

US008871437B2

(12) United States Patent

Inoue et al.

(54) CONSTRUCTION OF PROTEIN-RESPONSIVE SHRNA/RNAI CONTROL SYSTEM USING RNP MOTIF

- (75) Inventors: Tan Inoue, Kyoto (JP); Hirohide Saito, Kyoto (JP); Shunichi Kashida, Kyoto (JP); Karin Hayashi, Kyoto (JP)
- (73) Assignee: Japan Science and Technology Agency, Saitama (JP)
- (*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 537 days.
- (21) Appl. No.: 13/133,709
- (22) PCT Filed: Dec. 9, 2009
- (86) PCT No.: PCT/JP2009/070580
 § 371 (c)(1),
 (2), (4) Date: Jul. 13, 2011
- (87) PCT Pub. No.: WO2010/067811PCT Pub. Date: Jun. 17, 2010

(65) **Prior Publication Data**

US 2011/0263026 A1 Oct. 27, 2011

(30) Foreign Application Priority Data

Dec. 9, 2008 (JP) 2008-312951

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68	(2006.01)
C12P 19/34	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
<i>C07H 21/04</i>	(2006.01)

- (52) U.S. Cl.
 USPC 435/6; 435/91.1; 435/91.31; 435/320.1; 435/375; 435/455; 530/350; 536/23.1; 536/24.5

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

2008/0194027 A1* 8/2008 Dreyfuss et al. 435/440

(10) Patent No.: US 8,871,437 B2 (45) Date of Patent: Oct. 28, 2014

OTHER PUBLICATIONS

Beisel et al., Molecular Systems Biology, vol. 4, Article No. 224, pp. 1-14 (2008).*

Deans et al, Cell, vol. 130, pp. 363-372 (2007).*

Turner et al, RNA, vol. 11, pp. 1192-1200 (2005).*

Beisel et al., Model-guided design of ligand-regulated RNAi for programmable control of gene expression, Molecular Systems Biology, 2008, vol. 4, pp. 1-14.

Deans et al., A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells, Cell, 2007, vol. 130, No. 2, pp. 363-372.

Saito et al., Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches, Nature Communications, 2011, vol. 2., No. 160, pp. 1-8.

International Supplementary European Search Report issued Aug. 29, 2012 in European Patent Application No. EP09831915.5, PCT/JP2009070580.

Osamu Nagae et al., "Jinko RNAi/RNP o Mochiita Hito Gan Saibo deno Hon'yaku Seigyo System no Kochiku", Dai 80 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Dai 30 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Godo Taikai Koen Yoshishu, 2007, 4P-1321.

An, C. -I. et al., Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction, RNA, 2006, vol. 12, No. 5, pp. 710-716.

Hirohisa Ono et al., "RNA—Tanpakushitsu Sogo Sayo Motif L7Ae-BoxC/D o Mochiita Nanoscale Kozotai no Sekkei Oyobi Kochiku", RNA Meeting, Jul. 23, 2008, vol. 10th, p. 144.

Shun'ichi Kashida et al., "RNP Sogo Sayo o Mochiita Tanpakushitsu Otogata shRNA System no Kochiku to Apoptosis Keiro no Seigyo", Dai 82 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Program•Koen Yoshishu, Sep. 25, 2009, 4T15a-10.

Turner, B. et al., Induced fit of RNA on binding the L7Ae protein to the kink-turn motif, RNA, 2005, vol. 11, No. 8, p. 1192-1200.

International Search Report issued Mar. 9, 2010 in corresponding International Application No. PCT/JP2009/070580, 2 pages.

* cited by examiner

Primary Examiner — Jane Zara

(74) Attorney, Agent, or Firm — Meunier Carlin & Curfinan, LLC

(57) **ABSTRACT**

An object of the present invention is to provide an RNAi control system using an RNA-protein interaction motif. The present invention provides an shRNA comprising: a guide strand having a sequence complementary to a target sequence; a passenger strand which forms a duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, wherein the linker strand comprises an RNP-derived protein-binding motif sequence. The present invention also provides an RNAi control system comprising: the shRNA; and an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA.

9 Claims, 17 Drawing Sheets









pcDNA3.1-L7Ae -myc-His6



FIG.5(A)















nt Oct. 28, 2014









INTENSITY













5

10

35

40

60

CONSTRUCTION OF PROTEIN-RESPONSIVE SHRNA/RNAI CONTROL SYSTEM USING RNP MOTIF

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to the construction of a protein-responsive shRNA and RNAi control system using an RNP motif.

BACKGROUND ART

RNA interference (hereinafter, referred to as RNAi) is a phenomenon in which translation is transiently inhibited by cleaving mRNA in a sequence-specific manner. An approach ¹⁵ called knockdown, which causes this RNAi by introducing an RNA duplex such as short hairpin RNA (hereinafter, referred to as shRNA), has been established in various organism species. RNAi has been diffused widely, including study on its application to medical treatment, in a period as short as 10 ²⁰ years from its discovery as the convenient and potent approach of transiently inhibiting gene expression. However, its mechanisms or introduction techniques still remain to be evolved. Moreover, at this time, the theme of RNAi centers on studies for making knockdown strongly effective or the ²⁵ development of delivery techniques for delivering RNA to a site of interest.

Chung et al. have prepared artificial RNA in which the binding site of theophylline known as a caffeine-like lowmolecular-weight compound has been introduced in the loop ³⁰ portion of shRNA, and have revealed that RNAi is inhibited in a theophylline concentration-dependent manner (see Non-Patent Document 1).

Non-Patent Document 1: Chung-II An, Vu B. Trinh, and Yohei Yokobayashi, RNA, May 2006; 12: 710-716

DISCLOSURE OF THE INVENTION

Problems to be Solved by the Invention

An object of the present invention is to provide an RNAi control system using RNP for the purpose of newly designing and preparing a translational control mechanism using RNAs or proteins as inhibitors and incorporating such an artificial translational control system into a living body.

Means for Solving the Problems

The present invention has been achieved for attaining the object. Specifically, according to one embodiment, the 50 present invention relates to an shRNA comprising: a guide strand having a sequence complementary to a target sequence; a passenger strand which forms a duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, wherein the linker strand comprises 55 an RNP-derived protein-binding motif sequence. In the present specification, this shRNA is also referred to as a sensor shRNA.

It is preferred that the RNP-derived protein-binding motif sequence should be a Box C/D sequence.

According to an alternative aspect, the present invention relates to an RNAi control system comprising: the sensor shRNA; and an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA.

According to an alternative aspect, the present invention 65 relates to an RNAi control system comprising: a vector for expression of the sensor shRNA; and a vector for expression

of an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA.

According to a further alternative aspect, the present invention relates to an RNAi control method comprising the steps of: contacting the sensor shRNA with an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA, in a solution; and introducing the solution containing the shRNA and the protein into a cell.

According to a further alternative aspect, the present invention relates to an intracellular RNAi control method comprising the steps of: introducing a vector for expression of the sensor shRNA into a cell; introducing a vector for expression of an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA, into the cell; and causing their expressions from the vector for expression of the shRNA and the vector for expression of the protein.

According to a further alternative aspect, the present invention provides an RNAi control system responsive to a protein expressed in a cell, the system comprising: the sensor shRNA in which RNP-derived protein-binding motif sequence is a sequence specifically binding to the protein expressed in the cell, or a vector for expression of the shRNA, and also provides an RNAi control method responsive to a protein expressed in a cell, the method comprising the step of: introducing the sensor shRNA in which RNP-derived proteinbinding motif sequence is a sequence specifically binding to the protein expressed in the cell, or a vector for expression of the shRNA, into a cell.

According to a further alternative aspect, the present invention provides the RNAi control system which controls the expression of an apoptosis regulatory protein wherein the target sequence of the shRNA is Bc1-xL mRNA, and also provides an artificial protein information conversion system using the shRNA, wherein information of a protein specifically binding to an RNP-derived protein-binding motif sequence is converted to information of a protein encoded by an RNA of the target sequence of the shRNA.

Advantageous Effects of the Invention

As an advantageous effects of the present invention, use of the sensor shRNA described above enables RNAi control such that RNAi is inhibited in a manner dependent on a protein specifically binding to the shRNA. This means that in ⁴⁵ the presence of the sensor shRNA, use of a particular protein as an input signal can inhibit the RNAi of particular mRNA and relatively increase the amount of proteins expressed from the particular mRNA. The sensor shRNA according to the present invention used in combination with the particular protein is useful in the construction of biosensors for quantifying the expression of intracellular marker proteins without destroying cells or artificial gene circuits capable of activating the translation of proteins of interest in response to the expression level of marker proteins. For example, the present invention produces significant advantageous effects that lead to the treatment of diseases such as cancer or Alzheimer's disease by activating apoptosis-inducing proteins in response to the expression of cancer marker proteins.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 schematically shows an shRNA according to the first embodiment;

FIG. **2**(A) schematically shows an shRNA constituting an RNAi control system according to the second embodiment, FIG. **2**(B) schematically shows an RNP-derived protein 4 constituting the RNAi control system according to the second

embodiment, and FIG. 2(C) schematically shows a complex of the shRNA and the protein 4 in a system in which the shRNA and the protein 4 coexist;

FIG. 3(A) shows a pENTR (trademark)/H1/TO vector sold by Invitrogen Corp., FIG. 3(B) schematically shows a DNA 5 duplex inserted to the pENTR (trademark)/H1/TO vector;

FIG. 4 shows a preparation example of a protein expression vector;

FIG. 5(A) shows the secondary structure sequence of shRNA-GFP for EGFP knockdown (SEQ ID NO:10), FIG. 10 5(B) shows the secondary structure sequence of shRNA-GFP-mut used as a negative control that does not cause EGFP knockdown (SEQ ID NO:12), FIG. 5(C) shows the secondary structure sequence of shRNA-Box C/D-GFP that is expected to specifically bind at the Box C/D sequence to an L7Ae 15 protein (SEQ ID NO:9), and FIG. 5(D) shows the secondary structure sequence of shRNA-Box C/D-mut-GFP that does not bind to L7Ae (SEQ ID NO:11). In FIGS. 5(A) to 5(D), the wedge-shaped mark represents the position of cleavage by Dicer

FIG. 6 shows the binding of shRNA-GFP, shRNA-Box C/D-GFP, and shRNA-Box C/D mut-GFP to L7Ae by gel shift assay;

FIG. 7 shows results of the inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-GFP by L7Ae using an in-vitro reconsti- 25 tuted Dicer system;

FIG. 8 is a graph showing results of RT-PCR-analyzing RNAi inhibition by L7Ae;

FIG. 9 is a graph showing results of FACS-analyzing RNAi inhibition by L7Ae;

FIG. 10 is a superimposed image of fluorescence and phase-contrast images of intracellular GFP in Example2;

FIG. 11 is a graph showing results of FACS-analyzing fluorescence intensity distribution in Example 2;

FIG. 12 is a fluorescence image of EGFP showing the 35 inhibitory effect of AsRed2-L7Ae on the knockdown function of shRNA-Box C/D-GFP;

FIG. 13(A) shows the secondary structure sequence of shRNA-Bc1xL for Bc1xL knockdown (SEQ ID NO:47), FIG. 13(B) shows the secondary structure sequence of 40 shRNA-Box C/D-Bc1xL that is expected to specifically bind at the Box C/D sequence to an L7Ae protein (SEQ ID NO:45), and FIG. 13(C) shows the secondary structure sequence of shRNA-Box C/D mut-Bc1xL that does not bind to L7Ae (SEQ ID NO:59). In FIGS. 13(A) to 13(C), the 45 arrowheads indicate Dicer cleavage site;

FIG. 14 shows results of the inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-Bc1-xL and shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL by L7Ae using an in-vitro reconstituted Dicer system;

FIG. 15 shows intracellular Bc1-xL expression;

FIG. 16 shows results of adding up the intensities of detected Bc1-xL bands;

FIG. 17 shows intracellular Bc1-xL expression; and

FIG. 18 shows results of adding up the intensities of 55 detected Bc1-xL bands.

DESCRIPTION OF SYMBOLS

1 guide strand

- 2 linker strand
- 20 base sequence
- 21 protein-binding motif sequence
- **3** passenger strand
- 4 protein
- a Dicer cleavage site
- b Dicer cleavage site
- 1d guide strand-encoding DNA sequence

4

2d linker strand-encoding DNA sequence 3*d* passenger strand-encoding DNA sequence

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Hereinafter, the present invention will be described in detail with reference to embodiments. However, the present invention is not intended to be limited to the description below

In recent years, various noncoding RNAs that function in vivo have been discovered, and their roles have received attention. However, these RNAs often form a complex with a protein (RNP) in vivo. Thus, artificial RNP has been expected as a novel nanoblock capable of controlling cell functions. Naturally occurring RNP is found to form many complexes using an RNA-protein interaction motif (RNP motif) composed of a relatively short sequence. For example, HIV Rev proteins interact with high affinity with RNA motifs that 20 recognize Rev. Thus, RNP has been expected to be used as a research material for synthetic biology (field in which biological molecules or the systems of life are constituted through the procedures of artificially creating biological molecules to induce new technologies).

To develop a system for controlling the translation of proteins of interest in response to proteins expressed in cells, the present inventors have come up with the idea that RNA interference is controlled using this RNA-protein interaction motif, thereby controlling the translation of proteins of interest. Based on this idea, the present invention has been completed.

According to a first embodiment, the present invention provides an shRNA comprising: a guide strand having a sequence complementary to a target sequence; a passenger strand which forms a duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, wherein the linker strand comprises an RNP-derived protein-binding motif sequence.

The shRNA according to the first embodiment is schematically shown in FIG. 1. The shRNA according to the first embodiment comprises a guide strand 1, a linker strand 2, and a passenger strand 3 in this order from the 3' end. The linker strand 2 has an RNP-derived protein-binding motif sequence 21 in the strand.

The guide strand 1 may be an RNA nucleotide sequence of approximately 21 bases to 26 bases and may be located at the 3' end in the shRNA. The guide strand 1 has a sequence complementary to a particular sequence of mRNA to be controlled (hereinafter, referred to as a target sequence). The 50 mRNA to be controlled can be selected appropriately by those skilled in the art according to the purpose. Examples of the mRNA to be controlled include, but not limited to, mRNAs of apoptosis-inducing genes, mRNAs of apoptosis-suppressing genes, and mRNAs of cancer marker genes. More specific examples of the mRNA to be controlled include GFP mRNA, BimEL mRNA, and Bc1-xL mRNA. Moreover, in these mRNAs, a sequence used as the target sequence can be selected appropriately by those skilled in the art by using design software based on information about the constitution and type of its primary gene sequence in view of inhibited off-target effect and the more efficiently inhibited expression of the target gene. The guide strand must be completely

complementary to the target sequence. This is to cause the RNAi effect. At least 2 bases of the 3'-terminal in the guide 65 strand 1 may form overhang that does not form complemen-

60

tary strands with the passenger strand. The guide strand 1 is a portion that becomes siRNA after cleavage by Dicer.

The passenger strand 3 may be an RNA nucleotide sequence of approximately 21 bases to 26 bases and may be located at the 5' end of the shRNA. When the passenger strand 3 is, for example, of 21 bases, bases 3 to 21 from the 3' end of the passenger strand 3 have a sequence that forms comple- 5 mentary strands with bases 3 to 21 from the 3' end of the guide strand 1. When the passenger strand 3 is composed of 21 bases, usually, the guide strand is also composed of 21 bases. The numbers of bases constituting the passenger strand 3 and the guide strand 1 may be 22, 23, 24, 25, or 26. In either case, 10 the numbers of bases of the passenger strand 3 and the guide strand 5 are usually equal. Moreover, as shown in FIG. 1, base 3 from the 3' end to the base at the 5' end of the passenger strand 3 has a sequence that forms complementary strands with the base at the 5' end to base 3 from the 3' end of the guide 15 strand 1. In this case, the passenger strand may be permitted to contain a 1-base to 2-base mismatch to the guide strand. After cleavage by Dicer, the passenger strand 3 may have, at the 3' end, overhang of at least 2 bases that forms complementary strands neither with a portion of the guide strand 1_{20} nor with a portion of the linker strand. The passenger strand 3 may be also a portion that becomes siRNA after cleavage by Dicer.

The linker strand 2 serves as a linker between the guide strand 1 and the passenger strand 3. The linker strand 2 may 25 be bound to the 5' end of the guide strand 1 and the 3' end of the passenger strand 3. In other words, the linker strand 2 may be a portion that is cleaved off from the guide strand 1 and the passenger strand 3 after cleavage by Dicer. The linker strand 2 may constitute the major part of the nonhybridized loop 30 portion, as shown in the drawing, in the sensor shRNA according to the present invention. A portion of the nonhybridized loop portion may be derived from a portion of the 3' end of the passenger strand 3. Alternatively, the linker strand 2 may constitute the whole nonhybridized loop portion, and a 35 few bases at the 3' end of the linker strand 2 and a few bases at the 5' end of the linker strand 2 may form a portion of the stem portion of the hairpin structure through hybridization therebetween, though this structure is not shown in the draw-40 ings.

The linker strand 2 may comprise a base sequence 20 and an RNP-derived protein-binding motif sequence 21. In this context, the base sequence 20 in the present invention refers to a portion of the sequence constituting the linker strand and a portion that is not derived from the RNP-derived proteinbinding motif sequence 21. In another embodiment, the linker strand 2 may be composed only of the RNP-derived proteinbinding motif sequence 21. When the linker strand 2 comprises the base sequence 20 and the RNP-derived proteinbinding motif sequence 21 or when the linker strand 2 is 50 composed only of the RNP-derived proteinbinding motif sequence 21 or when the linker strand 2 is 50 composed only of the RNP-derived protein-binding motif sequence 21, the linker strand 2 may have, in its sequence, a sequence that does not form complementary strands, and this sequence that does not form complementary strands may be 6

of 4 to 20 bases, preferably 4 to 11 bases, and the types of the bases are not limited. Preferable examples of the sequence that does not directly form complementary strands include, but not limited to, 5'-AGCAUAG-3' and 5'-GAAA-3'.

The 3'-terminal 2 bases of the linker strand 2 may form complementary strands with the 3'-terminal 2 bases of the passenger strand 3. Furthermore, bases 3 to 7 bases may from the 3' end of the linker strand 2 may form complementary strands with bases 1 to 4 from the 5' end of the linker strand 2. In this case, the number of bases forming complementary strands is 4. However, this number is not limited to 4 and can be determined between 1 and 8 bases.

When the protein-binding motif sequence 21 is introduced to the base sequence 20, the introduction position of the protein-binding motif sequence 21 is not limited and may be a range which maintains recognition by Dicer described later. Moreover, when the linker strand is free from the base sequence, the protein-binding motif sequence 21 can be bound directly to the guide strand 1 and the passenger strand 3.

In this context, examples of the protein-binding motif sequence 21 include nucleotide sequences derived from RNA-protein complex interaction motifs (RNP motifs), and nucleotide sequences mutated from these nucleotide sequences. In the present invention, the nucleotide sequences derived from RNA-protein complex interaction motifs encompass: nucleotide sequences known as the RNA sequences of RNA-protein interaction motifs in known natural RNA-protein complexes; and nucleotide sequences as the RNA sequences of artificial RNA-protein complex interaction motifs obtained by an in-vitro evolution method. The RNA-protein complexes are a large number of associates of proteins and RNAs that have been confirmed in vivo, and are 3D objects having a complicated structure. The nucleotide sequences derived from natural RNA-protein complex interaction motifs are usually composed of approximately 10 to 80 bases and known to form specific binding in a noncovalent manner, i.e., through a hydrogen bond, with a particular amino acid sequence of a particular protein. Such nucleotide sequences derived from natural RNA-protein complex interaction motifs can be selected from Tables 1 and 2 below and the database: http://gibk26.bse.kyutech.acjp/jouhou/image/ dna-protein/rna/ma.html that is available on the website. The protein-binding motif sequence 21 as an RNA-protein interaction motif-derived nucleotide sequence preferably used in the present embodiment is a sequence that can be recognized by Dicer described below in detail to cause RNAi when incorporated in the shRNA. For conformational conditions, it is preferred that such a protein-binding motif sequence 21 should form a characteristic RNA tertiary structure comprising nonnatural base pairs and be highly specific for a protein binding to this site. Moreover, it is preferred that the RNAprotein interaction motif should have Kd of, but not limited to, approximately 0.1 nM to approximately 1 µM.

TABLE 1

RNA name	Protein name	Kd	Document
5S RNA (Xenopus laevis oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul; 5(7): 543-6
5S RNA (Xenopus laevis oocyte)	5R2	0.35 ± 0.03 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul; 5(7): 543-6
dsRNA	B2	1.4 ± 0.13 nM	Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov; 12(11): 952-7
RNA splicing motif with	Fox-1	0.49 nM at	EMBO J. 2006 Jan 11; 25(1): 163-73.
UGCAUGU element		150 mM salt	
TGE	GLD-1	9.2 ± 2 nM	J Mol Biol. 2005 Feb 11; 346(1): 91-104.

TABLE 1-continued

RNA name	Protein name	Ko	ł	Document
sodB mRNA	Hfq	1.8	nM	EMBO J. 2004 Jan 28; 23(2): 396-405.
RyhB (siRNA)	Hfq	1500	nM	Annu Rev Microbiol. 2004; 58: 303-28
mRNA	HuD	0.7 ± 0.02	nM	Nat Struct Biol. 2001 Feb; 8(2): 141-5
S domain of 7S RNA	human SRP19			RNA. 2005 Jul; 11(7): 1043-50. Epub 2005 May 31
Large subunit of SRP RNA	human SRP19	2	nM	Nat Struct Biol. 2001 Jun; 8(6): 515-20
23S rRNA	L1			Nat Struct Biol. 2003 Feb; 10(2): 104-8
23S rRNA	L11			Nat Struct Biol. 2000 Oct; 7(10): 834-7
5S rRNA	L18			Biochem J. 2002 May 1; 363(Pt 3): 553-61
23S rRNA	L20	13 ± 2	nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19; 278(38): 36522-30.
Own mRNA site1	L20	88 ± 23	nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19; 278(38): 36522-30.
Own mRNA site2	L20	63 ± 23	nM	Mol Microbiol. 2005 Jun; 56(6): 1441-56
23S rRNA	L23			J Biomol NMR. 2003 Jun; 26(2): 131-7
5S rRNA	L25			EMBO J. 1999 Nov 15; 18(22): 6508-21
Own mRNA	L30			Nat Struct Biol. 1999 Dec; 6(12): 1081-3.
mRNA	LicT			EMBO J. 2002 Apr 15; 21(8): 1987-97
Own mRNA	MS2 coat	39 ± 5	nM	FEBS J. 2006 Apr; 273(7): 1463-75
Stem-loop RNA motif	Nova-2			Cell. 2000 Feb 4; 100(3): 323-32
SL2	Nucleocapsid	110 ± 50	nM	J Mol Biol. 2000 Aug 11; 301(2): 491-511
Pre-rRNA	Nucleolin			EMBO J. 2000 Dec 15; 19(24): 6870-81
	p19	0.17 ± 0.02	nM	Cell. 2003 Dec 26; 115(7): 799-811
Box C/D	L7Ae	0.9 ± 0.2	nM	RNA. 2005 Aug; 11(8): 1192-200.

