小激活核酸分子”还含有除核糖核苷酸部分之外的核酸，包括但不限于修饰的核苷酸或类似物。

如本文所用，术语“热点”是指长度至少为 30 bp 的基因启动子区域，在这些区域，呈现出功能性小激活核酸分子靶点的聚集，即靶向这些热点区域的小激活核酸分子至少 30%能够诱导靶基因 mRNA 表达达到 1.1 倍至 2.89 倍。

如本文所用，术语“合成”是指寡核苷酸的合成方式，包括任何能够合成 RNA 的方式，例

如化学合成、体外转录、载体表达等。

本发明通过 RNA 激活方式上调 *Thpo/THPO* 基因的表达，通过增加 THPO 蛋白的表达量来治疗相关疾病，尤其是血小板减少症。本发明中 *Thpo/THPO* 基因有时也称为靶基因。

本发明提供的小激活核酸分子的制备方法包括序列设计和序列合成。

本发明的小激活核酸分子序列的合成可以采用化学合成的方法，或者委托专门从事核酸合成的生物技术公司合成。

一般来说，化学合成的方法包括以下四个过程：（1）寡聚核糖核苷酸的合成；（2）脱保护；（3）纯化分离；（4）脱盐及退火。

例如，本发明所述 saRNA 化学合成的具体步骤如下：

（1）寡聚核糖核苷酸的合成

在自动 DNA/RNA 合成仪（例如，Applied Biosystems EXPEDITE8909）上设定合成 1 微摩尔的 RNA，同时设定每个循环的偶联时间为 10-15 分钟，起始物为固相连接的 5'-O-对二甲氧基三苯甲基-胸苷支持物，第一个循环在固相支持物上连接一个碱基，然后在第 n 次（19≥n≥2）循环中，在第 n-1 次循环所连接的碱基上连接一个碱基，重复此循环直至完成全部核酸序列的合成。

（2）脱保护

将连接有 saRNA 的固相支持物加入到试管中，并在此试管中加入 1 毫升的乙醇/氨水溶液(体积比为 1：3)，然后密封，置于 25-70℃温箱中，孵育 2-30 小时，过滤含有 saRNA 的固相支持物的溶液并收集滤液，用双蒸水淋洗固相支持物 2 次（每次 1 毫升）并收集滤液，合并收集洗脱液，在真空条件下干燥 1-12 小时。然后，加入 1 毫升四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液（1M），室温放置 4-12 小时，再加入 2 毫升正丁醇，高速离心收集沉淀即得到 saRNA 单链的粗产物。

（3）纯化分离

将得到的 saRNA 的粗产物溶解于 2 毫升浓度为 1 摩尔/升的三乙胺乙酸盐溶液中，然后通过高压液相色谱反相 C18 柱进行分离，得到纯化的 saRNA 单链产物。

（4）脱盐及退火

用体积排阻凝胶过滤法去除盐份，将正义链和反义链的寡聚核糖核酸单链按相同摩尔比混合在 1-2 毫升的缓冲液中（10 mM Tris，pH＝7.5-8.0，50 mM NaCl），将此溶液加热至 95℃，然后缓缓将此溶液冷却至室温，得到含有 saRNA 的溶液。

本研究发现，将上述 saRNA 导入细胞后，能够有效增加 *Thpo/THPO* mRNA 和 THPO 蛋白质的表达。

下面结合具体实施例及附图，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不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 靶向小鼠 *Thpo* 基因启动子的 saRNA 的设计与合成

为了筛选能够激活 *Thpo* 基因表达的功能性 saRNA，以 *Thpo* 500 bp 的启动子序列为模板，从 TSS 上游-500 bp 处开始选定大小为 19 bp 的靶点。然后对靶点序列进行过滤处理，保留靶点序列的标准为：1）GC 含量在 35%~65%之间；2）不含有 5 个或者多于 5 个的连续同一核苷酸；3)不含多于 3 个的二核苷酸重复序列；4）不含多于 3 个的三核苷酸重复序列。过滤后，剩余 322 个靶点序列作为候选进入筛选过程。基于这些候选序列，化学合成相应的双链 saRNA。

其中，该实验中使用的 saRNA 的正义和反义链的长度均为 21 个核苷酸，所述双链 saRNA 的第一核糖核酸链（正义链）的 5'区域的 19 个核苷酸与启动子靶点序列具有 100%的同一性，其 3'末端含有 TT 序列；第二核糖核酸链的 5'区域的 19 个核苷酸与第一核糖核酸链序列互补，其 3'末端含有 TT 序列。将前述双链 saRNA 的两条链以同等量的摩尔数混合，退火后形成双链 saRNA。

小鼠 *Thpo* 启动子序列如下所示，其对应于序列表中 SEQ ID No: 1 从 5'至 3'的位置 1 至位置 500：

-500 taatataggc aatacctact ttgccagttg gaaaggggaa atgccaggaa

-450 agacactcct ctggagcagg ggaatataga aggaaaagca agcaagccag

-400 catgctgtca gaattcagca gcaggtatac tgttcaggga aaagaaattt

-350 ggagagccag gaactgagac ttcatccatc taaaacaaga cctctctttc

-300 ccagagagaa ccgtattctg ccagatttct cctggactaa ccctcttctc

-250 tctctcactt aggtcccagg ttctcatgtc gccaggacat gagacagttc

-200 ccgctataca aattctctct agagtgtgtg tgggtggagg agctgggctc

-150 tattcatgga ccatggtcca gccatgggct ctagtcccag tagacaggaa

-100 aagaagtcgt catttccggg ggagccttca cctgggcttg gtggctctct

-50 gctctctgat tgggcggaag tggcctgggc aggcttgtga ccctactaca

实施例 2 靶向小鼠 *Thpo* 启动子的 saRNA 的高通量筛选

（1）细胞培养和转染

小鼠胚胎肝细胞（BNL.CL2）（购自中国科学院上海生命科学研究院，GNM22）培养在DMEM培养基（Gibco）中，培养基含有10%小牛血清（Sigma-Aldrich）和1%青霉素/链霉素（Gibco）。细胞在5%的CO_2，37℃条件下培养。BNL.CL2细胞以每孔3500铺板到96孔板中，依照制造商的说明，使用RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以10 nM（除非另有说明）浓度转染小激活RNA，转染时间为72小时，每种处理使用2个复孔。

（2）一步法RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入150 μl PBS清洗一次，弃掉PBS，每孔加入50 μl细

胞裂解液，室温孵育5分钟。每孔取1 μl细胞裂解液使用一步法TB Green™ PrimeScrip™ RT-PCR 试剂盒 II (Takara,RR086A)。在ABI 7500 快速实时（Fast Real-time） PCR 系统（Applied Biosystems）进行qPCR分析，每个样本重复3个复孔扩增，PCR 反应条件见表1。

表1. PCR反应制备

试剂	体积
2 × 一步法 TB Green RT-PCR 缓冲液 4	2.5 μl
PrimeScript 1 step 酶混合物 2	0.2 μl
正向和反向引物混合物（5 μM）	0.4 μl
无 RNase dH_2O	1.4 μl
粗制裂解物（RNA）	0.5 μl
总计	5 μl

反应条件为阶段 1 反转录反应：42℃，5 分钟；95℃10 秒；阶段 2 PCR 反应：95℃ 5 秒，60℃ 20 秒，扩增 45 个循环。以 *Sdha* 及 *Tbp* 为内参基因。*Thpo*、*Sdha* 及 *Tbp* 所用 PCR 引物见表 2，其中 *Thpo* 用 *Thpo* F1/R1 引物对扩增。

表2. RT-qPCR分析的引物序列

引物名称	序列号	序列 (5'-3')
Thpo F1	SEQ ID NO：297	TGGAGCTGACTGATTTGCTCCTG
Thpo R1	SEQ ID NO：298	AACAGGGATAGACAAAGGGTCG
Sdha F	SEQ ID NO：299	ATGGTCACTAGGGCTGGTTTG
Sdha R	SEQ ID NO：300	ACGACACCCTTCTGTGATGAG
Tbp F	SEQ ID NO：301	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACT
Tbp R	SEQ ID NO：302	TGTCCGTGGCTCTCTTATTC

为了计算某个 saRNA 转染样本的 *Thpo*（目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用公式 1 代入目的基因及 2 个内参基因的 Ct 值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtT_m - CtT_s)} / ((2^{(CtR1_m - CtR1_s)} * 2^{(CtR2_m - CtR2_s)})^{(1/2)}) \qquad \text{(公式 1)}$$

其中，CtTm 为来自对照处理（Mock）样本的目的基因的 Ct 值，CtTs 为来自 saRNA 处理样本的目的基因的 Ct 值，CtR1m 为来自 Mock 处理样本的内参基因 1 的 Ct 值，CtR1s 为来自 saRNA 处理样本的内参基因 1 的 Ct 值，CtR2m 为来自对照处理样本的内参基因 2 的 Ct 值，CtR2s 为来自 saRNA 处理样本的内参基因 2 的 Ct 值。

（3）小鼠功能性 saRNA 筛选

为了获得能够激活 *Thpo* 转录的 saRNA，用上述 322 个 saRNA 分别转染 BNL.CL2 细胞，转染浓度为 10 nM，转染 72 小时后以如上所述相同的方法，裂解细胞并进行一步法 RT-qPCR 分析得到每个 saRNA 处理样本的 *Thpo* 基因的相对（与对照处理组比较）表达值。如表 3 所示，有 18（5.6%）个 saRNA 显示出高度激活作用，79（24.5%）个 saRNA 显示出轻度激活

作用，有 142（69.9%）个 saRNA 对 *Thpo* 的表达不产生影响。激活的最大幅度为 2.89 倍，最大抑制幅度为 0.26 倍，这些具有激活活性的 saRNA 被称为激活性 saRNA。

表3. 小鼠*Thpo* saRNA高通量筛选结果统计

saRNA 活性分类	*Thpo* mRNA 改变幅度的 log_2 值(倍数）	saRNA 数量	百分比
高度激活	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤1.53（2.89）	18	5.6%
轻度激活	≥ 0.13 (1.10）~ < 0.58 (1.50)	79	24.5%
无激活作用	< 0.13 (1.10）	225	69.9%
总计		322	100%

如图 1 所示，进一步显示了小鼠 *Thpo* saRNA 的 *Thpo* 表达改变从最高到最低排序。其中 *Thpo* 活性 saRNA 序列、活性靶点序列以及 *Thpo* mRNA 表达改变，如表 4 所示。

表4. 小鼠活性saRNA序列、其靶点序列以及其导致的小鼠*Thpo* mRNA表达改变

saRNA	靶点序列 (5'-3')	saRNA 正义序列 (5'-3')	saRNA 反义序列 (5'-3')	*Thpo* mRNA 相对表达改变倍数
RAG3-493	GGCAATACCTACTTTGCCA (SEQ ID NO:200)	GGCAAUACCUACUUUGCCATT (SEQ ID NO:6)	UGGCAAAGUAGGUAUUGCCTT (SEQ ID NO:103)	1.17
RAG3-490	AATACCTACTTTGCCAGTT (SEQ ID NO:201)	AAUACCUACUUUGCCAGUUTT (SEQ ID NO:7)	AACUGGCAAAGUAGGUAUUTT (SEQ ID NO:104)	1.21
RAG3-486	CCTACTTTGCCAGTTGGAA (SEQ ID NO:202)	CCUACUUUGCCAGUUGGAATT (SEQ ID NO:8)	UUCCAACUGGCAAAGUAGGTT (SEQ ID NO:105)	1.76
RAG3-484	TACTTTGCCAGTTGGAAAG (SEQ ID NO:203)	UACUUUGCCAGUUGGAAAGTT (SEQ ID NO:9)	CUUUCCAACUGGCAAAGUATT (SEQ ID NO:106)	1.13
RAG3-483	ACTTTGCCAGTTGGAAAGG (SEQ ID NO:204)	ACUUUGCCAGUUGGAAAGGTT (SEQ ID NO:10)	CCUUUCCAACUGGCAAAGUTT (SEQ ID NO:107)	1.24
RAG3-479	TGCCAGTTGGAAAGGGGAA (SEQ ID NO:205)	UGCCAGUUGGAAAGGGGAATT (SEQ ID NO:11)	UUCCCCUUUCCAACUGGCATT (SEQ ID NO:108)	1.25
RAG3-474	GTTGGAAAGGGGAAATGCC (SEQ ID NO:206)	GUUGGAAAGGGGAAAUGCCTT (SEQ ID NO:12)	GGCAUUUCCCCUUUCCAACTT (SEQ ID NO:109)	1.22
RAG3-472	TGGAAAGGGGAAATGCCAG (SEQ ID NO:207)	UGGAAAGGGGAAAUGCCAGTT (SEQ ID NO:13)	CUGGCAUUUCCCCUUUCCATT (SEQ ID NO:110)	1.41
RAG3-471	GGAAAGGGGAAATGCCAGG (SEQ ID NO:208)	GGAAAGGGGAAAUGCCAGGTT (SEQ ID NO:14)	CCUGGCAUUUCCCCUUUCCTT (SEQ ID NO:111)	1.81
RAG3-466	GGGGAAATGCCAGGAAAGA (SEQ ID NO:209)	GGGGAAAUGCCAGGAAAGATT (SEQ ID NO:15)	UCUUUCCUGGCAUUUCCCCTT (SEQ ID NO:112)	1.64
RAG3-465	GGGAAATGCCAGGAAAGAC (SEQ ID NO:210)	GGGAAAUGCCAGGAAAGACTT (SEQ ID NO:16)	GUCUUUCCUGGCAUUUCCCTT (SEQ ID NO:113)	1.29
RAG3-461	AATGCCAGGAAAGACACTC (SEQ ID NO:211)	AAUGCCAGGAAAGACACUCTT (SEQ ID NO:17)	GAGUGUCUUUCCUGGCAUUTT (SEQ ID NO:114)	1.48

RAG3-460	ATGCCAGGAAAGACACTCC (SEQ ID NO:212)	AUGCCAGGAAAGACACUCCTT (SEQ ID NO:18)	GGAGUGUCUUUCCUGGCAUTT (SEQ ID NO:115)	1.14
RAG3-459	TGCCAGGAAAGACACTCCT (SEQ ID NO:213)	UGCCAGGAAAGACACUCCUTT (SEQ ID NO:19)	AGGAGUGUCUUUCCUGGCATT (SEQ ID NO:116)	1.10
RAG3-454	GGAAAGACACTCCTCTGGA (SEQ ID NO:214)	GGAAAGACACUCCUCUGGATT (SEQ ID NO:20)	UCCAGAGGAGUGUCUUUCCTT (SEQ ID NO:117)	1.24
RAG3-453	GAAAGACACTCCTCTGGAG (SEQ ID NO:215)	GAAAGACACUCCUCUGGAGTT (SEQ ID NO:21)	CUCCAGAGGAGUGUCUUUCTT (SEQ ID NO:118)	1.49
RAG3-450	AGACACTCCTCTGGAGCAG (SEQ ID NO:216)	AGACACUCCUCUGGAGCAGTT (SEQ ID NO:22)	CUGCUCCAGAGGAGUGUCUTT (SEQ ID NO:119)	1.24
RAG3-449	GACACTCCTCTGGAGCAGG (SEQ ID NO:217)	GACACUCCUCUGGAGCAGGTT (SEQ ID NO:23)	CCUGCUCCAGAGGAGUGUCTT (SEQ ID NO:120)	1.14
RAG3-448	ACACTCCTCTGGAGCAGGG (SEQ ID NO:218)	ACACUCCUCUGGAGCAGGGTT (SEQ ID NO:24)	CCCUGCUCCAGAGGAGUGUTT (SEQ ID NO:121)	1.54
RAG3-446	ACTCCTCTGGAGCAGGGGA (SEQ ID NO:219)	ACUCCUCUGGAGCAGGGGATT (SEQ ID NO:25)	UCCCCUGCUCCAGAGGAGUTT (SEQ ID NO:122)	1.36
RAG3-441	TCTGGAGCAGGGGAATATA (SEQ ID NO:220)	UCUGGAGCAGGGGAAUAUATT (SEQ ID NO:26)	UAUAUUCCCCUGCUCCAGATT (SEQ ID NO:123)	1.15
RAG3-440	CTGGAGCAGGGGAATATAG (SEQ ID NO:221)	CUGGAGCAGGGGAAUAUAGTT (SEQ ID NO:27)	CUAUAUUCCCCUGCUCCAGTT (SEQ ID NO:124)	1.14
RAG3-439	TGGAGCAGGGGAATATAGA (SEQ ID NO:222)	UGGAGCAGGGGAAUAUAGATT (SEQ ID NO:28)	UCUAUAUUCCCCUGCUCCATT (SEQ ID NO:125)	1.10
RAG3-437	GAGCAGGGGAATATAGAAG (SEQ ID NO:223)	GAGCAGGGGAAUAUAGAAGTT (SEQ ID NO:29)	CUUCUAUAUUCCCCUGCUCTT (SEQ ID NO:126)	1.12
RAG3-436	AGCAGGGGAATATAGAAGG (SEQ ID NO:224)	AGCAGGGGAAUAUAGAAGGTT (SEQ ID NO:30)	CCUUCUAUAUUCCCCUGCUTT (SEQ ID NO:127)	1.99
RAG3-435	GCAGGGGAATATAGAAGGA (SEQ ID NO:225)	GCAGGGGAAUAUAGAAGGATT (SEQ ID NO:31)	UCCUUCUAUAUUCCCCUGCTT (SEQ ID NO:128)	1.83
RAG3-434	CAGGGGAATATAGAAGGAA (SEQ ID NO:226)	CAGGGGAAUAUAGAAGGAATT (SEQ ID NO:32)	UUCCUUCUAUAUUCCCCUGTT (SEQ ID NO:129)	1.47
RAG3-433	AGGGGAATATAGAAGGAAA (SEQ ID NO:227)	AGGGGAAUAUAGAAGGAAATT (SEQ ID NO:33)	UUUCCUUCUAUAUUCCCCUTT (SEQ ID NO:130)	1.13
RAG3-432	GGGGAATATAGAAGGAAAA (SEQ ID NO:228)	GGGGAAUAUAGAAGGAAAATT (SEQ ID NO:34)	UUUUCCUUCUAUAUUCCCCTT (SEQ ID NO:131)	1.10

RAG3-430	GGAATATAGAAGGAAAAGC (SEQ ID NO:229)	GGAAUAUAGAAGGAAAAGCTT (SEQ ID NO:35)	GCUUUUCCUUCUAUAUUCCTT (SEQ ID NO:132)	1.20
RAG3-426	TATAGAAGGAAAAGCAAGC (SEQ ID NO:230)	UAUAGAAGGAAAAGCAAGCTT (SEQ ID NO:36)	GCUUGCUUUUUCCUUCUAUATT (SEQ ID NO:133)	1.18
RAG3-425	ATAGAAGGAAAAGCAAGCA (SEQ ID NO:231)	AUAGAAGGAAAAGCAAGCATT (SEQ ID NO:37)	UGCUUGCUUUUUCCUUCUAUTT (SEQ ID NO:134)	1.57
RAG3-424	TAGAAGGAAAAGCAAGCAA (SEQ ID NO:232)	UAGAAGGAAAAGCAAGCAATT (SEQ ID NO:38)	UUGCUUGCUUUUUCCUUCUATT (SEQ ID NO:135)	1.79
RAG3-421	AAGGAAAAGCAAGCAAGCC (SEQ ID NO:233)	AAGGAAAAGCAAGCAAGCCTT (SEQ ID NO:39)	GGCUUGCUUGCUUUUUCCUUTT (SEQ ID NO:136)	1.11
RAG3-420	AGGAAAAGCAAGCAAGCCA (SEQ ID NO:234)	AGGAAAAGCAAGCAAGCCATT (SEQ ID NO:40)	UGGCUUGCUUGCUUUUUCCUTT (SEQ ID NO:137)	1.25
RAG3-419	GGAAAAGCAAGCAAGCCAG (SEQ ID NO:235)	GGAAAAGCAAGCAAGCCAGTT (SEQ ID NO:41)	CUGGCUUGCUUGCUUUUUCCTT (SEQ ID NO:138)	1.51
RAG3-418	GAAAAGCAAGCAAGCCAGC (SEQ ID NO:236)	GAAAAGCAAGCAAGCCAGCTT (SEQ ID NO:42)	GCUGGCUUGCUUGCUUUUUCTT (SEQ ID NO:139)	1.12
RAG3-417	AAAAGCAAGCAAGCCAGCA (SEQ ID NO:237)	AAAAGCAAGCAAGCCAGCATT (SEQ ID NO:43)	UGCUGGCUUGCUUGCUUUUUTT (SEQ ID NO:140)	1.19
RAG3-414	AGCAAGCAAGCCAGCATGC (SEQ ID NO:238)	AGCAAGCAAGCCAGCAUGCTT (SEQ ID NO:44)	GCAUGCUGGCUUGCUUGCUUTT (SEQ ID NO:141)	1.27
RAG3-410	AGCAAGCCAGCATGCTGTC (SEQ ID NO:239)	AGCAAGCCAGCAUGCUGUCTT (SEQ ID NO:45)	GACAGCAUGCUGGGCUUGCUTT (SEQ ID NO:142)	1.39
RAG3-409	GCAAGCCAGCATGCTGTCA (SEQ ID NO:240)	GCAAGCCAGCAUGCUGUCATT (SEQ ID NO:46)	UGACAGCAUGCUGGGCUUGCTT (SEQ ID NO:143)	1.38
RAG3-408	CAAGCCAGCATGCTGTCAG (SEQ ID NO:241)	CAAGCCAGCAUGCUGUCAGTT (SEQ ID NO:47)	CUGACAGCAUGCUGGGCUUGTT (SEQ ID NO:144)	2.09
RAG3-405	GCCAGCATGCTGTCAGAAT (SEQ ID NO:242)	GCCAGCAUGCUGUCAGAAUTT (SEQ ID NO:48)	AUUCUGACAGCAUGCUGGCTT (SEQ ID NO:145)	1.53
RAG3-404	CCAGCATGCTGTCAGAATT (SEQ ID NO:243)	CCAGCAUGCUGUCAGAAUUTT (SEQ ID NO:49)	AAUUCUGACAGCAUGCUGGTT (SEQ ID NO:146)	1.18
RAG3-397	GCTGTCAGAATTCAGCAGC (SEQ ID NO:244)	GCUGUCAGAAUUCAGCAGCTT (SEQ ID NO:50)	GCUGCUGAAUUCUGACAGCTT (SEQ ID NO:147)	1.34
RAG3-396	CTGTCAGAATTCAGCAGCA (SEQ ID NO:245)	CUGUCAGAAUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO:51)	UGCUGCUGAAUUCUGACAGTT (SEQ ID NO:148)	1.17

RAG3-378	AGGTATACTGTTCAGGGAA (SEQ ID NO:246)	AGGUAUACUGUUCAGGGAATT (SEQ ID NO:52)	UUCCCUGAACAGUAUACCUTT (SEQ ID NO:149)	1.36
RAG3-377	GGTATACTGTTCAGGGAAA (SEQ ID NO:247)	GGUAUACUGUUCAGGGAAATT (SEQ ID NO:53)	UUUCCCUGAACAGUAUACCTT (SEQ ID NO:150)	1.32
RAG3-376	GTATACTGTTCAGGGAAAA (SEQ ID NO:248)	GUAUACUGUUCAGGGAAAATT (SEQ ID NO:54)	UUUUCCCUGAACAGUAUACTT (SEQ ID NO:151)	1.67
RAG3-375	TATACTGTTCAGGGAAAAG (SEQ ID NO:249)	UAUACUGUUCAGGGAAAAGTT (SEQ ID NO:55)	CUUUUCCCUGAACAGUAUATT (SEQ ID NO:152)	1.11
RAG3-360	AAAGAAATTTGGAGAGCCA (SEQ ID NO:250)	AAAGAAAUUUGGAGAGCCATT (SEQ ID NO:56)	UGGCUCUCCAAAUUUCUUUTT (SEQ ID NO:153)	1.12
RAG3-337	CTGAGACTTCATCCATCTA (SEQ ID NO:251)	CUGAGACUUCAUCCAUCUATT (SEQ ID NO:57)	UAGAUGGAUGAAGUCUCAGTT (SEQ ID NO:154)	1.15
RAG3-290	CCGTATTCTGCCAGATTTC (SEQ ID NO:252)	CCGUAUUCUGCCAGAUUUCTT (SEQ ID NO:58)	GAAAUCUGGCAGAAUACGGTT (SEQ ID NO:155)	1.14
RAG3-273	TCTCCTGGACTAACCCTCT (SEQ ID NO:253)	UCUCCUGGACUAACCCUCUTT (SEQ ID NO:59)	AGAGGGUUAGUCCAGGAGATT (SEQ ID NO:156)	2.89
RAG3-272	CTCCTGGACTAACCCTCTT (SEQ ID NO:254)	CUCCUGGACUAACCCUCUUTT (SEQ ID NO:60)	AAGAGGGUUAGUCCAGGAGTT (SEQ ID NO:157)	1.89
RAG3-271	TCCTGGACTAACCCTCTTC (SEQ ID NO:255)	UCCUGGACUAACCCUCUUCTT (SEQ ID NO:61)	GAAGAGGGUUAGUCCAGGATT (SEQ ID NO:158)	1.17
RAG3-244	ACTTAGGTCCCAGGTTCTC (SEQ ID NO:256)	ACUUAGGUCCCAGGUUCUCTT (SEQ ID NO:62)	GAGAACCUGGGACCUAAGUTT (SEQ ID NO:159)	1.17
RAG3-243	CTTAGGTCCCAGGTTCTCA (SEQ ID NO:257)	CUUAGGUCCCAGGUUCUCATT (SEQ ID NO:63)	UGAGAACCUGGGACCUAAGTT (SEQ ID NO:160)	1.45
RAG3-242	TTAGGTCCCAGGTTCTCAT (SEQ ID NO:258)	UUAGGUCCCAGGUUCUCAUTT (SEQ ID NO:64)	AUGAGAACCUGGGACCUAATT (SEQ ID NO:161)	1.27
RAG3-239	GGTCCCAGGTTCTCATGTC (SEQ ID NO:259)	GGUCCCAGGUUCUCAUGUCTT (SEQ ID NO:65)	GACAUGAGAACCUGGGACCTT (SEQ ID NO:162)	1.10
RAG3-229	TCTCATGTCGCCAGGACAT (SEQ ID NO:260)	UCUCAUGUCGCCAGGACAUTT (SEQ ID NO:66)	AUGUCCUGGCGACAUGAGATT (SEQ ID NO:163)	1.12
RAG3-227	TCATGTCGCCAGGACATGA (SEQ ID NO:261)	UCAUGUCGCCAGGACAUGATT (SEQ ID NO:67)	UCAUGUCCUGGCGACAUGATT (SEQ ID NO:164)	1.39
RAG3-226	CATGTCGCCAGGACATGAG (SEQ ID NO:262)	CAUGUCGCCAGGACAUGAGTT (SEQ ID NO:68)	CUCAUGUCCUGGCGACAUGTT (SEQ ID NO:165)	1.30