IABLE 2	TA	BL	Æ	2
---------	----	----	---	---

RNA name	Protein name	Kd	Document
siRNA with the characteristic two-base 3'	PAZ (PiWi Argonaut and Zwille)		Nat Struct Biol. 2003 Dec; 10(12): 1026-32.
deRNA	Russe III		Cell 2006 Jap 27: 124(2): 355-66
HIV-1 RRE (IIB)	RR1-38	3-8 nM	Nat Struct Biol 1998 Jul: 5(7): 543-6
Own mRNA	S15	5 nM	EMBO I. 2003 Apr 15: 22(8): 1898-908
16S rRNA	S15	6 nM	Nat Struct Biol. 2000 Apr: 7(4): 273-277.
Own mRNA	815	43 nM	EMBO J. 2003 Apr 15: 22(8): 1898-908
16S rRNA	S4	6.5 μM in 4° C., 1.7 nM in 42° C.	J Biol Chem. 1979 Mar 25; 254(6): 1775-7
16S rRNA	S4	18 μM	J Biol Chem. 1979 Mar 25; 254(6): 1775-7
16S rRNA	S8	26 ± 7 nM	J Mol Biol. 2001 Aug 10; 311(2): 311-24
mRNA	S8	200 nM	RNA. 2004 Jun; 10(6): 954-64
mRNA	SacY	1400 nM	EMBO J. 1997 Aug 15; 16(16): 5019-29
SnRNA	Sm		Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006; 71: 313-20.
tmRNA	SmpB	21 ± 7 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec; 138(6): 729-39
TD3 of tmRNA	SmpB	650 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec; 138(6): 729-39
U1 snRNA	snRNP U1A	$0.032 \pm 0.007 \text{ nM}$ (salt dependence)	Nat Struct Biol. 2000 Oct; 7(10): 834-7
S domain of 7S RNA	SRP54	500 nM	RNA. 2005 Jul; 11(7): 1043-50.
TAR	Tat	200-800 nM	Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15; 24(20): 3974-81
BIV TAR	Tat	1.3 nM or 8 nM or 60 nM (depending on difference in Mg)	Mol Cell. 2000 Nov; 6(5): 1067-76
tRNA ^{Thr}	ThrRS	500 nM	Nat Struct Biol. 2002 May; 9(5): 343-7
thrS mRNA operator	ThrRS	10 nM	Trends Genet. 2003 Mar; 19(3): 155-61
Single stranded mRNA	TIS11d		Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar; 11(3): 257-64.
PSTVd	Virp1	500 nM	Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1; 31(19): 5534-43
RNA hairpin; Smaug recognition element (SRE)	Vts1p	30 nM	Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb; 13(2): 177-8.
BoxB	\square N	90 nM	Cell. 1998 Apr 17; 93(2): 289-99

The nucleotide sequences derived from artificial RNAprotein complex interaction motifs are the RNA nucleotide 55 motif-derived nucleotide sequence 2 of the present invention. sequences of RNA-protein interaction motifs in artificially designed RNA-protein complexes. Such nucleotide sequences are usually composed of approximately 10 to 80 bases and designed to form specific binding in a noncovalent manner, i.e., through a hydrogen bond, with a particular 60 amino acid sequence of a particular protein. Examples of such nucleotide sequences derived from artificial RNA-protein complex interaction motifs include, but not limited to, RNA aptamers specifically binding to the apoptosis-inducing protein Bc1-2 family, and RNA aptamers specifically recogniz- 65 ing cancer cell surface antigens. Moreover, nucleotide sequences listed in Table 3 below are also known, and these

can also be used as the RNA-protein complex interaction

TABLE 3

RNA name	Protein name	Kd	Document
Rev aptamer 5	Rev	190 nM	RNA. 2005 Dec; 11(12): 1848-57
Aptamer	p50	5.4 ± 2.2 nM	Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Aug 5; 100(16): 9268-73.
BMV Gag aptamer	BMV Gag	20 nM	RNA. 2005 Dec; 11(12): 1848-57

9

RNA name	Protein name	Kd	Document
BMV Gag aptamer	CCMV Gag	260 nM	RNA. 2005 Dec; 11(12): 1848-57
CCMV Gag aptamer	CCMV Gag	280 nM	RNA. 2005 Dec; 11(12): 1848-57
CCMV Gag aptamer	BMV Gag	280 nM	RNA. 2005 Dec; 11(12): 1848-57

10 The artificial RNA-protein complexes can be prepared by using a molecular design method and an in-vivo evolution method in combination. The in-vivo evolution method can produce aptamers or ribozymes by selecting functional RNAs from molecular libraries having various sequence diversities, 15 and repeating the reactions of amplification and transcription of their genes (DNAs). Thus, RNA-protein interaction motifs adapted to RNP having a functional structure of interest can be extracted in advance from natural RNP molecules by molecular design or prepared artificially by the in-vitro evo- 20 lution method. In the present embodiment, for the RNAprotein complex interaction motif-derived nucleotide sequence 2, it is preferred that the RNA-protein complex from which the nucleotide sequence is derived should have a dissociation constant Kd of approximately 0.1 nM to approxi-25 mately 1 µM. Specific examples of the protein-binding motif sequence 21 include a Box CD sequence: 5'-GGGCGUGAUGCGAAAGCUGACCC-3' (SEQ ID NO: 2), which is a nucleotide sequence binding to L7Ae (SEQ ID NO: 1) (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) 30 known to participate in RNA modifications such as RNA methylation or pseudouridylation.

The constitution of the shRNA according to the present embodiment can be obtained by molecular design. The sensor shRNA of the present embodiment can be obtained, for 35 example, by introducing a protein-binding motif sequence to a sequence portion forming the linker strand, based on the sequence of known natural or nonnatural shRNA, or by replacing a protein-binding motif sequence for a sequence portion forming the linker strand, based on the sequence of 40 known natural or nonnatural shRNA. In this procedure, the type and introduction position of the protein-binding motif sequence can be determined in view of the appropriate placement of RNP of interest such that the function of the Dicer protein can be inhibited. 45

Alternatively, the nucleotide sequence of the guide strand can be determined according to the desired target sequence to design the linker strand and the passenger strand by computer-aided molecular modeling. In this procedure, particular attention may be paid to the correct formation of a duplex 50 structure by the guide strand and the passenger strand.

The shRNA according to the first embodiment may be stably present through the formation of the hairpin structure shown in FIG. 1 under physiological conditions involving pH 6.5 to 8.0 and a temperature of 4 to 42° C., preferably pH 7.3 55 to 7.5 and a temperature of 4 to 37° C. When the shRNA according to the first embodiment may be present in this form in vivo, this shRNA is recognized by an RNA duplex-cleaving enzyme Dicer. Then, the shRNA may be cleaved at positions shown by arrowheads a and b in FIG. 1 to form an RNA 60 duplex of approximately 19 to 24 bases in the length of each strand having a 2-base protruding end. As a result, the guide RNA complementary to the target mRNA can be transferred from RLC to RISC to inhibit the translation of the mRNA to be controlled by its cleavage.

Thus, the shRNA according to the first embodiment is characterized in that the shRNA in the form shown in the drawing, i.e., in the form in which the protein-binding motif sequence **21** is unbound to the particular protein, functions in the same way as known natural shRNA.

Next, according to the second embodiment, the present invention provides an RNAi control system comprising: the shRNA according to the first embodiment; and an RNPderived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA.

The shRNA constituting the RNAi control system according to the present embodiment is schematically shown in FIG. 2(A), and an RNP-derived protein 4 is schematically shown in FIG. 2(B). The shRNA is as described in the first embodiment, and its description is omitted here. The same reference numerals will be used to designate the same components as those in FIG. 1.

The protein 4 shown in FIG. 2(B) is a protein that is derived from RNP and specifically binds to the protein-binding motif sequence 21 on the shRNA. Accordingly, this protein 4 can be determined in a manner specific for a sequence selected as the protein-binding motif sequence 21. Specifically, when Box C/D (SEQ ID NO: 2) is selected as the protein-binding motif sequence 21, the protein 4 is L7Ae (SEQ ID NO: 1). The protein 4 may also be a fusion protein containing the protein specifically binding to the protein-binding motif sequence 21 or may be a protein having an additional peptide added to the protein specifically binding to the protein-binding motif sequence 21. This is because the protein 4 needs only to be capable of inhibiting recognition by Dicer described below.

In the state shown in FIG. 2(A), the shRNA according to the present embodiment functions in the same way as known natural shRNA, as described in the first embodiment, in the absence of the protein 4 to cause RNAi such that the translational function of particular mRNA is inhibited.

Next, the states of the shRNA according to the present embodiment and the protein **4** in a system in which these molecules coexist will be described. FIG. **2**(C) schematically shows the shRNA and the protein 4 in the system in which the shRNA and the protein 4 coexist. The shRNA and the protein 4 may be stably present in the form of an RNP complex formed by specific binding under physiological conditions involving pH 6.5 to 8.0 and a temperature of 4 to 42° C., preferably pH 7.0 to 7.5 and a temperature of 4 to 37° C.

The present embodiment is characterized in that when the protein-binding motif sequence **21** on the shRNA specifically bind the protein 4 to form an RNP by specific binding, Dicer fails to recognize the shRNA in this RNP form. As a result, the Dicer fails to cleave the shRNA. Then, it cannot proceed to the next step of RNAi such that mRNA to be controlled is made insusceptible to cleavage. In other words, the coexistence of the shRNA according to the present embodiment with the protein 4 can inhibit RNAi. Moreover, according to the embodiment the protein 4 as input information is transformed to RNAi inhibition as output.

In this context, the system in which the shRNA and the protein 4 coexist may be a mixture of separately prepared shRNA and protein 4 molecules in a medium. Alternatively, a vector for expression of the shRNA molecule may be designed, and a vector for expression of the molecule of the protein 4 may be designed. These vectors may be introduced into the same cell, and their expressions can also be caused to achieve the system in which the shRNA and the protein 4 coexist. The vector design will be described in detail in Examples described later.

The RNAi control system according to the second embodiment of the present invention can achieve the inhibition of shRNA-mediated RNAi in a protein-specific manner. Next, according to the third embodiment, the present invention relates to an RNAi control method comprising the steps of: contacting the sensor shRNA according to the first embodiment with an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA, in a ⁵ solution; and introducing the solution containing the shRNA and the protein into a cell. The combination of the sensor shRNA and the protein used in the present embodiment can be selected based on the first and second embodiments to determine their sequences. ¹⁰

[In-Vitro Synthesis of a Sensor ShRNA]

In this context, the sensor shRNA can be obtained by an in-vitro synthesis method called in-vitro transcription. Single-stranded DNA in which a 19-base antisense sequence (TATAGTGAGTCGTATTAGC; SEQ ID NO: 3) of a T7 promoter sequence may be bound to the 3' end of a sequence serving as a template of shRNA is artificially synthesized (Hokkaido System Science Co., Ltd.), and this may be associated with a 19-base T7 promoter sequence (GCTAATAC-20 GACTCACTATA (SEQ ID NO: 4)) artificially synthesized in the same way. This associate may be mixed with ribonucleic acids, salts, and T7 RNA polymerase and reacted at 37° C., as specifically described in detail in Examples to obtain the sensor shRNA. 25

[Production of Protein]

On the other hand, the protein can be obtained by preparing a vector for expression of the protein and causing its expression using *E. coli*, followed by purification. For example, a vector for expression of L7Ae (SEQ ID NO: 2), which is a 30 protein specifically binding to a Box-C/D motif represented by SEQ ID NO: 1, can be prepared with reference to Nucleic Acid Research, 2003, Vol. 31, No. 3 869-877. One example of the vector for expression of L7Ae (SEQ ID NO: 2) in *E. coli* is shown in SEQ ID NO: 5. 35

In the present embodiment, the contacting step may be performed by mixing the thus-prepared sensor shRNA and protein in the same solution system. The mixing of the shRNA and the protein may be performed under physiological conditions involving pH 6.5 to 8.0 and a temperature of 4 40 to 42° C., preferably pH 7.3 to 7.5 and a temperature of 4 to 37° C. As a result, the shRNA and the protein may specifically interact with each other to form an RNP complex.

RNAi may be inhibited in the presence of Dicer, ATP, and Mg ions and under appropriate physiological conditions, in 45 addition to the conditions described above. Accordingly, in the contacting step, the sensor shRNA and the protein may be mixed to form an RNP complex, and then, the step of introduction into a cell can be carried out. The concentration of the RNP complex introduced into a cell is, for example, 1 nM to 50 40 nM shRNA, preferably 1 nM to 20 nM shRNA, and a protein concentration of preferably, but not limited to, that about 1 to 10 times the shRNA concentration. The introduction of the RNP complex into a cell can be performed by, but not limited to, transfection using liposomes and can be per-55 formed by those skilled in the art using general methods for introduction of an RNP into cells known in the art.

After the introduction of the RNP complex into a cell, the phenomenon described in the first embodiment with reference to FIG. **2** may take place in the cell containing Dicer. ⁶⁰ Specifically, Dicer neither recognizes the RNA cleavage site in the prepared complex of the sensor shRNA and the protein nor cleaves the shRNA. Then, mRNA complementary to the guide strand may not undergo RNAi. Thus, the expression of a protein encoded by this mRNA may be inhibited. ⁶⁵

According to the third embodiment of the present invention, RNAi can be inhibited in vitro. 12

In an modification of the third embodiment, the protein alone can be administered directly to a cell. This modification involves, after the introduction of the protein into a cell, forming an RNP complex of the sensor shRNA and the protein in the cell, and differs in this point from the third embodiment which involves forming an RNP complex and then introducing it into a cell. In this modification, the sensor shRNA can be introduced into the cell before or after the introduction of the protein into the cell. When the sensor shRNA is introduced into the cell before the protein introduction, a vector for expression of the shRNA may be designed such that the expression of the shRNA in this vector introduced into the cell can be controlled using a small molecule such as tetracycline. In this method, the shRNA can be expressed using tetracycline after the protein introduction. When the sensor shRNA is introduced into the cell after the protein introduction, the shRNA may be introduced directly into the cell or a vector for expression of the shRNA may be introduced into the cell. The protein introduced in the cell forms an RNP complex with the sensor shRNA and enables the expression of a gene of interest to be controlled by RNAi in the cell. Thus, the present embodiment seems to be effective in the development of protein drugs or the treatment of diseases such as cancer.

According to the fourth embodiment, the present invention relates to an intracellular RNAi control method comprising the steps of: introducing a vector for expression of the shRNA according to the first embodiment into a cell; introducing a vector for expression of an RNP-derived protein which specifically binds to a protein-binding motif sequence in the shRNA, into the cell; and causing their expressions from the vector for expression of the shRNA and the vector for expression of the protein.

The vector for expression of the sensor shRNA can be 35 prepared based on the primary structure sequence of the sensor shRNA determined as described in the first embodiment. One example of the vector preparation method is shown in FIG. 3. FIG. 3(A) shows a pENTR (trademark)/H1/TO vector (SEQ ID NO: 8) sold by Invitrogen Corp. A DNA sequence encoding the shRNA of the present invention may be inserted to the site shown by the arrow of FIG. 3(A). The inserted DNA duplex is schematically shown in FIG. 3(B). The upper strand shown in FIG. 3(B) comprises overhang CACC, a guide strand-encoding DNA sequence 1d, a linker strand-encoding DNA sequence 2d, and a passenger strand-encoding DNA sequence 3d located in this order from the 5' end. The lower DNA strand shown in the drawing is a strand complementary to the upper strand and has overhang AAAA located at the 5' end. Those skilled in the art can obtain the desired sensor shRNA by inserting the desired sequence into commercially available plasmids to prepare plasmids producing the desired sensor shRNA.

The protein expression vector can be prepared by incorporating a DNA sequence encoding a protein to be expressed, into vectors for mammalian expression. A vector preparation example is shown in FIG. 4. The vector shown in this drawing is a vector for expression of L7Ae (SEQ ID NO: 2), which is a protein specifically binding to a Box-C/D motif represented by SEQ ID NO: 1. The sequence of the vector is shown in SEQ ID NO: 6. Such a vector can be prepared with reference to Nucleic Acid Research, 2003, Vol. 31, No. 3 869-877, and a gene can be extracted therefrom and recombined to mammalian expression vector. This vector can be prepared using a pcDNA3.1 (+) myc H is A vector (SEQ ID NO: 7) commercially available from Invitrogen Corp.

The present embodiment is characterized by introducing the vector for expression of the shRNA and the vector for expression of the protein into the same cell and causing their expressions. The introducing step can be carried out by transfection. Examples of the transfection include, but not limited to, transfection using liposomes, direct injection, electroporation, and a lentiviral transfection method. The amounts of the shRNA expression vector and the protein expression vector introduced into a cell may differ depending on the purpose and are, for example, the amount of the L7Ae protein expression vector ¹/₄ times to 10 times, preferably 1 time to 4 times that of the shRNA expression vector.

According to the fourth embodiment, RNAi can be inhibited by causing the intracellular expressions of the shRNA and the protein. Examples of a practical application of the embodiment include the treatment of cancer. Moreover, an 15 RNAi control system can also be prepared by combining the vector for expression of the sensor shRNA and the protein expression vector used in the present embodiment.

In a modification, shRNA can be designed such that the 20 protein specifically binding to the protein-binding motif sequence shown in FIGS. 1 and 2 is, for example, a biological molecule expressed only in cancer cells, and the target sequence of the guide strand is an apoptosis-promoting gene. In this case, the shRNA may be introduced directly or via a vector into a cancer cell to form an RNP complex with a biological molecule expressed only in cancer, in the cancer cell. As a result, the shRNA may be made insusceptible to recognition by Dicer. Then, in the cancer cell, the RNAi of the apoptosis-promoting gene may be inhibited, resulting in the 30 selective expression of the apoptosis-promoting gene to promote the apoptosis of the cancer cell. On the other hand, in a normal cell, which may be free from the biological molecule expressed only in cancer, RNAi may not be inhibited even if the same shRNA is introduced thereinto directly or via a 35 vector. Therefore, the expression of the apoptosis-promoting gene may be inhibited by RNAi.

Moreover, in a further modification of this embodiment, shRNA can be designed such that the protein specifically $_{40}$ binding to the protein-binding motif shown in FIGS. 1 and 2 is, for example, a biological molecule that becomes no longer expressed by carcinogenesis, and the target sequence of the guide strand may be an apoptosis-suppressing gene. In this case, the shRNA is introduced directly or via a vector into a 45 normal cell to form an RNP complex with a biological molecule that becomes no longer expressed by carcinogenesis, in the normal cell. As a result, the shRNA may be made insusceptible to recognition by Dicer. Then, in the normal cell, the RNAi of the apoptosis-suppressing gene may be inhibited, 50 resulting in the selective expression of the apoptosis-suppressing gene to suppress the apoptosis of the normal cell. On the other hand, in a cancer cell, which may be free from the biological molecule that becomes no longer expressed by carcinogenesis, RNAi may not be inhibited even if the same shRNA is introduced thereinto directly or via a vector. Therefore, the expression of the apoptosis-suppressing gene may be inhibited by RNAi.

Furthermore, a cancer control system using L7Ae may be 60 constructed. The same promoter as that expressing such a cancer-related protein is incorporated upstream of the L7Ae protein expression vector. As a result, the RNAi function of apoptosis-controlling sensor shRNA comprising Box C/D incorporated in the linker strand can be regulated freely by 65 regulating the expression of L7 in response to the expression of the cancer-related protein.

EXAMPLE 1

[Design of Protein Molecule-Responsive shRNA]

An shRNA-GFP sequence for EGFP knockdown (shRNA-GFP (59 mer) GGCAUCAAGGUGAACUUCAAGAUC-CAGCAUAGGGAUCUUGAAGUUCACCUUGA UGC-CAG; FIG. **5**A (SEQ ID NO: 10)) was kindly provided by Dr. Tsutomu Suzuki and Dr. Takayuki Kato, the University of Tokyo. For shRNA-GFP-mut (shRNA-GFP-mut (59 mer) GCACUAGCGUAUGAAUGAAAGAUCCAG-

CAUAGGGAUCUUUCAUUCAUACGCUA GUGCAG; FIG. **5**B (SEQ ID NO: 12)), first, a guide strand in which three sequences complementary to the stop codons were inserted in the reading frame of three codons one for each was designed, and this was replaced for the guide strand of shRNA-GFP to design the shRNA-GFP-mut sequence. This shRNA-GFP mut was used as a negative control that did not cause EGFP knockdown. Next, from the structure of an RNP motif L7Ae-Box C/D, the RNA sequence of Box C/D was obtained and inserted such that it was located as close to a Dicer protein cleavage site in shRNA as possible and the duplex structure of guide and passenger strands was maintained to design shRNA-Box C/D-GFP (shRNA-Box C/D-GFP (63 mer) GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCUGAC-

UUGAUGCCAG; FIG. **5**C (SEQ ID NO: 9)) that was expected to specifically bind at the Box C/D sequence to an L7Ae protein. In its guide strand, the 3'-terminal 21 bases of the guide strand of shRNA-GFP were used. Furthermore, shRNA in which adenine at base 24 from the 5' end of this shRNA-Box C/D-GFP was deleted and guanine at base 38 was replaced by cytosine was designed as shRNA-Box C/Dmut-GFP (shRNA-Box C/D-mut-GFP (62 mer) GGCAU-CAAGGUGAACUUCAGCUGC-

CCGAAAGGGCGUCAUGCUGAAGUUCACCU

UGAUGCCAG; FIG. **5**(D) (SEQ ID NO: 11)) that did not bind to L7Ae.

[In-Vitro Synthesis of shRNA]

[shRNA-Box C/D-GFP]

5.25 μL of L7Aer template (100 μM, 5'-CTGGCAT-CAAGGTGAACTTCAGCATCACGC-CCTTTCGGGTCAGCTGAAGTTCACC TTGATGC-

CTATAGTGAGTCGTATTAGC-3; SEQ ID NO: 13) as template DNA of shRNA, 5.25 µL of T7 sense primer (100 µM, 5'-GCTAATACGACTCACTATA-3; SEQ ID NO: 4), 30 µL of T7 RNA polymerase, 5 µL of 1 mg/mL pyrophosphatase (ROCHE), 1.75 µL of 20 mg/mL BSA, 28 µL of 1 M Hepes-KOH, 14 µL of 1 M MgCl₂, 3.5 µL of 1 M DTT, 14 µL of 0.1 M spermidine, 33.6 µL of 0.1 M ATP (the same holds true for CTP and UTP), 8.96 µL of 0.1 M GTP, 89.6 µL of 0.1 M GMP, and 385 µL of ultrapure water were mixed and reacted overnight at 37° C. After the reaction, 10 µL of TURBO DNase was added thereto and reacted at 37° C. for 30 minutes to degrade the template DNA. After the reaction, phenol extraction and chloroform extraction were performed, and the supernatant was charged into a PD-10 column (GE Healthcare) equilibrated with a PD-10 buffer (0.3 M potassium acetate, 15% (v/v) ethanol, pH 6.0), and washed with 3 mL of PD-10 buffer, followed by elution with 500 μ L of PD-10 buffer twice. Then, to the eluate, an equal amount of ethanol was added to perform ethanol precipitation. The supernatant was discarded, and the pellet was dried and then dissolved in 20 μ L of 5× dye solution (0.25% BPB, 30% glycerol). The solution was layered on a nondenaturing 15% polyacrylamide (1/30 bisacrylamide) gel and electrophoresed at room temperature for 50 minutes for separation. A band with the size of interest was excised, and 500 μ L of elution

⁵ CCGAAAGGGCGUGAUGCUGAAGUUCACC

buffer (0.5 M NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) was added thereto, followed by elution overnight at 37° C. Then, a microfilter (22 µm Millex GP) was attached to a 5-mL syringe (TERUMO CORP.), and the eluate was added to the syringe and filtered through the filter. To this filtrate, a 2.5-fold vol- 5 ume of ethanol was added to perform ethanol precipitation. The supernatant was discarded, and the pellet was dried and then dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

[shRNA-Box C/D mut-GFP]

5.25 µL of L7AerN template (100 µM, 5'-CTGGCAT-CAAGGTGAACTTCAGCATGACGC-

CCTTTCGGGCAGCTGAAGTTCACCT TGATGCCTAT-AGTGAGTCGTATTAGC-3; SEQ ID NO: 15) as template 15 DNA of shRNA and 5.25 µL of T7 sense primer (100 µM, SEQ ID NO: 4) were used to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was 20 250 V at 4° C. for 50 minutes. After the electrophoresis, the used in subsequent experiments.

[shRNA-GFP]

5.25 µL of 481P template (100 µM, 5'-CTGGCATCAAG-GTGAACTTCAAGATCCCTATGCTG-

GATCTTGAAGTTCACCTTGA TGCCTATAGT- 25 GAGTCGTATTAGC-3; SEQ ID NO: 16) as template DNA of shRNA and 5.25 µL of T7 sense primer (100 µM, SEQ ID NO: 4) were used to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure 30 water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

[Expression and Purification of L7Ae Protein]

Plasmids comprising a gene of the L7Ae protein incorporated in pET-28b+, kindly provided by Dr. Huttenhofer were 35 amplified. From a -80° C. glycerol bacterial stock of E. coli BL21 (DE3) pLysS transformed with the pET-28b+L7Ae plasmid (SEQ ID NO: 5), the bacterial cells were inoculated to 5 mL of medium and shaken-cultured overnight at 37° C. Subsequently, the whole amount of the culture solution was 40 inoculated to 500 mL of LB medium containing 50 µg/mL kanamycin and 100 µg/mL chloramphenicol. The bacterial cells were shake-cultured at 37° C. until $\mathrm{O.D.}_{600}$ became 0.6 to 0.7. Then, 500 µL of 1 M IPTG was added (final concentration: 1 mM) thereto for inducing expression, and the cells 45 were shake-cultured overnight at 30° C. The bacterial cells were collected by centrifugation (4° C., 6000 rpm, 20 minutes). After addition of 5 mL of sonication buffer (50 mM Na phosphate, 0.3 M NaCl, 2.5 mM imidazole, pH 8.0), sonication was performed to disrupt the bacterial cells. In this soni- 50 cation, the procedure of cooling on ice and then irradiation with ultrasonic waves for 15 seconds was repeated 6 times. Then, impurity proteins were denatured at 80° C. for 15 minutes. The supernatant was collected by centrifugation (4° C., 6000 rpm, 20 minutes), and histidine-tagged proteins 55 were purified by the batch method using an Ni-NTA column (Qiagen). Specifically, first, the supernatant and 1 mL of Ni-NTA were mixed and stirred at 4° C. for 1 hour. Then, the mixture was charged into the column and washed twice with 4 mL of wash buffer (50 mM Na phosphate, 0.3 M NaCl, 20 60 mM imidazole, pH 8.0). Stepwise elution was performed with 1 mL each of 50 mM, 100 mM, 200 mM, and 300 mM imidazole elution buffers (prepared by adding imidazole to 50 mM Na phosphate, 0.3 M NaCl, pH 8.0) in each of two runs. The proteins of interest were confirmed by 15% SDS-PAGE. 65 Subsequently, Microcon YM-3 (Millipore Corp.) was used to concentrate the proteins, followed by buffer replacement by a

dialysis buffer (20 mM Hepes-KOH, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 5% glycerol, pH 7.5). Moreover, the protein concentration was determined by the Bradford method using Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

[Confirmation of RNP Complex by Gel Shift Assay]

The binding between each shRNA and the protein was confirmed as follows: after dilution with a dialysis buffer to bring the protein concentration to concentrations 25 times the final concentrations of 80 to 640 nM, 2 µL of the protein 10 solution with each concentration, $2 \mu L$ of $1 \mu M$ shRNA-Box C/D-GFP, 6 µL of ultrapure water, and 40 µL of Opti-MEM I (trademark, Invitrogen Corp.) were mixed and left standing at room temperature for 30 minutes to bind shRNA (40 nM) to L7Ae (80 nM, 160 nM, 320 nM, or 640 nM). shRNA-GFP and shRNA-Box C/D mut-GFP were bound to L7Ae in the same way. To each solution, 13 μ L of 5× dye solution (0.25%) BPB, 30% glycerol) was added and mixed, and 15 μ L of this mixed solution was layered on a nondenaturing 15% polyacrylamide (1/30 bisacrylamide) gel and electrophoresed at gel was stained with SYBR Green for 15 minutes, and bands were confirmed using FLA-7000 (FUJI FILM). FIG. 6 shows the binding of shRNA-GFP, shRNA-Box C/D-GFP, and shRNA-Box C/D mut-GFP to L7Ae by gel shift assay. The results suggested that shRNA-Box C/D-GFP is bound to L7Ae in a sequence-specific manner.

[Confirmation of Dicer Cleavage Inhibition by In-Vitro Dicer Cleavage Assav]

The inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-GFP and shRNA-Box C/D mut-GFP by L7Ae was confirmed as follows using GTS, Inc. Recombinant Human Dicer Enzyme Kit according to the protocol: first, 0.4 µL of 4 µM shRNA, 2 μL of 4 μM or 8 μM L7Ae, 1 μL of 10 mM ATP, 0.5 μL of 50 mM MgCl₂, 4 µL of Dicer Reaction Buffer (GTS, Inc.), 2 µL of 0.5 unit/µL Recombinant Dicer Enzyme, and 0.1 µL of ultrapure water were mixed and reacted at 37° C. for 15 hours. Then, 2 µL of Dicer Stop Solution was added thereto and mixed. To 8 μ L of this mixed solution, 2 μ L of 5× dye solution was added, and the mixture was layered on a nondenaturing 15% polyacrylamide (1/30 bisacrylamide) gel and electrophoresed at 4° C. for 50 minutes. After the electrophoresis, the gel was stained with SYBR Green, and bands were confirmed using FLA-7000 (FUJI FILM). FIG. 7 shows results of the inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-GFP and shRNA-Box C/D mut-GFP by L7Ae using an in-vitro reconstituted Dicer system. In FIG. 7, the mark + in L7Ae represents a sample prepared from 4 µM L7Ae, the mark ++ represents a sample prepared from 8 µM L7Ae, and the mark - represents that L7Ae was not used. Likewise, the mark + in Dicer represents that Dicer was used, and the mark - represents that Dicer was not used. The results suggested that upon sequence-specific binding to L7Ae, shRNA-Box C/D-GFP is made insusceptible to cleavage by Dicer.

[Construction/Synthesis of shRNA Expression Plasmid] [Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-GFP (SEQ ID NO: 17)]

5 µL of pENTR L7Aer Top strand (200 µM, 5'-CACCG-GCATCAAGGTGAACTTCAGCTGAC-

CCGAAAGGGCGTGATGCTGAAGTTC ACCTTGAT-GCC-3; SEQ ID NO: 18) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/ TO vectors (Invitrogen Corp.), 5 µL of pENTR L7Aer Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGGCATCAAGGTGAACT-TCAGCATCACGCCCTTTCGGGTCAGCTGAAGTTCA

CCTTGATGCC-3; SEQ ID NO: 19) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, 2 µL of 10× Oligo Annealing Buffer (Invitrogen Corp.), and 2 µL of ultrapure water were mixed, incubated at 95° C. for 4 minutes, and then left standing at room temperature for 5 minutes to form a DNA duplex. This duplex is a duplex shown in FIG. 3(B). This DNA duplex solution was diluted 100-fold with ultrapure water, and then, 1 µL of the diluted solution was diluted 100-fold by mixing with 10 µL of 10×Oligo Annealing Buffer and 89 uL of ultrapure water. Then, 4 uL of 5× Ligation Buffer, 2 µL of 0.75 ng/µL pENTR/H1/TO vectors, 5 µL of the 10,000-fold diluted DNA solution, 8 µL of ultrapure water, and 1 µL of 1 U/µL T4 DNA Ligase were mixed and left standing at room temperature for 5 minutes to incorporate the shRNA-encoding sequence into the pENTR/H1/TO vectors. 4 µL of this reaction solution was added to TOP 10 Competent E. coli for transformation. After addition of 250 μ L of S.O.C. 15 medium, the bacterial cells were shake-cultured for 1 hour, then seeded over an LB plate containing 50 µg/mL kanamycin, and cultured overnight at 37° C. The formed colonies were confirmed, and the insert in the plasmid vectors was confirmed by colony PCR using H1 Forward Primer (10 µM, 20 5'-TGTTCTGGGAAATCACCATA-3; SEQ ID NO: 20), M13 Reverse Primer (10 µM, 5'-CAGGAAACAGCTAT-GAC-3; SEQ ID NO: 21), and KOD-Plus-ver. 2 (TOYOBO CO., LTD.). This colony was inoculated to 50 mL of LB medium containing $50\,\mu$ g/mL kanamycin and shake-cultured 25 at 37° C. for 16 hours. The bacterial cells were collected by centrifugation (4° C., 6000 rpm, 15 minutes) and purified according to the protocol of Plasmid Purification Kit (Qiagen), followed by isopropanol precipitation. The supernatant was discarded, and the pellet was dried and then dissolved by the addition of 55 µL of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

(SEQ ID NO: 22)]

pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-mut-GFP was synthesized and purified in the same way as above using 5 μ L of pENTR L7AerN Top strand (200 µM, 5'-CACCGGCAT-CAAGGTGAACTTCAGCTGC-

CCGAAAGGGCGTCATGCTGAAGTTCAC CTTGAT-GCC-3; SEQ ID NO: 23) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/ TO vectors (Invitrogen Corp.) and pENTR L7AerN Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGGCATCAAGGTGAACT- 45 TCAGCATGACGCCCTTTCGGGCAGCTGAAGTTCAC CTTGATGCC-3; SEO ID NO: 24) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 µL of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent 50 experiments.

[Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-GFP (SEQ ID NO: 25)]

pENTR/H1/TO-shRNA-GFP was synthesized and purified in the same way as above using 5 µL of pENTR 481P Top 55 strand (200 µM, 5'-CACCGGCATCAAGGTGAACTTCAA-GATCCAGCATAGGGATCTTGAAGTTCACCTT GAT-GCC-3; SEQ ID NO: 26) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/ TO vectors (Invitrogen Corp.) and pENTR 481P Bottom 60 strand (200 µM, 5'-AAAAGGCATCAAGGTGAACT-TCAAGATCCCTATGCTGGATCTTGAAGTTCACCTT GATGCC-3; SEQ ID NO: 27) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 µL of ultrapure water. After plasmid vector 65 concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

[Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-GFP-mut (SEQ ID NO: 28)]

pENTR/H1/TO-shRNA-GFP-mut was synthesized and purified in the same way as above using 5 μ L of pENTR Sk-7N Top strand (200 µM, 5'-CACCGCACTAGCGTAT-GAATGAAAGATCCAGCATAGG-

GATCTTTCATTCATACGC TAGTGC-3; SEQ ID NO: 29) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/TO vectors (Invitrogen Corp.) and pENTR Sk-7N Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGCACTAGCGTATGAATGAAAGATC-

CCTATGCTGGATCTTTCATTCATACGC TAGTGC-3: SEQ ID NO: 30) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 µL of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

[Synthesis of pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 (SEQ ID NO: 6)] PCR was performed using pET-28b+L7Ae (SEQ ID NO: 5) as template DNA and BamHI-NdeI-NotI-L7Ae-primer (5'-

AAGGATCCATCATATGCGGCCGCTTATG-TACGTGAGATTTGAGG-3') (SEQ ID NO: 32) and L7Ae-EcoRI-XhoI-primer (5'-CACTCGAGTTGAATTCTCTTCTGAAGGCCTTTAATC-3') (SEQ ID NO: 33) as primers. 50 µL of this reaction solution contained a mixture of 2.5 µL of 10 ng/µL template DNA, 1.5 µL of each 10 µM DNA primer, 5 µL of 2 mM dNTPs, 5 µL of 10×KOD-PLUS-buffer ver. 2, 2 µL of 25 mM MgSO₄, 1 µL of KOD-PLUS-DNA Polymerase, and 31.5 µL of ultrapure water. The reaction was performed by initial

incubation at 94° C. for 2 minutes, followed by 36 cycles each involving 98° C. for 10 seconds, 55° C. for 30 seconds, and 68° C. for 1 minute. From the resulting PCR product, DNA was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN). However, elution was performed with 30 µL of ultrapure water, [Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-mut-GFP 35 and this DNA was used as a template in restriction enzyme treatment. 27 µL of the template, 5 µL of B Buffer (ROCHE), 1 µL of 10 U/µL BamH1 (ROCHE), 1 µL of 10 U/µL XhoI (ROCHE), and 16 µL of ultrapure water were mixed and reacted at 37° C. for 2 hours for restriction enzyme treatment. 40 Also for pcDNA3.1 (+) myc H is A vectors (Invitrogen Corp.), 1.88 µL of 1.6 µg/µL pcDNA vectors, 5 µL of B Buffer, 1 µL of 10 U/µL BamH1, 1 µL of 10 U/µL XhoI, and 41.12 µL of ultrapure water were mixed, and restriction enzyme treatment was performed in the same way. These treatment products were purified using PCR Purification Kit (QIAGEN). However, for elution, DNA was eluted into 10 µL of ultrapure water.

> 1.75 µL of the PCR product thus subjected to restriction enzyme treatment, 0.25 µL of the vectors thus subjected to restriction enzyme treatment, and 2 µL of Ligation High were mixed and incubated at 16° C. for 30 minutes. To the whole amount of this ligation reaction solution, 20 µL of Top10 Chemically competent cells (Invitrogen Corp.) was added. The cells were left standing on ice for 45 minutes, then placed in water bath at 42° C. for 1 minute, and left standing again on ice for 2 minutes for transformation. After further addition of 160 µL of LB medium, the cells were seeded over an LB plate containing 50 µg/mL ampicillin and incubated overnight at 37° C. The formed colonies were subjected to colony PCR using Extaq (TAKARA BIO INC.) and the DNA primers described above to check the insert. A colony in which the insert was confirmed was inoculated to 50 mL of LB medium containing 50 µg/mL ampicillin and shake-cultured overnight at 37° C. The bacterial cells were collected by centrifugation (4° C., 6000 rpm, 15 minutes) and purified according to the protocol of Plasmid Purification Kit (Qiagen), followed by isopropanol precipitation. The supernatant was discarded,

and the pellet was dried and then dissolved by the addition of $55 \,\mu\text{L}$ of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this plasmid vector was sequenced using T7 promoter primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3; SEQ ID NO: 34) and BGH rev primer (5'-GCTGGCAACTA-5 GAAGGCACAG-3; SEQ ID NO: 35) and used in subsequent experiments.

[Confirmation of Knockdown Function Control by Fluorescence Microscope Image]

On the day before transfection, HeLa cells were seeded 10 over a 24-well plate at a concentration of 0.8×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. On the next day, the cells were cotransfected with each pENTR/H1/TO shRNA expression vector, pcDNA3.1-AsRed2-L7Ae-myc-His6 (SEQ ID NO: 40), and pcDNA3.1-EGFP-myc-His6 (SEQ ID 15 NO: 41) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). To 0.3 µg each of pENTR-shRNA-GFP, pENTRshRNA-GFP mut, pENTR-shRNA-Box C/D-GFP, and pENTR-shRNA-Box C/D mut-GFP, 0.3 µg of pcDNA3.1-AsRed2-L7Ae-myc-His6 or pcDNA3.1-AsRed2-myc-His6 20 (SEQ ID NO: 42) and 0.2 µg of pcDNA3.1-EGFP-myc-His6 were added, and 1.25 µl of Lipofectamine 2000 was added per sample. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the medium for HeLa cells. 4 hours later, medium replacement 25 was performed. 24 hours later, the fluorescence microscope image of the cells was obtained using a fluorescence microscope (OLYMPUS IX-81) to observe the inhibition of shRNA-Box C/D-GFP function by AsRed2-L7Ae expression.

FIG. **12** is an EGFP fluorescence image obtained through a 510-550 nm wavelength filter by irradiation with excitation light having a wavelength around 488 nm. In FIG. **12**, the mark "+" below each panel represents high fluorescence intensity, and the mark "–" represents low fluorescence inten- 35 sity. This image demonstrated the inhibitory effect of AsRed2-L7Ae on the knockdown function of shRNA-Box C/D-GFP.

[Confirmation of RNAi Control by RT-PCR Analysis] Change in GFP mRNA level caused by RNAi control by 40 L7Ae was determined by real-time PCR.

On the previous day, HeLa-GFP cells were seeded over a 6-well plate at a concentration of 0.5×10^6 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. Then, the cells were cotransfected with each pENTR/H1/TO shRNA expression 45 vector and pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6. To 4 µg each of pENTR-shRNA-Box C/D-GFP and pENTR-shRNA-Box C/D mut-GFP, 0, 2, or 4 µg of pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 was added, and 5 µl of Lipofectamine 2000 was added per sample. These DNA-lipid complexes were incubated at room 50 temperature for 20 minutes and added dropwise to the cells. 4 hours later, medium replacement was performed. 24 hours after the transfection, the cells were collected, and RNA extraction and DNA removal were performed using RNAqueous 4PCR Kit (Ambion, Inc. (trademark)). 55

1.5 μ g (or 0.5 μ g) of the extracted RNA was used as a template to synthesize cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems Inc. (trademark)), random primers, and reverse transcriptase. Real-time PCR was performed using 1/20-diluted cDNA as a template 60 and LightCycler 480 Taqman probe (Roche) (trademark). PCR reaction and real-time fluorescence detection were carried out using LightCycler 480 (Roche) (trademark). The reaction conditions involved an initial denaturation step at 95° C. for 5 minutes and an amplification step of 45 cycles 65 each involving denaturation at 95° C. for 10 seconds and annealing/elongation at 60° C. for 25 seconds. Finally, the 20

reaction solution was cooled at 50° C. for 15 seconds to terminate the measurement. The Ct value was determined by the Abs Quant/fit point method. The GFP gene of interest was amplified using 481P Fwd (5'-CAAGGAGGACGGCAACA-3') (SEQ ID NO: 36) and Rev (5'-CCTTGATGCCGTTCT-TCTGC-3') (SEQ ID NO: 37). A reference gene GAPDH was amplified using GAPDH Fwd (5'-AGCCACATCGCTCA-GACAC-3') (SEQ ID NO: 38) and GAPDH Rev (5'-GC-CCAATACGACCAAATCC-3') (SEQ ID NO: 39). The amplification efficiency of GFP mRNA and GAPDH mRNA was determined using Universal probe Library probe #148 (ROCHE) and Universal probe Library probe #60 (ROCHE), respectively. The amplification product was confirmed by electrophoresis to be the single product of interest, and the results were evaluated by relative quantification. The EGFP level was normalized with GAPDH, and this normalized value was used in comparison among samples with the GFP mRNA relative level of a sample supplemented only with pENTR-shRNA-GFP mut as 1. FIG. 8 shows results of RT-PCR-analyzing RNAi inhibition by L7Ae. The difference in expression level among the samples suggested that the GFP mRNA level recovers at the time of cotransfection with pENTR-shRNA-Box C/D-GFP and pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 and that RNAi is inhibited in a Box C/D sequencespecific manner in the presence of L7Ae.

[Confirmation of RNAi Control of L7Ae by FACS Analysis] On the day before transfection, HeLa-GFP cells were seeded over a 24-well plate at a concentration of 0.5×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. On the next day, the cells were cotransfected with each pENTR/H1/ TO shRNA expression vector and pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). To 0.8 µg each of pENTR-shRNA-Box C/D-GFP and pENTR-shRNA-Box C/D mut-GFP, 0, 0.40, or 0.80 µg of pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 was added, and 2 µl of Lipofectamine 2000 was added per sample. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the cells. 4 hours later, medium replacement was performed.

24 hours after the transfection, the medium in each well was removed, and the cells were dissociated using 200 µl of Trypsin-EDTA and suspended by the addition of 200 μ l of DMEM/F12. The cell suspension was transferred to a FACS tube and analyzed using FACSAria (BD). In this context, live cells were gated, and FITC was determined for 20000 cells. The analysis was conducted using a general method comprising calculating a mean value of the fluorescence intensities of all the measured cells. FIG. 9 shows the results of FACS analysis (results showing a mean value of GFP intensities of 20000 cells per sample). The results demonstrated that recovery in GFP expression is seen in a manner specific for cells cotransfected with pcDNA3.1-L7Ae-myc-His6 and pENTRshRNA-Box C/D-GFP. This suggested that as in the results of RT-PCR analysis, RNAi is inhibited in a Box C/D sequence-55 specific manner in the presence of L7Ae.

EXAMPLE 2

[Design of Protein Molecule-Responsive shRNA]

shRNA-U1A-4 for EGFP knockdown (5'-GGCAUCAAG-GUGAACUUCAGGGCGAAAGCCCUGAAG-

UUCACCUUGAUGCCAG-3; SEQ ID NO: 14) was designed. The shRNA-U1A-4 comprised: 5'-terminal 24 bases which were the same as those in the passenger strand of shRNA-GFP shown in FIG. **5**(A) used in Example 1; a guide strand which formed a duplex therewith; and a nonhybridized loop structure GAAA. This shRNA-U1A-4 was functionally

5

similar to shRNA-GFP and was used as a negative control. Moreover, shRNA-Box C/D-GFP (SEQ ID NO: 9) of FIG. 5(C) designed in Example 1 was used.

[In-Vitro Synthesis of shRNA]

[shRNA-U1A-4]

5.25 µL of template single-stranded DNA of shRNA-U1A-4 (100)μΜ, 5'-CTGGCATCAAGGTGAACT-TCAGGGCTTTCGCCCTGAAGTTCACCT-TGATGCCTAT AGTGAGTCGTATTAGC-3' SEQ ID NO:

31) and 5.25 μL of T7 sense primer (SEQ ID NO: 4) were used $_{10}$ to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

[shRNA-Box C/D-GFP]

It was produced according to the in-vitro synthesis method described in Example 1.

[Expression and Purification of L7Ae Protein]

It was produced according to the L7Ae protein expression 20 and purification using E. coli described in Example 1. [Evaluation in Cultured Cell System and RNP]

[Confirmation of RNAi Inhibition of L7Ae-shRNA Complex by Observation Under Fluorescence Microscope]

On the day before transfection, HeLa-GFP cells were 25 seeded over a 24-well plate at a concentration of 0.5×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. In this context, the HeLa-GFP cell strain was HeLa cells in which GFP was stably expressed in a hygromycin-resistant manner, and was kindly provided by Dr. T. Suzuki. On the next day, the 30 medium in the 24 wells was replaced by 500 µl of Opti-MEM (Invitrogen Corp.). At the same time, complexes of shRNA-Box C/D-GFP and the L7Ae protein were introduced into the cells by transfection using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). 0.6 µl of 10 µM shRNA-Box C/D-GFP, 0 35 μl, 0.6 μl, 1.2 μl, 2.4 μl, 4.8 μl, or 9.6 μl of 20 μM L7Ae protein, and 2 µl of 5× binding buffer were mixed, and ultrapure water was added thereto to bring the whole amount to 10 µl (for 9.6 µl of the L7Ae protein, the whole amount was brought to 12.2 μ l without the addition of ultrapure water). 40 μ l (for 9.6 μ l of 40 the L7Ae protein, 37.8 µl) of Opti-MEM was further added thereto and mixed, and the mixture was left standing at 4° C. for 30 minutes to form RNA-protein complexes. 48 µl of Opti-MEM and 2 µl of Lipofectamine 2000 were mixed and left standing at room temperature for 5 minutes. To this mix- 45 ture, 50 µl of the RNA-protein complex solution was added and mixed, and the mixture was left standing at room temperature for 20 minutes to form RNA-protein-lipid complexes, which were in turn added dropwise to the cells. 4 hours later, the medium was replaced by 500 µl of DMEM/ 50 F12. An shRNA-free molecule (Mock) and shRNA-U1A-4 were mixed with the L7Ae protein in the same way to form RNA-protein complexes, which were in turn introduced into the cells by transfection.

45 hours after the transfection, the cells were observed 55 under a fluorescence microscope. The intracellular GFP fluorescence was photographed with settings of 20x magnification and 488 nM excitation wavelength on a fluorescence microscope (OLYMPUS) per sample. At the same time, a phase-contrast image of the cells was also taken using trans- 60 mitted light. FIG. 10 shows a superimposed image of the fluorescence and phase-contrast images.

[Confirmation of RNAi Inhibition of L7Ae-shRNA Complex by FACS Analysis]

47 hours after the transfection, the medium in each well 65 was removed, and the cells were dissociated using 200 µl of Trypsin-EDTA and suspended by the addition of 200 µl of

22

DMEM/F12. The cell suspension was transferred to a FACS tube and analyzed using FACSAria (BD). The FACS is a method comprising irradiating, with laser light, free cells passing through a thin tube and analyzing the intensity of fluorescence emitted from the cells. In this context, live cells were gated, and FITC was determined for 10000 cells. FIG. 11 shows results of FACS-analyzing fluorescence intensity distribution. The results demonstrated that recovery in GFP expression was observed in a manner specific for the cells transfected with the complex of L7Ae and shRNA-Box C/D-GFP. This suggested that RNAi is inhibited in a Box C/D sequence-specific manner in the presence of L7Ae. For Mock, RNAi did not occur, and thus, GFP expression is seen in an L7Ae concentration-independent manner. On the other hand, for shRNA-U1A-4, RNAi was not inhibited, and thus, GFP expression was inhibited in an L7Ae concentrationindependent manner.