RAG3-219	CCAGGACATGAGACAGTTC (SEQ ID NO:263)	CCAGGACAUGAGACAGUUCTT (SEQ ID NO:69)	GAACUGUCUCAUGUCCUGGTT (SEQ ID NO:166)	1.24
RAG3-215	GACATGAGACAGTTCCGC (SEQ ID NO:264)	GACAUGAGACAGUUCCCGCTT (SEQ ID NO:70)	GCGGGAACUGUCUCAUGUCTT (SEQ ID NO:167)	1.32
RAG3-214	ACATGAGACAGTTCCCGCT (SEQ ID NO:265)	ACAUGAGACAGUUCCCGCUTT (SEQ ID NO:71)	AGCGGGAACUGUCUCAUGUTT (SEQ ID NO:168)	1.28
RAG3-206	CAGTTCCCGCTATACAAAT (SEQ ID NO:266)	CAGUUCCCGCUAUACAAAUTT (SEQ ID NO:72)	AUUUGUAUAGCGGGAACUGTT (SEQ ID NO:169)	1.31
RAG3-205	AGTTCCCGCTATACAAATT (SEQ ID NO:267)	AGUUCCCGCUAUACAAAUUTT (SEQ ID NO:73)	AAUUUGUAUAGCGGGAACUTT (SEQ ID NO:170)	1.14
RAG3-204	GTTCCCGCTATACAAATTC (SEQ ID NO:268)	GUUCCCGCUAUACAAAUUCTT (SEQ ID NO:74)	GAAUUUGUAUAGCGGGAACTT (SEQ ID NO:171)	1.65
RAG3-203	TTCCCGCTATACAAATTCT (SEQ ID NO:269)	UUCCCGCUAUACAAAUUCUTT (SEQ ID NO:75)	AGAAUUUGUAUAGCGGGAATT (SEQ ID NO:172)	1.42
RAG3-202	TCCCGCTATACAAATTCTC (SEQ ID NO:270)	UCCCGCUAUACAAAUUCUCTT (SEQ ID NO:76)	GAGAAUUUGUAUAGCGGGATT (SEQ ID NO:173)	1.31
RAG3-164	GAGGAGCTGGGCTCTATTC (SEQ ID NO:271)	GAGGAGCUGGGCUCUAUUCTT (SEQ ID NO:77)	GAAUAGAGCCCAGCUCCUCTT (SEQ ID NO:174)	1.13
RAG3-158	CTGGGCTCTATTCATGGAC (SEQ ID NO:272)	CUGGGCUCUAUUCAUGGACTT (SEQ ID NO:78)	GUCCAUGAAUAGAGCCCAGTT (SEQ ID NO:175)	1.17
RAG3-153	CTCTATTCATGGACCATGG (SEQ ID NO:273)	CUCUAUUCAUGGACCAUGGTT (SEQ ID NO:79)	CCAUGGUCCAUGAAUAGAGTT (SEQ ID NO:176)	1.17
RAG3-152	TCTATTCATGGACCATGGT (SEQ ID NO:274)	UCUAUUCAUGGACCAUGGUTT (SEQ ID NO:80)	ACCAUGGUCCAUGAAUAGATT (SEQ ID NO:177)	1.10
RAG3-151	CTATTCATGGACCATGGTC (SEQ ID NO:275)	CUAUUCAUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:81)	GACCAUGGUCCAUGAAUAGTT (SEQ ID NO:178)	1.44
RAG3-150	TATTCATGGACCATGGTCC (SEQ ID NO:276)	UAUUCAUGGACCAUGGUCCTT (SEQ ID NO:82)	GGACCAUGGUCCAUGAAUATT (SEQ ID NO:179)	1.24
RAG3-147	TCATGGACCATGGTCCAGC (SEQ ID NO:277)	UCAUGGACCAUGGUCCAGCTT (SEQ ID NO:83)	GCUGGACCAUGGUCCAUGATT (SEQ ID NO:180)	1.31
RAG3-146	CATGGACCATGGTCCAGCC (SEQ ID NO:278)	CAUGGACCAUGGUCCAGCCTT (SEQ ID NO:84)	GGCUGGACCAUGGUCCAUGTT (SEQ ID NO:181)	1.44
RAG3-142	GACCATGGTCCAGCCATGG (SEQ ID NO:279)	GACCAUGGUCCAGCCAUGGTT (SEQ ID NO:85)	CCAUGGCUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:182)	1.26

RAG3-134	TCCAGCCATGGGCTCTAGT (SEQ ID NO:280)	UCCAGCCAUGGGCUCUAGUTT (SEQ ID NO:86)	ACUAGAGCCCAUGGCUGGATT (SEQ ID NO:183)	1.41
RAG3-133	CCAGCCATGGGCTCTAGTC (SEQ ID NO:281)	CCAGCCAUGGGCUCUAGUCTT (SEQ ID NO:87)	GACUAGAGCCCAUGGCUGGTT (SEQ ID NO:184)	1.11
RAG3-129	CCATGGGCTCTAGTCCCAG (SEQ ID NO:282)	CCAUGGGCUCUAGUCCCAGTT (SEQ ID NO:88)	CUGGGACUAGAGCCCAUGGTT (SEQ ID NO:185)	1.30
RAG3-122	CTCTAGTCCCAGTAGACAG (SEQ ID NO:283)	CUCUAGUCCCAGUAGACAGTT (SEQ ID NO:89)	CUGUCUACUGGGACUAGAGTT (SEQ ID NO:186)	1.51
RAG3-121	TCTAGTCCCAGTAGACAGG (SEQ ID NO:284)	UCUAGUCCCAGUAGACAGGTT (SEQ ID NO:90)	CCUGUCUACUGGGACUAGATT (SEQ ID NO:187)	1.72
RAG3-111	GTAGACAGGAAAAGAAGTC (SEQ ID NO:285)	GUAGACAGGAAAAGAAGUCTT (SEQ ID NO:91)	GACUUCUUUUCCUGUCUACTT (SEQ ID NO:188)	1.26
RAG3-110	TAGACAGGAAAAGAAGTCG (SEQ ID NO:286)	UAGACAGGAAAAGAAGUCGTT (SEQ ID NO:92)	CGACUUCUUUUCCUGUCUATT (SEQ ID NO:189)	1.25
RAG3-101	AAAGAAGTCGTCATTTCCG (SEQ ID NO:287)	AAAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (SEQ ID NO:93)	CGGAAAUGACGACUUCUUUTT (SEQ ID NO:190)	1.14
RAG3-100	AAGAAGTCGTCATTTCCGG (SEQ ID NO:288)	AAGAAGUCGUCAUUUCCGGTT (SEQ ID NO:94)	CCGGAAAUGACGACUUCUUTT (SEQ ID NO:191)	1.15
RAG3-099	AGAAGTCGTCATTTCCGGG (SEQ ID NO:289)	AGAAGUCGUCAUUUCCGGGTT (SEQ ID NO:95)	CCCGGAAAUGACGACUUCUTT (SEQ ID NO:192)	1.12
RAG3-078	AGCCTTCACCTGGGCTTGG (SEQ ID NO:290)	AGCCUUCACCUGGGCUUGGTT (SEQ ID NO:96)	CCAAGCCCAGGUGAAGGCUTT (SEQ ID NO:193)	1.10
RAG3-071	ACCTGGGCTTGGTGGCTCT (SEQ ID NO:291)	ACCUGGGCUUGGUGGCUCUTT (SEQ ID NO:97)	AGAGCCACCAAGCCCAGGUTT (SEQ ID NO:194)	1.10
RAG3-047	CTCTGATTGGGCGGAAGTG (SEQ ID NO:292)	CUCUGAUUGGGCGGAAGUGTT (SEQ ID NO:98)	CACUUCCGCCCAAUCAGAGTT (SEQ ID NO:195)	1.66
RAG3-046	TCTGATTGGGCGGAAGTGG (SEQ ID NO:293)	UCUGAUUGGGCGGAAGUGGTT (SEQ ID NO:99)	CCACUUCCGCCCAAUCAGATT (SEQ ID NO:196)	1.15
RAG3-044	TGATTGGGCGGAAGTGGCC (SEQ ID NO:294)	UGAUUGGGCGGAAGUGGCCTT (SEQ ID NO:100)	GGCCACUUCCGCCCAAUCATT (SEQ ID NO:197)	1.20
RAG3-023	GGCAGGCTTGTGACCCTAC (SEQ ID NO:295)	GGCAGGCUUGUGACCCUACTT (SEQ ID NO:101)	GUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (SEQ ID NO:198)	1.27
RAG3-022	GCAGGCTTGTGACCCTACT (SEQ ID NO:296)	GCAGGCUUGUGACCCUACUTT (SEQ ID NO:102)	AGUAGGGUCACAAGCCUGCTT (SEQ ID NO:199)	1.11

对322个saRNA的活性按照其在*Thpo*启动子上的位置排列，很明显地看到功能性saRNA的分布呈现聚集现象，即在某些启动子区域，激活性saRNA聚集在特定的“热点（hot spot）”区域（图2）。如图2所示，在启动子的-493/-356区域（H1）、-273/-183区域（H2）和-164/-80（H3）分别出现3个热点区域，表现为激活性saRNA的高度聚集。该分析结果表明，激活性saRNA在启动子上并非随机分布，而是存在特定的热点区域。

热点H1（5’至3’：-493至-356）序列，其对应于序列表中SEQ ID NO:2从5’至3’的位置1至位置138：

1 ggcaatacct actttgccag ttggaaaggg gaaatgccag gaaagacact
51 cctctggagc aggggaatat agaaggaaaa gcaagcaagc cagcatgctg
101 tcagaattca gcagcaggta tactgttcag ggaaaaga

热点H2（5’至3’：-273至-183）序列，其对应于序列表中SEQ ID NO:3从5’至3’的位置1至位置91：

1 tctcctggac taaccctctt ctctctctca cttaggtccc aggttctcat
51 gtcgccagga catgagacag ttcccgctat acaaattctc t

热点H3（5’至3’：-164至-80）序列，其对应于序列表中SEQ ID NO:4从5’至3’的位置1至位置85：

1 gaggagctgg gctctattca tggaccatgg tccagccatg ggctctagtc
51 ccagtagaca ggaaaagaag tcgtcatttc cgggg

实施例3 saRNA促进小鼠肝细胞中*Thpo* mRNA的表达

（1）细胞培养和转染

细胞培养如实施例2所述，小鼠胚胎肝细胞（BNL.CL2）以每孔1×10^5个细胞铺板到六孔板中，依照制造商的说明，使用RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以10 nM浓度转染小鼠*Thpo* saRNA，转染时间为72小时，每种处理使用2个复孔。

（2）二步法RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入500 μl细胞裂解液，室温孵育5分钟。用Qiagen RNeasy试剂盒提取RNA，反转录后在ABI 7500 快速实时（Fast Real-time） PCR 系统（Applied Biosystems）进行qPCR分析，每个样本重复3个复孔扩增，PCR 反应条件见表5和表6。

表5. RT反应制备

试剂（RT反应1）	体积
5 × gDNA Eraser缓冲液	2 μl
gDNA Eraser	1 μl
总量RNA（1 μg）+ D.W	7 μl

试剂（RT反应2）	体积
5 × PrimeScript 缓冲液2	4 μl
PrimeScript RT酶混合物1	1 μl
RT 引物混合物	1 μl

终体积	1 0 μl
42℃ 2 min ， 储存于 4℃	

无RNase dH_2O	4 μl
RT反应1	10 μl
终体积	20 μl
37℃ 15 min，85℃ 5 sec， 储存于 4℃	

表 6. RT-qPCR 反应制备

试剂	体积
SYBR Premix Ex Taq II (2 ×)	5 μl
ROX 参考染料 II (50 ×)	0.2 μl
正向和反向引物混合物 (5 μM)	0.8 μl
cDNA (RT 产物)	4 μl
总计	10 μl

反应条件为：95℃30秒， 95℃5秒，60℃30 秒，扩增40个循环。同时扩增*Tbp*基因作为内参，其中*Thpo*用*Thpo* F1/R1引物对扩增，扩增引物见表2。

为了计算某个saRNA转染样本的*Thpo*（目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用公式2代入目的基因及1个内参基因的Ct值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \quad \text{(公式 2)}$$

图 3 所示为不同小鼠 saRNA 处理后细胞中 *Thpo* 相对 mRNA 的表达值。以对照组（Mock）作为空白转染对照，与对照组相比，小鼠 *Thpo* 小干扰 RNA（siRNA） DS03-432i 组的 mRNA 相对表达值下降了 53.5%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。不同 saRNA，包括 DS03-0007（RAG3-424），DS03-0014（RAG3-425），DS03-0022 （RAG3-243）和 DS03-0024 （RAG3-151），组的 mRNA 相对表达值均高于对照组，分别上升了 25.5%、16.5%、16%和 41%。这说明随机选择的激活性 saRNA 在 BNL.CL2 细胞中能够促进 *Thpo* mRNA 的表达。

实施例 4 小鼠 *Thpo* saRNA 促进 LPC-H12 细胞中 *Thpo* mRNA 的表达

细胞培养如实施例 2 所述，小鼠肝癌细胞（LPC-H12）（购自北京北纳创联生物科技有限公司，BNCC101945）以每孔 2×10^5 个细胞铺板到六孔板中，依照制造商的说明，使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以 10 nM 浓度转染小鼠 Thpo saRNA，转染时间为 72 小时，每种处理使用 2 个复孔。二步法 RT-qPCR 如实施例 3 所述。

如图 4 所示为不同 saRNA 处理后细胞中 *Thpo* 相对 mRNA 的表达值。以对照处理作为空白转染对照，与对照组相比，小鼠 siRNA (DS03-432i) 组的 mRNA 相对表达值下降了 47%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。DS03-0007（RAG3-424），DS03-0019 （RAG3-453），DS03-0022 （RAG3-243），DS03-0024（RAG3-151），DS03-0027（RAG3-134）

组的 mRNA 相对表达值均高于对照组，其 mRNA 相对表达值分别上升了 52%，90%，30.5%，11.5%和 34%，以 DS03-0019 的激活效果（90%）尤为明显。这说明随机选择的激活性 saRNA 在 LPC-H12 细胞中能够不同程度地促进 *Thpo* mRNA 的表达。

实施例 5 小鼠 *Thpo* saRNA 促进原代小鼠肝细胞中 *Thpo* mRNA 的表达

（1）原代小鼠肝细胞的培养和转染

C57 雌性小鼠（6-8 周龄，体重约 25 g，购自扬州大学比较医学中心）在小鼠动物房适应 3 天后，采用两步灌注法分离原代小鼠肝细胞（Primary mouse liver cells）。两步灌注法的具体操作简述如下： 使用异氟烷维持麻醉小鼠，酒精消毒并用剪刀打开小鼠腹腔，暴露肝门静脉及下腔静脉；将针头插入肝门静脉，用蠕动泵将 37℃预热的前灌液（HBSS+HEPES+EGTA）以 1~2 ml/min 的速度灌注，小鼠肝脏膨胀发白说明插管成功；剪开下腔静脉，逐渐增加灌流速度至 7~9 ml/min，灌注 10~15 min；加入胶原酶溶液消化约 15 min，灌流速度 5~8 ml/min。消化完成后将肝转移至培养皿并收集肝细胞，经 200 目过滤器后，用 DMEM 培养基洗 3 次，4℃离心（100 g）5 min。将细胞以 2×10^5 个/每孔（胶原包被过的孔板）培养在含 10% 血清的 DMEM-L 培养基中，培养 4~6 小时后更换不含血清的 DMEM-L 培养基，在 5% CO_2，37℃条件下培养过夜。次日，依照制造商的说明，使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以 10 nM 浓度转染小鼠 *Thpo* saRNA，转染时间为 72 小时，每种处理使用 2 个复孔。二步法 RT-qPCR 如实施例 3 所述。

图 5 所示为不同小鼠 saRNA 处理后细胞中 *Thpo* 相对 mRNA 的表达值。以对照处理作为空白转染对照，与对照组相比，DS03-0007（RAG3-424），DS03-0012（RAG3-204），DS03-0014（RAG3-425），DS03-0019（RAG3-453），DS03-0022（RAG3-243），DS03-0024（RAG3-151）和 DS03-0027（RAG3-134）组的 mRNA 相对表达值均不同程度地高于对照组，分别上升了 33.5%，25.5%，51.5%，44.5%，28.5%，26%和 34.5%。这说明随机选择的激活性 saRNA 在原代小鼠肝细胞中能够促进 *Thpo* mRNA 的表达。

实施例 6. 小鼠体内检测 *Thpo* saRNA 对 *Thpo* 基因的激活作用

（1）寡核苷酸制剂制作

基于已公开的脂质纳米颗粒（Lipid Nanoparticle, LNP）制备方法（参见改进的脂质制剂，授权公告号：CN 104873464B；改进的脂质制剂，授权公告号：CN 102625696B；脂质制剂, 专利号: US 9394234B2；改进的脂质制剂，专利号：WO 2010/144740A1；脂质制剂，专利号：US 8158601B2；脂质制剂，US 8802644B2）进行改进制备 LNP。用所得 LNP 包载寡核苷酸。具体方法简述如下。

Thpo siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）储液制备：用 DEPC 水溶解 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024），配制理论终浓度为 5 mg/ml 的 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）储液。取适量的 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）储液，用 PBS 稀释 200 倍，用于检测 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（DS03-0024）浓度。

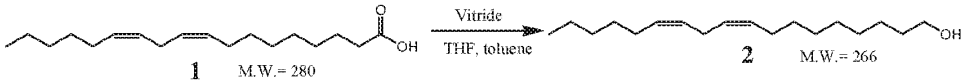
表 7. siRNA（DS03-432i）和 saRNA（DS03-0024）的 RNA 浓度

样品	RNA 测定浓度（ng/μl）	稀释倍数	RNA 储液浓度（mg/ml）
DS03-432i	41	200	8.2
DS03-0024	41	200	8.2

表 8. dsCon2 和 siRNA（DS03-432i）序列

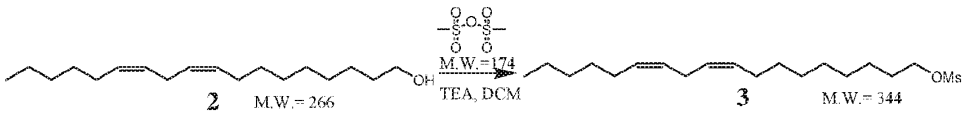
RNA 双链体	正义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
dsCon2	ACUACUGAGUGACAGUAGATT（SEQ ID NO:303）	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT（SEQ ID NO:304）
DS03-432i	GGACUUUAGCCUGGGAGAATT（SEQ ID NO:305）	UUCUCCCAGGCUAAAGUCCTT（SEQ ID NO:306）

制备 D-Lin-MC3 脂质：在专利公开方法（参见脂质制剂，公开号: US 2010/0324120 A1）的基础上，用化学方法如下合成 D-Lin-MC3 脂质。



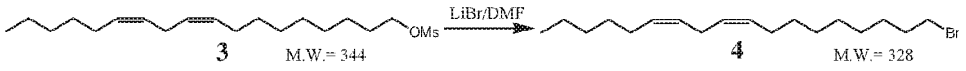
1 M.W.= 280 2 M.W.= 266

将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气并使用丙酮-干冰浴冷却至 0 ℃。加入 25 g 反应物 1（亚油酸）及 THF 300 ml。将 60 ml 的红铝溶液（70% wt/vol）的甲苯溶液缓慢滴加至反应器中。滴加完毕后，室温反应 2 小时。取小样，用 TLC 监测原料反应程度。反应完毕后，缓慢加入饱和的硫酸钠溶液。滴加完毕后，30 分钟内滴入 130 ml 乙酸乙酯，并剧烈搅拌。反应液过滤，固体用 90 ml 乙酸乙酯冲洗，合并有机相，浓缩。产物溶解于 80 ml 乙酸乙酯中，用水洗两次，并用无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩有机相并用真空泵除去有机溶剂，得到产物 2（17.49 g）。



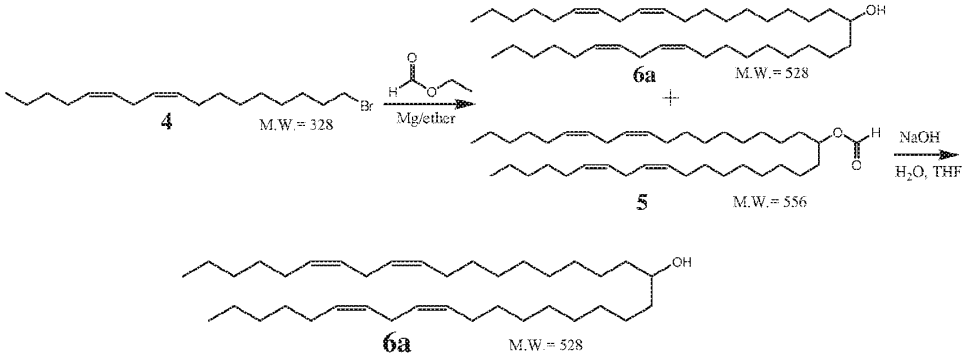
2 M.W.= 266 3 M.W.= 344

将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气，然后加入 17 g 产物 2 及 150 ml 二氯甲烷，然后加入 40 ml 三乙胺及 1 g 4-二甲氨基吡啶，溶液使用丙酮-干冰浴冷却至冷却至-10 ℃。30 g 甲烷磺酸酐溶于 45 ml 二氯甲烷中，缓慢滴加至反应器中。反应液滴加完毕，继续保持 0 ℃反应 1 小时。TLC 监测原料反应程度。反应完毕后，80 ml 冰水加入反应液中，溶液分层，水相用 40 ml 二氯甲烷萃取。合并有机相，有机相分别用稀盐酸、水及饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩有机相并用真空泵除去有机溶剂，得到产物 3（22.3 g）。

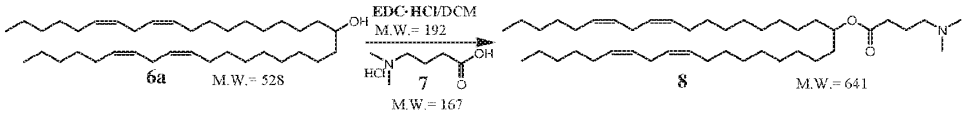


3 M.W.= 344 4 M.W.= 328

将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气，然后加入 100 ml DMF 及 22 g 产物 3，溶液使用丙酮-干冰浴冷却至冷却至-10 ℃。8.5 g LiBr 溶于 80 ml DMF，搅拌并缓慢滴加至反应器中。滴加完毕后，反应液升温至 45 ℃，搅拌反应 18-20 小时。TLC 监测原料反应程度。反应完毕后，加入 300 ml 水，并用 240 ml 正己烷萃取，水相继续用正己烷萃取。合并有机相，并用水及饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩有机相并用真空泵除去有机溶剂，得到粗品 16.76 g。用 60-120 目硅胶纯化（正己烷为流动相），得到产物 4 约 13.86 g。



将干燥 1 L 三口烧瓶通入干燥氩气，加装回流装置。反应器中加入 2 g 镁屑及 12 ml 无水乙醚。13 g 产物 4 溶解于 40 ml 无水乙醚中。氩气保护下，8 ml 该溶液滴加至反应器中，并继续加入 0.2 ml 二溴甲烷。反应器在水浴中升温至 40 ℃。反应开始后，停止加热，并将剩余 32 ml 溶液滴加至反应器中，让混合物保持轻微回流状态。滴加完毕后，开始加热使其保持回流状态（约 45 ℃）反应 1 小时。取小样用水淬灭后使用 TLC 监测原料反应程度。原料反应完毕后，反应液用冰浴冷却至 10 ℃以下，然后缓慢加入甲酸乙酯的乙醚溶液。滴加完毕后，室温反应 1 小时。然后加入 56 ml 冰水及 10 %的硫酸溶液，分离有机相，水相用乙醚萃取。合并有机相，并用饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩有机相并用真空泵除去有机溶剂，得到粗品 13 g。粗品用 100 ml 85%乙醇溶解，加入 7 g NaOH 固体，室温搅拌 24 小时，TLC 监测原料反应程度。反应完全后，用乙醚萃取，合并有机相，并用饱和 NaCl 溶液洗涤。无水硫酸钠干燥。过滤，浓缩有机相。粗品用 60-120 目硅胶纯化（4 % 乙醚/正己烷），得到产物 6 10.4 g。

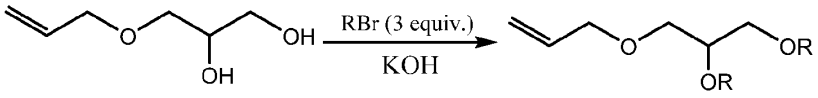


100 ml 烧瓶中加入反应产物 **6**（3 g）溶解在二氯甲烷 (24 ml)中，加入反应物 **7**（4-（二甲基氨基）丁酸盐酸盐）（1.1 g），然后加入二异丙基乙基胺（1.5 ml）及 4-二甲氨基吡啶（0.09 g）。室温搅拌 5 min 后，溶液中加入 EDC·HCl（1.7 g），室温搅拌过夜。TLC 监测原料反应程度。反应完全后，溶液用 20 ml 二氯甲烷稀释。然后用饱和 $NaHCO_3$、水及饱和 NaCl 溶液洗，无水 Na_2SO_4 干燥，过滤，浓缩有机相，得到粗产品约 3.3 g。使用层析法（1%-5% 甲醇/二氯甲烷作为梯度洗脱）分离得到纯的产物 **8**（Dlin-MC3-DMA，2.9 g）。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz), δ=5.44-5.22 (m, 8H), 4.95-4.79 (m, 1H), 2.81-2.63 (m, 4H),2.36-2.21 (m, 4H), 2.12-1.92 (m,