EXAMPLE 3

[Design of Protein Molecule-Responsive shRNA]

shRNA-Box C/D-Bc1-xL (FIG. 13(B)) and shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL (FIG. 13(C)) were designed by replacing a duplex site comprising the 5'-terminal 21 bases of shRNA-Box C/D-GFP or shRNA-Box C/D mut-GFP, by a duplex comprising a sequence of bases 365 to 385 of the Bc1-xL gene.

[Synthesis of shRNA]

[shRNA-Box C/D-Bc1-xL (FIG. 13(B) (SEQ ID NO: 43))] 5.25 µL of shRNA-Box C/D-Bc1xL template (100 µM, 5'-CTGCTTTGAACAGGTAGTGAATGAT-

CACGCCCTTTCGGGTCACATTCACTACCTGT

TCAAAGCTATAGTGAGTCGTATTAGC-3' (SEQ ID NO: 44)) as template DNA of shRNA and 5.25 μ L of T7 sense primer (100 µM, 5'-GCTAATACGACTCACTATA-3' (SEQ ID NO: 4)) were used to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

[shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL (FIG. 13(C) (SEQ ID NO: 45))]

5.25 µL of shRNA-Box C/D mut-Bc1xL template (100 5'-CTGCTTTGAACAGGTAGTGAATGATμΜ, GACGCCCTTTCGGGCACATTCACTACCTGTT

CAAAGCTATAGTGAGTCGTATTAGC-3' (SEQ ID NO: 46)) as template DNA of shRNA and 5.25 μL of T7 sense primer (100 µM, 5'-GCTAATACGACTCACTATA-3' (SEQ ID NO: 4)) were used to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

[shRNA-Bc1-xL (FIG. 13(A) (SEQ ID NO: 47))]

5.25 µL of shRNA-Bc1-xL template (100 µM, 5'-CT-GCTTTGAACAGGTAGTGAATGAACTC-

AGCTAT-TATGCTAGTTCATTCACTACCTGTTCAA AGTGAGTCGTATTAGC-3' (SEQ ID NO: 48)) as template DNA of shRNA and 5.25 µL of T7 sense primer (100 µM, 5'-GCTAATACGACTCACTATA-3' (SEQ ID NO: 4)) were used to perform transcription/synthesis and purification in the same way as in shRNA-Box C/D-GFP. The purification product was dissolved in 22 µL of ultrapure water. After concentration measurement, this solution was used in subsequent experiments.

5

[Confirmation of knockdown of Bc1-xL by shRNA-Bc1-xL]

On the day before transfection, HeLa-GFP cells were seeded over a 24-well plate at a concentration of 0.5×10^5 cells/well and cultured in a CO2 incubator at 37° C. On the next day, the cells were cotransfected with Bc1-xL, expression vectors, and shRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.). 0 or 0.4 µg of pBc1-xL and 10 µM shRNA-Bc1xL were mixed and brought to 50 µl with Opti-MEM I medium (Invitrogen Corp.). Then, a mixture of 1 µl of Lipo-10fectamine 2000 supplemented with 49 µl of Opti-MEM I medium was added per sample. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes. After addition of 400 µl of Opti-MEM I medium, the mixture was added dropwise to the cells. 4 hours later, medium replacement was performed.

24 hours after the transfection, the medium in each well was collected. Then, the cells were dissociated using 200 µl of Trypsin-EDTA and suspended by the addition of each medium collected in the previous step. The cell suspension 20 was subjected to centrifugal sedimentation at 500×g at 4° C. for 5 minutes and washed with 500 µl of PBS. Then, to the cell pellet, 30 µl of RIPA buffer (1×PBS, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.3 mg/ml PMSF+2 µg/ml Aprotinin) was added, and the mixture was left standing on ice for 30 25 minutes. The supernatant was collected by centrifugation (4° C., 15000 g, 20 minutes). The protein concentration was determined by the Lowry method using DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Bc1-xL was detected by western blotting. Proteins 30 extracted from the cells were developed by SDS-PAGE and subjected to western blotting. A primary antibody Anti-Bc1xL (SC-634) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1/500) and a secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1/2000) were used. 35 Color was developed using ECL Plus (GE Healthcare) (trademark) and detected using LAS3000 (FUJI FILM). By virtue of the cotransfection of shRNA-Bc1-xL with pBc1-xL, a band showing the expression of Bc1-xL did not appear. The results demonstrated Bc1-xL knockdown by shRNA-Bc1-xL 40 in the HeLa cells.

[Confirmation of Dicer Cleavage Inhibition by In-Vitro Dicer Cleavage Assay

The inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-Bc1xL and shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL by L7Ae was con- 45 firmed as follows using GTS, Inc. Recombinant Human Dicer Enzyme Kit according to the protocol: first, 0.4 µL of 1 µM shRNA, 2μ L of 4μ M or 8μ M L7Ae, 1μ L of 10μ M ATP, 0.5µL of 50 mM MgCl₂, 4 µL of Dicer Reaction Buffer (GTS, Inc.), 2 µL of 0.5 unit/µL Recombinant Dicer Enzyme, and 50 $0.1 \,\mu\text{L}$ of ultrapure water were mixed and reacted at $37^{\circ}\,\text{C}$. for 14 hours. Then, 2 µL of Dicer Stop Solution was added thereto and mixed. To 8 μ L of this mixed solution, 2 μ L of 5× dye solution was added, and the mixture was layered on a nondenaturing 15% polyacrylamide (1/30 bisacrylamide) gel 55 and electrophoresed at 4° C. for 50 minutes. After the electrophoresis, the gel was stained with SYBR Green, and bands were confirmed using FLA-7000 (FUJI FILM). FIG. 14 shows results of the inhibition of Dicer cleavage of shRNA-Box C/D-Bc1-xL and shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL by 60 L7Ae using an in-vitro reconstituted Dicer system. In FIG. 14, the mark "-" in L7Ae represents that L7Ae was not used. Likewise, the mark "+" in Dicer represents that Dicer was used, and the mark "-" represents that Dicer was not used. The results suggested that upon sequence-specific binding to 65 L7Ae, shRNA-Box C/D-Bc1-xL is made insusceptible to cleavage by Dicer.

Construction/Synthesis of shRNA Expression Plasmid [Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-Bc1-xL (SEQ ID NO: 49)]

pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-Bc1-xL was synthesized and purified in the same way as above using $5 \,\mu\text{L}$ of Box C/D Bc1-xL Top strand (200 µM, 5'-CACCGCTTTGAA-CAGGTAGTGAATGTGAC-

CCGAAAGGGCGTGATCATTCACTACC TGT-

- TCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 50)) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/TO vectors (Invitrogen Corp.) and Box C/D Bc1xL Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGCTTTGAACAGG-TAGTGAATGATCACGCCCTTTCGGGTCA-
- CATTCACTACC TGTTCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 51)) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 μ L of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

[Synthesis of pENTR H1 TO-shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL (SEO ID NO: 52)]

pENTR/H1/TO-Box C/D mut-Bc1-xL was synthesized and purified in the same way as above using $5 \,\mu\text{L}$ of Box C/D mut Bc1-xL Top strand (200 µM, 5'-CACCGCTTTGAA-CAGGTAGTGAATGTGCCCGAAAGGGCGT-

CATCATTCACTACCT GTTCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 53)) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/TO vectors (Invitrogen Corp.) and Box C/D mut Bc1-xL Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGCTTTGAACAGGTAGTGAATGAT-

GACGCCCTTTCGGGGCACATTCACTACCT

GTTCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 54)) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 μ L of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

[Synthesis of pENTR/H1/TO-shRNA-Bc1-xL (SEQ ID NO: 55)]

pENTR/H1/TO-shRNA-Bc1-xL was synthesized and purified in the same way as above using 5 µL of Bc1-xL Top strand (200 µM, 5'-CACCGCTTTGAACAGGTAGTGAAT-GAACTAGCATAGAGTTCATTCACTACCTGTT

CAAAGC-3' (SEQ ID NO: 56)) as single-stranded DNA containing an shRNA-encoding sequence for insertion to pENTR/H1/TO vectors (Invitrogen Corp.) and Bc1-xL Bottom strand (200 µM, 5'-AAAAGCTTTGAACAGGTAGT-GAATGAACTCTATGCTAGTTCATTCACTACCTGTT

CAAAGC-3' (SEQ ID NO: 57)) as single-stranded DNA containing a complementary strand thereof, and dissolved by the addition of 55 µL of ultrapure water. After plasmid vector concentration measurement, this was used in subsequent experiments.

[Experiment of RNA-Protein Complex Introduction]

To confirm the control of Bc1-xL knockdown by the binding between the L7Ae protein and shRNA-Box C/D-Bc1-xL in cultured human cancer cells, RNA-protein complexes were introduced into the cells, and the expression of Bc1-xL was detected by western blotting.

On the previous day, uterine cervix cancer-derived HeLa cells were seeded over a 24-well plate at a concentration of 1.0×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. On the next day, transfection was performed twice using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). To 0.4 μg of pBc1-xL or pBimEL, 1 μl of Lipofectamine 2000 was added. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the medium for HeLa cells. 4.5 hours later, medium replacement was performed. Immediately thereafter, the second transfection was performed. 2.5 pmol (concentration in the medium: 5 nM) of shRNA-Box C/D-Bc1-xL or shRNA-Box C/D mut-Bc1-xL and 0 or 200 pmol (concentration in the medium: 400 nM) of the purified L7Ae protein were mixed to form complexes. To the complexes, 1 μ l of Lipofectamine 2000 was added, and the complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the medium for HeLa cells. 5 hours later, medium replacement was performed.

22 hours after the second transfection, the medium in each ¹⁰ well was collected. Then, the cells were dissociated using 200 μ l of Trypsin-EDTA and suspended by the addition of each medium collected in the previous step. The cell suspension was subjected to centrifugal sedimentation at 500×g at 4° C. for 5 minutes and washed with 500 μ l of PBS. Then, to the cell pellet, 30 μ l of RIPA buffer (1×PBS, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.3 mg/ml PMSF+2 g/ml Aprotinin) was added, and the mixture was left standing on ice for 30 minutes. The supernatant was collected by centrifugation (4° 20 C., 15000× g, 20 minutes). The protein concentration was determined by the Lowry method using DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Bc1-xL or GAPDH was detected by western blotting. Proteins extracted from the cells were developed by SDS-PAGE 25 and subjected to western blotting. A primary antibody Anti-Bc1-xL (SC-634) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1/500) and a secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1/2000) were used. Color was developed using ECL Plus (GE Healthcare) (trademark) and detected using LAS3000 (FUJI FILM). Likewise, GAPDH was subjected to western blotting using a primary antibody Anti-GAPDH (MAB374) (Chemicon International, Inc.) (1/2000) and a secondary antibody Goat Anti-Mouse 35 IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1/2000). These results demonstrated that Bc1-xL knockdown was inhibited (lane 3) by the binding between the L7Ae protein and shRNA-Box C/D-Bc1-xL in the HeLa cells. Protein extraction from cells and L7Ae detection shown below 40 were performed in the same way. FIG. 15 shows intracellular Bc1-xL expression. It was also confirmed that the protein expression level of GAPDH used as a standard control did not change. The intensities of detected Bc1-xL bands were added up. The results are shown in FIG. 16. In FIGS. 15 and 16, sh 45 is an abbreviation of "shRNA".

[Experiment of Plasmid Introduction]

To confirm the control of Bc1-xL knockdown by the binding between the L7Ae protein and shRNA-Box C/D-Bc1-xL in cultured human cancer cells, the cells were cotransfected 50 with plasmids for expressions of Bc1-xL, L7Ae, and shRNA, and the expression of Bc1-xL was detected by western blotting.

On the previous day, uterine cervix cancer-derived HeLa cells were seeded over a 12-well plate at a concentration of 55 3.0×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. On the next day, transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). 0.2 µg of pBc1-xL, 0.4 µg of pcDNA3.1-L7Ae, and 0.6 µg of pENTR/ H1/TO-shRNA-Box C/D-Bc1-xL were mixed, and 2.5 µl of 60 Lipofectamine 2000 was added thereto. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the medium for HeLa cells. For pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-mut Bc1-xL, pENTR/H1/ TO-shRNA-Bc1-xL, and pENTR/H1/TO-shRNA-GFP mut 65 (negative control), the same procedures were also performed. 0.25 µg of pcDNA-AmCyan-myc-His6 ((SEQ ID NO: 58) or

 $0.2 \,\mu g$ of pBc1-xL were introduced alone as a control plasmid into the cells. 4 hours later, medium replacement was performed.

24 hours after the transfection, the medium in each well was collected. Then, the cells were dissociated using 200 μ l of Trypsin-EDTA and suspended by the addition of each medium collected in the previous step. The cell suspension was subjected to centrifugal sedimentation at 500× g at 4° C. for 5 minutes and washed with 500 μ l of PBS. Then, to the cell pellet, 100 μ l of RIPA buffer (1×PBS, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.3 mg/ml PMSF+2 μ g/ml Aprotinin) was added, and the mixture was left standing on ice for 30 minutes. The supernatant was collected by centrifugation (4° C., 15000 g, 20 minutes). The protein concentration was determined by the Lowry method using DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Bc1-xL or GAPDH was detected by western blotting. Proteins extracted from the cells were developed by SDS-PAGE and subjected to western blotting. A primary antibody Anti-Bc1-xL (SC-634) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1/500) and a secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1/2000) were used. Color was developed using ECL Plus (GE Healthcare) (trademark) and detected using LAS3000 (FUJI FILM). Likewise, GAPDH was subjected to western blotting using a primary antibody Anti-GAPDH (MAB374) (Chemicon International, Inc.) (1/2000) and a secondary antibody Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1/2000). These results demonstrated that Bc1-xL knockdown was inhibited (lane 5) by the binding between the L7Ae protein and shRNA-Box C/D-Bc1-xL in the HeLa cells. FIG. 17 shows intracellular Bc1-xL expression. It was also confirmed that the protein expression level of GAPDH used as a standard control did not change. The intensities of detected Bc1-xL bands were added up. The results are shown in FIG. **18.** In FIG. **18**, sh in the lanes **3** to **6** is an abbreviation of "shRNA".

[Experiment of Cell Death Control by Bc1-xL Expression Level Control Responsive to L7Ae Protein]

An apoptosis-promoting protein Bim-EL and an apoptosis-suppressing protein Bc1-xL have antagonistic effect on each other, and a relatively larger amount of the protein affects the fate of cells. Thus, an experiment was conducted which involved controlling Bc1-xL expression levels using the control of Bc1-xL knockdown by the binding between the L7Ae protein and shRNA-Box C/D-Bc1-xL in cultured human cancer cells, and controlling cell death by changing the relative amount of Bc1-xL to Bim-EL.

On the previous day, uterine cervix cancer-derived HeLa cells were seeded over a 24-well plate at a concentration of 0.5×10^5 cells/well and cultured in a CO₂ incubator at 37° C. On the next day, transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) (trademark). To 0.3 µg of pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-Bc1-xL, 0.2 µg of pBc1xL, 0.2 µg of pBimEL, and 0.2 µg of pcDNA3.1-AsRed2-L7Ae were added and mixed with a medium, and 1.25 µl of Lipofectamine 2000 was added thereto. These DNA-lipid complexes were incubated at room temperature for 20 minutes and added dropwise to the medium for HeLa cells. Approximately 4 hours later, medium replacement was performed. For pcDNA3.1 (+) myc H is A vectors (Invitrogen Corp., control vector), pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/Dmut Bc1-xL, pENTR/H1/TO-shRNA-Bc1-xL, and pENTR/ H1/TO-shRNA-GFP mut (negative control), the same procedures were also performed.

24 hours after the transfection, the medium in each well was collected. Then, the cells were dissociated using $200 \,\mu$ l of

Trypsin-EDTA and suspended by the addition of each medium collected in the previous step. The cell suspension was subjected to centrifugal sedimentation at 500× g at 4° C. for 3 minutes and washed with 300 µl of PBS. Then, to the cell pellet, a mixed solution of 3 µl of annexin V, Pacific Blue conjugate for flow cytometry (Invitrogen Corp.) and 50 ul of annexin-binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) was added. After tapping, the mixture was left standing at room temperature for 30 minutes for staining. Then, each sample was suspended by the addition of 200 µl of annexin-binding buffer. The cell suspension was transferred to a FACS tube and analyzed using FACSAria (BD). In this context, measurement was conducted for 30000 cells. For the analysis, first, cells emitting red fluorescence 15 attributed to AsRed2-L7 were gated, and blue fluorescence intensity derived from Pacific Blue was measured for the cells within the gate using a filter at an excitation wavelength of 405 nm and a fluorescence wavelength of 430-470 nm. The ratio of the number of cells having this fluorescence intensity 20 larger than the reference was measured. As the reference for determining cell death, phosphatidylserine, which is a lipid present in a manner specific for the outer membranes of dead cells, was stained with annexin V, Pacific Blue conjugate for flow cytometry (Invitrogen Corp.), and cells in which blue 25 fluorescence intensity was larger than the upper limit of intensities of untreated cell samples stained in the same way were counted as dead cells.

As a result, the sample supplemented with the control vector (pcDNA3.1 (+) myc H is A vector) had a dead cell ratio $_{30}$ of 8.3%, the sample supplemented with pENTR/H1/TO-shRNA-GFP mut (negative control) had a dead cell ratio of

28

10.1%, and the sample supplemented with pENTR/H1/TOshRNA-Box C/D-Bc1-xL had a dead cell ratio of 13.4%. By contrast, the sample supplemented with pENTR/H1/TOshRNA-Bc1-xL had a dead cell ratio of 34.5%, and the sample supplemented with pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-mut Bc1-xL had a dead cell ratio of 42.5%. This experimental result and the Bc1-xL detection results shown in FIGS. 17 and 18 demonstrated that cells in which Bc1-xL expression level was suppressed by knockdown died approximately 3 to 4 times more than cells maintaining the expression of Bc1-xL. From the results showing that the sample supplemented with pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-Bc1xL had a dead cell ratio of 13.4%, whereas the sample supplemented with pENTR/H1/TO-shRNA-Box C/D-mut Bc1-xL had a dead cell ratio of 42.5%, it was further confirmed that cell death could be controlled suppressively by inhibiting Bc1-xL protein knockdown by L7Ae in a Box C/D sequencespecific manner.

Industrial Applicability

According to a protein-responsive shRNA and an RNAi control system using an RNP motif according to the present invention, a sensor shRNA and a protein specifically binding to it can control RNAi and are thus useful in the construction of biosensors for quantifying the expression of intracellular marker proteins without destroying cells or artificial gene circuits capable of activating the translation of proteins of interest in response to the expression level of marker proteins. For example, the present invention produces significant effect that leads to the treatment of diseases such as cancer or Alzheimer's disease by activating apoptosis-inducing proteins in response to the expression of cancer marker proteins or as a basic technique for developing protein drugs.

SEQUENCE LISTING

```
<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 58
<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 139
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: homo sapiens
<400> SEOUENCE: 1
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
         5
                    10
Arg Gly Ser His Met Tyr Val Arg Phe Glu Val Pro Glu Asp Met Gln 20 25 30
Asn Glu Ala Leu Ser Leu Leu Glu Lys Val Arg Glu Ser Gly Lys Val
                           40
Lys Lys Gly Thr Asn Glu Thr Thr Lys Ala Val Glu Arg Gly Leu Ala
                      55
Lys Leu Val Tyr Ile Ala Glu Asp Val Asp Pro Pro Glu Ile Val Ala
65 70 75 80
His Leu Pro Leu Leu Cys Glu Glu Lys Asn Val Pro Tyr Ile Tyr Val
                85
                                   90
Lys Ser Lys Asn Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Ile Glu Val Pro Cys
            100
                               105
                                                   110
Ala Ser Ala Ala Ile Ile Asn Glu Gly Glu Leu Arg Lys Glu Leu Gly
                          120
                                               125
       115
Ser Leu Val Glu Lys Ile Lys Gly Leu Gln Lys
    130
                       135
```

pənurquop-

30

0801

1020 096

006

048

084

07/ 099

009 0₽9

08Þ

02Đ

098

67

ασσταστασσο σελεσσοσε σατασασσσε τετεσσοσε τεσασστέσα αστοσασστέ 300 утсодать адедотьые ддеасотода соссаавааа стедатьду дедатддье 240 αττετέσας ασθτέσαςα ασττέσεσα τεααθοτότα αατόθαθας τέσατταθα 08T σαθοθήθαος θοίασοττα οσαθοθοσοί αθοθοσούος σοττέσθοτ τοττοσότιο 150 ραθοθαθείδα δεοδοσος δεθαδαδοδο θεραθοδοδο δοδδδεδεδε εδδερασδοδ 09 <400> ZEÕNENCE: 2 <223> OTHER INFORMATION: pet-28b+L7Ae <220> FEATURE: <SI3> ORGANISM: Artificial <SI2> TYPE: DNA < SII> LENGTH: 5653 <JUS <510> ZEÕ ID NO 2 детаатасуа стеастата 6 T <400> REQUENCE: 4 <223> OTHER INFORMATION: T7 sense primer <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <S12> TYPE: DNA <SI1> LENGTH: 19 <510> ZEŐ ID NO 4 сясядсдядс сдсяссядс 6 T <400> REONENCE: 3 <223> OTHER INFORMATION: T7 promoter primer antisense S220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artiticial <SI2> TYPE: DNA <SII> LENGTH: 19 <JTO> ZTO> ZEÕ ID NO 3 аддедлдвид сдвавдеида сес 23 <400> ZEÕNENCE: S <213> ORGANISM: homo sapiens <SI2> TYPE: RNA <SJI> LENGTH: 23 <510> 2EÕ ID NO 5

стеслостдя асоддагае состодалься состодальное сдетегосод додагодоад аятсясяется воделетора сосодое дезодаваете соследовае совлеятае

сутельсат соубдатьог уссбадода дасудаатас усульсуст траларуас адастедьте авсаддееад седетасует сутельсава ателегодся теласелале

האדכהכבונט מטרטהכט אורכטונט אטאגרטטטא אאטרנדנט אטרטרניט אינדטרדנט

врердеват вларовалае вевотротоо соттавелае тореболее отвоевоотр

астелесуяд усадтессят дудатоделя датестодта тедотегос аттесодаете

ссясяссяда ястассяяся ссясяется дааваядоод стестусаят дааддадаа тесовостая застаяться садаяласт сасоводся садагсара восторо