9H), 1.84-1.67 (m, 2H), 1.48 (d, J=5.4, 4H), 1.36-1.14 (m, 39H), 0.91-0.81 (m, 6H)。

制备 PEG-c-DMA

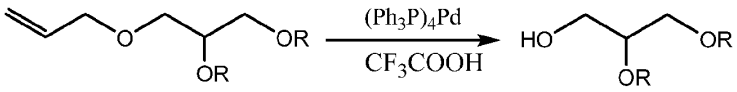
用化学方法如下制备 PEG-c-DMA：



1 $R = C_{14}H_{29}$ 2

产物 **2** 的制备

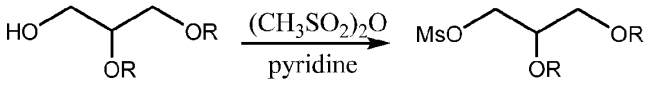
将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气并将 9 g 反应物 **1**（3-烯丙基氧-1,2-丙二醇），60 g 1-溴代十四烷和 15.5 g 氢氧化钾的混合物置于 500 mL 无水苯中，回流过夜，并用 Dean-Stark 分流装置除水。混合物冷却到室温后，用 200mL 无水苯稀释。有机相分别用水和饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸镁干燥。真空泵除去有机溶剂，得 53g 清澈黄色油状物。硅胶柱纯化（粒径 230-400 mesh，用量 1300 mL），流动相为 0-5%乙酸乙酯/正己烷梯度洗脱。产物 **2** 为 33g。



2 3

产物 **3** 的制备

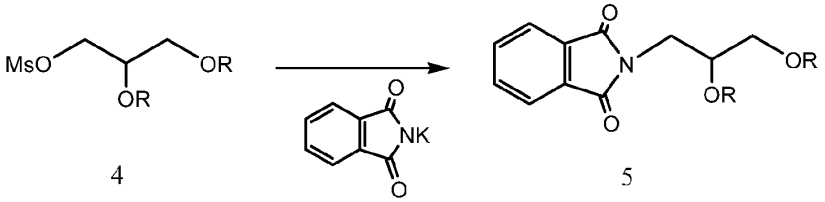
将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气并将 45 mL 三氟乙酸加入到产物 **2** 的乙醇溶液中（33 g 产物 **2** 溶于 500mL 乙醇）。加入 10 g 四（三苯基磷）钯后，避光回流过夜。反应完成后，真空泵去除有机溶剂，得棕色油状物。粗品用硅胶柱纯化（粒径 230-400 mesh，用量 1500 mL），流动相为 0-1% 甲醇/二氯甲烷梯度洗脱。终产物 **3** 呈黄色蜡状物，得 19 g。



3 4

产物 **4** 的制备

将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气，在反应器中将 13.8 g 甲磺酸酐溶解于 150 mL 二氯甲烷。并将 6.4 mL 吡啶滴加到反应器中。将 19 g 产物 **3** 溶解在 150 mL 二氯甲烷中并加入到反应体系中。反应混合物在氩气保护下室温搅拌过夜。反应完全后，产物用 200 mL 二氯甲烷稀释，分别用水和饱和 NaCl 溶液洗涤，后用无水硫酸镁干燥。旋蒸除去有机溶剂，得黄色蜡状粗品产物 **4** 22.1 g。



4 5

产物 **5** 的制备

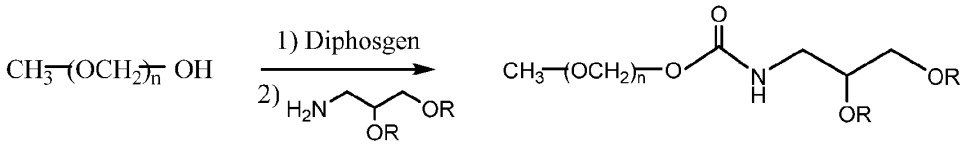
将干燥 1 L 玻璃反应器通入干燥氩气，将 22 g 产物 **4** 与 19 g 酞酰亚胺钾混合溶于 400 mL DMF 溶液中，升温到 70℃搅拌过夜，得黄色悬浊液。溶液冷却到室温后，倒入 800 mL 冰水中。水相用乙酸乙酯洗涤。合并有机相，分别用水和饱和 NaCl 溶液洗涤，后用无水硫酸镁干燥。真空泵去除有机溶剂。混合物溶于 500 ml 正己烷中，过滤，再用 100 mL 己烷冲洗。旋蒸去除有机溶剂，得蜡状物粗品 20.7 g。粗品用硅胶柱纯化（粒径 230-400 mesh，用量 600 mL），流动相为 0-5% 乙酸乙酯/正己烷梯度洗脱。得纯品白色蜡状产物 **5** 13.4 g。



5 6

产物 **6** 的制备

将 13.4 g 产物 **5** 和 15.8 mL 水合肼溶于 300 mL 乙醇溶液，过夜回流，产生白色固体。反应液冷却到室温后，过滤。固体用乙醇（100mL）清洗两次。合并有机相，旋蒸去除有机溶剂并溶于 500 mL 氯仿，过滤。固体用 100 mL 氯仿清洗一次。合并有机相并分别用水和饱和 NaCl 溶液洗涤，后用无水硫酸镁干燥。真空泵去除有机溶剂，得浅色油状粗品 10.6 g。硅胶柱纯化（粒径 230-400mesh，用量 300mL），流动相为 0-10% 甲醇/氯仿梯度洗脱。得到浅色油状产物 10 g。



6 7

产物 7 的制备

将 29.5 g 单甲氧基聚乙二醇 2000 溶解与 150 mL 无水苯中，旋蒸去除有机溶剂。将产物溶解于 250mL 无水二氯甲烷并加入到 1 L 干燥玻璃反应器中，通入干燥氩气。加入 7.3 g 氯甲酸三氯甲酯，室温搅拌 3 小时。旋蒸除去有机溶剂，加入 150ml 无水苯，旋蒸去除有机溶剂。将 10 g 产物 **6** 溶于 150 mL 二氯甲烷，然后再加入 3.2 mL 三乙胺，并在氩气保护下加入到 1 L 反应体系室温搅拌过夜。反应产物用 200 mL 二氯甲烷稀释。有机相用 1% HCl 溶液洗涤，然后分别用水，0.1%碳酸钠溶液，水和饱和 NaCl 溶液洗涤，最后用无水硫酸镁干燥。真空去除有机溶剂后，得浅色浆状粗品 46 g。粗品进行硅胶柱纯化（粒径 230-400 mesh，用量 1600 mL）。流动相为 0-10% 甲醇/氯仿梯度洗脱，得产品 PEG-c-DMA 和剩余反应物，呈白色或淡黄色蜡状物。蜡状混合物加入 150 ml 乙醚，溶解未反应的反应物。过滤，并用乙醚洗涤固体两遍，真空干燥固体得 32.2 g 产物 **7**。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ:5.15 (1H, m, NH), 4.21 (2H, m, CH2), 3.80-3.1 (8H, m), 3.60 (130H, s, OCH2CH2O), 3.34 (3H, s, OCH3), 2.42 (2H, m, NCH2), 1.49 (4H, m, 2 x CH2), 1.21 (44H, s, 22 x CH2), 0.84 (6H, t, 2 x CH3) ppm。

制备脂质储液：将 D-Lin-MC3 脂质、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱，即 DSPC（Avanti

Polar Lipid， 850365）、胆固醇（Sigma，C3045）、PEG-c-DMA 称量前在室温平衡约 30 min。将 D-Lin-MC3 脂质用 100%乙醇配制成 40 mg/ml 的储液，胆固醇用 100%乙醇配制成 20 mg/ml 的储液，将 DSPC 用 100%乙醇配制成 20 mg/ml 的储液。长效脂质用 100%乙醇配制成 50 mg/ml 的储液。

制备预制空囊泡（pre-formed vesicles，PFV）：D-Lin-MC3、胆固醇、DSPC、PEG-c-DMA 按 40:40:10:10 的摩尔比用无水乙醇配制成脂质乙醇溶液，各脂质所需量见表 9。待所有脂质溶解后，一边搅拌一边将上述脂质乙醇溶液加入到制剂缓冲液（50 mM 柠檬酸，pH 3.0）中，使乙醇的终浓度为 30%（v/v）。室温下，用装有一层核孔膜（Nuclepore Membrane）的 Avanti 脂质体挤出器反复挤出，即得到粒径均一的 PFV。经过挤出器的 PFV 用粒径分析仪测量其粒径。

表 9. F113 制剂中各脂质所需

总体积：10 ml		
乙醇体积：3 ml，乙醇的浓度为 30%（v/v）		
脂质	浓度 (mg/ml)	所需量 （ml）
D-Lin-MC3	40	1.25
DSPC	20	0.462
胆固醇	20	0.904
PEG-c-DMA	50	0.596
补加乙醇		0.286

制备 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）脂质体制剂：分装所需体积的 PFV 装入 15 ml Falcon 管中，35℃水浴中预平衡 5 min。分别将 200 μl（8.2mg/ml）的 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（DS03-0024）储液按照 RNA 储备液/制剂缓冲液/乙醇溶液=200 μl/100 μl/100 μl 的比例制成 0.4 ml 的 siRNA/制剂缓冲液/乙醇溶液和 saRNA/制剂缓冲液/乙醇溶液，然后将 siRNA（DS03-432i）或 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）/制剂缓冲液/乙醇溶液缓慢加入到上述 PFV 中，35℃孵育 30 min。用透析袋 MD24 透析上述 siRNA（DS03-432i）和 saRNA（RAG3-151/DS03-0024）脂质体制剂，1×磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）透析过夜，回收透析后产物，即得本实验中使用的 LNP 包载的寡核苷酸。用 0.2 μm 针头式过滤器过滤 LNP 包载的寡核苷酸进行过滤除菌，取 20 μl 除菌后产物用于包封率检测。

（2）小鼠尾静脉注射 LNP 包载的寡核苷酸

准备15只6-8周龄的雄性Balb/c小鼠（北京斯贝福生物技术有限公司），体重约25 g。在小鼠动物房适应3天后，根据体重随机分成3组，每组5只，分别为对照组（PBS）、LNP包载 *Thpo*-siRNA（DS03-432i，5 mg/kg）组和LNP包载*Thpo*-saRNA（RAG3-151/DS03-0024，5 mg/kg）组。按20 ml/kg 的剂量通过尾静脉注射给药。在给药后72小时，采用异氟烷麻醉小鼠并进行心脏穿刺采血200 μl用于分析血清THPO蛋白浓度。小鼠采血完成后，采用二氧化碳吸入窒息法处死小鼠。其操作方法是将待安乐死的实验小鼠置于可封闭的实验箱中，释放大量的二氧化碳，使实验小鼠窒息而亡。

（3） ELISA 检测小鼠血清 THPO 蛋白

取40 μl小鼠的全血室温静置30分钟，离心（4℃，13000 rpm，15 min）收集血清。用小鼠THPO ELISA 试剂盒（R&D Systems，MTP00）检测血清中THPO的含量。按照试剂盒提供的说明书进行操作，其操作过程简述如下。准备充足的板条（试剂盒自带），每组设两个复孔，每孔先加入50 μl的RD1-23，再分别加入50 μl的标准品、对照和样品，轻拍板条使其混匀，室温放置2小时。弃掉液体并用400 μl洗涤缓冲液清洗4次，每孔加入100 μl小鼠Thpo的偶联物，室温放置2小时。弃掉液体并用400 μl 洗涤缓冲液清洗4次，每孔加入100 μl底物反应液，室温避光放置30分钟。反应结束后，每孔加入100 μl终止液，轻拍板条使其混匀，使用酶标仪（Infinite M200 Pro）测定450 nm处吸光值。用已知标准品浓度（4000 pg/ml，试剂盒自带）制作保证曲线。 用待测样品的吸光值在减去空白对照（0 pg/ml）的吸光值后根据标准曲线计算出THPO蛋白浓度（pg/ml）。

（4）统计学分析

连续变量组间差异的比较采用单因素方差分析（ANOVA），多组间比较采用Tukey's多重比较分析。P值小于0.05为具有显著差异。

图 6 所示为不同处理组小鼠血清 Thpo 蛋白的浓度。与对照组（PBS）相比，LNP 包载 *Thpo-siRNA*（DS03-432i）组的 Thpo 蛋白含量下降了 16.1%，具有显著的统计学意义（*P<0.001*）。这说明 LNP 包载的 *Thpo*-siRNA（DS03-432i）能够成功将 *Thpo*-siRNA 递送至小鼠体内并且可以显著降低小鼠体内 *Thpo*-siRNA 蛋白的含量，符合预期并与体外细胞实验结果一致。LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024）组的 Thpo 蛋白含量与对照组相比上升了 32.9%，两者具有及其显著的统计学意义（*P<0.001*）。这说明 LNP 包载的 *Thpo*-saRNA（DS03-0024）可以有效地递送 *Thpo*-saRNA 至小鼠体内并且显著增加小鼠体内 Thpo 蛋白的含量。N（样本数）=5； *** 表示 *P<0.001*。

实施例 7. 小鼠尾静脉递送 saRNA 增加血清 Thpo 水平及外周血血小板数量

（1）准备32只6-8周龄的雄性Balb/c小鼠（扬州大学比较医学中心 ），体重28-30 g。在小鼠动物房适应7天后，根据体重随机分成4组，每组8只，分别为对照组（PBS）和3组不同剂量的LNP包载*Thpo*-saRNA（DS03-0024，1 mg/kg、DS03-0024，3 mg/kg 和DS03-0024，6 mg/kg）组。按10 ml/kg 的剂量通过尾静脉注射给药。给药前1天及给药后第2、4、6、9天分别尾静脉采血40 μl用于分析血清Thpo浓度及外周血血小板数量，给药后第17天采用异氟烷麻醉小鼠并进行心脏穿刺采血800 μl左右用于分析外周血血小板数量。小鼠采血完成后，采用二氧化碳吸入窒息法处死小鼠。其操作方法是将待安乐死的实验小鼠置于可封闭的实验箱中，释放大量的二氧化碳，使实验小鼠窒息而亡。

（2）小鼠外周血血小板检测

取 5 μl 全血与 5 μl 0.01%的肝素钠混匀，再加入 90 μl 生理盐水稀释至 100 μl（1：20 稀释），轻柔混匀后，加入至 200 μl 血小板分离液（Solarbio，P1620）上层，250 ×g 室温离心 15 分钟，收集 20 μl 最上层的血小板富集层。加入 80 μl 的 1× FASC standing buffer（R&D Systems，FC001）于上述收集的上清中，再加入 1 μl 的 CD41a 抗体（ThermoFisher，11-0411-82）

结合血小板，混匀后于室温避光静置 30 分钟。结合完成后，室温离心（800 g，5 min），用 200 μl PBS 重悬沉淀，并转移至酶标检测板，检测血小板含量。寡核苷酸制剂的制作和小鼠尾静脉注射 LNP 包载的寡核苷酸的方法如实施例 6 所述。

图 7 所示为不同处理组 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 Thpo 蛋白的浓度。如图 A 所示，检测给药前一天小鼠血清 Thpo 蛋白的基线浓度，4 组小鼠血清 Thpo 蛋白水平无显著差异。图 B 所示为给药后第 2 天检测小鼠血清 Thpo 的浓度。与对照组（PBS）相比， DS03-0024-3 mg/kg 组的血清 THPO 水平呈现上升趋势，但无统计学显著性。而 DS03-0024-6 mg/kg 组的 Thpo 蛋白浓度上升了 23.9%，具有极其显著的统计学意义（$P<0.0001$）。说明 LNP 包载的 *Thpo*-saRNA 可以快速高效地递送 *Thpo*-saRNA 并且显著增加小鼠血清 Thpo 蛋白的浓度。

图 8 所示为 *Thpo* saRNA 给药第 6 天后增加小鼠血小板数量。与对照组（PBS）相比，LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，1 mg/kg 和 DS03-0024，3 mg/kg）的这两组，虽不具有统计学意义但有明显的上升的趋势，尤其是 LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，3 mg/kg）组，血小板的数量增加了 88.6%。而 LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）组的血小板数量增加了 138.7%，且具统计学意义（$P<0.05$）。这说明在给药 6 天后 LNP 包载的 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）可以增加血小板的数量。

图 9 所示为 *Thpo* saRNA 给药第 17 天后增加小鼠血小板数量。给药第 17 天后检测小鼠的血小板数量，与对照组（PBS）相比，其中两组 LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，1 mg/kg 和 DS03-0024，3mg/kg）的血小板数量均有明显的上升，血小板数量分别增加了 53.8%和 53.9%，并且具有统计学意义（$P<0.05$）。而 LNP 包载 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）组的血小板数量有上升的趋势。这说明在 saRNA 导致的血小板数量增加可以持续至少 17 天。

实施例 8. 靶向人 *THPO* 基因启动子的 saRNA 的设计与合成

为了筛选能够激活人 *THPO* 基因表达的功能性 saRNA，以 *THPO* 1382 bp 的启动子序列为模板，从 TSS 上游-1382 bp 处开始选定大小为 19 bp 的靶点。然后对靶点序列进行过滤处理，保留靶点序列的标准为：1）GC 含量在 40%~65%之间；2）不含有 5 个或者多于 5 个的连续同一核苷酸；3)不含多于 3 个的二核苷酸重复序列；4）不含多于 3 个的三核苷酸重复序列。过滤后，剩余的 833 个靶点序列作为候选进入筛选过程。基于这些候选序列，化学合成相应的双链 saRNA。

其中，该实验中使用的 saRNA 的正义和反义链的长度均为 21 个核苷酸，所述 saRNA 的第一核糖核酸链（正义链）的 5’区域的 19 个核苷酸与启动子靶点序列具有 100%的同一性，其 3’末端含有 TT 序列；第二核糖核酸链的 5’区域的 19 个核苷酸与第一核糖核酸链序列互补，其 3’末端含有 TT 序列。将前述 saRNA 的两条链以同等量的摩尔数混合，退火后形成双链 saRNA。

人 THPO 启动子序列如下所示，其对应于序列表中 SEQ ID No: 600 从 5’至 3’的位置 1 至位置-1382：

-1382 gtccatcagc cgatctcccc ctgcctgggc ccacagcgcc ccccaaaccc

-1332 tcaccaccct ctctcactgc ctagcctgcc tccctacctt ctctctgagg

-1282 tcgctcctca ttcttgtgtt acccaggaca gggacctagc cagaaaccgg

-1232 cagcattccc ccttctgtgg agtgacagta tctccctctc attgtaactt

-1182 atcctcaggc gcattcgaca gtcccctctt gctttctcac ccccttcctt

-1132 cacccaaggg accctctgcc tctccagccc actcccagcc tcctttctct

-1082 tggttccctg gtcatgcctg cctccctgtc tcctgtctct ccctcccaca

-1032 cacacccact atcctcccag ctatcccagc accctccttc ctaatcttgg

-982 gagacatctc gtctggctgg acgggaaaat tccaggatct aggccacact

-932 tctcagcaga catgcccatc cttggggagg aggaacagga gagagcctga

-882 ggaagttctg ggggacaggg ggatgatggg atcaaggtca ggccaggaag

-832 cccctgagga cagagactgt ggggagactg ggactgggaa gaaagcaaag

-782 gagctagagc cagggccaaa ggaaaagggg ggccagcagg gaggtatttg

-732 cgggggaggt ccagcagctg tctttcctaa gacagggaca catgggcctg

-682 gttattcctc ttgtcacatg tggaacggta ggagatggaa gacggagaca

-632 gaacaagcaa aggagggccc tgggcacaga ggtctgtgtg tgtagccatc

-582 taagccactg gaccccagca gacgagcacc taagctcagg cttaacccag

-532 tgcacgtgtg cgcacataca tgtgccccgc acctgacagt ccactcaacc

-482 cgtccaaacc ctttccccat aacaccaacc cataacagga gatttctctc

-432 atgtgggcaa tatccgtgtt cccacttcga aaggggggaat gacaagatag

-382 gactccctag gggattacag aaagaaaagc aggaaagcaa gcatcctgtt

-332 ggatttcagc agcaggtatg atgtccaggg aaaagaaatt tggatagcca

-282 gggagtgaaa accccaccaa tcttaaacaa gacctctgtg cttcttcccc

-232 agcaacacaa atgtcctgcc agattcctcc tggaaaaaaa cttctgctcc

-182 tgtcccccte caggtcccag gttgcccatg tccaggaaaa gatggatccc

-132 cctatccaaa tcttctccgt ggtgtgtgtg ggtggaggag tggaccctgg

-82 tccaggcagg ggctccaggg aagagaaggc gtcacttccg ggggccttca

-32 ccagtgtctg gtggctccct tctctgattg gg

实施例 9. 靶向人 *THPO* 启动子的 saRNA 的高通量筛选

（1）细胞培养和转染

人肝癌细胞 HepG2（ATCC）培养在MEM培养基（Gibco）中，培养基含有10%小牛血清（Sigma-Aldrich）和1%青霉素/链霉素（Gibco）。细胞在5% CO_2，37℃条件下培养。HepG2细胞以每孔5000个铺板到96孔板中，依照制造商的说明，使用RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以25 nM浓度转染小激活RNA，转染时间为72小时，每种处理使用2个复孔。

（2）一步法RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入150 μl PBS清洗一次，弃掉PBS，每孔加入50 μl细胞裂解液，室温孵育5分钟。每孔取1 μl细胞裂解液使用一步法TB Green™ PrimeScrip™

RT-PCR 试剂盒 II (Takara,RR086A)。在ABI 7500 快速实时（Fast Real-time） PCR 系统（Applied Biosystems）进行qPCR分析，每个样本重复3个复孔扩增，PCR 反应条件见表1。

表 10 .PCR 反应制备

试剂	体积
2 × 一步法 TB Green RT-PCR 缓冲液 4	2.5 μl
PrimeScript 1 step 酶混合物 2	0.2 μl
正向和反向引物混合物（5μM）	0.4 μl
无 RNase dH_2O	1.4 μl
粗制裂解物（RNA）	0.5 μl
总计	5 μl

反应条件为阶段 1 反转录反应：42℃，5 分钟；95℃10 秒；阶段 2 PCR 反应：95℃5 秒，60℃ 20 秒，扩增 45 个循环。以 *TBP* 为内参基因。*THPO* 及 *TBP* 所用 PCR 引物见表 10，其中 *THPO* 用 *THPO* F1/R1 引物对扩增。

表11. RT-qPCR分析的引物序列

引物名称	序列号	序列 (5'-3')
THPO F	SEQ ID NO：309	TCGTGACTCCCATGTCCTTC
THPO R	SEQ ID NO：310	TGCCTTGGTCTCCTCCATCT
TBP F	SEQ ID NO：311	TGCTCACCCACCAACAATTTAG
TBP R	SEQ ID NO：312	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG
HPRT1 F	SEQ ID NO：313	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG
HPRT1 R	SEQ ID NO：314	TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC

为了计算某个 saRNA 转染样本的 *THPO* 目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用实施例 3 中的公式 2 代入目的基因及 1 个内参基因的 Ct 值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \qquad \text{(公式 2)}$$

其中，CtTm 为来自 Mock 样本的目的基因的 Ct 值，CtTs 为来自 saRNA 处理样本的目的基因的 Ct 值，CtRm 为来自 Mock 处理样本的内参基因的 Ct 值，CtRs 为来自 saRNA 处理样本的内参基因的 Ct 值。

（3）功能性 saRNA 筛选

为了获得能够激活 *THPO* 转录的 saRNA，用上述 833 个 saRNA 分别转染 HepG2 细胞，转染浓度为 25 nM，转染 72 小时后以如上所述相同的方法，裂解细胞并进行一步法 RT-qPCR 分析得到每个 saRNA 处理样本的 *THPO* 基因的相对（与对照处理组比较）表达值。如表 11 所示，有 158（19 %）个 saRNA 显示出高度激活作用，243（29.2 %）个 saRNA 显示出轻度激活作用，有 432（51.8 %）个 saRNA 对 *THPO* 的表达不产生影响。激活的最大幅度为 5.15 倍，最大抑制幅度为 0.09 倍，这些具有激活活性的 saRNA 被称为激活性 saRNA。

表12. 人*THPO* saRNA高通量筛选结果统计

saRNA 活性分类	*THPO* mRNA 改变幅度的 log_2 值(倍数）	saRNA 数量	百分比
高度激活	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤ 2.36（5.15）	158	19 %
轻度激活	≥ 0.13 (1.10）~ < 0.58 (1.50)	243	29.2 %
无激活作用	< 0.13 (1.10）	432	51.8 %
总计		833	100%

如图 10 所示，进一步显示了人 *THPO* saRNA 的 *THPO* 表达改变从最高到最低排序。其中 *THPO* 活性 saRNA 序列以及 *THPO* mRNA 表达改变，如表 13 所示。

表13. 人活性saRNA序列、其靶点序列以及其导致的*THPO* mRNA表达改变

saRNA	靶点序列 (5'-3')	saRNA 正义序列 (5'-3')	saRNA 反义序列 (5'-3')	*THPO* mRNA 相对表达改变倍数
RAG3A-889	AGCCTGAGGAAGTTCTGGG (SEQ ID NO：606)	AGCCUGAGGAAGUUCUGGGTT (SEQ ID NO：1048)	CCCAGAACUUCCUCAGGCUTT (SEQ ID NO：1490)	5.1
RAG3A-723	TCCAGCAGCTGTCTTTCCT (SEQ ID NO：607)	UCCAGCAGCUGUCUUUCCUTT (SEQ ID NO：1049)	AGGAAAGACAGCUGCUGGATT (SEQ ID NO：1491)	4.1
RAG3A-1069	ATGCCTGCCTCCCTGTCTC (SEQ ID NO：608)	AUGCCUGCCUCCCUGUCUCTT (SEQ ID NO：1050)	GAGACAGGGAGGCAGGCAUTT (SEQ ID NO：1492)	4
RAG3A-541	TTAACCCAGTGCACGTGTG (SEQ ID NO：609)	UUAACCCAGUGCACGUGUGTT (SEQ ID NO：1051)	CACACGUGCACUGGGUUAATT (SEQ ID NO：1493)	3.4
RAG3A-480	TCCAAACCCTTTCCCCATA (SEQ ID NO：610)	UCCAAACCCUUUCCCCAUATT (SEQ ID NO：1052)	UAUGGGGAAAGGGUUUGGATT (SEQ ID NO：1494)	3.1
RAG3A-980	GACATCTCGTCTGGCTGGA (SEQ ID NO：611)	GACAUCUCGUCUGGCUGGATT (SEQ ID NO：1053)	UCCAGCCAGACGAGAUGUCTT (SEQ ID NO：1495)	3.1
RAG3A-462	AACACCAACCCATAACAGG (SEQ ID NO：612)	AACACCAACCCAUAACAGGTT (SEQ ID NO：1054)	CCUGUUAUGGGUUGGUGUUTT (SEQ ID NO：1496)	3
RAG3A-787	CAAAGGAGCTAGAGCCAGG (SEQ ID NO：613)	CAAAGGAGCUAGAGCCAGGTT (SEQ ID NO：1055)	CCUGGCUCUAGCUCCUUUGTT (SEQ ID NO：1497)	2.9
RAG3A-232	AGCAACACAAATGTCCTGC (SEQ ID NO：614)	AGCAACACAAAUGUCCUGCTT (SEQ ID NO：1056)	GCAGGACAUUUGUGUUGCUTT (SEQ ID NO：1498)	2.9
RAG3A-727	GAGGTCCAGCAGCTGTCTT (SEQ ID NO：615)	GAGGUCCAGCAGCUGUCUUTT (SEQ ID NO：1057)	AAGACAGCUGCUGGACCUCTT (SEQ ID NO：1499)	2.9
RAG3A-542	CTTAACCCAGTGCACGTGT (SEQ ID NO：616)	CUUAACCCAGUGCACGUGUTT (SEQ ID NO：1058)	ACACGUGCACUGGGUUAAGTT (SEQ ID NO：1500)	2.8
RAG3A-748	AGCAGGGAGGTATTTGCGG (SEQ ID NO：617)	AGCAGGGAGGUAUUUGCGGTT (SEQ ID NO：1059)	CCGCAAAUACCUCCCUGCUTT (SEQ ID NO：1501)	2.8
RAG3A-540	TAACCCAGTGCACGTGTGC (SEQ ID NO：618)	UAACCCAGUGCACGUGUGCTT (SEQ ID NO：1060)	GCACACGUGCACUGGGUUATT (SEQ ID NO：1502)	2.8

RAG3A-1219	TCTGTGGAGTGACAGTATC (SEQ ID NO : 619)	UCUGUGGAGUGACAGUAUCTT (SEQ ID NO : 1061)	GAUACUGUCACUCCACAGATT (SEQ ID NO : 1503)	2.8
RAG3A-487	CAACCCGTCCAAACCCTTT (SEQ ID NO : 620)	CAACCCGUCCAAACCCUUUTT (SEQ ID NO : 1062)	AAAGGGUUUGGACGGGUUGTT (SEQ ID NO : 1504)	2.7
RAG3A-559	GAGCACCTAAGCTCAGGCT (SEQ ID NO : 621)	GAGCACCUAAGCUCAGGCUTT (SEQ ID NO : 1063)	AGCCUGAGCUUAGGUGCUCTT (SEQ ID NO : 1505)	2.7
RAG3A-1308	CCTGCCTCCCTACCTTCTC (SEQ ID NO : 622)	CCUGCCUCCCUACCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1064)	GAGAAGGUAGGGAGGCAGGTT (SEQ ID NO : 1506)	2.7
RAG3A-24	TGGTGGCTCCCTTCTCTGA (SEQ ID NO : 623)	UGGUGGCUCCCUUCUCUGATT (SEQ ID NO : 1065)	UCAGAGAAGGGAGCCACCATT (SEQ ID NO : 1507)	2.6
RAG3A-1169	TTCGACAGTCCCCCTCTTGC (SEQ ID NO : 624)	UUCGACAGUCCCCCUCUUGCTT (SEQ ID NO : 1066)	GCAAGAGGGGACUGUCGAATT (SEQ ID NO : 1508)	2.6
RAG3A-1256	GACAGGGACCTAGCCAGAA (SEQ ID NO : 625)	GACAGGGACCUAGCCAGAATT (SEQ ID NO : 1067)	UUCUGGCUAGGUCCCUGUCTT (SEQ ID NO : 1509)	2.6
RAG3A-522	CGCACATACATGTGCCCCG (SEQ ID NO : 626)	CGCACAUACAUGUGCCCCGTT (SEQ ID NO : 1068)	CGGGGCACAUGUAUGUGCGTT (SEQ ID NO : 1510)	2.6
RAG3A-851	TCAAGGTCAGGCCAGGAAG (SEQ ID NO : 627)	UCAAGGUCAGGCCAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1069)	CUUCCUGGCCUGACCUUGATT (SEQ ID NO : 1511)	2.6
RAG3A-1096	AGCCTCCTTTCTCTTGGTT (SEQ ID NO : 628)	AGCCUCCUUUCUCUUGGUUTT (SEQ ID NO : 1070)	AACCAAGAGAAAGGAGGCUTT (SEQ ID NO : 1512)	2.5
RAG3A-227	CACAAATGTCCTGCCAGAT (SEQ ID NO : 629)	CACAAAUGUCCUGCCAGAUTT (SEQ ID NO : 1071)	AUCUGGCAGGACAUUUGUGTT (SEQ ID NO : 1513)	2.5
RAG3A-1178	TCAGGCGCATTCGACAGTC (SEQ ID NO : 630)	UCAGGCGCAUUCGACAGUCTT (SEQ ID NO : 1072)	GACUGUCGAAUGCGCCUGATT (SEQ ID NO : 1514)	2.5
RAG3A-544	GGCTTAACCCAGTGCACGT (SEQ ID NO : 631)	GGCUUAACCCAGUGCACGUTT (SEQ ID NO : 1073)	ACGUGCACUGGGUUAAGCCTT (SEQ ID NO : 1515)	2.5
RAG3A-836	GAAGCCCCTGAGGACAGAG (SEQ ID NO : 632)	GAAGCCCCUGAGGACAGAGTT (SEQ ID NO : 1074)	CUCUGUCCUCAGGGGCUUCTT (SEQ ID NO : 1516)	2.4
RAG3A-569	CCCAGCAGACGAGCACCTA (SEQ ID NO : 633)	CCCAGCAGACGAGCACCUATT (SEQ ID NO : 1075)	UAGGUGCUCGUCUGCUGGGTT (SEQ ID NO : 1517)	2.4

RAG3A-1320	CTCACTGCCTAGCCTGCCT (SEQ ID NO : 634)	CUCACUGCCUAGCCUGCCUTT (SEQ ID NO : 1076)	AGGCAGGCUAGGCAGUGAGTT (SEQ ID NO : 1518)	2.4
RAG3A-1319	TCACTGCCTAGCCTGCCTC (SEQ ID NO : 635)	UCACUGCCUAGCCUGCCUCTT (SEQ ID NO : 1077)	GAGGCAGGCUAGGCAGUGATT (SEQ ID NO : 1519)	2.3
RAG3A-290	GATAGCCAGGGAGTGAAAA (SEQ ID NO : 636)	GAUAGCCAGGGAGUGAAAATT (SEQ ID NO : 1078)	UUUUCACUCCCUGGCUAUCTT (SEQ ID NO : 1520)	2.3
RAG3A-1074	TGGTCATGCCTGCCTCCCT (SEQ ID NO : 637)	UGGUCAUGCCUGCCUCCCUTT (SEQ ID NO : 1079)	AGGGAGGCAGGCAUGACCATT (SEQ ID NO : 1521)	2.2
RAG3A-279	AGTGAAAACCCCACCAATC (SEQ ID NO : 638)	AGUGAAAACCCCACCAAUCTT (SEQ ID NO : 1080)	GAUUGGUGGGGUUUUCACUTT (SEQ ID NO : 1522)	2.2
RAG3A-521	GCACATACATGTGCCCCGC (SEQ ID NO : 639)	GCACAUACAUGUGCCCCGCTT (SEQ ID NO : 1081)	GCGGGGCACAUGUAUGUGCTT (SEQ ID NO : 1523)	2.2
RAG3A-25	CTGGTGGCTCCCTTCTCTG (SEQ ID NO : 640)	CUGGUGGCUCCCUUCUCUGTT (SEQ ID NO : 1082)	CAGAGAAGGGAGCCACCAGTT (SEQ ID NO : 1524)	2.1
RAG3A-62	AAGAGAAGGCGTCACTTCC (SEQ ID NO : 641)	AAGAGAAGGCGUCACUUCCTT (SEQ ID NO : 1083)	GGAAGUGACGCCUUCUCUUTT (SEQ ID NO : 1525)	2.1
RAG3A-852	ATCAAGGTCAGGCCAGGAA (SEQ ID NO : 642)	AUCAAGGUCAGGCCAGGAATT (SEQ ID NO : 1084)	UUCCUGGCCUGACCUUGAUTT (SEQ ID NO : 1526)	2.1
RAG3A-931	CTCAGCAGACATGCCCATC (SEQ ID NO : 643)	CUCAGCAGACAUGCCCAUCTT (SEQ ID NO : 1085)	GAUGGGCAUGUCUGCUGAGTT (SEQ ID NO : 1527)	2.1
RAG3A-892	GAGAGCCTGAGGAAGTTCT (SEQ ID NO : 644)	GAGAGCCUGAGGAAGUUCUTT (SEQ ID NO : 1086)	AGAACUUCCUCAGGCUCUCTT (SEQ ID NO : 1528)	2
RAG3A-235	CCCAGCAACACACAAATGTCC (SEQ ID NO : 645)	CCCAGCAACACACAAAUGUCCTT (SEQ ID NO : 1087)	GGACAUUUGUGUUGCUGGGTT (SEQ ID NO : 1529)	2
RAG3A-1246	TAGCCAGAAACCGGCAGCA (SEQ ID NO : 646)	UAGCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO : 1088)	UGCUGCCGGUUUCUGGCUATT (SEQ ID NO : 1530)	2
RAG3A-19	GCTCCCTTCTCTGATTGGG (SEQ ID NO : 647)	GCUCCCUUCUCUGAUUGGGTT (SEQ ID NO : 1089)	CCCAAUCAGAGAAGGGAGCTT (SEQ ID NO : 1531)	2
RAG3A-1322	CTCTCACTGCCTAGCCTGC (SEQ ID NO : 648)	CUCUCACUGCCUAGCCUGCTT (SEQ ID NO : 1090)	GCAGGCUAGGCAGUGAGAGTT (SEQ ID NO : 1532)	2

RAG3A-795	GAAGAAAGCAAAGGAGCTA (SEQ ID NO : 649)	GAAGAAAGCAAAGGAGCUATT (SEQ ID NO : 1091)	UAGCUCCUUUGCUUUCUUCTT (SEQ ID NO : 1533)	2
RAG3A-515	ACATGTGCCCCCGCACCTGA (SEQ ID NO : 650)	ACAUGUGCCCCCGCACCUGATT (SEQ ID NO : 1092)	UCAGGUGCGGGGGCACAUGUTT (SEQ ID NO : 1534)	2
RAG3A-128	TCCAAAATCTTCTCCGTGGT (SEQ ID NO : 651)	UCCAAAUCUUCUCCGUGGUTT (SEQ ID NO : 1093)	ACCACGGAGAAGAUUUGGATT (SEQ ID NO : 1535)	2
RAG3A-661	GGAACGGTAGGAGATGGAA (SEQ ID NO : 652)	GGAACGGUAGGAGAUGGAATT (SEQ ID NO : 1094)	UUCCAUCUCCUACCGUUCCTT (SEQ ID NO : 1536)	2
RAG3A-125	AAATCTTCTCCGTGGTGTG (SEQ ID NO : 653)	AAAUCUUCUCCGUGGUGUGTT (SEQ ID NO : 1095)	CACACCACGGAGAAGAUUUTT (SEQ ID NO : 1537)	2
RAG3A-1241	AGAAACCGGCAGCATTCCC (SEQ ID NO : 654)	AGAAACCGGCAGCAUUCCCTT (SEQ ID NO : 1096)	GGGAAUGCUGCCGGUUUCUTT (SEQ ID NO : 1538)	2
RAG3A-463	TAACACCAACCCATAACAG (SEQ ID NO : 655)	UAACACCAACCCAUAACAGTT (SEQ ID NO : 1097)	CUGUUAUGGGUUGGUGUUATT (SEQ ID NO : 1539)	2
RAG3A-434	TCATGTGGGCAATATCCGT (SEQ ID NO : 656)	UCAUGUGGGCAAUAUCCGUTT (SEQ ID NO : 1098)	ACGGAUAUUGCCCACAUGATT (SEQ ID NO : 1540)	1.9
RAG3A-520	CACATACATGTGCCCCGCA (SEQ ID NO : 657)	CACAUACAUGUGCCCCGCATT (SEQ ID NO : 1099)	UGCGGGGCACAUGUAUGUGTT (SEQ ID NO : 1541)	1.9
RAG3A-499	TGACAGTCCACTCAACCCG (SEQ ID NO : 658)	UGACAGUCCACUCAACCCGTT (SEQ ID NO : 1100)	CGGGUUGAGUGGACUGUCATT (SEQ ID NO : 1542)	1.9
RAG3A-668	CACATGTGGAACGGTAGGA (SEQ ID NO : 659)	CACAUGUGGAACGGUAGGATT (SEQ ID NO : 1101)	UCCUACCGUUCCACAUGUGTT (SEQ ID NO : 1543)	1.9
RAG3A-591	GTAGCCATCTAAGCCACTG (SEQ ID NO : 660)	GUAGCCAUCUAAGCCACUGTT (SEQ ID NO : 1102)	CAGUGGCUUAGAUGGCUACTT (SEQ ID NO : 1544)	1.9
RAG3A-1209	GACAGTATCTCCCTCTCAT (SEQ ID NO : 661)	GACAGUAUCUCCCUCUCAUTT (SEQ ID NO : 1103)	AUGAGAGGGAGAUACUGUCTT (SEQ ID NO : 1545)	1.9
RAG3A-1257	GGACAGGGACCTAGCCAGA (SEQ ID NO : 662)	GGACAGGGACCUAGCCAGATT (SEQ ID NO : 1104)	UCUGGCUAGGUCCCUGUCCTT (SEQ ID NO : 1546)	1.9
RAG3A-1170	ATTCGACAGTCCCCCTCTTG (SEQ ID NO : 663)	AUUCGACAGUCCCCCUCUUGTT (SEQ ID NO : 1105)	CAAGAGGGGGACUGUCGAAUTT (SEQ ID NO : 1547)	1.9

RAG3A-39	GCCTTCACCAGTGTCTGGT (SEQ ID NO : 664)	GCCUUCACCAGUGUCUGGUTT (SEQ ID NO : 1106)	ACCAGACACUGGUGAAGGCTT (SEQ ID NO : 1548)	1.9
RAG3A-431	TGTGGGGCAATATCCGTGTT (SEQ ID NO : 665)	UGUGGGGCAAUAUCCGUGUUTT+B50 (SEQ ID NO : 1107)	AACACGGAUAUUGCCCACATT (SEQ ID NO : 1549)	1.9
RAG3A-1080	GTTCCCTGGTCATGCCTGC (SEQ ID NO : 666)	GUUCCCUGGUCAUGCCUGCTT (SEQ ID NO : 1108)	GCAGGCAUGACCAGGGAACTT (SEQ ID NO : 1550)	1.9
RAG3A-1266	TGTTACCCAGGACAGGGAC (SEQ ID NO : 667)	UGUUACCCAGGACAGGGACTT (SEQ ID NO : 1109)	GUCCCUGUCCUGGGUAACATT (SEQ ID NO : 1551)	1.9
RAG3A-1202	TCTCCCTCTCATTGTAACT (SEQ ID NO : 668)	UCUCCCUCUCAUUGUAACUTT (SEQ ID NO : 1110)	AGUUACAAUGAGAGGGAGATT (SEQ ID NO : 1552)	1.9
RAG3A-979	ACATCTCGTCTGGCTGGAC (SEQ ID NO : 669)	ACAUCUCGUCUGGCUGGACTT (SEQ ID NO : 1111)	GUCCAGCCAGACGAGAUGUTT (SEQ ID NO : 1553)	1.9
RAG3A-343	AGCATCCTGTTGGATTTCA (SEQ ID NO : 670)	AGCAUCCUGUUGGAUUUCATT (SEQ ID NO : 1112)	UGAAAUCCAACAGGAUGCUTT (SEQ ID NO : 1554)	1.9
RAG3A-430	GTGGGCAATATCCGTGTTC (SEQ ID NO : 671)	GUGGGCAAUAUCCGUGUUCTT (SEQ ID NO : 1113)	GAACACGGAUAUUGCCCACTT (SEQ ID NO : 1555)	1.9
RAG3A-319	AGGTATGATGTCCAGGGAA (SEQ ID NO : 672)	AGGUAUGAUGUCCAGGGAATT (SEQ ID NO : 1114)	UUCCCUGGACAUCAUACCUTT (SEQ ID NO : 1556)	1.8
RAG3A-612	TGGGCACAGAGGTCTGTGT (SEQ ID NO : 673)	UGGGCACAGAGGUCUGUGUTT (SEQ ID NO : 1115)	ACACAGACCUCUGUGCCCATT (SEQ ID NO : 1557)	1.8
RAG3A-454	CCCATAACAGGAGATTTCT (SEQ ID NO : 674)	CCCAUAACAGGAGAUUUCUTT (SEQ ID NO : 1116)	AGAAAUCUCCUGUUAUGGGTT (SEQ ID NO : 1558)	1.8
RAG3A-1312	CTAGCCTGCCTCCCTACCT (SEQ ID NO : 675)	CUAGCCUGCCUCCCUACCUTT (SEQ ID NO : 1117)	AGGUAGGGAGGCAGGCUAGTT (SEQ ID NO : 1559)	1.8
RAG3A-342	GCATCCTGTTGGATTTCAG (SEQ ID NO : 676)	GCAUCCUGUUGGAUUUCAGTT (SEQ ID NO : 1118)	CUGAAAUCCAACAGGAUGCTT (SEQ ID NO : 1560)	1.8
RAG3A-1118	TCTGCCTCTCCAGCCCACT (SEQ ID NO : 677)	UCUGCCUCUCCAGCCCACUTT (SEQ ID NO : 1119)	AGUGGGCUGGAGAGGCAGATT (SEQ ID NO : 1561)	1.8
RAG3A-970	CTGGCTGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO : 678)	CUGGCUGGGACGGGAAAAUUTT (SEQ ID NO : 1120)	AAUUUUCCCGUCCAGCCAGTT (SEQ ID NO : 1562)	1.8

RAG3A-1133	TCACCCAAGGGACCCTCTG (SEQ ID NO : 679)	UCACCCAAGGGACCCUCUGTT (SEQ ID NO : 1121)	CAGAGGGUCCCUUGGGUGATT (SEQ ID NO : 1563)	1.8
RAG3A-689	GGGCCTGGTTATTCCTCTT (SEQ ID NO : 680)	GGGCCUGGUUAUUCCUCUUTT (SEQ ID NO : 1122)	AAGAGGAAUAACCAGGCCCTT (SEQ ID NO : 1564)	1.8
RAG3A-1321	TCTCACTGCCTAGCCTGCC (SEQ ID NO : 681)	UCUCACUGCCUAGCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1123)	GGCAGGCUAGGCAGUGAGATT (SEQ ID NO : 1565)	1.8
RAG3A-662	TGGAACGGTAGGAGATGGA (SEQ ID NO : 682)	UGGAACGGUAGGAGAUGGATT (SEQ ID NO : 1124)	UCCAUCUCCUACCGUUCCATT (SEQ ID NO : 1566)	1.8
RAG3A-817	ACTGTGGGGAGACTGGGAC (SEQ ID NO : 683)	ACUGUGGGGAGACUGGGACTT (SEQ ID NO : 1125)	GUCCCAGUCUCCCCACAGUTT (SEQ ID NO : 1567)	1.8
RAG3A-1242	CAGAAACCGGCAGCATTCC (SEQ ID NO : 684)	CAGAAACCGGCAGCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1126)	GGAAUGCUGCCGGUUUCUGTT (SEQ ID NO : 1568)	1.8
RAG3A-278	GTGAAAACCCCACCAATCT (SEQ ID NO : 685)	GUGAAAACCCCACCAAUCUTT (SEQ ID NO : 1127)	AGAUUGGUGGGGUUUUCACTT (SEQ ID NO : 1569)	1.8
RAG3A-1210	TGACAGTATCTCCCTCTCA (SEQ ID NO : 686)	UGACAGUAUCUCCCUCUCATT (SEQ ID NO : 1128)	UGAGAGGGAGAUACUGUCATT (SEQ ID NO : 1570)	1.8
RAG3A-1084	CTTGGTTCCCTGGTCATGC (SEQ ID NO : 687)	CUUGGUUCCCUGGUCAUGCTT (SEQ ID NO : 1129)	GCAUGACCAGGGAACCAAGTT (SEQ ID NO : 1571)	1.8
RAG3A-1166	GACAGTCCCCTCTTGCTTT (SEQ ID NO : 688)	GACAGUCCCCUCUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1130)	AAAGCAAGAGGGGACUGUCTT (SEQ ID NO : 1572)	1.8
RAG3A-982	GAGACATCTCGTCTGGCTG (SEQ ID NO : 689)	GAGACAUCUCGUCUGGCUGTT (SEQ ID NO : 1131)	CAGCCAGACGAGAUGUCUCTT (SEQ ID NO : 1573)	1.8
RAG3A-171	AGGTCCCAGGTTGCCCATG (SEQ ID NO : 690)	AGGUCCCAGGUUGCCCAUGTT (SEQ ID NO : 1132)	CAUGGGCAACCUGGGACCUTT (SEQ ID NO : 1574)	1.8
RAG3A-256	ACAAGACCTCTGTGCTTCT (SEQ ID NO : 691)	ACAAGACCUCUGUGCUUCUTT (SEQ ID NO : 1133)	AGAAGCACAGAGGUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1575)	1.7
RAG3A-563	AGACGAGCACCTAAGCTCA (SEQ ID NO : 692)	AGACGAGCACCUAAGCUCATT (SEQ ID NO : 1134)	UGAGCUUAGGUGCUCGUCUTT (SEQ ID NO : 1576)	1.7
RAG3A-1176	AGGCGCATTCGACAGTCCC (SEQ ID NO : 693)	AGGCGCAUUCGACAGUCCCTT (SEQ ID NO : 1135)	GGGACUGUCGAAUGCGCCUTT (SEQ ID NO : 1577)	1.7

RAG3A-707	CCTAAGACAGGGACACATG (SEQ ID NO : 694)	CCUAAGACAGGGACACAUGTT (SEQ ID NO : 1136)	CAUGUGUCCCUGUCUUAGGTT (SEQ ID NO : 1578)	1.7
RAG3A-561	ACGAGCACCTAAGCTCAGG (SEQ ID NO : 695)	ACGAGCACCUAAGCUCAGGTT (SEQ ID NO : 1137)	CCUGAGCUUAGGUGCUCGUTT (SEQ ID NO : 1579)	1.7
RAG3A-504	GCACCTGACAGTCCACTCA (SEQ ID NO : 696)	GCACCUGACAGUCCACUCATT (SEQ ID NO : 1138)	UGAGUGGGACUGUCAGGUGCTT (SEQ ID NO : 1580)	1.7
RAG3A-195	AAACTTCTGCTCCTGTCCC (SEQ ID NO : 697)	AAACUUCUGCUCCUGUCCCTT (SEQ ID NO : 1139)	GGGACAGGAGCAGAAGUUUTT (SEQ ID NO : 1581)	1.7
RAG3A-850	CAAGGTCAGGCCAGGAAGC (SEQ ID NO : 698)	CAAGGUCAGGCCAGGAAGCTT (SEQ ID NO : 1140)	GCUUCCUGGCCUGACCUUGTT (SEQ ID NO : 1582)	1.7
RAG3A-388	AGATAGGACTCCCTAGGGG (SEQ ID NO : 699)	AGAUAGGACUCCCUAGGGGTT (SEQ ID NO : 1141)	CCCCUAGGGAGUCCUAUCUTT (SEQ ID NO : 1583)	1.7
RAG3A-1079	TTCCCTGGTCATGCCTGCC (SEQ ID NO : 700)	UUCCCUGGUCAUGCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1142)	GGCAGGCAUGACCAGGGAATT (SEQ ID NO : 1584)	1.7
RAG3A-1263	TACCCAGGACAGGGACCTA (SEQ ID NO : 701)	UACCCAGGACAGGGACCUATT (SEQ ID NO : 1143)	UAGGUCCCUGUCCUGGGUATT (SEQ ID NO : 1585)	1.7
RAG3A-531	GCACGTGTGCGCACATACA (SEQ ID NO : 702)	GCACGUGUGCGCACAUACATT (SEQ ID NO : 1144)	UGUAUGUGCGCACACGUGCTT (SEQ ID NO : 1586)	1.7
RAG3A-254	AAGACCTCTGTGCTTCTTC (SEQ ID NO : 703)	AAGACCUCUGUGCUUCUUCTT (SEQ ID NO : 1145)	GAAGAAGCACAGAGGUCUUTT (SEQ ID NO : 1587)	1.7
RAG3A-421	ATCCGTGTTCCCACTTCGA (SEQ ID NO : 704)	AUCCGUGUUCCCACUUCGATT (SEQ ID NO : 1146)	UCGAAGUGGGAACACGGAUTT (SEQ ID NO : 1588)	1.7
RAG3A-473	CCTTTCCCCATAACACCAA (SEQ ID NO : 705)	CCUUUCCCCAUAACACCAATT (SEQ ID NO : 1147)	UUGGUGUUAUGGGGAAAGGTT (SEQ ID NO : 1589)	1.7
RAG3A-292	TGGATAGCCAGGGAGTGAA (SEQ ID NO : 706)	UGGAUAGCCAGGGAGUGAATT (SEQ ID NO : 1148)	UUCACUCCCUGGCUAUCCATT (SEQ ID NO : 1590)	1.7
RAG3A-283	AGGGAGTGAAAACCCCACC (SEQ ID NO : 707)	AGGGAGUGAAAACCCCACCTT (SEQ ID NO : 1149)	GGUGGGGUUUUCACUCCCUTT (SEQ ID NO : 1591)	1.7
RAG3A-786	AAAGGAGCTAGAGCCAGGG (SEQ ID NO : 708)	AAAGGAGCUAGAGCCAGGGTT (SEQ ID NO : 1150)	CCCUGGCUCUAGCUCCUUUTT (SEQ ID NO : 1592)	1.7