сододовает учеление сосстатть учельного саваначие саваначие

אראאלגדנ אארטרט דנאאראאל ארנארטרט אראארדני אראארדיטא ארטטרטרט

сператея саядудатее сосодатес досстатеда сталалала адоедатета

מרדנאמדמני טעמטרטרנטר דטמאמטנטט אאמטניגיע מאטטרארטי אאטטיט איידארט

		1000	\sim
-7 H / S	17.17	X X .	SO

pənuțquos-

3480	ссддрдссря	ддредядярс	ငေအရွင်ရင်ငေ	гдааддегег	crdscrdddr	ടേർർദ്ദർർദർ
3420	сссдсдссся	атадтсатдс	rdcddcdacd	садтсатаад	агаадаада	gagttgcatg
3360	ссгдгосгяс	getgeeggea	ရႊငငငေအရဲအရဲင	сдеедааат	аадсддтсст	geteeagega
3300	teategtege	дясяддссдя	гассдсаадс	адаттссдаа	адддсдрдся	ggettgageg
3540	сядъдасдая	дгаасаааяс	дааасдсссд	actcccacc	атаатддсст	ဒောင်ရင်ငေရရငရ
08TE	მჺმმმმაიმა	рарадавае	дядсясдагс	резедаеад	sgccgggfcc	ငငရငငေအရငင္ရင
3150	сааддсаасс	бворевторт	ставство	сдедгягедд	cacgttcgct	gcagtcgctt
0908	ғтғдсядся	дредеядяед	rgttgeteag	ссяттсятдг	ааассдаада	ငေဒနေခငေခငေရဌ
3000	ссядастта	tteegegegttt	dddcdcfdsc	гаатдуса	атссддааса	гдсдягдсяд
5640	agcagcatcc	ငေဒရဲရဲရဲင္ေဒရင္ရင	вдарарава	атасадатдт	сдеттедтта	ссаатдосад
0882	fcsctcaggg	сададаааа	მამმამმაც	сддтатддат	ааасаастдд	բբдբдցддд
2820	гастддаасд	cstgcccggt	гдатдатдаа	сясдддддас	атдетеаеда	နင်ရန်ရန်ရန်
0922	гассдатдаа	მმმგლფემშ	tetgtteatg	аадддддагг	ασεεσεαεαε	ggtcactgat
0072	ттесстдете	здддсддддр	ggccatgtta	гдагааадсд	<u> α</u> ταταδαετες	аадсуттаат
0492	дееессяд	адстсдттда	ateegegegtee	ctgcctgttc	тсасадатдт	дғдәәдсдәғ
2280	cagegtggtc	таздостат	მიფმიემიმმ	алсдедедад	сеяссяссда	ατττεσεσα
2520	гдгдгсядяд	дддадсгдся	<u>α</u> αςcgtctcc	дасаадстдт	госдоргаса	дереседдея
0945	<u> </u>	дедееердяе	асссдстдас	ясссдссяяс	ရငရငငငငရဲအင	ggtcatggct
2400	гясдгдясгд	седетатеде	адтатасаст	садстаядсс	гдатдссдса	саатстдстс
2340	астетеадта	сататдугдс	гсясассдся	дғасаағяғғ	трасовата	tattttetee
2280	ငင္ငင္ဂဒိနင္ရင္မင္ရင္မ	ငေရင်နေရေအျင်င	ввевдавад	ငရအရင္ရငေအရင္ရရ	ငငရဲဒရငရငအရ	အဌင္ဒေဌနနင္အေဒ
2220	cdcrcdccdc	дадстдатас	geetttgagt	содтатасо	стдтддагаа	тесссраятт
0972	гссгдсдггэ	асатдттст	catttgata	sttttgstgg	αθεεσσεάας	дееррегае
0012	ငေရငဒေနငေရငရ	9933333696	сддядссгяг	85cs388888	тдтдагдсгс	cdrcdsrrrr
2040	сгдэсггдэд	тесдееяеет	ссрдрсдддр	теттатад	ясдеердаря	ссяддддая
086T	даддадстт	дядадсдсяс	дссддяясяд	аадсддсадд	ддгягссддг	ааддоддаса
026I	сдяяддаядя	ссясдерресс	сдадааадсд	дсд£дядс£я	датасстаса	ассдаастда
098T	аясдасстас	მანღმმუეან	နငင္ရင္ရေဒျငင္ရင္	333 εες3ε3c	дердаясдад	ငေအရငရရင္ငရေရ
008T	ggataaggcg	датадтасс	дястсаадас	гяссдддггд	адтедтет	адъддсдата
0₽∠ፒ	ααεραστασε	тдегосадт	стдетаятес	атасстедет	сяссдеетае	аястстдгад
089T	ссясттсяад	адтадаса	дсасадсадс	гдгоогра	свссаватас	အဌခဒ္ဌဒန္ဒန
079T	rggetteage	сдааддтаас	астеттте	ададстасса	тдееддатса	<u> Α</u> ςαα <u>ε</u> εεαεε
09ST	ရငင်နငငေနရငဗ	2262266666	сезавасаа Стусавасаа	адтотдотая	ttetgegegt	датестттт
00ST	атеттеттда	вдавсазадд	сссдгядаа	ခရင်ရင်ငန်ရနင	сдрессясрд	գցեցացեեեե
0440	аатсссттаа	беробрара	дстетер	Бовреорьет	астдтттатд	сссррдгарр
1380	стсатаасас	рртатару	воодаравов	ငင္မရဲအရငအေရ	таатедедеде	тдтеддаатт
1320	гсадсатсса	сссятатааа	сссатттата	сгятсдедад	ггдеседяся	regeacetga
097T	сдатадаттд	сссятасаат	сятсдддагг	аястетддед	стерездаяс	сттгдосятд
1200	дсяясдстяс	аасатсаттд	тетеятетдт	адъсъдасса	садесадѣѣѣ	таааттесдт
07140	ದಿರ್ಶದಿತದಿಂತ	сссдясддсс	ддагаааагд	ссяддядгас	ссятдсятся	гддгдядгяя

7E

IE

<SITS> LABE: DNF
<SITS> LABE: DNF
<SITO> ZEĞ ID NO 0

2653					gat	астататссод
0799	8989999999	βεεεεεασεε	дссссдядда	стстааасдд	cccffdddac	стадсатас
0855	гдадсаатаа	cfdccøccdc	მფმჺჺმმჺჺმ	аааддаадст	всавадееед	ссддсгдсгя
2220	ссястдадат	вссассасса	၁၁ဧ၁၉နဗ္ဗ၁၃၁	ссядаядгаа	тсазаддеет	дгддядяядя
0975	тддаадсстт	даваддадст	მმფმფმсჺმფ	веровеотее	ငရိရငေခရငရခင	ccatgcgctt
0075	сяғғдяддғд	aaacraraaa	дассттддаа	эверьвэрьв	ьвэтерьетта	дгдоодгяся
0769	ರಿರತರಿತತರಿತ	гесгсгдсдя	catetgeeee	дяғсдғғдсғ	ясссдссгдя	даддагдггд
5280	стасатедса	свавдетедт	ສ ຝີດີດີດີສຣ ຼ ເດີດີ	ддсгдгддзд	адасдасааа	ддряссяясд
5220	ддгааадааа	ададсддгаа	ааддггаддд	гсгдсгддад	аадстстдад	атдсадаасд
0975	сссгдяддяс	дагггдаддг	атдтасдтда	сддсядссяр	raaraccaca	၁၁၉၄၁၉၄၃၄၄
0015	састедеот	дссятсятся	атдддсадса	дадататасс	сттаадаад	стеретая
0409	стадааатаа	сааттесест	дадсддатаа	333399922	астедетата	ааттаатасд
086₽	датеседеда	стодадатстс	дсдгядадда	<u>α</u> ες ας αλές ας α	рдосддосяс	дсдссддрдя
4620	cgcacctgtg	ငရငငေအရငအခင	gcgatatagg	ggtgatgtcg	5755555775	ငရိဒရိဇငေရေဒင္
09817	ငငငရဲအချင်ရရ	сдетеатдад	ငငရဲဒခဒငေခဒရ	сатасссасд	ддеердееве	ငငေရိရငေးခေရိရ
008₽	садеадеес	ສຊິສຽຊີຊີຊີຊີຊີ	gcatgcaagg	ааддаатддг	ငငရငငရငငရင	ငငရင်ငရအရငအ
0740	гаддстдадд	вадсссядгад	астаддаадс	cgacteetge	стесеррядо	тегедяедег
089₽	дғдғссдддғ	ссяттсдатд	ցցցեեեեցզց	атассдсдаа	статсатдсс	сггссдддсд
029₽	ааттдастст	сяссяссс£д	дтесясатт	аасдстастд	дасатсдтат	сатастство
095₽	გგვაღალე	ддрсрагаа	აგგამეგგავი	тддтгагса	<u> </u> β <u>τ</u> ββς <u>τ</u> ββςς	ссдсядааас
005₽	τοσοβοβεεε	ттовотт	ccatcgccgc	стсядегеед	дддаатдгаа	ссясдеддер
0 4 4 4 0	адстдстдгд	tttgcccgcc	дсаасдастд	асдесаатса	მმამმ£მმсა	давссядяср
4380	მმიმიმენიფ	аятттдодас	t cgccgcgaac	сдадатта	ffgafcggcg	рдсясссяд
4320	ခင္ငင္ကေဒၚင္ရင္လင္ရင	сяссятсдас	cgettegtte	ασττοσαοσο	сдетттасад	rdrdcsccgc
4560	дебеебебоб	<u>α</u> εαςαςτας	тсядсссяст	ғадтеатда	атссадсдда	cateetggte
4200	နငနင္တငေနနင်င္ပဌ	ддсядсггсс	саттадтдса	<u></u> အင္အရင္ရင္မေဒျခန	атсаадааат	ддреядядяс
0₽Т₽	атдадтагсг	аатастдттд	ддадааад	ссдрорран	сядссдсдга	дересяедее
080₽	дедассадат	дғдәсссәяғ	сдягггдсгд	ရငင်ရင္လင္ရေဌငဗ	сазедддеее	адасадааст
4020	နာင်ရင်ရင်ရေ	အရှင်နေရှင်ရင်	сарссадсс	дтададататт	ттдаттдада	гсддсгдааг
0968	сдрросдаря	αταθαστεα	тддсястсся	ааассддаса	адстедстая	дсасстдоас
3900	ссстсяттся	дддвасдагд	βςατςgcagt	ттддсяясся	сатстдатсд	ငရငငေအရငရင
3840	<u> α</u> ςαςας τρα	стеддтватд	მсядсссддя	ရင်နငင်နေင်ရင	сдадататсс	атсссастас
3780	ά τ ετεάτεατ	αστατοτεα	татаасатда та	васддсддда	дягддгддгг	аатсстдттт
3720	<u></u> အရငအရရင	αθεεεασσος	<u> α</u> β <u>τ</u> εςεεβε <u>τ</u>	tgcagcaagc	ငင်ရအရအရောင	იიმიიქმიი
0998	ттдесеггея	ဒေဒဒေဒရင်ဥဒ	ရင်ရအင်ရရရ	стетсясся	адеддееее	င္ရရွင္ရရွင္ေအရ
3000	дееедсаеве	ർർദർദർ	ငငၶಆငရငရငရ	аатдаатсдд	садстдсатт	ccfdfcdfdc
3240	адъсдддааа	cccdcfffcc	gegeteaetg	таястдедть	таасттасат	ခင်ရခင်ရခင်

pənuțquop-

Polla / 4000

028 / 1/2 8'8 SU

74

pənurquop-

<213> ORGANISM: Artificial
 <223> ORGANISM: Artificial
 <223> ORHER INFORMATION: pcDNA3_1_b7Ae_myc_His6

caggerere ageaggeaga agraegeaaa geargearer caartagrea geaaceagge 5550 כסמפאמדנדה מכטכטממדנה מדנכנטנטע מנטנטנטני טנימטטטנטי איזאגאניניט 0977 стедаетсяе адодаетсе десдаетсед деселатоде садалада десдаетсаа 0012 тетальнуе улогострето содалосуда доласово досстатово удеобальное 0402 כטנגטנטטט כארכטכנט אנאטאטטט דינכטככני לטאכטנינטא טרככאכטנינ 086T 1920 ссодятстя дедостелод доясосодяя сосяяяяяс седятсядад сдагод стессодося сдетодосода саладотослая агодододот сосетелодо 098T agegragaceg cracactege cagegeceta gegecegete ettecetee 008T адарярсссс ясасассра рядсадсяся рряядсасаа садардада адррясасас 0740 089T асгаааавта саагаассь гугаасгог аяаасаазу дууссудаа cradadadra daardadaa daycayaa dadayadayrr adayyayy radcyadayr J620 деостессе алеллянда дулалесося содолеров рольностае 09ST 00ST 0740 כמככתרכתכ תדדקתקדדנת תמככטכרטת בכתטכנרטש כדטרטככדנ בתקדנטככת дводераять сародая дадарства агагдсадая сдерсагсаг 08ET 1350 стеддаядое тедетдадая дасталадде стесадаяда даастелает сулдтелада адсяггаяда гассагасас ггодасадса ягаагсааса аддададсг дадааадаад 1560 даддадаяда агдгдосдга сагггасдгг аааадсаада асдассггдд аадддогдгд 0021 αττεσετος οαθαθατός τοαοσοσος θαθατοθετό στοατοτόσο σοτοστόσο 07T40 ааддгааада ааддгассаа суадасуаса ааддстугу адаууудаст уусаааустс 080T агссгдаядя асатдсаядая сдаадстсту адготдогду адааддттад дуададсудт 1020 בממקכדנקטה מככטמקכנכט טמנכטמרכמו מנטכטקכ לנמנטרמכטה טמטמוננטמט 096 стдетьяста детальные выстальные верольтые детадетаде 006 дгаддедеде асддедддад дестагата деададетег седдегааст ададаасса 048 азаятсаясу удастігоса адагуісуія асадогосус оссатідасу садагуусу 08/ 074 coccerers carggrave cogreredge agracateaa roggcorega rageggereg 099 009 argocoagea cargacorea rgggactero cracteggca gracarorac gractageoa 075 ateatacge anglacge cetategaeg teaatgaegg taaatggeee geetggeatt астуасуса атууугу сатосууса адастуссая стеуусадта сагсадугу 08₽ сосдесечет дасубелата агдаеутар тесееладар адоссадата дууластее 45O гддядгесод сдргасягая страсудгая ярдуссодос гддогдасод сосаясдасо 098 300 алельоров дволделля стасурудся астадста, адоссатата ττασσστεα σοστέτεσο στοστέσσο ατστασσσσο σασατατάο σστέσσατε 042 суадсаваат стаадстаса асаадусаад устерассуа саатеусабу аауаатегус 08T ככמכשרשמרר ששמככשמרשר כרמכרככרם כררמרמרקרר ממשממרכמכר משמרשמרמכמ 150 09 дасудатсоуд дадатотосо дагосостат уубодотос садгасальс густогодагу <400> REGUENCE: 6

9E
LE

pənuțquos-

095₽	сттодачаа	адссадттас	αστοτασα	тддтатстдс	даасадтатт	тасастадаа та
005₽	сяястасддс	ց ցէցցէցցсс	дядттстая	сддрдсрася	адгатдгада	<u></u> အင်္ဂဒေဒဒေဒဒေ
04440	таасаддатт	ဒေရငဒေဒင္နေရရ	ငေးငင်ရွင်အရ	сдясттатсд	сддгяядяся	gagteceaace
4380	статедтет	ғатссддтаа	cactacacct	гсядоосдяс	адсососодг	rdrdrdcscd
4320	csagetgggc	τοθετοθοτο	гсддгдгядд	дғағсғсадғ	сясдстдтад	тотадада
4260	cdfddcdcff	сггсдддяяд	geetttetee	атасстдтсс	сдерряссдд	ссдясссрдс
4200	стотостдет	cccccdcdcd	ссрддяядср	a dcdrrrccc	ааадатасса	асаддастат
0₽Т₽	дсдяяясссд	дгсядяддгд	сдясдсрсяя	тсасааааат	сгдясдядся	creedecece
080₽	стессятада	բցշեցցշցեե	နေရရငငေရငရင	даассутааа	ааааддссад	<u></u> အအgggccagc
4020	ငေဒင္ဒရင္ခရင္ကအ	ငေဒဂိဂိဒေဒဒဂိဒဒ	дддагаасд	свсвдавтсв	гасддтгатс	ааддсддгаа
3960	адетелетел	дядсддгягс	ငရိရင္နရင္ရရရင	сгсддгсдгг	seregergeg	гедерезера
3900	tteedettee	rrdddcdcrc	адстедедея	പ്പുട്ടുക്കുന്നും	ရငေဗဗငရငရင	саатдаатсд
3840	ссядстдсат	яссрдродра	сядссдддяя	ασσσαστεεσ	тдедетеяет	ттадсусус
3780	стаястсаса	аатдадтдад	<u>ғ</u> аааағассғ	дғдғяздас	даадсатааа	агасдадссд
3720	рссясясяяс	сдетевеват	ааттуттатс	rccrdrdrda	сатадстдтт	таатсатддт
0998	გაფაღემაც	сстстадста	атассдтсда	tcatgtetgt	атдтатста	ааастсатса
3600	<u>τ</u> θθεεεθεςς	аттстадттд	сетсястдс	тазадсатт	аттсасааа	адсатсасаа
3240	твервевте	атдутасаа	дсядстата	стедетеле	сссяссссяя	αθεεεεεα
3480	ссгоягдогд	ತ ರ್ಧರ್ಧರ್ರಧ್ರ	атдатестес	ငရငငရရင္နရရ	гггссдддя	стеддаатед
3450	အအဖွင့်ငံဗုဒ္ဓရွင	сеттетатаа	fccsccgccg	адатттедат	tgccatcacg	အင္ခေငငေနနင္ငင
3360	ငရင္ေဒေဒရင္ရင္	усдааатдас	τοτάδάδττο	гдадсдддас	сдядттстс	дееррерая
3300	деерредеер	geagegeate	стеседятте	ddfsfcdccd	сдедерерс	яссдеттеет
3540	gaatggggctg	<u> αςτ</u> τααςαας	ттдстдаада	всседтдата	agegttgget	атсаддасат
08TE	ရငရရအငေရင္	acraaarara	setgtgggegg	ддяггсягсд	ccgetttet	сддаааасдд
3750	аататсатда	cracrracca	атдасдатдс	дгсдгдяссс	сдяддятстс	rdcccdycdd
3060	အဆွဲရှင်ရင်ရင	ငရငငေးရရင္ရင	ссдяястдтт	средедевяд	дсягсядддд	гддясдяядя
3000	саддатдатс	тертарая	рдаядссдд	сдгястсддя	ငရဲအရငရဲအရငအ	аясатсдсат
0462	сяссяядсдя	сссяттсдас	сддсгяссгд	асдеттдате	дсддсрдсяр	атдсаатдсд
2880	атсатддстд	дааадтатсс	сгесгдесдя	сссасстт <u>д</u>	гсгссгдгся	ငေဒဒဒဒဒဒဒဒဒဒဒဒ
2820	მმсმяяд£მс	αςταςταττα	даадддастд	астдаадсдд	cgacgttgtc	ဒေရငင်ရင်ရငင
0972	<u> </u>	ငနငဗနငဗဗဗင	ငရင္ရရရင္ရရရင	дсдсддсгяг	გეგალეგელი	атдаастдса
0072	ддрдсссрдя	cgacctgtcc	стдесаадас	ccggttcttt	მიჟმმმმიმი	<u> α</u> βαράς αθα
0492	αςεαεάεεες	стстдятдсс	саатсддстд	ရင္ရင္ရင္ရင္ရင္ရင္ရ	статдастдд	<u> </u>
0852	гдддгддяда	τοσάαοσάοτ	асдсаддътс	датддаттдс	дастдаасаа	сдересаер
5220	ეფეფეფეფე	гсаададаса	гсддатстда	ататесеаттт	aaasacrtar	состоравав
2460	ддегегедея	гддяддссгя	дяддагггг	аадтадтдад	дстаттссад	сгдссгсгдя
2400	ရႊရရင္ရေငင္ရေင	ဥဝင္အေဒခုဒ္အခုင္ရင	נבבבבמבבבמ	тдастааттт	ეველებებე	2003550000
2340	сссядррса	ссгяястосд	ccatecegee	стаястосдо	agtecegece	садсаассат
2280	стсааттадт	аадсатдсат	даадтатдса	ငငောင်ငေအငါင်ခ	сссяддерсс	атдааадтс

8E

871.437 B2	-8	SU
------------	----	----

6E

θασθαετοθα θαθατοτοσο θατοσοστατ θθεθοαστοτ σαθεασαατο τθοτοτθατη 09 <400> REQUENCE: 7 <223> OTHER INFORMATION: pcDNA3.1(+)myc His A vector <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <212> TYPE: DNA <SII> LENGTH: 5493 < SIO> SEÕ ID NO J dacgtc 9285 тутаттада алалата алтауууут ссусуслол туссосулал аугусслост 2850 стератате атераядсяе телерадде саседенся срадоддата сасастерая 0949 аатдосодсаа аааддодаат ааддоодаса содааатдтт даагастоат астотьсоть 0049 тдатстсад сатетттас ттсассадс дттестдддт дадсававае аддааддсаа 0799 скессевада сосседет детерадатос адтеодатот вассевает сосседае 0899 дедесезета деадаетет ададерете атеатердая адертесте дудусуалая 0799 0915 streamer and argument and argument and argument and argument and argument a 00179 0755 agaagraage eggeeger greatedere arggreatgg cageaergea taateerer 082S асядатсос ссяддебд сяядаядод дерядсесе годдессес дагодердес reacgerede cyretygear ggereated agereegere eccaacgate aaggegate 2330 09TS адтадтесяе садтелатад тетдевсала дебегасая тедегасаду сатедбуд адсостдова отстатоодо оссельсова собаталь устосодода адогадада 0015 0705 телесудете садаттеле адеальное садееадеед дааддееда дедеадаадт асуатасууу аууустасс атстууссос аутустусаа туатассусу ауасссасус 0867 נכמקטקאנטן שנטראנינט ננטאנטטאנא אינטטנטאנטן איטאטר נטטערטאנטע נטאטאנאטר 4620 адгагатата адгааастту дгогдасадг гассаатдог гаагсадгда ддоасогаго 0987 008₽ сезазаядуя сстетела дасестета алеталале даадететая асельтая асудудесту асустоядбу даасулалас теасуттаяу удатетдут сатулудта 0776 тоталосядо адагасто садававая дуагогозад аадагоого дагобатог 089₽ ададтеддта дототедато оддовавае восекодото дтадоддед тттттедте 4620 pənurquop-