RAG3A-582	TAAGCCACTGGACCCCAGC (SEQ ID NO : 709)	UAAGCCACUGGACCCCAGCTT (SEQ ID NO : 1151)	GCUGGGGUCCAGUGGCUUATT (SEQ ID NO : 1593)	1.7
RAG3A-933	TTCTCAGCAGACATGCCCA (SEQ ID NO : 710)	UUCUCAGCAGACAUGCCCATT (SEQ ID NO : 1152)	UGGGCAUGUCUGCUGAGAATT (SEQ ID NO : 1594)	1.7
RAG3A-472	CTTTCCCCATAACACCAAC (SEQ ID NO : 711)	CUUUCCCCAUAACACCAACTT (SEQ ID NO : 1153)	GUUGGUGUUAUGGGGAAAGTT (SEQ ID NO : 1595)	1.7
RAG3A-646	GGAAGACGGAGACAGAACA (SEQ ID NO : 712)	GGAAGACGGAGACAGAACATT (SEQ ID NO : 1154)	UGUUCUGUCUCCGUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1596)	1.6
RAG3A-389	AAGATAGGACTCCCTAGGG (SEQ ID NO : 713)	AAGAUAGGACUCCCUAGGGTT (SEQ ID NO : 1155)	CCCUAGGGAGUCCUAUCUUTT (SEQ ID NO : 1597)	1.6
RAG3A-971	TCTGGCTGGACGGGGAAAAT (SEQ ID NO : 714)	UCUGGCUGGACGGGAAAAUTT (SEQ ID NO : 1156)	AUUUUCCCGUCCAGCCAGATT (SEQ ID NO : 1598)	1.6
RAG3A-751	GCCAGCAGGGAGGTATTTG (SEQ ID NO : 715)	GCCAGCAGGGAGGUAUUUGTT (SEQ ID NO : 1157)	CAAAUACCUCCCUGCUGGCTT (SEQ ID NO : 1599)	1.6
RAG3A-299	AGAAATTTGGATAGCCAGG (SEQ ID NO : 716)	AGAAAUUUGGAUAGCCAGGTT (SEQ ID NO : 1158)	CCUGGCUAUCCAAAUUUCUTT (SEQ ID NO : 1600)	1.6
RAG3A-750	CCAGCAGGGAGGTATTTGC (SEQ ID NO : 717)	CCAGCAGGGAGGUAUUUGCTT (SEQ ID NO : 1159)	GCAAAUACCUCCCUGCUGGTT (SEQ ID NO : 1601)	1.6
RAG3A-671	TGTCACATGTGGAACGGTA (SEQ ID NO : 718)	UGUCACAUGUGGAACGGUATT (SEQ ID NO : 1160)	UACCGUUCCACACAUGUGACATT (SEQ ID NO : 1602)	1.6
RAG3A-749	CAGCAGGGAGGTATTTGCG (SEQ ID NO : 719)	CAGCAGGGAGGUAUUUGCGTT (SEQ ID NO : 1161)	CGCAAAUACCUCCCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1603)	1.6
RAG3A-547	TCAGGCTTAACCCAGTGCA (SEQ ID NO : 720)	UCAGGCUUAACCCAGUGCATT (SEQ ID NO : 1162)	UGCACUGGGUUAAGCCUGATT (SEQ ID NO : 1604)	1.6
RAG3A-655	GTAGGAGATGGAAGACGGA (SEQ ID NO : 721)	GUAGGAGAUGGAAGACGGATT (SEQ ID NO : 1163)	UCCGUCUUCCAUCUCCUACTT (SEQ ID NO : 1605)	1.6
RAG3A-170	GGTCCCAGGTTGCCCATGT (SEQ ID NO : 722)	GGUCCCAGGUUGCCCAUGUTT (SEQ ID NO : 1164)	ACAUGGGCAACCUGGGACCTT (SEQ ID NO : 1606)	1.6
RAG3A-629	CAAGCAAAGGAGGGCCCTG (SEQ ID NO : 723)	CAAGCAAAGGAGGGCCCUGTT (SEQ ID NO : 1165)	CAGGGCCCUCCUUUGCUUGTT (SEQ ID NO : 1607)	1.6

RAG3A-253	AGACCTCTGTGCTTCTTCC (SEQ ID NO : 724)	AGACCUCUGUGCUUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1166)	GGAAGAAGCACAGAGGUCUTT (SEQ ID NO : 1608)	1.6
RAG3A-695	ACACATGGGCCTGGTTATT (SEQ ID NO : 725)	ACACAUGGGCCUGGUUAUUTT (SEQ ID NO : 1167)	AAUAACCAGGCCCAUGUGTT (SEQ ID NO : 1609)	1.6
RAG3A-788	GCAAAGGAGCTAGAGCCAG (SEQ ID NO : 726)	GCAAAGGAGCUAGAGCCAGTT (SEQ ID NO : 1168)	CUGGCUCUAGCUCCUUUGCTT (SEQ ID NO : 1610)	1.6
RAG3A-688	GGCCTGGTTATTCCTCTTG (SEQ ID NO : 727)	GGCCUGGUUAUUCCUCUUGTT (SEQ ID NO : 1169)	CAAGAGGAAUAACCAGGCCTT (SEQ ID NO : 1611)	1.6
RAG3A-728	GGAGGTCCAGCAGCTGTCT (SEQ ID NO : 728)	GGAGGUCCAGCAGCUGUCUTT (SEQ ID NO : 1170)	AGACAGCUGCUGGACCUCCTT (SEQ ID NO : 1612)	1.6
RAG3A-519	ACATACATGTGCCCCGCAC (SEQ ID NO : 729)	ACAUACAUGUGCCCCGCACTT (SEQ ID NO : 1171)	GUGCGGGGCACAUGUAUGUTT (SEQ ID NO : 1613)	1.6
RAG3A-272	ACCCCACCAATCTTAAACA (SEQ ID NO : 730)	ACCCCACCAAUCUUAAACATT (SEQ ID NO : 1172)	UGUUUAAGAUUGGUGGGGUTT (SEQ ID NO : 1614)	1.6
RAG3A-318	GGTATGATGTCCAGGGAAA (SEQ ID NO : 731)	GGUAUGAUGUCCAGGGAAATT (SEQ ID NO : 1173)	UUUCCCUGGACAUCAUACCTT (SEQ ID NO : 1615)	1.6
RAG3A-1338	AAACCCTCACCACCCTCTC (SEQ ID NO : 732)	AAACCCUCACCACCCUCUCTT (SEQ ID NO : 1174)	GAGAGGGUGGGUGAGGGGUUUTT (SEQ ID NO : 1616)	1.6
RAG3A-539	AACCCAGTGCACGTGTGCG (SEQ ID NO : 733)	AACCCAGUGCACGUGUGCGTT (SEQ ID NO : 1175)	CGCACACGUGCACUGGGUUTT (SEQ ID NO : 1617)	1.6
RAG3A-826	AGGACAGAGACTGTGGGGA (SEQ ID NO : 734)	AGGACAGAGACUGUGGGGATT (SEQ ID NO : 1176)	UCCCCACAGUCUCUGUCCUTT (SEQ ID NO : 1618)	1.6
RAG3A-337	CTGTTGGATTTCAGCAGCA (SEQ ID NO : 735)	CUGUUGGAUUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO : 1177)	UGCUGCUGAAAUCCAACAGTT (SEQ ID NO : 1619)	1.6
RAG3A-273	AACCCCACCAATCTTAAAC (SEQ ID NO : 736)	AACCCCACCAAUCUUAAACTT (SEQ ID NO : 1178)	GUUUAAGAUUGGUGGGGUUTT (SEQ ID NO : 1620)	1.6
RAG3A-478	CAAACCCTTTCCCCATAAC (SEQ ID NO : 737)	CAAACCCUUUCCCCAUAACTT (SEQ ID NO : 1179)	GUUAUGGGGAAAGGGUUUGTT (SEQ ID NO : 1621)	1.6
RAG3A-963	GACGGGAAAATTCCAGGAT (SEQ ID NO : 738)	GACGGGAAAAUUCCAGGAUTT (SEQ ID NO : 1180)	AUCCUGGAAUUUUCCCGUCTT (SEQ ID NO : 1622)	1.6

RAG3A-248	TCTGTGCTTCTTCCCCAGC (SEQ ID NO : 739)	UCUGUGCUUCUUCCCCAGCTT (SEQ ID NO : 1181)	GCUGGGGAAGAAGCACAGATT (SEQ ID NO : 1623)	1.6
RAG3A-35	TCACCAGTGTCTGGTGGCT (SEQ ID NO : 740)	UCACCAGUGUCUGGUGGCUTT (SEQ ID NO : 1182)	AGCCACCAGACACUGGUGATT (SEQ ID NO : 1624)	1.5
RAG3A-613	CTGGGCACAGAGGTCTGTG (SEQ ID NO : 741)	CUGGGCACAGAGGUCUGUGTT (SEQ ID NO : 1183)	CACAGACCUCUGUGCCCAGTT (SEQ ID NO : 1625)	1.5
RAG3A-1141	CCCTTCCTTCACCCAAGGG (SEQ ID NO : 742)	CCCUUCCUUCACCCAAGGGTT (SEQ ID NO : 1184)	CCCUUGGGUGAAGGAAGGGTT (SEQ ID NO : 1626)	1.5
RAG3A-477	AAACCCTTTCCCCATAACA (SEQ ID NO : 743)	AAACCCUUUCCCCAUAACATT (SEQ ID NO : 1185)	UGUUAUGGGGAAAGGGUUUTT (SEQ ID NO : 1627)	1.5
RAG3A-634	CAGAACAAGCAAAGGAGGGTT (SEQ ID NO : 744)	CAGAACAAGCAAAGGAGGGTT (SEQ ID NO : 1186)	CCCUCCUUUGCUUGUUCUGTT (SEQ ID NO : 1628)	1.5
RAG3A-1280	GCTCCTCATTCTTGTGTTA (SEQ ID NO : 745)	GCUCCUCAUUCUUGUGUUATT (SEQ ID NO : 1187)	UAACACAAGAAUGAGGAGCTT (SEQ ID NO : 1629)	1.5
RAG3A-1062	CCTCCCTGTCTCCTGTCTC (SEQ ID NO : 746)	CCUCCCUGUCUCCUGUCUCTT (SEQ ID NO : 1188)	GAGACAGGAGACAGGGAGGGTT (SEQ ID NO : 1630)	1.5
RAG3A-778	TAGAGCCAGGGCCAAAGGA (SEQ ID NO : 747)	UAGAGCCAGGGCCAAAGGATT (SEQ ID NO : 1189)	UCCUUUGGCCCUGGCUCUATT (SEQ ID NO : 1631)	1.5
RAG3A-939	CCACACTTCTCAGCAGACA (SEQ ID NO : 748)	CCACACUUCUCAGCAGACATT (SEQ ID NO : 1190)	UGUCUGCUGAGAAGUGUGGGTT (SEQ ID NO : 1632)	1.5
RAG3A-779	CTAGAGCCAGGGCCAAAGG (SEQ ID NO : 749)	CUAGAGCCAGGGCCAAAGGTT (SEQ ID NO : 1191)	CCUUUGGCCCUGGCUCUAGTT (SEQ ID NO : 1633)	1.5
RAG3A-803	GGGACTGGGAAGAAAGCAA (SEQ ID NO : 750)	GGGACUGGGAAGAAAGCAATT (SEQ ID NO : 1192)	UUGCUUUCUUCCCAGUCCCTT (SEQ ID NO : 1634)	1.5
RAG3A-1382	GTCCATCAGCCGATCTCCC (SEQ ID NO : 751)	GUCCAUCAGCCGAUCUCCCTT (SEQ ID NO : 1193)	GGGAGAUCGGCUGAUGGACTT (SEQ ID NO : 1635)	1.5
RAG3A-97	AGGAGTGGACCCTGGTCCA (SEQ ID NO : 752)	AGGAGUGGACCCUGGUCCATT (SEQ ID NO : 1194)	UGGACCAGGGUCCACUCCUTT (SEQ ID NO : 1636)	1.5
RAG3A-543	GCTTAACCCAGTGCACGTG (SEQ ID NO : 753)	GCUUAACCCAGUGCACGUGTT (SEQ ID NO : 1195)	CACGUGCACUGGGUUAAGCTT (SEQ ID NO : 1637)	1.5

RAG3A-556	CACCTAAGCTCAGGCTTAA (SEQ ID NO : 754)	CACCUAAGCUCAGGCUUAATT (SEQ ID NO : 1196)	UUAAGCCUGAGCUUAGGUGTT (SEQ ID NO : 1638)	1.5
RAG3A-60	GAGAAGGCGTCACTTCCGG (SEQ ID NO : 755)	GAGAAGGCGUCACUUCCGGTT (SEQ ID NO : 1197)	CCGGAAGUGACGCCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1639)	1.5
RAG3A-647	TGGAAGACGGAGACAGAAC (SEQ ID NO : 756)	UGGAAGACGGAGACAGAACTT (SEQ ID NO : 1198)	GUUCUGUCUCCGUCUUCCATT (SEQ ID NO : 1640)	1.5
RAG3A-243	GCTTCTTCCCCAGCAACAC (SEQ ID NO : 757)	GCUUCUUCCCCAGCAACACTT (SEQ ID NO : 1199)	GUGUUGCUGGGGAAGAAGCTT (SEQ ID NO : 1641)	1.5
RAG3A-533	GTGCACGTGTGCGCACATA (SEQ ID NO : 758)	GUGCACGUGUGCGCACAUATT (SEQ ID NO : 1200)	UAUGUGCGCACACGUGCACTT (SEQ ID NO : 1642)	1.5
RAG3A-628	AAGCAAAGGAGGGCCCTGG (SEQ ID NO : 759)	AAGCAAAGGAGGGCCCUGGTT (SEQ ID NO : 1201)	CCAGGGCCCUCCUUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1643)	1.5
RAG3A-849	AAGGTCAGGCCAGGAAGCC (SEQ ID NO : 760)	AAGGUCAGGCCAGGAAGCCTT (SEQ ID NO : 1202)	GGCUUCCUGGCCUGACCUUTT (SEQ ID NO : 1644)	1.5
RAG3A-1307	CTGCCTCCCTACCTTCTCT (SEQ ID NO : 761)	CUGCCUCCCUACCUUCUCUTT (SEQ ID NO : 1203)	AGAGAAGGUAGGGAGGCAGTT (SEQ ID NO : 1645)	1.5
RAG3A-293	TTGGATAGCCAGGGAGTGA (SEQ ID NO : 762)	UUGGAUAGCCAGGGAGUGATT (SEQ ID NO : 1204)	UCACUCCCUGGCUAUCCAATT (SEQ ID NO : 1646)	1.5
RAG3A-1285	AGGTCGCTCCTCATTCTTG (SEQ ID NO : 763)	AGGUCGCUCCUCAUUCUUGTT (SEQ ID NO : 1205)	CAAGAAUGAGGAGCGACCUTT (SEQ ID NO : 1647)	1.5
RAG3A-1223	CCCTTCTGTGGAGTGACAG (SEQ ID NO : 764)	CCCUUCUGUGGAGUGACAGTT (SEQ ID NO : 1206)	CUGUCACUCCACAGAAGGGTT (SEQ ID NO : 1648)	1.5
RAG3A-1177	CAGGCGCATTCGACAGTCC (SEQ ID NO : 765)	CAGGCGCAUUCGACAGUCCTT (SEQ ID NO : 1207)	GGACUGUCGAAUGCGCCUGTT (SEQ ID NO : 1649)	1.5
RAG3A-226	ACAAATGTCCTGCCAGATT (SEQ ID NO : 766)	ACAAAUGUCCUGCCAGAUUTT (SEQ ID NO : 1208)	AAUCUGGCAGGACAUUUGUTT (SEQ ID NO : 1650)	1.5
RAG3A-1097	CAGCCTCCTTTCTCTTGGT (SEQ ID NO : 767)	CAGCCUCCUUUCUCUUGGUTT (SEQ ID NO : 1209)	ACCAAGAGAAAGGAGGCUGTT (SEQ ID NO : 1651)	1.5
RAG3A-1188	TAACTTATCCTCAGGCGCA (SEQ ID NO : 768)	UAACUUAUCCUCAGGCGCATT (SEQ ID NO : 1210)	UGCGCCUGAGGAUAAGUUATT (SEQ ID NO : 1652)	1.5

RAG3A-593	GTGTAGCCATCTAAGCCAC (SEQ ID NO : 769)	GUGUAGCCAUCUAAGCCACTT (SEQ ID NO : 1211)	GUGGCUUAGAUGGCUACACTT (SEQ ID NO : 1653)	1.5
RAG3A-670	GTCACATGTGGAACGGTAG (SEQ ID NO : 770)	GUCACAUGUGGAACGGUAGTT (SEQ ID NO : 1212)	CUACCGUUCCACAUGUGACTT (SEQ ID NO : 1654)	1.5
RAG3A-503	CACCTGACAGTCCACTCAA (SEQ ID NO : 771)	CACCUGACAGUCCACUCAATT (SEQ ID NO : 1213)	UUGAGUGGACUGUCAGGUGTT (SEQ ID NO : 1655)	1.5
RAG3A-1167	CGACAGTCCCCTCTTGCTT (SEQ ID NO : 772)	CGACAGUCCCCUCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1214)	AAGCAAGAGGGGACUGUCGTT (SEQ ID NO : 1656)	1.5
RAG3A-583	CTAAGCCACTGGACCCCAG (SEQ ID NO : 773)	CUAAGCCACUGGACCCCAGTT (SEQ ID NO : 1215)	CUGGGGUCCAGUGGCUUAGTT (SEQ ID NO : 1657)	1.5
RAG3A-706	CTAAGACAGGGACACATGG (SEQ ID NO : 774)	CUAAGACAGGGACACAUGGTT (SEQ ID NO : 1216)	CCAUGUGUCCCUGUCUUAGTT (SEQ ID NO : 1658)	1.5
RAG3A-983	GGAGACATCTCGTCTGGCT (SEQ ID NO : 775)	GGAGACAUCUCGUCUGGCUTT (SEQ ID NO : 1217)	AGCCAGACGAGAUGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1659)	1.5
RAG3A-718	CAGCTGTCTTTCCTAAGAC (SEQ ID NO : 776)	CAGCUGUCUUUCCUAAGACTT (SEQ ID NO : 1218)	GUCUUAGGAAAGACAGCUGTT (SEQ ID NO : 1660)	1.5
RAG3A-378	CCCTAGGGGATTACAGAAA (SEQ ID NO : 777)	CCCUAGGGGAUUACAGAAATT (SEQ ID NO : 1219)	UUUCUGUAAUCCCCUAGGGTT (SEQ ID NO : 1661)	1.5
RAG3A-1095	GCCTCCTTTCTCTTGGTTC (SEQ ID NO : 778)	GCCUCCUUUCUCUUGGUUCTT (SEQ ID NO : 1220)	GAACCAAGAGAAAGGAGGCTT (SEQ ID NO : 1662)	1.4
RAG3A-698	GGGACACATGGGCCTGGTT (SEQ ID NO : 779)	GGGACACAUGGGCCUGGUUTT (SEQ ID NO : 1221)	AACCAGGCCCAUGUGUCCCTT (SEQ ID NO : 1663)	1.4
RAG3A-277	TGAAAACCCCACCAATCTT (SEQ ID NO : 780)	UGAAAACCCCACCAAUCUUTT (SEQ ID NO : 1222)	AAGAUUGGUGGGGUUUUCATT (SEQ ID NO : 1664)	1.4
RAG3A-644	AAGACGGAGACAGAACAAG (SEQ ID NO : 781)	AAGACGGAGACAGAACAAGTT (SEQ ID NO : 1223)	CUUGUUCUGUCUCCGUCUUTT (SEQ ID NO : 1665)	1.4
RAG3A-941	GGCCACACTTCTCAGCAGA (SEQ ID NO : 782)	GGCCACACUUCUCAGCAGATT (SEQ ID NO : 1224)	UCUGCUGAGAAGUGUGGGCCTT (SEQ ID NO : 1666)	1.4
RAG3A-794	AAGAAAGCAAAGGAGCTAG (SEQ ID NO : 783)	AAGAAAGCAAAGGAGCUAGTT (SEQ ID NO : 1225)	CUAGCUCCUUUGCUUUCUUTT (SEQ ID NO : 1667)	1.4

RAG3A-890	GAGCCTGAGGAAGTTCTGG (SEQ ID NO : 784)	GAGCCUGAGGAAGUUCUGGTT (SEQ ID NO : 1226)	CCAGAACUUCCUCAGGCUCTT (SEQ ID NO : 1668)	1.4
RAG3A-1310	AGCCTGCCTCCCTACCTTC (SEQ ID NO : 785)	AGCCUGCCUCCCUACCUUCTT (SEQ ID NO : 1227)	GAAGGUAGGGAGGCAGGCUTT (SEQ ID NO : 1669)	1.4
RAG3A-27	GTCTGGTGGCTCCCTTCTC (SEQ ID NO : 786)	GUCUGGUGGCUCCCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1228)	GAGAAGGGAGCCACCAGACTT (SEQ ID NO : 1670)	1.4
RAG3A-38	CCTTCACCAGTGTCTGGTG (SEQ ID NO : 787)	CCUUCACCAGUGUCUGGUGTT (SEQ ID NO : 1229)	CACCAGACACUGGUGAAGGTT (SEQ ID NO : 1671)	1.4
RAG3A-532	TGCACGTGTGCGCACATAC (SEQ ID NO : 788)	UGCACGUGUGCGCACAUACTT (SEQ ID NO : 1230)	GUAUGUGCGCACACGUGCATT (SEQ ID NO : 1672)	1.4
RAG3A-1023	TATCCTCCCAGCTATCCCA (SEQ ID NO : 789)	UAUCCUCCCAGCUAUCCCATT (SEQ ID NO : 1231)	UGGGAUAGCUGGGAGGAUATT (SEQ ID NO : 1673)	1.4
RAG3A-797	GGGAAGAAAGCAAAGGAGC (SEQ ID NO : 790)	GGGAAGAAAGCAAAGGAGCTT (SEQ ID NO : 1232)	GCUCCUUUGCUUUCUUCCCTT (SEQ ID NO : 1674)	1.4
RAG3A-399	GGGGAATGACAAGATAGGA (SEQ ID NO : 791)	GGGGAAUGACAAGAUAGGATT (SEQ ID NO : 1233)	UCCUAUCUUGUCAUUCCCCTT (SEQ ID NO : 1675)	1.4
RAG3A-945	TCTAGGCCACACTTCTCAG (SEQ ID NO : 792)	UCUAGGCCACACUUCUCAGTT (SEQ ID NO : 1234)	CUGAGAAGUGUGGCCUAGATT (SEQ ID NO : 1676)	1.4
RAG3A-344	AAGCATCCTGTTGGATTTC (SEQ ID NO : 793)	AAGCAUCCUGUUGGAUUUCTT (SEQ ID NO : 1235)	GAAAUCCAACAGGAUGCUUTT (SEQ ID NO : 1677)	1.4
RAG3A-1255	ACAGGGACCTAGCCAGAAA (SEQ ID NO : 794)	ACAGGGACCUAGCCAGAAATT (SEQ ID NO : 1236)	UUUCUGGGCUAGGUCCCUGUTT (SEQ ID NO : 1678)	1.4
RAG3A-524	TGCGCACATACATGTGCCC (SEQ ID NO : 795)	UGCGCACAUACAUGUGCCCTT (SEQ ID NO : 1237)	GGGCACAUGUAUGUGCGCATT (SEQ ID NO : 1679)	1.4
RAG3A-244	TGCTTCTTCCCCAGCAACA (SEQ ID NO : 796)	UGCUUCUUCCCCAGCAACATT (SEQ ID NO : 1238)	UGUUGCUGGGGAAGAAGCATT (SEQ ID NO : 1680)	1.4
RAG3A-340	ATCCTGTTGGATTTCAGCA (SEQ ID NO : 797)	AUCCUGUUGGAUUUCAGCATT (SEQ ID NO : 1239)	UGCUGAAAUCCAACAGGAUTT (SEQ ID NO : 1681)	1.4
RAG3A-687	GCCTGGTTATTCCTCTTGT (SEQ ID NO : 798)	GCCUGGUUAUUCCUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1240)	ACAAGAGGAAUAACCAGGCTT (SEQ ID NO : 1682)	1.4

RAG3A-568	CCAGCAGACGAGAGCACCTAA (SEQ ID NO : 799)	CCAGCAGACGAGAGCACCUAATT (SEQ ID NO : 1241)	UUAGGUGCUCGUCUGCUGGTT (SEQ ID NO : 1683)	1.4
RAG3A-804	TGGGACTGGGAAGAAAAGCA (SEQ ID NO : 800)	UGGGACUGGGAAGAAAAGCATT (SEQ ID NO : 1242)	UGCUUUUCUUCCCAGUCCCATT (SEQ ID NO : 1684)	1.4
RAG3A-496	CAGTCCACTCAACCCGTCC (SEQ ID NO : 801)	CAGUCCACUCAACCCGUCCTT (SEQ ID NO : 1243)	GGACGGGUUGAGUGGACUGTT (SEQ ID NO : 1685)	1.4
RAG3A-810	GGAGACTGGGACTGGGAAG (SEQ ID NO : 802)	GGAGACUGGGACUGGGAAGTT (SEQ ID NO : 1244)	CUUCCCAGUCCCAGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1686)	1.4
RAG3A-356	AAGCAGGAAAGCAAGCATC (SEQ ID NO : 803)	AAGCAGGAAAGCAAGCAUCTT (SEQ ID NO : 1245)	GAUGCUUGCUUUCCUGCUUTT (SEQ ID NO : 1687)	1.4
RAG3A-1248	CCTAGCCAGAAACCGGCAG (SEQ ID NO : 804)	CCUAGCCAGAAACCGGCAGTT (SEQ ID NO : 1246)	CUGCCGGUUUCUGGCUAGGTT (SEQ ID NO : 1688)	1.4
RAG3A-1015	CAGCTATCCCAGCACCCTC (SEQ ID NO : 805)	CAGCUAUCCCAGCACCCUCTT (SEQ ID NO : 1247)	GAGGGUGCUGGGAUAGCUGTT (SEQ ID NO : 1689)	1.4
RAG3A-645	GAAGACGGAGACAGAACAA (SEQ ID NO : 806)	GAAGACGGAGACAGAACAATT (SEQ ID NO : 1248)	UUGUUCUGUCUCCGUCUUCTT (SEQ ID NO : 1690)	1.4
RAG3A-517	ATACATGTGCCCCGCACCT (SEQ ID NO : 807)	AUACAUGUGCCCCGCACCUTT (SEQ ID NO : 1249)	AGGUGCGGGGGCACAUGUAUTT (SEQ ID NO : 1691)	1.4
RAG3A-194	AACTTCTGCTCCTGTCCCC (SEQ ID NO : 808)	AACUUCUGCUCCUGUCCCCTT (SEQ ID NO : 1250)	GGGGACAGGAGCAGAAGUUTT (SEQ ID NO : 1692)	1.4
RAG3A-927	GCAGACATGCCCATCCTTG (SEQ ID NO : 809)	GCAGACAUGCCCAUCCUUGTT (SEQ ID NO : 1251)	CAAGGAUGGGGCAUGUCUGCTT (SEQ ID NO : 1693)	1.4
RAG3A-271	CCCCACCAATCTTAAACAA (SEQ ID NO : 810)	CCCCACCAAUCUUAAACAATT (SEQ ID NO : 1252)	UUGUUUAAGAUUGGUGGGGTT (SEQ ID NO : 1694)	1.4
RAG3A-398	GGGAATGACAAGATAGGAC (SEQ ID NO : 811)	GGGAAUGACAAGAUAGGACTT (SEQ ID NO : 1253)	GUCCUAUCUUGUCAUUCCCTT (SEQ ID NO : 1695)	1.4
RAG3A-230	CAACACAAATGTCCTGCCA (SEQ ID NO : 812)	CAACACAAAUGUCCUGCCATT (SEQ ID NO : 1254)	UGGCAGGACAUUUGUGUUGTT (SEQ ID NO : 1696)	1.4
RAG3A-1104	CCACTCCCAGCCTCCTTTC (SEQ ID NO : 813)	CCACUCCCAGCCUCCUUUCTT (SEQ ID NO : 1255)	GAAAGGAGGGCUGGGAGUGGTT (SEQ ID NO : 1697)	1.4

RAG3A-1254	CAGGGACCTAGCCAGAAAC (SEQ ID NO : 814)	CAGGGACCUAGCCAGAAACTT (SEQ ID NO : 1256)	GUUUCUGGCUAGGUCCCUGTT (SEQ ID NO : 1698)	1.4
RAG3A-288	TAGCCAGGGAGTGAAAACC (SEQ ID NO : 815)	UAGCCAGGGAGUGAAAACCTT (SEQ ID NO : 1257)	GGUUUUCACUCCCUGGCUATT (SEQ ID NO : 1699)	1.4
RAG3A-837	GGAAGCCCCTGAGGACAGA (SEQ ID NO : 816)	GGAAGCCCCUGAGGACAGATT (SEQ ID NO : 1258)	UCUGUCCUCAGGGGCUUCCTT (SEQ ID NO : 1700)	1.4
RAG3A-935	ACTTCTCAGCAGACATGCC (SEQ ID NO : 817)	ACUUCUCAGCAGACAUGCCTT (SEQ ID NO : 1259)	GGCAUGUCUGCUGAGAAGUTT (SEQ ID NO : 1701)	1.4
RAG3A-476	AACCCTTTCCCCATAACAC (SEQ ID NO : 818)	AACCCUUUCCCCAUAACACTT (SEQ ID NO : 1260)	GUGUUAUGGGGAAAGGGUUTT (SEQ ID NO : 1702)	1.4
RAG3A-589	AGCCATCTAAGCCACTGGA (SEQ ID NO : 819)	AGCCAUCUAAGCCACUGGATT (SEQ ID NO : 1261)	UCCAGUGGCUUAGAUGGCUTT (SEQ ID NO : 1703)	1.4
RAG3A-1207	CAGTATCTCCCTCTCATTG (SEQ ID NO : 820)	CAGUAUCUCCCUCUCAUUGTT (SEQ ID NO : 1262)	CAAUGAGAGGGAGAUACUGTT (SEQ ID NO : 1704)	1.4
RAG3A-1284	GGTCGCTCCTCATTCTTGT (SEQ ID NO : 821)	GGUCGCUCCUCAUUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1263)	ACAAGAAUGAGGAGCGACCTT (SEQ ID NO : 1705)	1.4
RAG3A-956	AAATTCCAGGATCTAGGCC (SEQ ID NO : 822)	AAAUUCCAGGAUCUAGGCCTT (SEQ ID NO : 1264)	GGCCUAGAUCCUGGAAUUUTT (SEQ ID NO : 1706)	1.4
RAG3A-557	GCACCTAAGCTCAGGCTTA (SEQ ID NO : 823)	GCACCUAAGCUCAGGCUUATT (SEQ ID NO : 1265)	UAAGCCUGAGCUUAGGUGCTT (SEQ ID NO : 1707)	1.4
RAG3A-500	CTGACAGTCCACTCAACCC (SEQ ID NO : 824)	CUGACAGUCCACUCAACCCTT (SEQ ID NO : 1266)	GGGUUGAGUGGACUGUCAGTT (SEQ ID NO : 1708)	1.4
RAG3A-1208	ACAGTATCTCCCTCTCATT (SEQ ID NO : 825)	ACAGUAUCUCCCUCUCAUUTT (SEQ ID NO : 1267)	AAUGAGAGGGAGAUACUGUTT (SEQ ID NO : 1709)	1.4
RAG3A-686	CCTGGTTATTCCTCTTGTC (SEQ ID NO : 826)	CCUGGUUAUUCCUCUUGUCTT (SEQ ID NO : 1268)	GACAAGAGGAAUAACCAGGTT (SEQ ID NO : 1710)	1.4
RAG3A-1168	TCGACAGTCCCCTCTTGCT (SEQ ID NO : 827)	UCGACAGUCCCCUCUUGCUTT (SEQ ID NO : 1269)	AGCAAGAGGGGACUGUCGATT (SEQ ID NO : 1711)	1.4
RAG3A-218	CCTGCCAGATTCCTCCTGG (SEQ ID NO : 828)	CCUGCCAGAUUCCUCCUGGTT (SEQ ID NO : 1270)	CCAGGAGGAAUCUGGCAGGTT (SEQ ID NO : 1712)	1.4

RAG3A-835	AAGCCCCTGAGGACAGAGA (SEQ ID NO : 829)	AAGCCCCUGAGGACAGAGATT (SEQ ID NO : 1271)	UCUCUGUCCUCAGGGGCUUTT (SEQ ID NO : 1713)	1.4
RAG3A-291	GGATAGCCAGGGAGTGAAA (SEQ ID NO : 830)	GGAUAGCCAGGGAGUGAAATT (SEQ ID NO : 1272)	UUUCACUCCCUGGCUAUCCTT (SEQ ID NO : 1714)	1.3
RAG3A-1222	CCTTCTGTGGAGTGACAGT (SEQ ID NO : 831)	CCUUCUGUGGAGUGACAGUTT (SEQ ID NO : 1273)	ACUGUCACUCCACAGAAGGTT (SEQ ID NO : 1715)	1.3
RAG3A-276	GAAAACCCCACCAATCTTA (SEQ ID NO : 832)	GAAAACCCCACCAAUCUUATT (SEQ ID NO : 1274)	UAAGAUUGGGUGGGGUUUUCTT (SEQ ID NO : 1716)	1.3
RAG3A-156	CATGTCCAGGAAAAAGATGG (SEQ ID NO : 833)	CAUGUCCAGGAAAAAGAUGGTT (SEQ ID NO : 1275)	CCAUCUUUUCCUGGACAUGTT (SEQ ID NO : 1717)	1.3
RAG3A-937	ACACTTCTCAGCAGACATG (SEQ ID NO : 834)	ACACUUCUCAGCAGACAUGTT (SEQ ID NO : 1276)	CAUGUCUGCUGAGAAGUGUTT (SEQ ID NO : 1718)	1.3
RAG3A-1262	ACCCAGGACAGGGACCTAG (SEQ ID NO : 835)	ACCCAGGACAGGGACCUAGTT (SEQ ID NO : 1277)	CUAGGUCCCUGUCCUGGGUTT (SEQ ID NO : 1719)	1.3
RAG3A-1139	CTTCCTTCACCCCAAGGGAC (SEQ ID NO : 836)	CUUCCUUCACCCCAAGGGACTT (SEQ ID NO : 1278)	GUCCCUUGGGGUGAAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1720)	1.3
RAG3A-535	CAGTGCACGTGTGCGCACA (SEQ ID NO : 837)	CAGUGCACGUGUGCGCACATT (SEQ ID NO : 1279)	UGUGCGCACACGUGCACUGTT (SEQ ID NO : 1721)	1.3
RAG3A-719	GCAGCTGTCTTTCCTAAGA (SEQ ID NO : 838)	GCAGCUGUCUUUCCUAAGATT (SEQ ID NO : 1280)	UCUUAGGAAAGACAGCUGCTT (SEQ ID NO : 1722)	1.3
RAG3A-726	AGGTCCAGCAGCTGTCTTT (SEQ ID NO : 839)	AGGUCCAGCAGCUGUCUUUTT (SEQ ID NO : 1281)	AAAGACAGCUGCUGGACCUTT (SEQ ID NO : 1723)	1.3
RAG3A-384	AGGACTCCCTAGGGGATTA (SEQ ID NO : 840)	AGGACUCCCUAGGGGAUUATT (SEQ ID NO : 1282)	UAAUCCCCUAGGGAGUCCUTT (SEQ ID NO : 1724)	1.3
RAG3A-834	AGCCCCTGAGGACAGAGAC (SEQ ID NO : 841)	AGCCCCUGAGGACAGAGACTT (SEQ ID NO : 1283)	GUCUCUGUCCUCAGGGGCUTT (SEQ ID NO : 1725)	1.3
RAG3A-562	GACGAGCACCTAAGCTCAG (SEQ ID NO : 842)	GACGAGCACCUAAGCUCAGTT (SEQ ID NO : 1284)	CUGAGCUUAGGUGCUCGUCTT (SEQ ID NO : 1726)	1.3
RAG3A-940	GCCACACTTCTCAGCAGAC (SEQ ID NO : 843)	GCCACACUUCUCAGCAGACTT (SEQ ID NO : 1285)	GUCUGCUGAGAAGUGUGGCTT (SEQ ID NO : 1727)	1.3

RAG3A-632	GAACAAGCAAAGGAGGGCC (SEQ ID NO : 844)	GAACAAGCAAAGGAGGGCCTT (SEQ ID NO : 1286)	GGCCCUCCUUUGCUUGUUCTT (SEQ ID NO : 1728)	1.3
RAG3A-746	CAGGGAGGTATTTGCGGGG (SEQ ID NO : 845)	CAGGGAGGUAUUUGCGGGGTT (SEQ ID NO : 1287)	CCCCGCAAAUACCUCCCUGTT (SEQ ID NO : 1729)	1.3
RAG3A-1309	GCCTGCCTCCCTACCTTCT (SEQ ID NO : 846)	GCCUGCCUCCCUACCUUCUTT (SEQ ID NO : 1288)	AGAAGGUAGGGAGGCAGGCTT (SEQ ID NO : 1730)	1.3
RAG3A-780	GCTAGAGCCAGGGCCAAAG (SEQ ID NO : 847)	GCUAGAGCCAGGGCCAAAGTT (SEQ ID NO : 1289)	CUUUGGCCCUGGCUCUAGCTT (SEQ ID NO : 1731)	1.3
RAG3A-693	ACATGGGCCTGGTTATTCC (SEQ ID NO : 848)	ACAUGGGCCUGGUUAUUCCTT (SEQ ID NO : 1290)	GGAAUAACCAGGCCCAUGUTT (SEQ ID NO : 1732)	1.3
RAG3A-636	GACAGAACAAGCAAAGGAG (SEQ ID NO : 849)	GACAGAACAAGCAAAGGAGTT (SEQ ID NO : 1291)	CUCCUUUGCUUGUUCUGUCTT (SEQ ID NO : 1733)	1.3
RAG3A-258	AAACAAGACCTCTGTGCTT (SEQ ID NO : 850)	AAACAAGACCUCUGUGCUUTT (SEQ ID NO : 1292)	AAGCACAGAGGUCUUGUUUTT (SEQ ID NO : 1734)	1.3
RAG3A-1022	ATCCTCCCAGCTATCCCAG (SEQ ID NO : 851)	AUCCUCCCAGCUAUCCCAGTT (SEQ ID NO : 1293)	CUGGGAUAGCUGGGAGGAUTT (SEQ ID NO : 1735)	1.3
RAG3A-381	ACTCCCTAGGGGATTACAG (SEQ ID NO : 852)	ACUCCCUAGGGGAUUACAGTT (SEQ ID NO : 1294)	CUGUAAUCCCCUAGGGAGUTT (SEQ ID NO : 1736)	1.3
RAG3A-379	TCCCTAGGGGATTACAGAA (SEQ ID NO : 853)	UCCCUAGGGGAUUACAGAATT (SEQ ID NO : 1295)	UUCUGUAAUCCCCUAGGGATT (SEQ ID NO : 1737)	1.3
RAG3A-663	GTGGAACGGTAGGAGATGG (SEQ ID NO : 854)	GUGGAACGGUAGGAGAUGGTT (SEQ ID NO : 1296)	CCAUCUCCUACCGUUCCACTT (SEQ ID NO : 1738)	1.3
RAG3A-1099	CCCAGCCTCCTTTCTCTTG (SEQ ID NO : 855)	CCCAGCCUCCUUUCUCUUGTT (SEQ ID NO : 1297)	CAAGAGAAAGGAGGCUGGGTT (SEQ ID NO : 1739)	1.3
RAG3A-855	GGGATCAAGGTCAGGCCAG (SEQ ID NO : 856)	GGGAUCAAGGUCAGGCCAGTT (SEQ ID NO : 1298)	CUGGCCUGACCUUGAUCCCTT (SEQ ID NO : 1740)	1.3
RAG3A-1279	CTCCTCATTTCTTGTGTTAC (SEQ ID NO : 857)	CUCCUCAUUUCUUGUGUUACTT (SEQ ID NO : 1299)	GUAACACAAGAAUGAGGAGTT (SEQ ID NO : 1741)	1.3
RAG3A-34	CACCAGTGTCTGGTGGCTC (SEQ ID NO : 858)	CACCAGUGUCUGGUGGCUCTT (SEQ ID NO : 1300)	GAGCCACCAGACACUGGUGTT (SEQ ID NO : 1742)	1.3

RAG3A-633	AGAACAAGCAAAGGAGGGC (SEQ ID NO : 859)	AGAACAAGCAAAGGAGGGCTT (SEQ ID NO : 1301)	GCCCUCCUUUGCUUGUUCUTT (SEQ ID NO : 1743)	1.3
RAG3A-453	CCATAACAGGAGATTTCTC (SEQ ID NO : 860)	CCAUAACAGGAGAUUUCUCTT (SEQ ID NO : 1302)	GAGAAAUCUCCUGUUAUGGTT (SEQ ID NO : 1744)	1.3
RAG3A-246	TGTGCTTCTTCCCCAGCAA (SEQ ID NO : 861)	UGUGCUUCUUCCCCAGCAATT (SEQ ID NO : 1303)	UUGCUGGGGAAGAAGCACATT (SEQ ID NO : 1745)	1.3
RAG3A-592	TGTAGCCATCTAAGCCACT (SEQ ID NO : 862)	UGUAGCCAUCUAAGCCACUTT (SEQ ID NO : 1304)	AGUGGCUUAGAUGGCUACATT (SEQ ID NO : 1746)	1.3
RAG3A-270	CCCACCAATCTTAAACAAG (SEQ ID NO : 863)	CCCACCAAUCUUAAACAAGTT (SEQ ID NO : 1305)	CUUGUUUAAGAUUGGUGGGTT (SEQ ID NO : 1747)	1.3
RAG3A-630	ACAAGCAAAGGAGGGCCCT (SEQ ID NO : 864)	ACAAGCAAAGGAGGGCCCUTT (SEQ ID NO : 1306)	AGGGCCCUCCUUUGCUUGUTT (SEQ ID NO : 1748)	1.3
RAG3A-685	CTGGTTATTCCTCTTGTCA (SEQ ID NO : 865)	CUGGUUAUUCCUCUUGUCATT (SEQ ID NO : 1307)	UGACAAGAGGAAUAACCAGTT (SEQ ID NO : 1749)	1.3
RAG3A-1103	CACTCCCAGCCTCCTTTCT (SEQ ID NO : 866)	CACUCCCAGCCUCCUUUCUTT (SEQ ID NO : 1308)	AGAAAGGAGGCUGGGAGUGTT (SEQ ID NO : 1750)	1.3
RAG3A-1065	CTGCCTCCCTGTCTCCTGT (SEQ ID NO : 867)	CUGCCUCCCUGUCUCCUGUTT (SEQ ID NO : 1309)	ACAGGAGACAGGGAGGCAGTT (SEQ ID NO : 1751)	1.3
RAG3A-523	GCGCACATACATGTGCCCC (SEQ ID NO : 868)	GCGCACAUACAUGUGCCCCTT (SEQ ID NO : 1310)	GGGGCACAUGUAUGUGCGCTT (SEQ ID NO : 1752)	1.3
RAG3A-590	TAGCCATCTAAGCCACTGG (SEQ ID NO : 869)	UAGCCAUCUAAGCCACUGGTT (SEQ ID NO : 1311)	CCAGUGGCUUAGAUGGCUATT (SEQ ID NO : 1753)	1.3
RAG3A-505	CGCACCTGACAGTCCACTC (SEQ ID NO : 870)	CGCACCUGACAGUCCACUCTT (SEQ ID NO : 1312)	GAGUGGACUGUCAGGUGCGTT (SEQ ID NO : 1754)	1.3
RAG3A-1247	CTAGCCAGAAACCGGCAGC (SEQ ID NO : 871)	CUAGCCAGAAACCGGCAGCTT (SEQ ID NO : 1313)	GCUGCCGGUUUCUGGCUAGTT (SEQ ID NO : 1755)	1.3
RAG3A-1281	CGCTCCTCATTCTTGTGTT (SEQ ID NO : 872)	CGCUCCUCAUUCUUGUGUUTT (SEQ ID NO : 1314)	AACACAAGAAUGAGGAGCGTT (SEQ ID NO : 1756)	1.3
RAG3A-747	GCAGGGAGGTATTTGCGGG (SEQ ID NO : 873)	GCAGGGAGGUAUUUGCGGGTT (SEQ ID NO : 1315)	CCCGCAAAUACCUCCCUGCTT (SEQ ID NO : 1757)	1.3

RAG3A-1220	TTCTGTGGAGTGACAGTAT (SEQ ID NO : 874)	UUCUGUGGAGUGACAGUAUTT (SEQ ID NO : 1316)	AUACUGUCACUCCACAGAATT (SEQ ID NO : 1758)	1.3
RAG3A-1268	TGTGTTACCCAGGACAGGG (SEQ ID NO : 875)	UGUGUUACCCAGGACAGGGTT (SEQ ID NO : 1317)	CCCUGUCCUGGGUAACACATT (SEQ ID NO : 1759)	1.3
RAG3A-782	GAGCTAGAGCCAGGGCCAA (SEQ ID NO : 876)	GAGCUAGAGCCAGGGCCAATT (SEQ ID NO : 1318)	UUGGCCCUGGCUCUAGCUCTT (SEQ ID NO : 1760)	1.3
RAG3A-107	GTGTGGGTGGAGGAGTGGA (SEQ ID NO : 877)	GUGUGGGUGGAGGAGUGGATT (SEQ ID NO : 1319)	UCCACUCCUCCACCCACACTT (SEQ ID NO : 1761)	1.3
RAG3A-923	ACATGCCCATCCTTGGGGA (SEQ ID NO : 878)	ACAUGCCCAUCCUUGGGGATT (SEQ ID NO : 1320)	UCCCCAAGGAUGGGCAUGUTT (SEQ ID NO : 1762)	1.3
RAG3A-349	AAAGCAAGCATCCTGTTGG (SEQ ID NO : 879)	AAAGCAAGCAUCCUGUUGGTT (SEQ ID NO : 1321)	CCAACAGGAUGCUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1763)	1.3
RAG3A-1085	TCTTGGTTCCCTGGTCATG (SEQ ID NO : 880)	UCUUGGUUCCCUGGUCAUGTT (SEQ ID NO : 1322)	CAUGACCAGGGAACCAAGATT (SEQ ID NO : 1764)	1.3
RAG3A-432	ATGTGGGCAATATCCGTGT (SEQ ID NO : 881)	AUGUGGGCAAUAUCCGUGUTT (SEQ ID NO : 1323)	ACACGGAUAUUGCCCACAUTT (SEQ ID NO : 1765)	1.3
RAG3A-129	ATCCAAATCTTCTCCGTGG (SEQ ID NO : 882)	AUCCAAAUCUUCUCCGUGGTT (SEQ ID NO : 1324)	CCACGGAGAAGAUUUGGAUTT (SEQ ID NO : 1766)	1.3
RAG3A-830	CCTGAGGACAGAGACTGTG (SEQ ID NO : 883)	CCUGAGGACAGAGACUGUGTT (SEQ ID NO : 1325)	CACAGUCUCUGUCCUCAGGTT (SEQ ID NO : 1767)	1.3
RAG3A-74	GGGGCTCCAGGGAAGAGAA (SEQ ID NO : 884)	GGGGCUCCAGGGAAGAGAATT (SEQ ID NO : 1326)	UUCUCUUCCCUGGAGCCCCTT (SEQ ID NO : 1768)	1.3
RAG3A-856	TGGGATCAAGGTCAGGCCA (SEQ ID NO : 885)	UGGGAUCAAGGUCAGGCCATT (SEQ ID NO : 1327)	UGGCCUGACCUUGAUCCCATT (SEQ ID NO : 1769)	1.3
RAG3A-435	CTCATGTGGGCAATATCCG (SEQ ID NO : 886)	CUCAUGUGGGCAAUAUCCGTT (SEQ ID NO : 1328)	CGGAUAUUGCCCACAUGAGTT (SEQ ID NO : 1770)	1.3
RAG3A-564	CAGACGAGCACCTAAGCTC (SEQ ID NO : 887)	CAGACGAGCACCUAAGCUCTT (SEQ ID NO : 1329)	GAGCUUAGGUGCUCGUCUGTT (SEQ ID NO : 1771)	1.3
RAG3A-1251	GGACCTAGCCAGAAACCGG (SEQ ID NO : 888)	GGACCUAGCCAGAAACCGGTT (SEQ ID NO : 1330)	CCGGUUUCUGGGCUAGGUCCTT (SEQ ID NO : 1772)	1.3

RAG3A-1291	TCTCTGAGGTCGCTCCTCA (SEQ ID NO : 889)	UCUCUGAGGUCGCUCCUCATT (SEQ ID NO : 1331)	UGAGGAGCGACCUCAGAGATT (SEQ ID NO : 1773)	1.3
RAG3A-781	AGCTAGAGCCAGGGCCAAA (SEQ ID NO : 890)	AGCUAGAGCCAGGGCCAAATT (SEQ ID NO : 1332)	UUUGGCCCUGGCUCUAGCUTT (SEQ ID NO : 1774)	1.3
RAG3A-261	CTTAAACAAGACCTCTGTG (SEQ ID NO : 891)	CUUAAACAAGACCUCUGUGTT (SEQ ID NO : 1333)	CACAGAGGUCUUGUUUAAGTT (SEQ ID NO : 1775)	1.3
RAG3A-1098	CCAGCCTCCTTTCTCTTGG (SEQ ID NO : 892)	CCAGCCUCCUUUCUCUUGGTT (SEQ ID NO : 1334)	CCAAGAGAAAGGAGGCUGGTT (SEQ ID NO : 1776)	1.3
RAG3A-565	GCAGACGAGCACCTAAGCT (SEQ ID NO : 893)	GCAGACGAGCACCUAAGCUTT (SEQ ID NO : 1335)	AGCUUAGGUGCUCGUCUGCTT (SEQ ID NO : 1777)	1.2
RAG3A-930	TCAGCAGACATGCCCATCC (SEQ ID NO : 894)	UCAGCAGACAUGCCCAUCCTT (SEQ ID NO : 1336)	GGAUGGGCAUGUCUGCUGATT (SEQ ID NO : 1778)	1.2
RAG3A-422	TATCCGTGTTCCCACTTCG (SEQ ID NO : 895)	UAUCCGUGUUCCCACUUCGTT (SEQ ID NO : 1337)	CGAAGUGGGAACACGGAUATT (SEQ ID NO : 1779)	1.2
RAG3A-516	TACATGTGCCCCCGCACCTG (SEQ ID NO : 896)	UACAUGUGCCCCCGCACCUGTT (SEQ ID NO : 1338)	CAGGUGCGGGGGCACAUGUATT (SEQ ID NO : 1780)	1.2
RAG3A-1190	TGTAACTTATCCTCAGGCG (SEQ ID NO : 897)	UGUAACUUAUCCUCAGGCGTT (SEQ ID NO : 1339)	CGCCUGAGGAUAAGUUACATT (SEQ ID NO : 1781)	1.2
RAG3A-360	AGAAAAGCAGGAAAGCAAG (SEQ ID NO : 898)	AGAAAAGCAGGAAAGCAAGTT (SEQ ID NO : 1340)	CUUGCUUUCCUGCUUUUCUTT (SEQ ID NO : 1782)	1.2
RAG3A-126	CAAATCTTCTCCGTGGTGT (SEQ ID NO : 899)	CAAAUCUUCUCCGUGGUGUTT (SEQ ID NO : 1341)	ACACCACGGAGAAGAUUUGTT (SEQ ID NO : 1783)	1.2
RAG3A-938	CACACTTCTCAGCAGACAT (SEQ ID NO : 900)	CACACUUCUCAGCAGACAUTT (SEQ ID NO : 1342)	AUGUCUGCUGAGAAGUGUGTT (SEQ ID NO : 1784)	1.2
RAG3A-853	GATCAAGGTCAGGCCAGGA (SEQ ID NO : 901)	GAUCAAGGUCAGGCCAGGATT (SEQ ID NO : 1343)	UCCUGGCCUGACCUUGAUCTT (SEQ ID NO : 1785)	1.2
RAG3A-716	GCTGTCTTTCCTAAGACAG (SEQ ID NO : 902)	GCUGUCUUUCCUAAGACAGTT (SEQ ID NO : 1344)	CUGUCUUAGGAAAGACAGCTT (SEQ ID NO : 1786)	1.2
RAG3A-1027	CCACTATCCTCCCAGCTAT (SEQ ID NO : 903)	CCACUAUCCUCCCAGCUAUTT (SEQ ID NO : 1345)	AUAGCUGGGAGGAUAGUGGTT (SEQ ID NO : 1787)	1.2

RAG3A-640	CGGAGACAGAACAAGCAAA (SEQ ID NO : 904)	CGGAGACAGAACAAGCAAATT (SEQ ID NO : 1346)	UUUGCUUGUUCUGUCUCCGTT (SEQ ID NO : 1788)	1.2
RAG3A-284	CAGGGAGTGAAAACCCCAC (SEQ ID NO : 905)	CAGGGAGUGAAAACCCCACTT (SEQ ID NO : 1347)	GUGGGGUUUUCACUCCCUGTT (SEQ ID NO : 1789)	1.2
RAG3A-705	TAAGACAGGGACACATGGG (SEQ ID NO : 906)	UAAGACAGGGACACAUGGGTT (SEQ ID NO : 1348)	CCCAUGUGUCCCUGUCUUATT (SEQ ID NO : 1790)	1.2
RAG3A-1315	TGCCTAGCCTGCCTCCCTA (SEQ ID NO : 907)	UGCCUAGCCUGCCUCCCUATT (SEQ ID NO : 1349)	UAGGGAGGCAGGCUAGGCATT (SEQ ID NO : 1791)	1.2
RAG3A-1381	TCCATCAGCCGATCTCCCC (SEQ ID NO : 908)	UCCAUCAGCCGAUCUCCCCTT (SEQ ID NO : 1350)	GGGGAGAUCGGCUGAUGGATT (SEQ ID NO : 1792)	1.2
RAG3A-558	AGCACCTAAGCTCAGGCTT (SEQ ID NO : 909)	AGCACCUAAGCUCAGGCUUTT (SEQ ID NO : 1351)	AAGCCUGAGCUUAGGUGCUTT (SEQ ID NO : 1793)	1.2
RAG3A-498	GACAGTCCACTCAACCCGT (SEQ ID NO : 910)	GACAGUCCACUCAACCCGUTT (SEQ ID NO : 1352)	ACGGGUUGAGUGGACUGUCTT (SEQ ID NO : 1794)	1.2
RAG3A-581	AAGCCACTGGACCCCAGCA (SEQ ID NO : 911)	AAGCCACUGGACCCCAGCATT (SEQ ID NO : 1353)	UGCUGGGGUCCAGUGGGCUUTT (SEQ ID NO : 1795)	1.2
RAG3A-1135	CTTCACCCAAGGGACCCTC (SEQ ID NO : 912)	CUUCACCCAAGGGACCCUCTT (SEQ ID NO : 1354)	GAGGGUCCCUUGGGUGAAGTT (SEQ ID NO : 1796)	1.2
RAG3A-1070	CATGCCTGCCTCCCTGTCT (SEQ ID NO : 913)	CAUGCCUGCCUCCCUGUCUTT (SEQ ID NO : 1355)	AGACAGGGAGGCAGGCAUGTT (SEQ ID NO : 1797)	1.2
RAG3A-1181	TCCTCAGGCGCATTCGACA (SEQ ID NO : 914)	UCCUCAGGCGCAUUCGACATT (SEQ ID NO : 1356)	UGUCGAAUGCGCCUGAGGATT (SEQ ID NO : 1798)	1.2
RAG3A-1206	AGTATCTCCCTCTCATTGT (SEQ ID NO : 915)	AGUAUCUCCCUCUCAUUGUTT (SEQ ID NO : 1357)	ACAAUGAGAGGGAGAUACUTT (SEQ ID NO : 1799)	1.2
RAG3A-461	ACACCAACCCATAACAGGA (SEQ ID NO : 916)	ACACCAACCCAUAACAGGATT (SEQ ID NO : 1358)	UCCUGUUAUGGGUUGGUGUTT (SEQ ID NO : 1800)	1.2
RAG3A-242	CTTCTTCCCCAGCAACACA (SEQ ID NO : 917)	CUUCUUCCCCAGCAACACATT (SEQ ID NO : 1359)	UGUGUUGCUGGGGAAGAAGTT (SEQ ID NO : 1801)	1.2
RAG3A-1127	AAGGGACCCTCTGCCTCTC (SEQ ID NO : 918)	AAGGGACCCUCUGCCUCUCTT (SEQ ID NO : 1360)	GAGAGGCAGAGGGUCCCUUTT (SEQ ID NO : 1802)	1.2

RAG3A-419	CCGTGTTCCCACTTCGAAA (SEQ ID NO : 919)	CCGUGUUCCCACUUCGAAATT (SEQ ID NO : 1361)	UUUCGAAGUGGGAACACGGTT (SEQ ID NO : 1803)	1.2
RAG3A-790	AAGCAAAGGAGCTAGAGCC (SEQ ID NO : 920)	AAGCAAAGGAGCUAGAGCCTT (SEQ ID NO : 1362)	GGCUCUAGCUCCUUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1804)	1.2
RAG3A-635	ACAGAACAAGCAAAGGAGG (SEQ ID NO : 921)	ACAGAACAAGCAAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1363)	CCUCCUUUGCUUGUUCUGUTT (SEQ ID NO : 1805)	1.2
RAG3A-673	CTTGTCACATGTGGAACGG (SEQ ID NO : 922)	CUUGUCACAUGUGGAACGGTT (SEQ ID NO : 1364)	CCGUUCCACAUGUGACAAGTT (SEQ ID NO : 1806)	1.2
RAG3A-1001	CCCTCCTTCCTAATCTTGG (SEQ ID NO : 923)	CCCUCCUUCCUAAUCUUGGTT (SEQ ID NO : 1365)	CCAAGAUUAGGAAGGAGGGTT (SEQ ID NO : 1807)	1.2
RAG3A-1005	AGCACCCTCCTTCCTAATC (SEQ ID NO : 924)	AGCACCCUCCUUCCUAAUCTT (SEQ ID NO : 1366)	GAUUAGGAAGGAGGGUGCUTT (SEQ ID NO : 1808)	1.2
RAG3A-1064	TGCCTCCCTGTCTCCTGTC (SEQ ID NO : 925)	UGCCUCCCUGUCUCCUGUCTT (SEQ ID NO : 1367)	GACAGGAGACAGGGAGGCATT (SEQ ID NO : 1809)	1.2
RAG3A-801	GACTGGGAAGAAAGCAAAG (SEQ ID NO : 926)	GACUGGGAAGAAAGCAAAGTT (SEQ ID NO : 1368)	CUUUGCUUUCUUCCCAGUCTT (SEQ ID NO : 1810)	1.2
RAG3A-486	AACCCGTCCAAACCCTTTC (SEQ ID NO : 927)	AACCCGUCCAAACCCUUUCTT (SEQ ID NO : 1369)	GAAAGGGUUUGGACGGGUUTT (SEQ ID NO : 1811)	1.2
RAG3A-555	ACCTAAGCTCAGGCTTAAC (SEQ ID NO : 928)	ACCUAAGCUCAGGCUUAACTT (SEQ ID NO : 1370)	GUUAAGCCUGAGCUUAGGUTT (SEQ ID NO : 1812)	1.2
RAG3A-854	GGATCAAGGTCAGGCCAGG (SEQ ID NO : 929)	GGAUCAAGGUCAGGCCAGGTT (SEQ ID NO : 1371)	CCUGGCCUGACCUUGAUCCTT (SEQ ID NO : 1813)	1.2
RAG3A-1267	GTGTTACCCAGGACAGGGA (SEQ ID NO : 930)	GUGUUACCCAGGACAGGGATT (SEQ ID NO : 1372)	UCCCUGUCCUGGGUAACACTT (SEQ ID NO : 1814)	1.2
RAG3A-1264	TTACCCAGGACAGGGACCT (SEQ ID NO : 931)	UUACCCAGGACAGGGACCUTT (SEQ ID NO : 1373)	AGGUCCCUGUCCUGGGUAATT (SEQ ID NO : 1815)	1.2
RAG3A-513	ATGTGCCCCGCACCTGACA (SEQ ID NO : 932)	AUGUGCCCCGCACCUGACATT (SEQ ID NO : 1374)	UGUCAGGUGCGGGGCACAUTT (SEQ ID NO : 1816)	1.2
RAG3A-1286	GAGGTCGCTCCTCATTCTT (SEQ ID NO : 933)	GAGGUCGCUCCUCAUUCUUTT (SEQ ID NO : 1375)	AAGAAUGAGGAGCGACCUCTT (SEQ ID NO : 1817)	1.2

RAG3A-653	AGGAGATGGAAGACGGAGA (SEQ ID NO : 934)	AGGAGAUGGAAGACGGAGATT (SEQ ID NO : 1376)	UCUCCGUCUUCCAUCUCCUTT (SEQ ID NO : 1818)	1.2
RAG3A-1014	AGCTATCCCAGCACCCTCC (SEQ ID NO : 935)	AGCUAUCCCAGCACCCUCCTT (SEQ ID NO : 1377)	GGAGGGUGCUGGGAUAGCUTT (SEQ ID NO : 1819)	1.2
RAG3A-61	AGAGAAGGCGTCACTTCCG (SEQ ID NO : 936)	AGAGAAGGCGUCACUUCCGTT (SEQ ID NO : 1378)	CGGAAGUGACGCCUUCUCUTT (SEQ ID NO : 1820)	1.2
RAG3A-666	CATGTGGAACGGTAGGAGA (SEQ ID NO : 937)	CAUGUGGAACGGUAGGAGATT (SEQ ID NO : 1379)	UCUCCUACCGUUCCACAUGTT (SEQ ID NO : 1821)	1.2
RAG3A-348	AAGCAAGCATCCTGTTGGA (SEQ ID NO : 938)	AAGCAAGCAUCCUGUUGGATT (SEQ ID NO : 1380)	UCCAACAGGAUGCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1822)	1.2
RAG3A-545	AGGCTTAACCCAGTGCACG (SEQ ID NO : 939)	AGGCUUAACCCAGUGCACGTT (SEQ ID NO : 1381)	CGUGCACUGGGUUAAGCCUTT (SEQ ID NO : 1823)	1.2
RAG3A-584	TCTAAGCCACTGGACCCCA (SEQ ID NO : 940)	UCUAAGCCACUGGACCCCATT (SEQ ID NO : 1382)	UGGGGUCCAGUGGCUUAGATT (SEQ ID NO : 1824)	1.2
RAG3A-1162	GTCCCCTCTTGCTTTCTCA (SEQ ID NO : 941)	GUCCCCUCUUGCUUUCUCATT (SEQ ID NO : 1383)	UGAGAAAGCAAGAGGGGACTT (SEQ ID NO : 1825)	1.2
RAG3A-308	CCAGGGAAAAGAAATTTGG (SEQ ID NO : 942)	CCAGGGAAAAGAAAUUUGGTT (SEQ ID NO : 1384)	CCAAAUUUCUUUUCCCUGGTT (SEQ ID NO : 1826)	1.2
RAG3A-158	CCCATGTCCAGGAAAAGAT (SEQ ID NO : 943)	CCCAUGUCCAGGAAAAGAUTT (SEQ ID NO : 1385)	AUCUUUUCCUGGACAUGGGTT (SEQ ID NO : 1827)	1.2
RAG3A-161	TTGCCCATGTCCAGGAAAA (SEQ ID NO : 944)	UUGCCCAUGUCCAGGAAAATT (SEQ ID NO : 1386)	UUUUCCUGGACAUGGGCAATT (SEQ ID NO : 1828)	1.2
RAG3A-1253	AGGGACCTAGCCAGAAACC (SEQ ID NO : 945)	AGGGACCUAGCCAGAAACCTT (SEQ ID NO : 1387)	GGUUUCUGGCUAGGUCCCUTT (SEQ ID NO : 1829)	1.2
RAG3A-926	CAGACATGCCCATCCTTGG (SEQ ID NO : 946)	CAGACAUGCCCAUCCUUGGTT (SEQ ID NO : 1388)	CCAAGGAUGGGCAUGUCUGTT (SEQ ID NO : 1830)	1.2
RAG3A-1191	TTGTAACTTATCCTCAGGC (SEQ ID NO : 947)	UUGUAACUUAUCCUCAGGCTT (SEQ ID NO : 1389)	GCCUGAGGAUAAGUUACAATT (SEQ ID NO : 1831)	1.2
RAG3A-697	GGACACATGGGCCTGGTTA (SEQ ID NO : 948)	GGACACAUGGGCCUGGUUATT (SEQ ID NO : 1390)	UAACCAGGCCCAUGUGUCCTT (SEQ ID NO : 1832)	1.2

RAG3A-1224	CCCCTTCTGTGGAGTGACA (SEQ ID NO : 949)	CCCCUUCUGUGGAGUGACATT (SEQ ID NO : 1391)	UGUCACUCCACAGAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1833)	1.2
RAG3A-964	GGACGGGAAAATTCCAGGA (SEQ ID NO : 950)	GGACGGGAAAAUUCCAGGATT (SEQ ID NO : 1392)	UCCUGGAAUUUUCCCGUCCTT (SEQ ID NO : 1834)	1.2
RAG3A-791	AAAGCAAAGGAGCTAGAGC (SEQ ID NO : 951)	AAAGCAAAGGAGCUAGAGCTT (SEQ ID NO : 1393)	GCUCUAGCUCCUUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1835)	1.2
RAG3A-526	TGTGCGCACATACATGTGC (SEQ ID NO : 952)	UGUGCGCACAUACAUGUGCTT (SEQ ID NO : 1394)	GCACAUGUAUGUGCGCACATT (SEQ ID NO : 1836)	1.2
RAG3A-972	GTCTGGCTGGACGGGAAAA (SEQ ID NO : 953)	GUCUGGCUGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO : 1395)	UUUUCCCGUCCAGCCAGACTT (SEQ ID NO : 1837)	1.2
RAG3A-289	ATAGCCAGGGAGTGAAAAC (SEQ ID NO : 954)	AUAGCCAGGGAGUGAAAACTT (SEQ ID NO : 1396)	GUUUUCACUCCCUGGCUAUTT (SEQ ID NO : 1838)	1.2
RAG3A-255	CAAGACCTCTGTGCTTCTT (SEQ ID NO : 955)	CAAGACCUCUGUGCUUCUUTT (SEQ ID NO : 1397)	AAGAAGCACAGAGGUCUUGTT (SEQ ID NO : 1839)	1.2
RAG3A-1000	CCTCCTTCCTAATCTTGGG (SEQ ID NO : 956)	CCUCCUUCCUAAUCUUGGGTT (SEQ ID NO : 1398)	CCCAAGAUUAGGAAGGAGGGTT (SEQ ID NO : 1840)	1.2
RAG3A-694	CACATGGGCCTGGTTATTC (SEQ ID NO : 957)	CACAUGGGCCUGGUUAUUCTT (SEQ ID NO : 1399)	GAAUAACCAGGCCCAUGUGTT (SEQ ID NO : 1841)	1.2
RAG3A-549	GCTCAGGCTTAACCCAGTG (SEQ ID NO : 958)	GCUCAGGCUUAACCCAGUGTT (SEQ ID NO : 1400)	CACUGGGUUAAGCCUGAGCTT (SEQ ID NO : 1842)	1.2
RAG3A-1240	GAAACCGGCAGCATTCCCC (SEQ ID NO : 959)	GAAACCGGCAGCAUUCCCCTT (SEQ ID NO : 1401)	GGGGAAUGCUGCCGGUUUCTT (SEQ ID NO : 1843)	1.2
RAG3A-978	CATCTCGTCTGGCTGGACG (SEQ ID NO : 960)	CAUCUCGUCUGGCUGGACGTT (SEQ ID NO : 1402)	CGUCCAGCCAGACGAGAUGTT (SEQ ID NO : 1844)	1.2
RAG3A-1290	CTCTGAGGTCGCTCCTCAT (SEQ ID NO : 961)	CUCUGAGGUCGCUCCUCAUTT (SEQ ID NO : 1403)	AUGAGGAGCGACCUCAGAGTT (SEQ ID NO : 1845)	1.2
RAG3A-1006	CAGCACCCTCCTTCCTAAT (SEQ ID NO : 962)	CAGCACCCUCCUUCCUAAUTT (SEQ ID NO : 1404)	AUUAGGAAGGGAGGGUGCUGTT (SEQ ID NO : 1846)	1.2
RAG3A-1311	TAGCCTGCCTCCCTACCTT (SEQ ID NO : 963)	UAGCCUGCCUCCCUACCUUTT (SEQ ID NO : 1405)	AAGGUAGGGAGGCAGGCUATT (SEQ ID NO : 1847)	1.2

RAG3A-42	GGGGCCTTCACCAGTGTCT (SEQ ID NO : 964)	GGGGCCUUCACCAGUGUCUTT (SEQ ID NO : 1406)	AGACACUGGUGAAGGCCCCTT (SEQ ID NO : 1848)	1.2
RAG3A-21	TGGCTCCCCTTCTCTGATTG (SEQ ID NO : 965)	UGGCUCCCCUUCUCUGAUUGTT (SEQ ID NO : 1407)	CAAUCAGAGAAGGGAGCCATT (SEQ ID NO : 1849)	1.2
RAG3A-59	AGAAGGCGTCACTTCCGGG (SEQ ID NO : 966)	AGAAGGCGUCACUUCCGGGTT (SEQ ID NO : 1408)	CCCGGAAGUGACGCCUUCUTT (SEQ ID NO : 1850)	1.2
RAG3A-1187	AACTTATCCTCAGGCGCAT (SEQ ID NO : 967)	AACUUAUCCUCAGGCGCAUTT (SEQ ID NO : 1409)	AUGCGCCUGAGGAUAAGUUTT (SEQ ID NO : 1851)	1.2
RAG3A-576	ACTGGACCCCAGCAGACGA (SEQ ID NO : 968)	ACUGGACCCCAGCAGACGATT (SEQ ID NO : 1410)	UCGUCUGCUGGGGUCCAGUTT (SEQ ID NO : 1852)	1.1
RAG3A-639	GGAGACAGAACAAGCAAAG (SEQ ID NO : 969)	GGAGACAGAACAAGCAAAGTT (SEQ ID NO : 1411)	CUUUGCUUGUUCUGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1853)	1.1
RAG3A-815	TGTGGGGAGACTGGGACTG (SEQ ID NO : 970)	UGUGGGGAGACUGGGACUGTT (SEQ ID NO : 1412)	CAGUCCCAGUCUCCCCACATT (SEQ ID NO : 1854)	1.1
RAG3A-957	AAAATTCCAGGATCTAGGC (SEQ ID NO : 971)	AAAAUUCCAGGAUCUAGGCTT (SEQ ID NO : 1413)	GCCUAGAUCCUGGAAUUUUTT (SEQ ID NO : 1855)	1.1
RAG3A-1217	TGTGGAGTGACAGTATCTC (SEQ ID NO : 972)	UGUGGAGUGACAGUAUCUCTT (SEQ ID NO : 1414)	GAGAUACUGUCACUCCACATT (SEQ ID NO : 1856)	1.1
RAG3A-1165	ACAGTCCCCTCTTGCTTTC (SEQ ID NO : 973)	ACAGUCCCCUCUUGCUUUCTT (SEQ ID NO : 1415)	GAAAGCAAGAGGGGACUGUTT (SEQ ID NO : 1857)	1.1
RAG3A-1134	TTCACCCAAGGGACCCTCT (SEQ ID NO : 974)	UUCACCCAAGGGACCCUCUTT (SEQ ID NO : 1416)	AGAGGGUCCCUUGGGUGAATT (SEQ ID NO : 1858)	1.1
RAG3A-667	ACATGTGGAACGGTAGGAG (SEQ ID NO : 975)	ACAUGUGGAACGGUAGGAGTT (SEQ ID NO : 1417)	CUCCUACCGUUCCACAUGUTT (SEQ ID NO : 1859)	1.1
RAG3A-1339	CAAACCCTCACCACCCTCT (SEQ ID NO : 976)	CAAACCCUCACCACCCUCUTT (SEQ ID NO : 1418)	AGAGGGUGGGUGAGGGUUUGTT (SEQ ID NO : 1860)	1.1
RAG3A-676	CCTCTTGTCACATGTGGAA (SEQ ID NO : 977)	CCUCUUGUCACAUGUGGAATT (SEQ ID NO : 1419)	UUCCACAUGUGACAAGAGGTT (SEQ ID NO : 1861)	1.1
RAG3A-153	GTCCAGGAAAAGATGGATC (SEQ ID NO : 978)	GUCCAGGAAAAGAUGGAUCTT (SEQ ID NO : 1420)	GAUCCAUCUUUUCCUGGACTT (SEQ ID NO : 1862)	1.1

RAG3A-320	CAGGTATGATGTCCAGGGA (SEQ ID NO : 979)	CAGGUAUGAUGUCCAGGGATT (SEQ ID NO : 1421)	UCCCUGGACAUCAUACCUGTT (SEQ ID NO : 1863)	1.1
RAG3A-1010	ATCCCAGCACCCTCCTTCC (SEQ ID NO : 980)	AUCCCAGCACCCUCCUUCCTT (SEQ ID NO : 1422)	GGAAGGAGGGUGCUGGGAUTT (SEQ ID NO : 1864)	1.1
RAG3A-999	CTCCTTCCTAATCTTGGGA (SEQ ID NO : 981)	CUCCUUCCUAAUCUUGGGATT (SEQ ID NO : 1423)	UCCCAAGAUUAGGAAGGAGTT (SEQ ID NO : 1865)	1.1
RAG3A-567	CAGCAGACGAGCACCTAAG (SEQ ID NO : 982)	CAGCAGACGAGCACCUAAGTT (SEQ ID NO : 1424)	CUUAGGUGCUCGUCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1866)	1.1
RAG3A-862	GGATGATGGGATCAAGGTC (SEQ ID NO : 983)	GGAUGAUGGGAUCAAGGUCTT (SEQ ID NO : 1425)	GACCUUGAUCCCAUCAUCCTT (SEQ ID NO : 1867)	1.1
RAG3A-460	CACCAACCCATAACAGGAG (SEQ ID NO : 984)	CACCAACCCAUAACAGGAGTT (SEQ ID NO : 1426)	CUCCUGUUAUGGGUUGGUGTT (SEQ ID NO : 1868)	1.1
RAG3A-921	ATGCCCATCCTTGGGGAGG (SEQ ID NO : 985)	AUGCCCAUCCUUGGGGAGGTT (SEQ ID NO : 1427)	CCUCCCCAAGGAUGGGCAUTT (SEQ ID NO : 1869)	1.1
RAG3A-704	AAGACAGGGACACATGGGC (SEQ ID NO : 986)	AAGACAGGGACACAUGGGCTT (SEQ ID NO : 1428)	GCCCAUGUGUCCCUGUCUUTT (SEQ ID NO : 1870)	1.1
RAG3A-233	CAGCAACACAAATGTCCTG (SEQ ID NO : 987)	CAGCAACACAAAUGUCCUGTT (SEQ ID NO : 1429)	CAGGACAUUUGUGUUGCUGTT (SEQ ID NO : 1871)	1.1
RAG3A-1203	ATCTCCCTCTCATTGTAAC (SEQ ID NO : 988)	AUCUCCCUCUCAUUGUAACTT (SEQ ID NO : 1430)	GUUACAAUGAGAGGGAGAUTT (SEQ ID NO : 1872)	1.1
RAG3A-247	CTGTGCTTCTTCCCCAGCA (SEQ ID NO : 989)	CUGUGCUUCUUCCCCAGCATT (SEQ ID NO : 1431)	UGCUGGGGAAGAAGCACAGTT (SEQ ID NO : 1873)	1.1
RAG3A-721	CAGCAGCTGTCTTTCCTAA (SEQ ID NO : 990)	CAGCAGCUGUCUUUCCUAATT (SEQ ID NO : 1432)	UUAGGAAAGACAGCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1874)	1.1
RAG3A-391	ACAAGATAGGACTCCCTAG (SEQ ID NO : 991)	ACAAGAUAGGACUCCCUAGTT (SEQ ID NO : 1433)	CUAGGGAGUCCUAUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1875)	1.1
RAG3A-159	GCCCATGTCCAGGAAAAGA (SEQ ID NO : 992)	GCCCAUGUCCAGGAAAAGATT (SEQ ID NO : 1434)	UCUUUUCCUGGACAUGGGCTT (SEQ ID NO : 1876)	1.1
RAG3A-437	CTCTCATGTGGGCAATATC (SEQ ID NO : 993)	CUCUCAUGUGGGCAAUAUCTT (SEQ ID NO : 1435)	GAUAUUGCCCACAUGAGAGTT (SEQ ID NO : 1877)	1.1

RAG3A-29	GTGTCTGGTGGCTCCCTTC (SEQ ID NO : 994)	GUGUCUGGUGGCUCCCUUCTT (SEQ ID NO : 1436)	GAAGGGAGCCACCAGACACTT (SEQ ID NO : 1878)	1:1
RAG3A-63	GAAGAGAAGGCGTCACTTC (SEQ ID NO : 995)	GAAGAGAAGGCGUCACUUCTT (SEQ ID NO : 1437)	GAAGUGACGCCUUCUCUUCTT (SEQ ID NO : 1879)	1:1
RAG3A-996	CTTCCTAATCTTGGGAGAC (SEQ ID NO : 996)	CUUCCUAAUCUUGGGAGACTT (SEQ ID NO : 1438)	GUCUCCCAAGAUUAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1880)	1:1
RAG3A-1083	TTGGTTCCCTGGTCATGCC (SEQ ID NO : 997)	UUGGUUCCCUGGUCAUGCCTT (SEQ ID NO : 1439)	GGCAUGACCAGGGAACCAATT (SEQ ID NO : 1881)	1:1
RAG3A-1128	CAAGGGACCCTCTGCCTCT (SEQ ID NO : 998)	CAAGGGACCCUCUGCCUCUTT (SEQ ID NO : 1440)	AGAGGCAGAGGGUCCCUUGTT (SEQ ID NO : 1882)	1:1
RAG3A-1094	CCTCCTTTCTCTTGGTTCC (SEQ ID NO : 999)	CCUCCUUUCUCUUGGUUCCTT (SEQ ID NO : 1441)	GGAACCAAGAGAAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1883)	1:1
RAG3A-771	AGGGCCAAAGGAAAAGGGG (SEQ ID NO : 1000)	AGGGCCAAAGGAAAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1442)	CCCCUUUUCCUUUGGCCCUTT (SEQ ID NO : 1884)	1:1
RAG3A-287	AGCCAGGGAGTGAAAACCC (SEQ ID NO : 1001)	AGCCAGGGAGUGAAAACCCTT (SEQ ID NO : 1443)	GGGUUUUCACUCCCUGGCUTT (SEQ ID NO : 1885)	1:1
RAG3A-981	AGACATCTCGTCTGGCTGG (SEQ ID NO : 1002)	AGACAUCUCGUCUGGCUGGTT (SEQ ID NO : 1444)	CCAGCCAGACGAGAUGUCUTT (SEQ ID NO : 1886)	1:1
RAG3A-23	GGTGGCTCCCTTCTCTGAT (SEQ ID NO : 1003)	GGUGGCUCCCUUCUCUGAUTT (SEQ ID NO : 1445)	AUCAGAGAAGGGAGCCACCTT (SEQ ID NO : 1887)	1:1
RAG3A-1072	GTCATGCCTGCCTCCCTGT (SEQ ID NO : 1004)	GUCAUGCCUGCCUCCCUGUTT (SEQ ID NO : 1446)	ACAGGGAGGCAGGCAUGACTT (SEQ ID NO : 1888)	1:1
RAG3A-415	GTTCCCACTTCGAAAGGGG (SEQ ID NO : 1005)	GUUCCCACUUCGAAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1447)	CCCCUUUCGAAGUGGGAACTT (SEQ ID NO : 1889)	1:1
RAG3A-1287	TGAGGTCGCTCCTCATTCT (SEQ ID NO : 1006)	UGAGGUCGCUCCUCAUUCUTT (SEQ ID NO : 1448)	AGAAUGAGGAGCGACCUCATT (SEQ ID NO : 1890)	1:1
RAG3A-1201	CTCCCTCTCATTGTAACTT (SEQ ID NO : 1007)	CUCCCUCUCAUUGUAACUUTT (SEQ ID NO : 1449)	AAGUUACAAUGAGAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1891)	1:1
RAG3A-772	CAGGGCCAAAGGAAAAGGG (SEQ ID NO : 1008)	CAGGGCCAAAGGAAAAGGGTT (SEQ ID NO : 1450)	CCCUUUUCCUUUGGCCCUGTT (SEQ ID NO : 1892)	1:1

RAG3A-1249	ACCTAGCCAGAAACCGGCA (SEQ ID NO : 1009)	ACCUAGCCAGAAACCGGCATT (SEQ ID NO : 1451)	UGCCGGUUUCUGGCUAGGUTT (SEQ ID NO : 1893)	1.1
RAG3A-546	CAGGCTTAACCCAGTGCAC (SEQ ID NO : 1010)	CAGGCUUAACCCAGUGCACTT (SEQ ID NO : 1452)	GUGCACUGGGUUAAGCCUGTT (SEQ ID NO : 1894)	1.1
RAG3A-160	TGCCCATGTCCAGGAAAAG (SEQ ID NO : 1011)	UGCCCAUGUCCAGGAAAAGTT (SEQ ID NO : 1453)	CUUUUCCUGGACAUGGGCATT (SEQ ID NO : 1895)	1.1
RAG3A-64	GGAAGAGAAGGCGTCACTT (SEQ ID NO : 1012)	GGAAGAGAAGGCGUCACUUTT (SEQ ID NO : 1454)	AAGUGACGCCUUCUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1896)	1.1
RAG3A-1002	ACCCTCCTTCCTAATCTTG (SEQ ID NO : 1013)	ACCCUCCUUCCUAAUCUUGTT (SEQ ID NO : 1455)	CAAGAUUAGGAAGGAGGGUTT (SEQ ID NO : 1897)	1.1
RAG3A-1288	CTGAGGTCGCTCCTCATTC (SEQ ID NO : 1014)	CUGAGGUCGCUCCUCAUUCTT (SEQ ID NO : 1456)	GAAUGAGGAGCGACCUCAGTT (SEQ ID NO : 1898)	1.1
RAG3A-891	AGAGCCTGAGGAAGTTCTG (SEQ ID NO : 1015)	AGAGCCUGAGGAAGUUCUGTT (SEQ ID NO : 1457)	CAGAACUUCCUCAGGCUCUTT (SEQ ID NO : 1899)	1.1
RAG3A-231	GCAACACAAATGTCCTGCC (SEQ ID NO : 1016)	GCAACACAAAUGUCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1458)	GGCAGGACAUUUGUGUUGCTT (SEQ ID NO : 1900)	1.1
RAG3A-669	TCACATGTGGAACGGTAGG (SEQ ID NO : 1017)	UCACAUGUGGAACGGUAGGTT (SEQ ID NO : 1459)	CCUACCGUUCCACAUGUGATT (SEQ ID NO : 1901)	1.1
RAG3A-1009	TCCCAGCACCCTCCTTCCT (SEQ ID NO : 1018)	UCCCAGCACCCUCCUUCCUTT (SEQ ID NO : 1460)	AGGAAGGAGGGUGCUGGGATT (SEQ ID NO : 1902)	1.1
RAG3A-656	GGTAGGAGATGGAAGACGG (SEQ ID NO : 1019)	GGUAGGAGAUGGAAGACGGTT (SEQ ID NO : 1461)	CCGUCUUCCAUCUCCUACCTT (SEQ ID NO : 1903)	1.1
RAG3A-229	AACACAAATGTCCTGCCAG (SEQ ID NO : 1020)	AACACAAAUGUCCUGCCAGTT (SEQ ID NO : 1462)	CUGGCAGGACAUUUGUGUUTT (SEQ ID NO : 1904)	1.1
RAG3A-484	CCCGTCCAAACCCTTTCCC (SEQ ID NO : 1021)	CCCGUCCAAACCCUUUCCCTT (SEQ ID NO : 1463)	GGGAAAGGGUUUGGACGGGTT (SEQ ID NO : 1905)	1.1
RAG3A-799	CTGGGAAGAAAGCAAAGGA (SEQ ID NO : 1022)	CUGGGAAGAAAGCAAAGGATT (SEQ ID NO : 1464)	UCCUUUGCUUUCUUCCCAGTT (SEQ ID NO : 1906)	1.1
RAG3A-296	AATTTGGATAGCCAGGGAG (SEQ ID NO : 1023)	AAUUUGGAUAGCCAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1465)	CUCCCUGGCUAUCCAAAUUTT (SEQ ID NO : 1907)	1.1

RAG3A-1183	TATCCTCAGGCGCATTCGA (SEQ ID NO : 1024)	UAUCCUCAGGCGCAUUCGATT (SEQ ID NO : 1466)	UCGAAUGCGCCUGAGGAUATT (SEQ ID NO : 1908)	1:1
RAG3A-380	CTCCCTAGGGGATTACAGA (SEQ ID NO : 1025)	CUCCCUAGGGGAUUACAGATT (SEQ ID NO : 1467)	UCUGUAAUCCCCUAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1909)	1:1
RAG3A-157	CCATGTCCAGGAAAAGATG (SEQ ID NO : 1026)	CCAUGUCCAGGAAAAGAUGTT (SEQ ID NO : 1468)	CAUCUUUUCCUGGACAUGGTT (SEQ ID NO : 1910)	1:1
RAG3A-1185	CTTATCCTCAGGCGCATTC (SEQ ID NO : 1027)	CUUAUCCUCAGGCGCAUUCTT (SEQ ID NO : 1469)	GAAUGCGCCUGAGGAUAAGTT (SEQ ID NO : 1911)	1:1
RAG3A-1244	GCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO : 1028)	GCCAGAAACCGGCAGCAUUTT (SEQ ID NO : 1470)	AAUGCUGCCGGUUUCUGGCTT (SEQ ID NO : 1912)	1:1
RAG3A-588	GCCATCTAAGCCACTGGAC (SEQ ID NO : 1029)	GCCAUCUAAGCCACUGGACTT (SEQ ID NO : 1471)	GUCCAGUGGGCUUAGAUGGCTT (SEQ ID NO : 1913)	1:1
RAG3A-436	TCTCATGTGGGCAATATCC (SEQ ID NO : 1030)	UCUCAUGUGGGCAAUAUCCTT (SEQ ID NO : 1472)	GGAUAUUGCCCACAUGAGATT (SEQ ID NO : 1914)	1:1
RAG3A-1029	ACCCACTATCCTCCCAGCT (SEQ ID NO : 1031)	ACCCACUAUCCUCCCAGCUTT (SEQ ID NO : 1473)	AGCUGGGAGGAUAGUGGGUTT (SEQ ID NO : 1915)	1:1
RAG3A-28	TGTCTGGTGGCTCCCTTCT (SEQ ID NO : 1032)	UGUCUGGUGGCUCCCUUCUTT (SEQ ID NO : 1474)	AGAAGGGAGCCACCAGACATT (SEQ ID NO : 1916)	1:1
RAG3A-234	CCAGCAACACAAATGTCCT (SEQ ID NO : 1033)	CCAGCAACACAAAUGUCCUTT (SEQ ID NO : 1475)	AGGACAUUUGUGUUGCUGGTT (SEQ ID NO : 1917)	1:1
RAG3A-249	CTCTGTGCTTCTTCCCCAG (SEQ ID NO : 1034)	CUCUGUGCUUCUUCCCCAGTT (SEQ ID NO : 1476)	CUGGGGAAGAAGCACAGAGTT (SEQ ID NO : 1918)	1:1
RAG3A-775	AGCCAGGGCCAAAGGAAAA (SEQ ID NO : 1035)	AGCCAGGGCCAAAGGAAAATT (SEQ ID NO : 1477)	UUUUCCUUUGGCCCUGGCUTT (SEQ ID NO : 1919)	1:1
RAG3A-951	CCAGGATCTAGGCCACACT (SEQ ID NO : 1036)	CCAGGAUCUAGGCCACACUTT (SEQ ID NO : 1478)	AGUGUGGCCUAGAUCCUGGTT (SEQ ID NO : 1920)	1:1
RAG3A-861	GATGATGGGATCAAGGTCA (SEQ ID NO : 1037)	GAUGAUGGGAUCAAGGUCATT (SEQ ID NO : 1479)	UGACCUUGAUCCCAUCAUCTT (SEQ ID NO : 1921)	1:1
RAG3A-259	TAAACAAGACCTCTGTGCT (SEQ ID NO : 1038)	UAAACAAGACCUCUGUGCUTT (SEQ ID NO : 1480)	AGCACAGAGGUCUUGUUUATT (SEQ ID NO : 1922)	1:1

RAG3A-394	ATGACAAGATAGGACTCCC (SEQ ID NO : 1039)	AUGACAAGAUAGGACUCCCTT (SEQ ID NO : 1481)	GGGAGUCCUAUCUUGUCAUTT (SEQ ID NO : 1923)	1.1
RAG3A-534	AGTGCACGTGTGCGCACAT (SEQ ID NO : 1040)	AGUGCACGUGUGCGCACAUTT (SEQ ID NO : 1482)	AUGUGCGCACACGUGCACUTT (SEQ ID NO : 1924)	1.1
RAG3A-316	TATGATGTCCAGGGAAAAG (SEQ ID NO : 1041)	UAUGAUGUCCAGGGAAAAGTT (SEQ ID NO : 1483)	CUUUUCCCUGGACAUCAUATT (SEQ ID NO : 1925)	1.1
RAG3A-560	CGAGCACCTAAGCTCAGGC (SEQ ID NO : 1042)	CGAGCACCUAAGCUCAGGCTT (SEQ ID NO : 1484)	GCCUGAGCUUAGGUGCUCGTT (SEQ ID NO : 1926)	1.1
RAG3A-1105	CCCACTCCCAGCCTCCTTT (SEQ ID NO : 1043)	CCCACUCCCAGCCUCCUUUTT (SEQ ID NO : 1485)	AAAGGAGGCUGGGAGUGGGTT (SEQ ID NO : 1927)	1.1
RAG3A-709	TTCCTAAGACAGGGACACA (SEQ ID NO : 1044)	UUCCUAAGACAGGGACACATT (SEQ ID NO : 1486)	UGUGUCCCUGUCUUAGGAATT (SEQ ID NO : 1928)	1.1
RAG3A-948	GGATCTAGGCCACACTTCT (SEQ ID NO : 1045)	GGAUCUAGGCCACACUUCUTT (SEQ ID NO : 1487)	AGAAGUGUGGGCCUAGAUCCTT (SEQ ID NO : 1929)	1.1
RAG3A-998	TCCTTCCTAATCTTGGGAG (SEQ ID NO : 1046)	UCCUUCCUAAUCUUGGGAGTT (SEQ ID NO : 1488)	CUCCCAAGAUUAGGAAGGATT (SEQ ID NO : 1930)	1.1
RAG3A-387	GATAGGACTCCCTAGGGGA (SEQ ID NO : 1047)	GAUAGGACUCCCUAGGGGATT (SEQ ID NO : 1489)	UCCCCUAGGGAGUCCUAUCTT (SEQ ID NO : 1931)	1.1

对 833 个 saRNA 的活性按照其在 *THPO* 启动子上的位置排列，很明显地看到功能性 saRNA 的分布呈现聚集现象，即在某些启动子区域，激活性 saRNA 聚集在特定的"热点（hot spot）"区域（图 11）。如图 11 所示，在启动子的-1339/-1044 区域（H1）、-1027/-903 区域（H2）、-861/-754 区域（H3）、-728/-611 区域（H4）和-593/-1（H5）分别出现 5 个热点区域，表现为激活性 saRNA 的高度聚集。该分析结果表明，激活性 saRNA 在启动子上并非随机分布，而是存在特定的热点区域。

热点 H1（5'至 3'：-1339 至-1044）序列，其对应于序列表中 SEQ ID NO:601 从 5'至 3'的位置 1 至位置 296：

1 caaaccctca ccaccctctc tcactgccta gcctgcctcc ctaccttctc
51 tctgaggtcg ctcctcattc ttgtgttacc caggacaggg acctagccag
101 aaaccggcag cattcccccc tctgtggagt gacagtatct ccctctcatt
151 gtaacttatc ctcaggcgca ttcgacagtc ccctcttgct ttctcacccc
201 cttccttcac ccaagggacc ctctgcctct ccagcccact cccagcctcc
251 tttctcttgg ttccctggtc atgcctgcct ccctgtctcc tgtctc

热点 H2（5'至 3'：-1027 至-903）序列，其对应于序列表中 SEQ ID NO:602 从 5'至 3'的位置 1 至位置 125：

1 ccactatcct cccagctatc ccagcaccct ccttcctaat cttgggagac
51 atctcgtctg gctggacggg aaaattccag gatctaggcc acacttctca
101 gcagacatgc ccatccttgg ggagg

热点 H3（5'至 3'：-861 至-754）序列，其对应于序列表中 SEQ ID NO:603 从 5'至 3'的位置 1 至位置 108：

1 gatgatggga tcaaggtcag gccaggaagc ccctgaggac agagactgtg
51 gggagactgg gactgggaag aaagcaaagg agctagagcc agggccaaag
101 gaaaaggg

热点 H4（5'至 3'：-728 至-611）序列，其对应于序列表中 SEQ ID NO:604 从 5'至 3'的位置 1 至位置 118：

1 ggaggtccag cagctgtctt tcctaagaca gggacacatg ggcctggtta
51 ttcctcttgt cacatgtgga acggtaggag atggaagacg gagacagaac
101 aagcaaagga gggccctg

热点 H5（5'至 3'：-593 至-1）序列，其对应于序列表中 SEQ ID NO:605 从 5'至 3'的位置 1 至位置 593：

1 gtgtagccat ctaagccact ggaccccagc agacgagcac ctaagctcag
51 gcttaaccca gtgcacgtgt gcgcacatac atgtgccccg cacctgacag
101 tccactcaac ccgtccaaac cctttcccca taacaccaac ccataacagg
151 agatttctct catgtgggca atatccgtgt tcccacttcg aaaggggggaa
201 tgacaagata ggactcccta ggggattaca gaaagaaaag caggaaagca
251 agcatcctgt tggatttcag cagcaggtat gatgtccagg gaaaagaaat
301 ttggatagcc agggagtgaa aaccccacca atcttaaaca agacctctgt
351 gcttcttccc cagcaacaca aatgtcctgc cagattcctc ctggaaaaaa
401 acttctgctc ctgtcccccc ccaggtccca ggttgcccat gtccaggaaa
451 agatggatcc ccctatccaa atcttctccg tggtgtgtgt gggtggagga
501 gtggaccctg gtccaggcag gggctccagg gaagagaagg cgtcacttcc

551 gggggccttc accagtgtct ggtggctccc ttctctgatt ggg

实施例 10. 人 *THPO* saRNA 促进人肝癌细胞（HepG2）*THPO* mRNA 的表达

（1）细胞培养和转染

细胞培养如实施例 9 所述，HepG2 细胞（购自中国科学院上海生命科学研究院，TCHu119）以每孔 2×10^5 个铺板到六孔板中，依照制造商的说明，使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以 25 nM（除非另有说明）浓度转染人 *THPO* saRNA，转染时间为 72 小时，每种处理使用 2 个复孔。。

（2）二步法 RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入500 μl细胞裂解液，室温孵育5分钟。用Qiagen RNeasy试剂盒提取RNA，反转录后在ABI 7500 快速实时（Fast Real-time）PCR系统（Applied Biosystems）进行qPCR分析，每个样本重复3个复孔扩增，RT-PCR 和qPCR反应体系如实施例5中的表5和表6所示，扩增引物见表11。同时扩增*TBP*和*HPRT1*基因作为内参，其中*THPO*用*THPO* F1/R1引物对扩增。

反应条件为：95℃30秒， 95℃ 5秒，60℃ 30 秒，扩增40个循环。

为了计算某个saRNA转染样本的*THPO*（目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用实施例3中的公式2代入目的基因及2个内参基因的Ct值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \qquad (公式\ 2)$$

图 12 所示为不同 saRNA 处理后细胞中的 *THPO* 相对 mRNA 的表达值。以对照处理（Mock）作为空白转染对照，与对照组相比，siRNA (RAG3A-365i) 组的 mRNA 相对表达值敲低了 85%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。RAG3A-1219、RAG3A-1096、RAG3A-1308、RAG3A-1069 和 RAG3A-851 组的 mRNA 相对表达值均高于对照组，其 mRNA 相对表达值分别上升了 1.8、1.8、1.6、1.7 和 1.9 倍。RAG3A-541、RAG3A-1319、RAG3A-62、RAG3A-889 和 RAG3A-787 组的 mRNA 相对表达值也高于对照组，分别增加了 2.5、2.1、2.9、2.0 和 2.0 倍。RAG3A-62 的激活效果尤为明显，其 mRNA 相对表达值增加了近 3 倍。这说明随机选择的激活性 saRNA 不仅能够被成功转染到在 HepG2 细胞中，而且能够显著地增加 *THPO* mRNA 的表达。

实施例 11. 人 *THPO* saRNA 促进人肝癌细胞（HepG2）THPO 蛋白水平的表达

细胞培养如实施例 9 所述，细胞转染如实施例 10 所述。使用 ELISA Kit 检测 HepG2 细胞培养液中 THPO 蛋白水平

1) 用去离子水或蒸馏水溶解人 THPO 蛋白标准品。溶解产生 20,000 pg/mL 蛋白标准品的储备溶液。取 100 μL THPO 蛋白标准品储备液加入 900μL 校准稀释剂 RD6-11(稀释 1:5)(用于细胞培养上清样品)或校准稀释剂 RD6-11(用于血清/血浆样品)得到 2000 pg/mL 的标准品溶液，在此基础上 7 个梯度稀释，适当的校准稀释剂作为零标准(0 pg/mL)。

2) 取样品的细胞上清液，离心去掉死细胞和碎片。

3) 从微孔板框上取出适量的微孔板带。

4) 每孔加入 50 μL 的分析稀释剂 RD1-1。

5) 每孔加入 200 μL 的标准品、对照或者处理样品。盖上膜，室温孵育 3h。

6) 去掉每个孔的液体随后用 400 μL 洗涤缓冲液清洗 4 次。

7) 每孔加入 200 μL 的人 THPO 抗体盖上膜室温孵育 1h。

8) 重复步骤 5。

9) 每孔加入 200 μL 底物溶液（显色试剂（Color Regent） A 和 B 等体积混合，15 分钟之内使用完）室温避光孵育 30 分钟。

10) 每孔加入 50 μL 终止液，轻轻混匀。

11) 使用多功能酶标仪检测 450 nM 处的吸光度（30 分钟之内）。

图 13 所示为不同 saRNA 处理后细胞培养液中 THPO 相对蛋白水平的表达值。以对照处理（Mock）作为空白转染对照，与对照组相比，siRNA (DS3A-365i) 组的蛋白相对表达值敲低了 81%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。RAG3A-723、RAG3A-892、RAG3A-62、RAG3A-1178、RAG3A-889、RAG3A-563、RAG3A-487 和 RAG3A-787 组的 THPO 蛋白水平相对表达值均高于对照组，其蛋白水平相对表达值分别上升了 1.46、1.26、1.44、1.31、1.29、1.32、1.42 和 1.40 倍。这说明随机选择的激活性 saRNA 在 HepG2 细胞中能够不同程度地促进 THPO 蛋白水平的表达。

综合上述结果，申请人通过高通量分别筛选靶向人和小鼠 *THPO/Thpo* 基因启动子的 saRNA，发现了多个能够显著激活 *THPO/Thpo* 基因表达的人和小鼠的 saRNA。申请人通过大量研究发现，小鼠的靶向其 *Thpo* 基因的活性 saRNA 和人的靶向其 *THPO* 基因的活性 saRNA 均可以被本发明中使用的脂质体系统有效递送至细胞内，并且能够在 mRNA 和蛋白表达层面显著上调细胞内 *Thpo/THPO* 基因和蛋白质的表达。特别是小鼠 *Thpo* 基因的活性 saRNA，其在小鼠体内显著增加 *Thpo* mRNA 和蛋白的表达，并同时显著上调或增加血小板的数量。因此，本发明的小鼠 *Thpo* 活性 saRNA 和人 *THPO* 活性 saRNA 可用于治疗由 Thpo/THPO 蛋白表达下降或者不足引发的疾病或病症或由各种原因引起疾病或状况，如血小板减少症，或制备用于治疗上述疾病或病症的药物。

参考文献

Bartley, T. D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y. S. Li, H. S. Lu, F. Martin, M. S. Chang, B. Samal, J. L. Nichol, S. Swift, and et al. 1994. 'Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl', *Cell*, 77: 1117-24.

Basser, R. 2002. 'The impact of thrombopoietin on clinical practice', *Curr Pharm Des*, 8: 369-77.

de Sauvage, F. J., P. E. Hass, S. D. Spencer, B. E. Malloy, A. L. Gurney, S. A. Spencer, W. C. Darbonne, W. J. Henzel, S. C. Wong, W. J. Kuang, and et al. 1994. 'Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand', *Nature*, 369: 533-8.

Hassan, M. N., and E. K. Waller. 2015. 'Treating chemotherapy-induced thrombocytopenia: is it time for oncologists to use thrombopoietin agonists?', *Oncology (Williston Park)*, 29: 295-6.

Kaushansky, K. 2006. 'Lineage-specific hematopoietic growth factors', *N Engl J Med*, 354: 2034-45.

Kuter, D. J. 2009. 'Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia', *Annu Rev Med*, 60: 193-206.

Laki, K. 1972. 'Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences', *Ann N Y Acad Sci*, 202: 297-307.

Machlus, K. R., J. N. Thon, and J. E. Italiano, Jr. 2014. 'Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation', *Br J Haematol*, 165: 227-36.

Mignotte, V., I. Vigon, E. Boucher de Crevecoeur, P. H. Romeo, V. Lemarchandel, and S. Chretien. 1994. 'Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL)', *Genomics*, 20: 5-12.

Provan, D., R. Stasi, A. C. Newland, V. S. Blanchette, P. Bolton-Maggs, J. B. Bussel, B. H. Chong, D. B. Cines, T. B. Gernsheimer, B. Godeau, J. Grainger, I. Greer, B. J. Hunt, P. A. Imbach, G. Lyons, R. McMillan, F. Rodeghiero, M. A. Sanz, M. Tarantino, S. Watson, J. Young, and D. J. Kuter. 2010. 'International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia', *Blood*, 115: 168-86.

Seo, A., M. Ben-Harosh, M. Sirin, J. Stein, O. Dgany, J. Kaplelushnik, M. Hoenig, U. Pannicke, M. Lorenz, K. Schwarz, C. Stockklausner, T. Walsh, S. Gulsuner, M. K. Lee, A. Sendamarai, M. Sanchez-Bonilla, M. C. King, H. Cario, A. E. Kulozik, K. M. Debatin, A. Schulz, H. Tamary, and A. Shimamura. 2017. 'Bone marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in thrombopoietin', *Blood*, 130: 875-80.

Solberg, L. A., Jr. 2005. 'Biologic aspects of thrombopoietins and the development of therapeutic agents', *Curr Hematol Rep*, 4: 423-8.