астуасуса атууудану састосуда аластуссая стеуусадта сассалуде сседесечет даедесечата агдаедете стессельде адерестата дудаететесе гддядгесод сдегасятая стеасдбеая абдосодос тддогдаеод сосаасдаео даграгода сыдгалсая стасудудся астадгоас адоссавала ττασσστέα σοστέτεσος αταστέσος ατατασσσός από ασαλαταία σο τα από ματα τα παραστέ суадсадаят сталдстаса асалдусалд устедаесуа салебусаеу алуалесьое ασασετεατέ ελαστατές σταστοστά σττατάτατά ασασαστά αλαταστασ

asaarcaacg ggacreeca aaargeegea acaaceege eccaregaeg caaargggeg

астеледддд атттееллегеле ттдледтела тдддадттд тттдделее

regeratese cardgrgarg eggreregge agracates rgggegrgga rageggrreg

מנקטכטמקדת כתנקתכטננת נקטקמטנננט טרתטננטקטמ קנתטדטנים אנקטטט

ארכאראנקנט אאטראטטט פינאדלאפט נטאאנטאנט אאטראטטט אינטאני אינאנאני

087

074

099

009

0₽9 08₽

450

390

300 240

08T

pənuțquos-

3750	саасрадар	rccggggacgc	ддаатсдттт	<u> </u>	ссгатдааад	နငင်ရင်ငရင်ငင
3060	стесдатесс	сатсасдада	сссяясстдс	ნაღმანღაა	ааатдассда	ааааггсаса
3000	gegggæetet	дтестегдя	ссссевасая	соботвтотт	gegeategee	ссдяттсдся
0462	ategeegete	getttægggt	getteetegt	гдддсгдясс	гддсддсдяя	ငင်ရအရွေအရွင်
0882	сдғдағағғд	дғғддсғясс	aggacatagc	дяссдстатс	მმმჺმჺმმcმ	ՅբՅՅշշՅՅշբ
2820	тсатсдаст	стетердая	аааатддссд	атсатддтдд	сттдссдаат	dcdørdccrd
0922	дгдясссягд	ддягагадга	ငငရဲနငရရငရန	acacacstac	сяддсгсяяд	аастдттсдс
0072	მამააფმაამ	гсяддддсгс	всдаададса	датдатстдд	гдгсдягсяд	аадссддгсг
0492	астсддатдд	gcgagcacgt	атсдсатсда	саадсдааас	эгээгдэгтг	cracctgccc
2580	сггдягссдд	дстдсатасд	ငေဒနင်ရင်ရင်ရ	атддстдатд	адтатесате	сгдссдядяя
5520	caccttgctc	ссгдгсягсг	ддсяддягсг	ရအအရင်ရင်	getattgggge	ရိရိရိနင္နေရိရင္
0942	двадсдддая	сдррдрава	сгдгдсгсдя	ссррдсвад	дясдддсдгг	მშიქმმიიფი
2400	сддстатсдт	ടേദ്ദേദ്ദേദ്ദേ	аастдсадда	дсссрдяярд	ccrdrccddr	гсаадассда
2340	βτταττττα	მმმმიმნნნ	тдтсядсдся	<u> </u>	rgatgccgcc	ταθαταστα
2280	саасадасаа	гдастдддса	таттс99ста т	მჺმმෳმෳმმс	адссдсррад	caggttctcc
2220	βαττβεαεα	тдаасаадат	ттедсятдат	тдадағсдғ	ададасадда	датстдатса
0972	teestttteg	адсттдтага	ageteceggg	ьвевовттт	ဒရရင်ငင် နေရရင	<u> </u>
0012	гадъдадад	аттссадаад	ссрерадар	αςαβεστετα	ададдссдад	сезететас
2040	стаатттт	ссятддстда	atteteegee	agtteegeee	алстесдеес	tecegeceet
086T	воророрая	сседееестя	саассатадт	аастадсад	ототеортео	дғатдсааад
076T	бсаддсадаа	аддетееса	дааадтесее	နငင္ေအရွင္ရင္ရင္ရ	ьрертретт	гдсатстсаа
098T	вреверодав	здаеверербе	geteeceage	аадтоссед	аддагдгдаа	тдтсядтт
008T	стдтддаатд	сдааттаатт	азатттаасд	дастеазсаа	азаатдадст	гаттддтгаа
0₽∠⊤	gattteggee	ggattttgcc	дасссасаад	статтетте	сғяғсғсддғ	роввотовов
089T	ваесбдавса	гертдргеса	аатадтдаас	сясдеееее	cdffddadfc	сдесеррра
079T	дясддееее	сдесердяря	адъдддсаят	rggttcacgt	астадддгда	рттовевеве
09ST	ငငင္ငင္ပေဒဒင္လင္	стттасддся	cgatttagtg	стгядддггс	aaaaacccc	устставатс
00ST	гессадгаяя	redeedderr	сгадасясдг	ccetteette	тедеттетт	cccdctcctt
0440	ငရငငေင့အရငရ	сясттдссад	дгдяссдсгя	Lacgegeage	მჺმჺმმჺმმჺ	ଙ୍କରିରେରିରେରିର
1380	сддсдсяггя	сдесердгяд	рэвээээтвт	ссссяддддд	ငငေးရငင္ရရရရ	ရငရဲရအအရအအ
1350	ддегесбаяд	тдадстстат	გფეფალმიმმ	сяддсягдсг	аадасаатад	даддаггддд
1360	ငေရငနေရေရရရ	гддддсяддя	88888¢¢888	стетаттега	дгяддгдгся	сяттдтстда
1200	ааттдсатсд	аааасдадда	стесстаят	тессяетдте	ааддъдссас	стдассстдд
07140	cgtgccttcc	βοσοστοσοσ	בכבקבבקבבב	стдесадеса	тдееттетад	<u>α</u> ςςτςααςτα
080T	ссдстдатса	дадстааас	сатсассатт	сеятсятсяс	тдсатассдд	датстдаата
1020	сссядаадад	аааастсат	сссттсдаяс	дссғядяддд	ддеедередя	მсясадъддс
096	садататсса	тдааттста	teeagtgtgg	датесаетад	နငင္ရေအရင္ရင္ရရ	таадсттддт
006	getggetagt	ддядясссяя	стсастатад	астаатасуа	дстатсдаа	стдсттастд
01-28	ададаассса	сгддсгяясг	дсядядсгсг	велелелолб	асддгдддад	drøddaardr

∩2 8'811'431 BC

-continuêd

2493			arc	десяесрдяе	ငငငရဲဒနာအရင်	oddacatttc
0975	aggggttccg	атаассааат	аттадаааа	асседаасдс	дсддагасаг	тдтетеятда
0079	тсадддтат	даадсатта	саататтатс	sttestttt	тастсатаст	ааатдттдаа
0789	მმიმჟიჟიმმ	адддаагаад	дссдсяявая	ааддсаааас	ರತಾತಾತರತರಿ	гсгдддгдэд
5280	ငေဒငေဒရငရင္င	стттастт	теттеядеят	всссявстда	ccrcdrdc	гедатдтаас
5220	дядатссадт	taccgctgtt	тсааддатст	дсдаааастс	аггеггедда	эггддаааас
0915	адъдотовто	даастттааа	ငင္မင္ရင္ရင္ရင္ရင္ရ	гаатассдсд	ငေခင်ခငေရွရွရ	բցշշցցշցե
0015	дядттдстст	rdcddcdacc	даатадтдта	дгсаттстда	веровертов	астддтдадт
0405	стттстдгд	ссдгяздагд	дгсягдссяг	тесетезет	свстдсатаа	дггягддсяд
086₽	атсастсатд	ссдсядгдгг	адгаадггдд	сдррдрава	дгосгосдяг	ядстесттед
4650	аааадсудст	гдггдгдсээ	тдатесесея	дсдяддрэся	аасдатсаад	reeddrreee
098₽	сеястсадс	сгадгягддс	cactcatcat	сдрддрдгая	сгясяддсяг	дттдссяттд
008₽	дсдсяясдгг	ттадететт	адттедесад	тададтаадт	ရငေရဲရဲရဲအရဲင	аттааттдта
0₽∠₽	сатссадтст	татесдеете	ссрдсяясрр	ငေအဌနေဌင်ဌဌင	മ്മാടർഴ്മാറ്റ	ငငေးရငငေရရအ
089₽	аатааассад	астатсядс	ссддсрссяд	сссясдерся	гяссдедада	дстдсаатда
029₽	тддееееядт	устассатс	асасдддадд	дагаастасд	ссдрсдрар	<u>ας</u> τдяςτος
095₽	атссатадтт	באַדָּדַבְכַּמַבְבָכ	αςαατςτατς	асстатстса	rcagtgaggc	саатдеттаа
005₽	тдасадттас	ааасттддтс	асасасдадс	аатстааадт	утстаяатс	таааатдаа т
0 4 4 4 0	сстттаяят	тсасстадат	ааааддатст	дадастатса	сссадсаяс	сдррээдддэ
4380	сдаааастса	сссядсддяя	дддреразад	стттстасд	атсстттдат	ссссяядаад
4350	аааааадда	стасдедеад	<u></u> အရင္အရင္အရအ	בבבבקבבבקכ	<u> </u> αcaacaacter	ассдстддта
4560	2388838885	сттдятесдд	дсгадсядаг	ರಿರತಿಕಿಕಿಕಿಂತರಿತ	садттасст	сғдсғдяядс
4200	татстдедет	сядтаттада	астадаадаа	стясддстас	адрадссрэя	тестедаядт
0₽Т₽	раразадад	асдсядасда	ададсдаддс	င္အေရွရွအင္ရင္အရွင	ссястддтая	ငင္ရရွင္ရအရွင္အရွ
080₽	стедсова	гаадасасда	рссадессдд	седсоссаяд	ссддраясра	гдсдссггяг
4020	ရငငငရဲဗငငရင	сссссдррозо	драсясдаяс	<u> מכ</u> במממכבמב	ргодородд	дгдгяддгсд
0968	роттреотот	дсгдгяддгя	сятадстсас	αβαβατττατ	ငရရရအရေငရင	tteteteett
3900	ccfdfccdcc	стасс99аtа	နငငငင္ရရင္ရင္ရင္ရင္ရ	reergtteeg	redrdedere	ggaageteee
3840	gttteeeet	ရအင်ရငင္ရေရွရင	ддастатааа	ааасссдаса	ತರಿತರಿರಿದರಿಂದ	сдерездоро
3780	сааааассуа	всдводерая	cacccccccd	ссятаддете	гддсдееее	<u> α</u> ςcacattac
3720	ссдгаааад	аддесаддаа	ддссядсяяя	драдсяяяя	дааадаасат	датаасдсад
3990	адаатсаддд	авротвтард	деддгаагас	рвввотрерт	ဒေရာနောင်နေရင	င႕ရငရရငရအရ
3600	<u> </u>	cactacactc	стеястдяст	cgetteeteg	αβαβαραταττα	стдедтаттд
3240	ရအရေရေရင	<u></u> အင္အေငွေငွေငွေငွေငွ	гдаатеддее	детдеаттаа	гдгсдгдсся	င္ငင္မရွင္အနားနင္ရင
3480	сдетттесад	getezetgee	астдедстве	астедедета	дадъдадста	ддедссеяяе
3450	гаадостдд	ရင်ရင်ရအချင်ပ	ငေါ့အဝိုင်ငေဝိုင်ခုအ	асасаасата	содавется	rgttatccgc
3360	тдгдгдаааг	адетдттее	тсатддтсат	сггддсдгээ	ငင်ရငွင်ခြေရွှ	ccdfcdaccf
3300	гдгогдгэгэ	татстатса	стсатсаатд	ттдтссяяя	сғядғғдад	тсястдсятт
3240	адсаттттт	ссясааатаа	этсасааатт	ခရင္ခရင္ခရင္	дтгасааата	дстатаатд
08TE	дттаттдся	ассссаястт	ttettegeee	сятдстддад	дсддддягсг	атсстссядс

††

£7

0402	ασαττgetta	статадааа Статадааа	ааадттдаса	стесседсяе	ragacccagc	ccactagttc			
086T	בבבבבקקפיב	дететееята	ссррсддая	тдтсдадстт	асасстттт	адгдагадад			
0261	утьсостато	адасттатаа	ссядтдатад	дааатссста	ссятааасдт	тдддааатса			
098T	стясдтдтс	стдсятдгсд	датстаатат	сссссссавя	дгяссдддсс	астддатссд			
008T	ааттсадтсд	саваддаасс	ခု ခရင္က ခရင္ ရ	ттдтасаааа	доверортее	деттттат			
0740	дағдадсаағ	дсяасааатт	сседеесдее	сгдагадгда	ьстаттту	ааатаатдат			
089T	crcdddcccc	садтеттад	<u></u> အနှင်ဌနငဌဌင	сдясдггдгя	ттасадгая	сатддатдтт			
079T	стаасдетад	ദഴദർർദേദഴ	ссевсядас	сгдясясяся	свсассстая	дддаясрерс			
09ST	гдддаядссг	ττοταοστας	стрезерто	дадатдсатд	стдастаатт	cscctggttg			
00ST	ддясррров	მმმამაანემ	сғдссғдсғд	ттдсятастт	дағдсағдсғ	дастааттда			
0₽₽Т	татдагтдаг	മ്	ддсддядггя	ရိဒိရိဒေရိဒိရိအနှင့်	дсддядггэд	ရငရရအင္ရရရ			
08ET	ငေရရအရေအင္ဂရရ	ತ ರ್ದಿತ್ರದ್ದರಿರಿದಿ	эдвэдтвве	асаастаааа	caacctctac	მഴმმამმაა			
1320	ငင္ငေအရဲအရဲရင္အေ	ссгддаагад	ссгеястаст	ааааадсст	сгяддеегее	сревавадс			
1260	сმმმяმсבבב	гасаадстес	аааатдуата	атсадатесд	ясясдъдсъд	стааттутса С			
1200	атдеедатда	ссдататаст	ртьстастату	ссредесяра	гадтестса	ддссяғддғг			
07140	тдугаястт	ддяясддсяс	ggtgagcacc	cdrcdcdcdc	дсрееддедя	даастсдасс			
080T	ддреддрев	<u></u> အင္လင္ရေဒရင္ရင	дгеседддяд	ссресяедая	ရငရအရင်ငရင	ရအငေအငေအငေရ			
1020	carcarcca	васадддсса	ငေရငရင္ရရဲအင္ရရဲ	адгесгадяс	ggeaceatet	αθεθεεδες			
096	ငငငေទငါရငငေခင	сдсясссяся	gteeøggeeg	сдгясядсгс	gaccactegg	сясдясстсс			
006	адстедедая	gegteeegga	ငေရိရငငငေရိရိအရိ	cggtcatggc	тедеедатет	ငေႊငေရဲရင္ရရင			
048	actecegeee	ငရငနရရရငရန	მმაამმმეამ	cgcagttgcc	асдаадтдса	creereddee			
082	gtcagtcctg	cgtagcacgt	атсдааатст	ငရိရိငရိရိင္ရရိရိဖ	рсагадаадд	дсссаясстт			
720	берооттеро	гсссддаааа	ငေទရဲငငေရဲရငရဲ	ддаддагсаг	teceededet	ဒေရငခင်ရခရခ			
099	сдаадаастс	rraaaaraaa	аатааасаад	сагаадстдс	ттдтаяссат	аттдеттат			
009	ттдтатдст	ттертдатт	ааатдортьья	вевердрерд	саястадаят	ддясяяясся			
075	тдагдадттг	таадатасат	стадасатда	гааттедеее	actetegegt	geagtteeet			
08₽	rrdargccrg	тесдететае	gaetgageet	ссядтеттес	ခုနှင်ဗုန္ဓနာရှင်င	саасадатаа			
450	свесдаеаа	ရရအရေအရောင်	дгесгяегся	ငေရိရငေရိရိအင်င်င	аатеедетее	всадсуска			
98	ccdffgcffc	secereedaa	ccfdcccdcc	բձձcձձձacձբ	гддсядггга	дегедяедсс			
300	сттетдетта	rcaggatggc	аддесатесд	ааасусаааа	дадстедгад	гадссаддаа			
240	ငရငရင္နနင္နင္ရေင	дсааттаата	гдадсдсаас	ခေဒဝဒေဒဒဒဒ	ငငငရဲဒငင္ရရဲရဲဒ	cgacaggttt			
08T	ရင်န်ရင်ငံရွင်နေ	аттсаттаат	<u> acgttgggcg</u>	ctctccccdc	ငရငနနင္ငငေရင	дедееевата			
120	<u></u> အရင်ရွင်နေရန	მჺმෳმჺმෳმმ	ငေရငဗဒေဒငဒေ	ငေရႊငေရအရငရ	ငရငၶရငငရၶၶ	røccdcrcdc			
09	အဌင်ရအျင်ငံရအ	ассдеегтгд	таяссдтатт	аттердаа	статеееегд	erreerded			
					SNCE: 8	<400> SEQUI			
	<pre><223> OTHER INFORMATION: pENTR(TM)/H1/TO vector</pre>								

<210> SEQ ID NO 8
<211> LENGTH: 3869
<211> LENGTH: 3869
<213> ORGANISM: Artificial
<2203</pre>

pənuțquop-

<SJ1> LENGTH: 59 <JUD NO TO XO TO

адсялсяяда паяясллсяа слаясссаяя ядадсалаял аслаяядллс яссллаялас 09 6 : 30N30035 <00+> <223> OTHER INFORMATION: shRNA-BoxC/D-GFP <2220> FEATURE: <SI3> ORGANISM: Artificial <SI2> TYPE: RNA <211> LENGTH: 63 < 010 A CI ÕES <017 > 6988 ασστετέσσε αθαστέτεσα ταπαστάτε ссдсеядада дасадаядсег ягддаяваяс десядеяяса садесгрег ясддерсер 3840 τατοτττατα θτοστθυσθα θτητοθοσας στοτθαστό αθοθεσθατό τηθηθα 3180 дгаядоддса дддгоддаас аддададодс асдадддадо геосаддддд ааасдоогдд 3120 3660 садодедада сдосасдоет сосдаадда даааддода саддеасод адададееса асвоедое садоеедава савведаесе всессаваее дадагаесе 3600 стелесоддег сддассолад додагадега соддагалду сдоадобдес дддосбдалод 3240 αςαταςοτος στοτασταατ σοταστασοα στασταστα σοαστασσα τααστοστα 3480 αστάττατα ταστάτασας σταστασας σασαστάσα ασααστάτα ασοσοσοσε 3450 савдадстас саастстст сосдааддта астддотса дсададодса датассават 3360 деятогдог доггдоваяс авааваеса содогасовд оддеддегед гегдооддаг 3300 суадсугсая асоссугада авадатсава удатоттотт удадатсотт тттотусус 3540 гдасдддаед дедезадете агдаесадада гесеггадед гдадггаеде дгедггееде 3780 дадстетет автездалет удеталетур стугалене удеядаяет гасустуле 3750 כאמאדהנט טראנדטאנא נכטנטאנאנע אאנאגעט אטרונטאנדנ אינטטער 3060 כדנקטכהנכם באנקטאמניט כטנטטטקטא לדנדטיטיני כאנדאכאאא אטטטרנדנד 3000 0767 coaceggate cageegere coatggegat teeceateg ataacetat tetegaegag 0887 5850 дядодгяята догадосгаг гдаясаядго гддаяядаяя гдоягаяяст гггдосягго 5760 стедетезда сдеяатезед алтдально ддетеддеба атдедядба стетедате 2700 αθασάθεταα ατταθατταα ταττάταση ταταττά ασαφασάστα αστατταστ дгагтадалд алгатостда ттоаддгдал алгатоттд агдодогддо адгдгтоогд 0492 субастосбу абдабусабу уббастого асбусутос соудалалас аусаббогод 08S2 5250 атерисадае саластерее дасеральть агусстете сулсалсал усатьть дедсевдадт тутестдая асатдусала уугадедтся селатулту тасадатуау 2460 дерезата атдтеддуса асаатотате дерезов асаатотате детери даадееедат 0042 даваедтеда ддеедедать адаттеедае агддатдетд атттагатдд дтатаатдд 0462 2280 асаластус ссустелет даясаусаль асалууусу стасуауса сассалсуу сосутутся адалетето атутелент усасаадата адальтато атодедоза 5550 ασταλλάτος σσταταστας στοστάτας αταστέλα σταττοστα σεαστόταα 0972 создередат делаерие вдевевате адсоверает стросатоса 5700

pənurquop-

87

89

Lt

Geo

<212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE:	
<223> OTHER INFORMATION: SHRWA-GFF <400> SEQUENCE: 10	
ggcaucaagg ugaacuucaa gauccagcau agggaucuug aaguucaccu ugaugccag	59
<210> SEQ ID NO 11 <211> LENGTH: 62 <212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-BoxC/D-mut-GFP	
<400> SEQUENCE: 11	
ggcaucaagg ugaacuucag cugcccgaaa gggcgucaug cugaaguuca ccuugaugcc	60
ag	62
<210> SEQ ID NO 12 <211> LENGTH: 59 <212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-GFP-mut	
<400> SEQUENCE: 12	
gcacuagcgu augaaugaaa gauccagcau agggaucuuu cauucauacg cuagugcag	59
<210> SEQ ID NO 13 <211> LENGTH: 82 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: L7Aer template	
<400> SEQUENCE: 13	
ctggcatcaa ggtgaacttc agcatcacgc cctttcgggt cagctgaagt tcaccttgat	60
gcctatagtg agtogtatta go	82
<210> SEQ ID NO 14 <211> LENGTH: 52 <212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-U1A-4	
<400> SEQUENCE: 14	
ggcaucaagg ugaacuucag ggcgaaagcc cugaaguuca ccuugaugcc ag	52
<210> SEQ ID NO 15 <211> LENGTH: 81 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: L7AerN template	
<400> SEQUENCE: 15	
ctggcatcaa ggtgaacttc agcatgacgc cctttcgggc agctgaagtt caccttgatg	60
cctatagtga gtcgtattag c	81
<210> SEQ ID NO 16 <211> LENGTH: 78	

<212> TYPE: DNA

pənui Jnop-

008T дотететат алгуссалог теделовала алуодоте таладуласе алгеодеод аватаатуат ттаттту отдатадтуа сстуттсутт усаасааатт уагуадсаат 077 considerer reconders conclets anadgeogo captering croggeoco 089T дуудаетьс сасассстая стуасасаса тессаездее даадуусуаа ттаасустау 1620 כאככנקטלנק כנקאכלאני קאטאנקכאנק כנונקכאנא נוסנקככנקכ נקטטאקככנ 0991 00ST αθαεταθτέσα σατασατάσε ετασαταστέ στασστάστα ασαασσέασα ασαστέτοσα ασαβαγοταα ασαβατεία αρασαβατα αροσαβαστέν αραβασαβασι ταταβτέσοτ 1440 дадусусст судостстус агаатаааа алааггаутс ауссатуууу сууауагуу 08ET 1350 стусалалус стадусстсе лалалусст сстелстаст сстудлатау стелулуса 1560 стаятедеся ясяедеее асадабеее алаледдаба тасалдееее соддадеете дуссатдуть тадътосьса сотъдгода стагастату содагата тосодатда 1500 дваетсувае устесудеуа субезоводе удбавдевее удваесудеве туугевает 0770 дассасасод дедаадтедт сетесаводая дтеседдад алеседадее ддтеддтеел 0801 οτοτ αθεθεεάτατας αθασταστας αθεαστάθας αθαθατά απασαθάθεα αθεαθεασα σεσθεστές βεσσετέδα σάρεσσθαρία άροσθασό αδοεσσες σοσεάδασσε 096 ссясддастас годосдягос оддесягддо оддосоддяд додгосоддя ядгеодгдда 006 стестеддее жедаждедея сдеядетедее ддеедддеед сдеядддедя жегеседеее 048 дссеялост голгадалда судеудда агодалагог сугадслоуг уголусогу 084 садсатдада тососдодот дуаддатоат соадооддод тосоддаааа сдаттоодаа 720 аттдеттат ттдталесат таталдетде алталелад ттддддддд сдалдалете 099 довавласа салотадаль услуговала лалбостта стедедалат стугулатуст 009 дадерара дередера и стадарание собратание собратов составение воставение воставение воставение воставение воставение в составение в сос 0129 саясядатая авсудаторо совдестое дастуадост теодетет тедатосто 08₽ асазсуться альсодотос одуоданые утостастоя удададодые сасодасала 07F αττισατισος τασοαστιτα τασοασασας σοτασοσασο ασοστοσασα σοστισοτιο 098 сторосторая дадетерское какаетерское сезболово стестоста 300 сдасаддете сосдастдда дадоддоад гдадодсаас доадетеата сдоделосдо 072 08T дедессвятя сдеяяяседе стегесседе дедигддеед ягсятгаят деядегддея 150 гасодогодо одогодада сдасодадо садодадся дедадодада алдодада стегоседод телесосед агеседедая галосугате досусства дубудоедая 09 <400> ZEÕNENCE: JJ <223> OTHER INFORMATION: PENTR/H1/TO-ShRNA-BoxC/D-GFP <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <212> TYPE: DNA <SI1> LENGTH: 3930 атадтдадте дтаттаде 87 09 студсятсяя удтуальтся адуатсоста тустудатот туалуста отгульдост <400> ZEÕNENCE: JO <223> OTHER INFORMATION: 481P template <220> FEATURE: <S13> ORGANISM: Artificial

<210> SEQ ID NO 18
<211> LENGTH: 65
<211> LENGTH: 65
<213> ORGANISM: Artificial
<2220> PEATURE:

3 3 3 0				стсясятдтт	ραασεεεεα	αθασεεεεάα
3900	тасудтесет	geggeettt	ငရငငေအရငအဆင	сасудаааа тарааааа	მმმამმანი	сғсдғсяддд
3840	стесдедяед	дядсдрсдяр	ссрераясрр	ддрррася	ядросрдрод	усятоттар
3780	дааасдеетд	сғғссядддд	ငၚငရဲဒရဲရရဲအရ	ငေအရရအရေရငရ	вдддссддая	ggtaagcggc
3720	асаддтатсс	вдагаддодд	гсссдяяддд	dedeeseder	сгягдадааа	နင်နင်ငင်နင်နင
3990	тдадатасст	гясассдаас	ရငရဲဒေဒငရဲဒငင	ငေအရွင်ငင်ရွရှ	rgcacacagc	ааааааггса
3600	сдддсгдяяс	გсдсядсддр	ассддагаад	дасдатадтт	стддясссяя	ссгезсодаа
3240	агаадгодгд	მაიფელმები	адъддсъдсъ	гостдтгасс	дстстдстаа	стоствоетс
3480	Lagcaccgcc	аадаастстд	ccaccacttc	сдгадггадд	сғадғдғадс	тастдетет
3450	адатассааа	<u></u> အရင္အရင္ရရင္	аястддсттс	ттссдааддт	ссяястетт	гсаададста
3360	дееедсоддя	<u> α</u> ςααράαρερ	всодораса	CAAAAAACC	бабазаа	одталтотдо
3300	rrrrcraada	тдадатестт	аддатстег	аааадатсаа	дассссдгад	ငင်ရဲအရှင်ရင်အ
3240	сдгсдггсся	дгдядггясд	атесертаас	вввроврдвр	႕၁၉၈၈၁၉၁၉၃ ၂၂၂၂	ငင်ရင္ခရင္ခရင္ခ
3180	съедасрава	гддсядадся	дггдгээсэс	тудсталтер	таясадаат	сдядеееес
3 7 7 0	гдатдстсда	садттсатт	даатааатта	атсстдатат	ддгаттдага	тсаааатат
3060	аасддеттт	гсаттасада	gtttteteet	дссгсддгдз	статдааст	отвоортот
3000	даѓассадда	атсдсадасс	всдадсодда	ttgatgttgg	атаддтадаа	дддааатта
2940	ьераветттт	датаасстта	ттетезетт	стсятддтда	гоздротрьот	стсяссддат
2880	тттдосятт	атдсатааас	сгддааадаа	ттдаасаадт	αασταασετα	сдадсдтаат
2820	астедатда	gatgegagtg	գցցեեեցցեե	даатдаатаа	рертеворор	tetegeteag
5760	gegtatteg	адедодарс	ттдгосгег	стдтттдгаа	саттедатте	acaccaarra
2700	cagtgttcct	gatgegetgg	ааататтдтт	аттсаддтда	даататсстд	ддғатғадаа
2640	садсаттеса	сссддяяяяя	сястдедате	ддрегассас	датдатдсат	седгяетеег
2280	адсатттат	ссдяссятся	татдеегег	тдаеддаатт	сгяяясгддс	датддтсада
5250	стасадатда т	дссватдатд	аддгадсдгг	аасатддсаа	гедерера	rdcdccødød
2460	ရဲဒၶရငငငရဲဒ	сдеггдгэгд	дасаатстат	аатсаддъдс	аатдтеддас	ддередедяр
2400	ддғағаағд	дагтгагагд	ငေအင္ရရွင္အရွင္ရင	гаааттесаа	အရွှင်ငေရှင်ရဆင်	ရာနေနငရင်ငရ
2340	ататтсадся	дггягдядсс	гасааддддг	гааасадтаа	гердергаев	дтэваватав
2280	сатсатдаас	ааааататат	тдсасаадат	датдттасат	сададстете	<u> α</u> εεεδ <u>ε</u> δεεε
2220	ggcagetetg	getgttteet	сатддтсата	адъедеата	ссстатадтд	адстдататс
0912	сотвоорттт	ададсатта	садтсаааат	аддтеветат	тдсаасдаас	атсаатттдт
0012	адсаттдстт	астатаадаа	ဒေနအရွင်ငံဗျင္မ	стететев	ငင်ရမ္မငငငေရမှ	тесястадтт
2040	атттттдда	адететееат	гссггсдддя	ттдтсдядст	датдееттт	адтезаетте
086T	дғдяғдсғдя	ငငရဲဒနာရရရင	тсадетдае	ငနေရွဗွင်ခုနှင့	နငနငင္ရေဌငနင	адтдатадад
076T	дтгесегяге	адасттатаа	ссядгдагад	дааатссста	ссятаяасдт	гдддааагса
098T	статдтдтс	стдсятдтсд	датстаатат	сссссссаяя	<u> </u> β <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u>	астддатссд

pənuțquop-

∩2 8'811'431 BC

75

NR 8'871,437 B2

LΤ

99

55

<223> OTHER INFORMATION: M13 Reverse Primer <220> FEATURE: <S13> ORGANISM: Artificial <rp><SIS> TYPE: DNA <JUN STO> REG ID NO JT сдеееддда аасеасаеа 07 <400> REQUENCE: 20 <223> OTHER INFORMATION: H1 Forward Primer <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial AND : ETYPE: DNA <SII> LENGTH: 20 <510> REÕ ID NO 50 S 9 acgcc 09 азаяддсятс заддтдаяст телдеятсяе десетттедд дтелдегдая дттелесттд <400> ZEÕNENCE: JO <223> OTHER INFORMATION: pENTR LTART Bottom strand <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <212> TYPE: DNA <sit> rength: 65 <570> 2EÕ ID NO 70 S 9 atgcc сассудсятс алудтуласт толосо суландудсу тульствое альсетед 09 <400> ZEÕNENCE: I8 < constant of the stand stand stand stand stand stand</pre> pənurquop-

cagcardaga recordeder ggaggarcar ceageoggeg recordgaaaa cgarreegaa 720 аттдоттат ттдталосат таталдотдо алгалалад ттдддддддд одалдалсто 099 адасявлеся свястядаль деядералая алагдетстя стедералат стдерандет 009 дсядтесст астегедедт таатесдесе ттадаеатда таадатасат тдатдадтте 0₽5 саясадатая авсуальное создестее дастуадсет теодігіат терагосед 081 450 асаледется лабосдетсе судеудатет убестается удадаусуть саседаелая טרדנקאדטכט בטטכאטרנדא בטטטטטער טטרטטטט אטטטאטטט בטטרנטטט איז איז איז איז א 390 гадосаддаа дадстедсад аласдолала аддосатоод голддагддо отбогдо г 300 сдясяддеее сосдяседдя выдоддовая сдядодсямо дояяееяся сдодеясодо 240 08τ дедессявря сдеяваесде срересседе дедррддеед врреврряер деядерддея ττο racederede egeageedaa egaeegaged eagegagea grgagegagg aageggaaga стесседся телесссея алесфедда гаассубать ассусству аубуадстуа 09 <400> REQUENCE: 22

<223> OTHER INFORMATION: pENTR/H1/TO-shRNA-BoxC/D-mut-GFP

<S20> FEATURE:

<SIT> LLDE: DNY
<SIT> PENGLH: 3353
<SIT> SEO ID NO 55

саддааасад статдас

<400> ZEÕNENCE: JJ

<213> ORGANISM: Artificial

LS

pənuțquop-

3060	асддеттт	саттасадаа	tttetetett	ငငင္ငင်ရဲရင္ခရ	<u>гатддаастд</u>	cttgccatcc
3000	атассаддат	рсдсядяссд	сдядгсддяя	гдатдтгдда	гаддтгдгаг	дддаааттаа
2940	стегдясдад	атаассттат	стегеяеггд	гсягддгдяг	сядтедтеяс	гсяссддагг
0882	сттессетт	тдсатаааст	с99ааадааа	сдаасаадтс	getggeetgt	дадсдтаатд
2820	стератдас	атдсдадтда	адгггадгга	аатдаатаас	cgcaatcacg	стедетеяда
0972	cgtatttogt	асадсдатсд	тдесерра	тдеттдтад	аттедаттес	cdccddffdc
0072	ядгдггссгд	stgcgctggc	аататтдта	стсаддъдаа	аататсстда	дғаттадаад
2640	адсаттесад	ссддяяяяс	астдсдатсс	дграсговос	атдатдсатд	cdfactcctg
5580	дсятттатор	сдассатсаа	атдеетете	дасддааттт	тааастддст	атддтсадас
5520	гасадатдад	ссяятдатдт	ddrødcdrrd	всатддсааа	гдееесдвя	ရငရငငေအရအရင္
2460	ရအအရင္ရင္ရေအင္	деггдгягдд	асаатстатс	атсаддъдсд	атдтедддеа	дегедедага
2400	дравевтерд	астататав	атдаатдстд	аааттесаас	ggccgcgaatt	дааасдъсда
2340	сатсаясдд	стасдадсса	асааддддтд	ааасадтаат	стдеттасят	асаааассдс
0822	атсатдааса	аааатататс	дсясяядяга	атдтасатт	аааатстстд	сссдрдрооо
2220	дсядсгсгдд	стдттгссгд	атддтсатад	дгсдгяггас	ссгягядгдя	дстдататсс
09TZ	ттдссятсся	ааатсаттат	адссааааса	ддреясряра	дсяасдааса	тсаятттдтт
0012	дсяттдстта	стасаздааа	ааадстддса	стестедгас	гадасссадс	ссястадттс
2040	сссссбаяс	дстстссата	ссрродая	тдтедадетт	атдееттт	βττοαοσττg
086T	гсатдстдаа	ငေဒဒဒေခရိဒ်ရင်ရ	ttcagetgec	сааддеаас	асассддсат	адтдатадад
076T	дттссстятс	адасттатаа	ссядтдатад	дааатссста	ссатааасдт	гдддааатса
098T	статдтдтс	стдсатдтсд	датстаатат	ссссстсдая	<u> </u> β <u></u> τ εςcggggcc	астддатссд
008T	ааттсадтсд	саваддаасс	аздсаддстт	ьвввовт <u>р</u> тт	аатдосааст	детттттат
0₽८Т	датдадсаат	дсаасааатт	cctgttcgtt	ငင်ရခင်ချင်ရခ	ьстаттту	ааатаатдат
089T	crcdddcccc	садтеттад	<u></u> အနေငေရနငေရရင	сдясдггдгя	ггасаядгая	сатддатдтт
079T	стаасдетад	ရအေရရရေဒ	сосвоедсс	срдасасаса	сясясссрая	aaaasceec
09ST	гддддядссг	rrcrdccrdc	стрезетте	дадатдсатд	стдастаатт	сясстддттд
00ST	ддясттссая	გმეფელემშ	сгдссгдсгд	ттастастт	дағдсағдсғ	дастааттда
0₽₽1	татддтгдсг	მმმმсმმმ95	ддсддядддя	მმმсმმმფჺმ	дсддяддрэд	дсддяясгдд
08ET	сддадаагдд	адссатдддд	аааастадъс	асаастаааа	caaccfcfgc	მഴმმсმმсс£
1350	стсядаддся	ретьердтот	cctcactact	ааааадсст	стаддеетее	стревевортт
1560	сдддядсрр	сотовельст	аааатдуата	атсадатссд	асасдѣдсѣд	ғсааттутса т
1200	атдеседатда	ссдататаст	ртасстатд	ссттдтсдта	ғадттатағ <i>а</i> ғ	მმავალმმლ
0770	тдоявотерт	38399c333c9c	მმჺმფმcscc	იმჺიმიმი	ရင်ငင်ရွှင်ရေန	даастсдасс
080T	адгоддгося	<u></u> အနှင်ငင်ရန်ရှင်င	дгосодддяд	ссресяедая	gegaggeege	ရဲဒငေဒဒေဒေငေရ
1020	carcarcca	васадддсса	ငရငရငင္ရရဲအင္ရရဲ	адгесгадяс	ggcaccatct	αθεθεεδεςς
096	ငငေဒရဲရဲငေဒရဲ	ငရင်နငငငေနငန	arccødacca	сдгясядсгс	дяссястодд	ငေဒၚေဒၚေၚငင္
006	адттедтдда	dcdrcccddg	ငေဒရငငေရရဲအရ	ငေရင်နင်ရင်င	тедеедатет	ငေးငရဲရင်ငရင
048	actecegece	ငရငၶရရရငရ	მმიიმმმეიმ	cdcsgttgcc	асдаадтдса	cfccfcddcc
084	<u>α</u> τς σα τς τα	cdrødcøcdr	атсдааатст	сддсдддая	ссягадаадд	доссяясорр

OS 8'871,437 B2

69

pənuțquop-

	<pre><s10> SEQ ID NO 25 <220> FEATURE: <220> FEATURE: </s10></pre>
₽9	racc
09	аваядусатс авуугуалст годостудас усстттоуу усадогулад ттологуда
	<400> ZEÕNENCE: 54
	<pre><210> SEQ ID NO 24 <211> LENGTH: 64 <211> LENGTH: 64 <212> CRGANISM: Artificial <220> REATURE: <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: PENTR L7AerN Bottom strand</pre>
₽9	râcc
09	сасодусато азудтуалог сосо улазудоот сагостала госостоя
	<400> REÕNENCE: 33
	<210> SEQ ID NO 23 <211> LENGTH: 64 <212> CYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: PENTR L'AREN' TOP Strand
6265	geetttget ggeetttge teaeatgtt
3900	седсеядада дасадяясь ягадяяес досядсяеса садострег ясадрессра
3840	οριεφτοιά τιεροτροφε φατοεφούο σεοοφοτατό φροτρασοτό ετεστάστει
08LE	მცყყმაში მმმგიმყყი ყმამამამამაში ყიმამმაში გიამმმმმ ყყაიმმიმ
3720	сядодгдядо гягдядяяяд одосяодогг осодяядддя дяяяддоддя сяддгягоод
0998	дададересар довозее садоррада сдаводяеср асвоедавор дадарасора
3600	стелосододе едолеголло годаглоста содолгодо одолдого додоедлло
3240	асатасстоу стотуствае сотугтасся утуусту ссаутуусуа тааутоугу
3480	торовова траотовкая вотовово одредарся одрагора оторатото
3420	авададстас саястетете сосдааддеа астдоется деададоете дагасеаат
3360	дезердер дередение виние содориси содорадов содарате средоват
3300	туадодсад ассосдтада аладатоала ддаготтог дадатоогог титогоос
3240	ταασάβαεα αραστασταστασταστασταστασταστασταστασταστα
0816	σαφτετετό αατοασατε αφεταστεσα τεσεασες ασοασοδοτα τασοτόσες
3750	

αττθατθος ταθοαθττα ταθοαθασα οστασοσασο ασοστοσαθα οσαττασττο

тадосадуая уадттбтад ааасусаааа аууссатосу тоаууатуус сттотуста сдасаддёть сосдаетдда аадоддоад тдадодсаас доаактаата сдодкасодо

дедессаята сдеаааседе стетесееде дедибдеед алгеалтаат деадегддеа

гассдетеде сделества сдассдадед садедадтеа дтдадедадд аадеддаада

стегоседов талеососту алестридуа талоодтать асодостья адидадогода

<400> REQUENCE: 25

360 300

240

08τ

13O

09

pənuțquos-

2100	<u> </u>	сдс£ддсяд£	аттдттдатд	аддтдаааат	атсстдаттс	ттадаадаат
0492	аттссаддта	дааааасадс	βοθατοοοσ	астсяссяст	атдсатддтт	астестдатд
0852	тетатосят	ссятсяядся	сстстродя	ддаасссасд	эсгддсгдзс	дгсядасгаа
5520	адатдадатд	атдатдтас	вдедредеея	гддсяяяддг	гтстдаааса	აღვამაელე
0942	gcccgatgcg	гдгягдддая	атстатсдст	вдардава	гсдддсяятс	сдсдатаатд
2400	гааатдддсг	ғағағдддға	датдстдатт	ртезаватд	сдедаттаа	acgtcgaggc
2340	гсяасдддаа	тдадссатат	аддддддга	садтаатаса	сттасатааа	ааастдтстд
2280	атдаасаата	атататсатс	саадатаааа	стасаттдса	атстстдатд	дғдғсғсяяя
2220	<u> αςτςτ</u> ααςςς	бордоотт	дгсягядсгд	дтаттасатд	атадъдадъс	дататесесет
09TZ	ссятссядст	саяттатттд	саааатаааа	сястатсадт	ತಂದತಾಂತರಿರ	аттдттдса
0012	ғодғадобад	гаадааадса	дттддсяття	сттдтясаяя	ассеядетт	стадттстад
0402	срадарса	стесятятт	гсдддяядсг	cdødcrrccr	setttttgt	сяссттдатд
086T	тсттдаядтт	адсатаддда	стсаадатсс	сааддтдаас	асассддсат	адъдатадад
076T	дтессстатс	адасттатаа	ссядсдясяд	дааатссста	ссятааасдт	тдддааатса
098T	сгятдтдтс	стдсятдгсд	датстаатат	сссссссаяя	<u> </u> β <u></u> <u></u> <u></u> <u>β</u> <u></u>	астддатссд
008T	ааттсадтсд	саваддаасс	аадсаддстт	стдтасаааа	аатдосааст	деттттт
0740	датдадсаат	дсаасааатт	ссрдррсарр	сғдағадғда	гстасссба	ааатаатдат
089T	crcdddcccc	садтеттад	၁၉၉၁န၉၁နန	сдасдттдта	ботдерортт	сатддатдтт
079T	стаасдетад	даадддсдаа	5566565555	стдасасаса	сасассстаа	3333scffc
09ST	гдддаядссг	ττοταοσταο	стттдсятас	дадатдсатд	стдастаатт	сяссрадрра
00ST	ддастттсса	გვეფელილი	ςταςςταςτα	ттовтаст	датдсатдст	дастааттда
0 8 8 7 4 0	татддтадст	მმმმсმმმ96	ддсддзддгэ	გქვეფებებები	дсддяддряд	дсддээсрдд
1380	ငရိဒ်အခွေအင်ဗ္ဗရ	адссатдддд	ааааттадтс	атаатаааа	caacctctac	gaggeggeet
1350	стсядаддся	сседдаатад	сстсястаст	азазадсст	стаддеетее	сревавадс
1560	сдддядсрр	соторевовт	втардтвеве	атсадатссд	асасдъдсъд	стааттдтса
1200	атдесдатда	ссдататаст	стасастасд	ссредесара	гадттестеа	ggccatggtt
07740	тдағсаястт	ရဲရအငေရရင်အင	ရိုင်ရဲအရင်အင်င	ດລີຼເດລີດລີດລີດ	geteeggega	даастсдасс
080T	ддреддреся	<u></u> အင္လင္ရင္မေဒၚင္ရင္	дрессдддяд	ссресяедяя	дсдяядрсдр	ရအငေအငေအငေရ
070τ	carcarcca	васадддсса	ငရငရငင္ရရဲအင္ရရ	адресрадяс	ддаясаярар	aafaffafcc
096	ငငငေအရဲရငငေအရဲ	сдсясссяся	дресяддеед	сдгясядсгс	дяссясссдд	сясдяссрсс
006	адттедтдая	дедрессадая	ငေရရငငငေရရအရ	cggtcatggc	гсдесдягег	ငေးခေရရင္နရင
048	actecegeee	ငရငၶရရရငရ	მმალმმმელიმ	cgcagttgcc	асдаадъдса	creereddee
082	<u> </u>	сдғядсясдғ	атсдааатст	ငေခံခဲငေခံခဲ႕ခ်ခ	сатадаадд	дсссяясстт
027	сдаттссдаа	гсссддаааа	ငငောင်ငင်ရဲရငရဲ	ддаддатсат	τοσοσασαστ	ငေရငခင်ရအရ
099	сдаадаастс	сс6888268	аатааасаад	сетаадстдс	ттдгаассат	аттдосттат
009	ттдтдагдсг	ттердазат	ааатдстта	дсядұдааа	саастадаат	ддясяяясся
01/9	тдатдадтт	таздатасат	стадасатда Сарасатда	тааттедеее	actctcgcgt	geagtteeet
08₽	rrgargeerg	теодереае	дастдадсст	ccagtettee	аасдаааддс	саасадатаа
420	сяссдясяяя	ддэдэдсдрр	десерессе	сддсддяггг	аатседетес	асаасдетса

US 8,871,437 B2

E9

pənurquop-

τ9 Э алаядусатс алдугдалст тсалдатсос тагустдуят сттдалутс ассттдатус 09 <400> REQUENCE: 27 <223> OTHER INFORMATION: pENTR 481P Bottom strand <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <rr><Z12> TYPE: DNA <2JJ> LENGTH: 61 <510> 2EÕ ID NO 51 С τ9 09 сассддсятс заддтдаяст тсаядатсса дсягадддат сттдаадтс ассттдатдс <400> ZEÕNENCE: 30 <223> OTHER INFORMATION: PENTR 481P TOP Strand <3205 FEATURE:</pre> <213> ORGANISM: Artificial <SIS> TYPE: DNA <SII> LENGTH: 61 <570> 2EÕ ID NO 50 ננננקטנקקט מננננקטנים מתוקננ 9768 ссядддддда ддядасстагд дававаедос адсавододд соггствод дегостддос 3000 כדנדתבשלבט טבטרטטטער בטטטטאטטרט לשמנדטאטט ארטארטט ארטארטט 3840 адоддовдда годдавсяда ададодовод адддадство садддддава сдоогдддва 3.180 сдраваетер дадавадсос сведерсос давддавая аддеддаеад драгосддра 3.150 детесутдея свездоссая струдадсув всувствая содаватовая агасствову 0998 3600 гасободого сустаятос уладовод устуствое усудоватая усодовог 0795 3480 gerererad egeageegea geraggeeae eaereeaga aereegeaeaea 3450 дадстассая стоттесо даяддтаяст ддогтоадся дадодоадат ассалатаст 3360 агордоров суставля валасовосу обасодору будетодет усоруатоза 3300 дедеездвее седеядяяя дысезаядда тетестдад асесттет тетдеуедея сдддясддсд сяядсгсягд яссяяяягсе сггяясдгдя дггясдсдге дггсеясгда 3540 08TE стетелаят садааттедет тааттедете саясастедо ададсаттас детдаетте авататудта ттуататсе тдататудаат аваттусадт ттоаттуат устоуатуау 3750 всоделень драваерсое сдугдадеть сессерсая сасадаваед дететесая 3060 алаттальну уттутия тутуудасуа утсуулатсу садассула ссадуатст 3000 0462 οσддатесяд тодеског тодебата асстальте грасдаддд сугалтууст уусстугуа асанутстуу аладалатус аталасттт уссаттога 2880 ассеядасас аярсяедаяр даяраясадар редардара сдадрардар разодаад 0282 מטטרנטמגר מטארדמניטר דנטראאנדטר ממוראבאמא אמטארמטנטר אדרדמטרמי 0912

<5TT> FENGLH: 3650 <5T0> 2EO ID NO 58

<220> FEATURE:

<rr><Z12> TYPE: DNA

<400> 2EÕNENCE: 58

<S13> ORGANISM: Artiticial

> other information: pentr/hl/fo-shrnb-gfP-mut

2340	ссаасдддаа	тдадссатат	аддддддга	садтаатаса	сстасатааа	ааастдтстд
2280	атдаасаата	атататсатс	саадатаааа	стасаттдса	атстстдатд	дғдғсғсяяя
2220	<u> αςτςτ</u> ααςςς	ттгастддая	дгсягядсгд	дтастасатд	ခင်ရင်ဗုဒ်ငင	дагатссссст
09TZ	ссятссядст	саяттатттд	саааатаааа	сястатсадт	နင္ခရန္ကရေဌင	аттедттдса
0012	ттдаттатая	гаадааадса	дттддсяття	сттдтасааа	ассеядетт	сгядггсгад
2040	ғардағсса	JJJEJESSJS	гсдддяядсг	cgagetteet	αστττττατ	ағасдсғадғ
086T	5776577757	адсагаддаа	гдааадатсс	адсдгагдаа	ясяссдсяср	адгдагадад
0261	дттесстатс	ввтеттовре	ссядтдатад	дааатссста	ссатааасдт	гдддааатса
098T	стясдтдтс	стдсятдгсд	датстаатат	сссссссавя	dfsccgggcc	воодявдоя
008T	ааттсадтсд	гаааддаасс	аадсаддстт	стдтасаааа	аатдссааст	деттттт
0₽८Ҭ	датдадсаат	дсаасааатт	ccfgttcgtt	сғдағадғда	статтта	ааатаатдат
089T	crcdddcccc	садтеттад	ခဒေငေရခငေရရင	сдасдттдта	тессеядеся	сатддатдтт
079T	рьтовольт	ရအေရရရေဒ	ровереродд	ငင်ရအအေဒေဒဒ	сясассстая	ддддясррс
09ST	င္ရရွင္အရွင္ရင္	ttetgeetge	стрезетте	გვფეფებიფე	стдастаатт	сясстддттд
00ST	ддясттгося	ရဲရဲအရဲငေင့ရဲရဲ	сгдссгдсгд	ттдеятаетт	дағдсағдсғ	дастааттда
0₽₽Т	татдагтдаг	പ്പ്പ് പ്പ്പ്പ് പ്പ്പ്പ് പ്പ്പ്പ് പ്പ്പ്പ് പ്പ്പ്പ് പ്പിന്നും പ്പിന്നും പ്രപ്പാം പ്രപ്പാം പ്രപ്പാം പ്രപ്പാം പ്	მმიმმფმჺჺფ	მმმიმმშყემ	მიმმამבבამ	მсддяясгдд
08ET	ငေရရအရေအင်ရရ	<u>နဗ္ဗဗေငရဗ</u> ဗ္ဌဗဗ္ဌ	ааааттадте	атаатаааа	cddccrcrdc	ရအရိုင်ငံရင်
1320	ငင္ငေအရဲအရဲရင္အ	ссгддаагад	сстсястаст	ааааадсст	стаддеетее	стдсааадс
1360	ငရိရိရိအရင်ငင်	ротовеесес	аааатдуата	атсадатесд	асасдъдсъд	ғсадттығт
1200	атдесдатда	ссдататаст	ртастастатд	ссггдгсдгя	гадтесетса	ggccatggtt
0₽ТТ	тдағсаяст	<u> ဒ</u> ရာငျေရှင်နှင	მმჺმჾმcჾcc	cdrcdcdcdc	ရင်ငင်ရရင်ရန	даастедаес
080T	адгаддгаая	ခေဒငေဒေဒနာဒိုင်င	дгасаддаяд	ссресяедяя	дсдяядгсдг	ရဆငေအငေအင
1020	carcarcca	васадддсса	ငေရငရင္ရရဲအင္ရရဲ	адгесгадяс	ggcaccatct	aafaffacc
096	ငငငေးရရငငေးရ	ငရင်နငငငေနငန	дгссяддссд	ငရင်နငန္တငင	дяссясреда	сясдяссрсс
006	адттедтдаа	дсдросоддя	ငေရိရငငေရရဲအရ	ငေရင်ငနင်ရင	тедеедятет	ငေၾငရဲရင္ရရင
048	actecegeee	ငရငနရရရငရန	მმიიმმმეიმ	ငရငောရင်ငရငင	асдаадтдса	creereddee
084	дгсядгссгд	сдрядсясдр	атсдааатст	ടേർദ്ദേർദ്ദേര്ദ	ссятадаадд	дсссяясстт
027	сдаттссдаа	гсссддяяяя	ငေၾငါငငေရဲင်ရဲ	ддаддагсаг	receededer	ဒေရငခင်ရအရ
099	сдаадаастс	rraaaaaraaa	аатааасаад	свтавдетде	терсавстрат	аттдортта
009	ттдтагдаг	ттертдааат	ааатдстта	дсядұдааа	саастадаат	99acaaacca
075	тдағдадтғг	таздатасат	стадасатда т	гааттедеее	actetegegt	geagtteeet
08₽	τταντασστα	ттедттеят	ရအင်္ခရအျင်ငင်	ссядтеттес	၁၉၉၈၈၈၉၂၀၈၈	саасадатаа
450	сяссдасааа	ရရာရေအရင်ရင်	дгесгяегся	շддсддяггг	аатеедетее	воддеревов
360	ccgttgcttc	accetecggg	ccfgcccgcc	բаасааасар	тддсядтта	ατττασταςς
300	сттетдетта	rcaggatggc	аддесатесд	ааасусаааа	дадстедгад	гадссаддаа
240	ငရငရင္နနင္နင္ရင္ရင	дсааттаата	гдадсдсаас	နေရင်ရွှင်ရင်နှင့	ငငငရဲဒင္ရင္ရရဲဒ	сдясяддрр
08T	ရင္အရင္ရရွင္ရရွင္အ	аттсаттаат	მამჯემშანმ	cteteceede	ငရငဒၶဒငငရင	дедеесевете
021	аадсудаада	მჺმෳმჺმෳმმ	сядсдядгся	ငေရႊငေရအရငရ	ငရငၶရငငရၶၶ	гяссдетеде
09	адъдадсъда	яссдсссссса	таассдтатт	аттстдтдда	статесестд	crrccrdcd

pənuțquos-

∩2 8'811'431 B5

99

S9

ададусаета усубатудале удададаесе бабусудае себесабеа басусбаубу 09

> construction process of the state of th <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <rp><212> TYPE: DNA <2J1> LENGTH: 61 <510> SEÕ ID NO 30

> > С

сассдсяста дсугатот удаладатсса усагадудат стргоатса гасустауту 09

Τ9

<400> SEQUENCE: 29

<400> ZEÕNENCE: 30

<223> OTHER INFORMATION: PENTR Sk-7N Top strand <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <SIS> TYPE: DNA < SII > LENGTH: 61 <570> 2EÕ ID NO 50

3926 בדבדקפבקקפ פבבבקפבפא פאנקבב ссяддддддс ддядоссятд дяяваедос адсавододд остетевод детостддос 3900 3840 ατεπέλατα ατατασασστά ταραστάστα ταρατάσα ατασπάτατα αταπάσασα адоддоядда годдаасада ададсасас адддадстес саддддааа сдоседдеага 3180 сугдадстат дадааадсус сасустсосо даадудадаа адусудасау угагосууга 3150 детесутдея свездессая сттдуадсув асуастася ссуваетдая атасстасад 3660 ассдддегдд асгсаадасу агадгеассу дагааддодс адсддесдду стуаасудду 3600 тасотодото тдогальсот дттасоадто догдосая дтододалая дтодъдоть 3240 утестерая тарадосуга уттадуесая састесаяда астегутаде аседестаса 3480 довлеверов лереоровов вореотлоре товелеровов соллатато веровловер 3450 атстдстдст гдсавасався стассадодд гддтггдггг дооддагсаа 3360 gegreadate ecgradata gareataga rerecryag arecerter rergegegea 3300 3540 стетествае свдаатедде саледетед саледеседде ададелетае деседеенеда 08TE οστε asatatogta troatastot toatatogat asatrodoagt troatrodat gorogatogd gecarecerar ggaactgeet eggtgagtt tetecteat tacagaaaeg gettetaa 3060 азайтазы утертерая сутерудания сосудалься садассуль создульть 3000 0462 σοαθαέτοαα τοφτοαστοα τοφτότετο τοαστύβατα ασοτταττέτ τοασσασθασ 0882 сугаатдуст дусстдтба асаадтстуу ааадааатдус атааасттт уссаттстса 2820 дессяддеде алгеледаль дальаеддь студстдату сдадталь трагдаедад αθαρείαστε αθατέσστας τέφταλτάς σστέττασα φοθαίοθο αττέστος 0922 נדמקממקמה מנכינקמוני מקטנקמממת מנוטניקמנט כקכיקקכאנ טרנכינקכאי 0072 астостдату атдоатдугт астоасоаст додатоосод дааааасадо аттооаддыа 0492 089Z усодастая астодосудае дуальтате состоеда соагоалдоа стетатосус ссядадтедт теседаласа тоделадот ародтерсоя абатодета адаградате 5250 сусультату содудстатс аддедодася асстагодог сугагуддаа усосуагусу 09₽Z асутсуадус сусуаттая тъссаясату ульустуатт тататууута тааатуууст 2400

pənurquop-

89

78 LEP'IL8'8 SO

-continued

70

c	61	
<210> SEQ ID NO 31 <211> LENGTH: 71 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-U1A-4 template		
<400> SEQUENCE: 31		
ctggcatcaa ggtgaacttc agggctttcg ccctgaagtt caccttgatg cctatagt	tga 60	
gtcgtattag c	71	
<210> SEQ ID NO 32 <211> LENGTH: 44 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: BamHI-NdeI-NotI-L7Ae-primer		
<400> SEQUENCE: 32		
aaggatccat catatgcggc cgcttatgta cgtgagattt gagg	44	
<210> SEQ ID NO 33 <211> LENGTH: 36 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: L7Ae-EcoRI-XhoI-primer		
<400> SEQUENCE: 33		
cactcgagtt gaattetett etgaaggeet ttaate	36	
<210> SEQ ID NO 34 <211> LENGTH: 20 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: T7 promoter primer <400> SEQUENCE: 34		
taatacgact cactataggg	20	
<210> SEQ ID NO 35 <211> LENGTH: 21 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: BGHrev primer		
<400> SEQUENCE: 35		
gctggcaact agaaggcaca g	21	
<210> SEQ ID NO 36 <211> LENGTH: 17 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: 481P Fwd <400> SEQUENCE: 36		
caaggaggac ggcaaca	17	

<210> SEQ ID NO 37

L

0₽9 атсатасус алубасос сстатьдасу тсальдасуу талатууссе усстуусать астуасуса атуучу сатсазуу аластусса сттуусадта сатсалугу 08₽ сосдессять дасугсаль агуасугату гесссатадь алеуссалья уудаетьес 450 судадтессу сутасатая страсудтая агууссодос туустуассу сосаасуасс 360 300 альтарсова тартарся всеметая стасуруст астадитата воссельта רבאטטטרבאט טכטרדניטכט כדטכדניטכט ארטרבאכטטט כאטאבאראכט כטרנטאני 240 08T сувдсявлаят сталдосьяся асалдусалд усстудассуя сальсусату алуластус codostagtt aagooagtat otgotocotg ottgtgtgtgt ggaggtogot gagtagog 150 дасудатсоу дадатогосо дагосостат уубододото саугасаато гуогогдату 09 <400> ZEÕNENCE: 40 <sss> other INFORMATION: pcDNA3.1-AsRed2-L7Ae-myc-His6 <220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial Sequence <AND : 34YT < 21S > <511> PENGTH: 6548 <510> 250 ID NO 40 дессаатасу ассааатес бT <400> REONENCE: 30 <223> OTHER INFORMATION: GAPDH Rev <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial AND : ETYPE: DNA <570> 2EÕ ID NO 30 адссасатод стсадасас 6 T <400> ZEÕNENCE: 38 <223> OTHER INFORMATION: GAPDH Fwd <S205 FEATURE:</pre> <213> ORGANISM: Artificial <212> TYPE: DNA <SJI> LENGTH: 19 <570> 2EÕ ID NO 38 αστέθατθας θετατέας οz <400> ZEÕNENCE: 31 <223> OTHER INFORMATION: 481P Rev <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <SI2> TYPE: DNA <SII> LENGTH: 20 pənurquop-

actreasdry eacedgeasy gycgaggges acceedga gyggaceeag gagargaa

стетдегдая даядассатд ссетездда селесатеда ддделеедту аледдеелет

raageriggt acceased garceactag recagiging rugaarree accarggeer

стдеттаетд детелетая атталтаета стелетад ддадаессал детддетадт

дездесета асдетдерая детатала дездадетет стдестале ададалееса

regetatese carggraatg eggetergge agtacateaa tgggegtaga tageggtte

atgeceagea cardacetta tgggaettee etaettggga gtacatetae gtattagtea

ZL

080T

τοςο

096

006

048 084

720

099

3420	ccddfdcccf	яссдяссгдг	стерезид	ασσσάθεεσε	მიმიჟმმმი	ccddccdccg
3360	ccdccdfdff	рагодага	дясяятсддс	gggcacaaca	ggctatgact	даддстаттс
3300	сссдаадая	teteeddeed	მიფიმიფმმ	аадатддатт	атдаттдаас	атедттеде
3540	ငေအရရအင္ရရအရရ	датсаадада	тттадаятаг	усасасас	ငငရဲရဲရဲအရဲငင္င	саааадстс
08TE	гяддсгггд	стеддяддсс	аддаддетт	адаадтадта	дядстаттсс	стогдоогог
3750	ငငရဲအရဲရငငရင	гягдсядядд	בבבבבבשבב	дсгдясгааг	ссдесесярд	cgcccattct
3060	сдессядрр	сссстаястс	gcccatcccg	сссгяясгсс	атадтеседе	дгсядсяясс
3000	атстсаатта	сааадсатдс	садаадтатд	ငငငငေအငါအေဝါဝ	гссссяддсг	дғдғддяяяд
0462	сядсяяссяд	стсааттадт	аадсатдсат	даадтатдса	ငငေးရငအရရငအ	сссяддсрсс
0882	дғадағадғс	ငနင်ငနင္စရင္စရင	даатдтдтдг	саястогода	таасдсдаат	аасааааатт
2820	дадстдаттт	уссаяаяас	cddccrarrd	ттдесдаттт	атавддагг	аттертатар
0972	теддтетатт	садесестате	даясаясаст	ртовяветд	гддясгоггд	ретевттот
2100	<u>α</u> яд <u>г</u> есяед <u>г</u>	стедясдеед	ttttcggccc	сдатадасдд	gccatcgccc	сясдтадтдд
0492	მმჺმფჺმმჺჺ	асттдаттад	ассссааааа	ငရရင္ဆင္ရင္ရင္ရ	тадтдстта т	ддессдяее
0852	стесерран	ааатсддддд	дссяядсссс	αβατττασαα	сясдеесдее	setttetege
2520	ttetteeett	τοστττοθοτ	ragegeeege	მააფმამააც	сдстасастр	მიფებელი
2460	дғддғғясдс	მმჺმმმჺმჺმ	саттаадсус	rdrødcddcd	ငငေးငရငရငငင	дддддгягсс
2400	гддддсгсгя	အအgaaccagc	ငင္ရရဲအရွင္ရရွေအ	тстатдустт	բձշձձբձձձշ	атдстдддда
2340	ခရင်ချင်ရင်ချင်	стдддаадас	අයියියියියියියිය	ငေအရရအငေအရငအ	raaaaraaaa	сссдааааа
2280	тдтаттар	ссгдядгядд	сятсдсяттд	даддааастсд	стаатааат	стдгостгго
2220	дссястесся	ငငင္ရရဲဒၶအရဲရင္	стесстедяс	receedade	rgtttgcccc	адссатстдт
0972	ссгядссдсс	gactgtgcct	дятсядсстс	таяасссдст	ссяттдадтт	атсассатса
2700	ассддрсарс	даататдсат	аададдатст	стаятатада	сдаасааааа	gagggccctt
2040	стедядтетя	дадааттсаа	дссрразая	аадастааад	ссггдгддяд	адсттддаад
086T	ರ್ಧರಿತರಿತತರಿರ	දුල් පරිස් පරිස්ප	сдатаатсаа	деррадава	aaracstac	гдддсяггдя
076T	ддээдддсгд	даасдасстт	стааадсаа	рэвэтэтвэвэ	даатдтдссд	дсдяддядяя
098T	cccctcctct	гдегеягегд	сгдядягсдг	gttgacccgc	ငရငၶရခရေ	тедеттасат
008T	сгддсяяядс	ддядядддя	свавддстдт	аасдадасда	даааддтасс	дгааддгааа
0₽∠⊤	ടാറ്റപ്പെട്ടറ്റെ	ддөвөөбөб	тдадсстдст	адодаддстс	ggacatgcag	аддеесерая
089T	дтдадагсгд	устатугас	<u></u> အရာရရင်ရေရငင	ддссясяясд	стесяядегд	နင္ခရင္ငင္ရေငငင္
079T	ငရင်နငင်ရငရ	ငရငငရင္ရရဲရရင	<u>အ</u> ရင်နင့္အရွင္အင	рдегасаадс	даадддсаад	аддаддаа
09ST	дадатсстдд	ссяссдсятс	асттедадда	cccddcffcc	ссгдаадагд	cedeeteede
00ST	сссаадаадс	сясстассдс	асстдеясас	ငင်ရအငေငင်ရငင	сддредееве	ತರ್ದಿ ರ್ದಿಂದದರಿ
0 ₽ ₽ T	ցեցցշշեցց	ccødrcccrd	racracacaa	ရင္ရရာင္ရရာင္ရရ	ငရင်ရင်နှင်ရအရ	ငေဗငေငရဲဗရဲဗင္
08ET	rgggagceer	მმიიმმიიმი	гдсядаасаа	ддссссдгдя	ငငငငရငငရအင	дсаясаяст
1320	аадатестдд	дгясяяддгд	actgcctggt	င္ရေ႕ရႊင္မေရြင္ရရ	ggacacctcc	ငငရငငေဗငငေဗ
1260	ддеггеегдя	ငရဲဗရဲရဲဗငေရဲရင	ссяссяссря	င္႕ရဲရဲအရဲင္ရေဒေ	მმმсբբсясс	ငင်ငင်ငင်ငင်ရိဗ
1200	трездевадт	ссссдястас	гдгосддояг	врадерара	сааддеетте	rgtacggete
0₽11	всетестдея	сатсстдтсс	годоогроз	ccccfgcccf	იმფმმმიმი	тсдаддтдат

pənuțquop-

∩2 8'811'431 BC

£L

†L

5820	даадстадад	rrarraccaa	адтетатаа	деерееярее	аастттатсс	<u> α</u> ταατεεταε
0925	ദ്ദേദദേദ	ငေဒါဒဗဒဒဒဒဒဒဒဒ	နငင္ေနငွင္ေနငွင	ссадсаатаа	ссадатта	дереяседде
0045	сдядясссяс	аатдатассд	ccødfgcfgc	ccatctggcc	ддаддасгга	стасдатасд
0799	дгдгядягээ	acteceegte	гядттдсстд	сдрраярсая	стдтстатт	тегеядедаг
0855	ရအရွင်နင်ငင်ခ	стеятсядт	дттассаатд	гддгсгдяся	тдадтаааст	азадтатата
2220	азатсаатст	атдаадттт	таааттаааа	тадатестт	датеттеасс	рававарда
0949	дгсягдядяг	аддаяггггд	астеледта	гддаасдааа	rdacgeteag	сгясддддгс
00₽9	ттдатеттт	адаадатсст	ааддатстса	сдсядаааа	дсядаттасд	стедсяздся
0789	адгегегеа	гддгядсддг	ааассассдс	гссддсяяяс	гадететтда	ааададссуда
082S	ассттсддаа	дзадссадтт	ασαστσταστ	стеддеяесе	аадаасадта	дстасастад
5220	сстаястасд	მფფმჺმმჺმმ	сададтест	адсаддасғя	даддтатдта	срадсададс
0915	ддгаасадда	адсадссаст	cdccsctddc	сасдасттат	сссддряядя	ггдядгосяя
0015	алетатерге	сттатосддт	accgctgcgc	<u> α</u> τεσ α ασοσα	сдяясссссс	βοέθτθέσα
0709	гссяядсгдд	aarcarrcac	дерсадрая	аддтатста	сгсясдсгдг	стесезгад
086₽	နောင်ရင်ရင်ရင	сссттсдада	cegeettet	ддагасстдг	деедергаес	тгосдяссст
4620	cacteteeta	creceredra	ငငငငင္ဝဒိဒအဒိ	ဒေဒရိဒိဒေဒိင္နင္နင္	атаадатас	ငရအငေအရွရအငင
0987	гддсдяяясс	ваярсадада	атедаедете	сатсасаааа	ငငငင္ဝိဒငဝိဒဝိ	a dcrccdccc
4800	стетесата	<u> </u>	<u></u> အအဆgggcggc	аддаассдта	၁၁၉၉၈၈၈၈၉၈၉	ငဒဒဒဒရရဲငငဒ
0740	аасатдтдад	ငရငဒရရအအရ	саддддаѓаа	тесевсадаат	аатасудтта	ငဒဒဒရရင်ရင်
0897	теядетеяет	ရငရအရငရရင	rrcddcrdcd	cacrcaarca	tgaetegetg	сегедегеве
4620	tetteegett	rattgggggg	acaarrraca	ദദർദ്ദർദ്ദേദ	ငရိရငေဒေဒငရင	аттадаат
0957	raccagetge	ааасстдтсд	fccødfcddd	cracccactr	дғғдсдағағ	саттааттдс
005₽	адстаастса	стаатдадтд	շշբննննբնշ	аадтдтаад	ငေရရအရေငဒင္ရန	နင်ရင်ခင်ခင်
0 ₽ ₽ ₽	аттесаесаса	госдорора	дааастдста	tttcctdtdt	дтсатадстд	сдгаатсатд
4380	гададсттдд	дяссреряде	утассдгс	татсатдгос	саатдтатст	ссваястсат
4320	гдгддггдг	дсяттстадт	тттта	аатаадсат	азатттеве	атадсатсас
4560	ааатааадса	саатдустас	стдеядетта т	аасттутта	ဝခငငေနငငငင	тдатст
4200	датстсатдс	ငေႊရဲငရဲငရဲရဲရဲ	ддяғдяғссғ	ရႊငေရငငေရရင္	catttccaga	дстгсддяят
0₽Т₽	даааддстдд	сдееррарово	астесаяседе	сдядаттса	ссрдссярся	ငရိဒငရငငေဒဒ
080₽	вссдассаад	гсдсдааагд	ясрерддддр	гсгдядсддд	дясдядеесе	tegeettett
4020	гсдееррад	гсдсядсдся	сдерессдяр	асддгатсдс	стедедетт	гдяссдегге
0962	გсдяя£дддс	გაფალემაც	ғаттдағдаа	сгясссдгдя	атадедтра	статсаддас
3900	гддсддяссд	саасгааага	ငရိနငင်ရင်ရွင	стддаттсат	ageegettt	дағадағағ
3840	сдаататсат	ασερασραία	ငဒေနငုရွင္ခရွင္ရေနင	гедгедгдяс	ექამეგევები	сятдееедае
3780	гсяяддедед	стедееядде	адеедаяестд	<u> </u>	გგავალეფე	гсгддясдяя
3720	атсаддатда	αθεσεεάεσα	ရအင်ရွှင်နေရွှင်င	сясдтястсд	атсдадсдад	ရအအငအင်င်ရင
3990	နငင္ေၾငၚအၾငိုင	тдеееяттед	сседдерар	атасусттда	ରେସିବେସିସିକେସିବ	сдатдсаатд
3600	ccatcatggc	дадааадтат	rgeteetgee	сатетеасет	gateteetgt	ർദേർർർർദേള
3240	င်ရွှင်ရနေရင်	тддстдстат	ದಿರಿತಳದಿದಿತ್	ссястдаадс	сгсдясдггд	ငရငေးရင္ရရင္ရရ
3480	ασαττοσττα	ရငေးရေအငေရဲရ	ցեշցեցցշեց	ငေးရငရငရငရင	ငေခင်ရင်နှင်ရင်	даатдаастд

pənuțquos-

9L

∩2 8'811'431 BC

SL

8*L*

LL

pənurquop-

240	cgttgacatt	садататасд	атдтасдддс	cractrcaca	ггэдддггэд додгггдод
08T	аадаатстдс	сааттдсатд	дсттдассда	всааддсаад	суадсаааат ттаадстаса
120	gagtagtgcg	მმფმმჺჺმჺჺ	շբեզբզբեր	cracrcccra	седеятадтт аадееадтат
09	гдсгсгдягд	садтасадтс	ddfdcøcfcf	датесестат	дасддатсдд дадатстссс
					<400> SEQUENCE: 41
		98.İI	- ЕСЕЪ-шХс-I гсе	төирөЗ Гкіэ. I.£ANOэq :NO	 <210> SEQ ID NO 41 <211> LENGTH: 6203 <212> CRGRNISM: Artifi <213> ORGRNISM: Artifi <223> ORGRNISM: Artifi
8759					сгдясдгс
0759	ааадъдссас	астесссода	ргосдодсяс	ငေအခင်ချင်မှ	аатутатта уааааатааа
0879	ратавтереа	ငေနင်ရန်ရင်ရရန	дстастдссс	аттатсяда	сраврата стассаво
0249	эртэрэра	стоятастс	сясддяяядд	асаздддсда	аааатдосдо аааааддда
0989	36993936	дрдадсяяяя	α cα <u>τ</u> εεεαα	асттсасса	астдатетте адеатеттт
0089	сдрдсяесся	дгаясссаст	ссяд走тсдат	сғдғғдядяғ	аастетелад дагеттаеед
6240	ссддддсдяя	аааасдееее	сатсатт99	стааадтус	ссдедеевся гадеадааст
0819	сдддагаага	ддедревара	αστσττασσο	сдяссдядבב	сссдядааса дсдсасдод
0219	ассаадъсат	гдадтастса	сғдғдясғдд	адатдсттт	гтастдтсат десатеедта
0909	сатааттстс	ggcagcactg	тсатддтат	дедерезсво	гсадаадгаа дггддссдса
0009	ссдятсдттд	cffcddfccf	сддррядсро	сдсөөөөөөд	ттасатдатс соссатд г д
0165	ссяяддедад	ссссаясда	rcsgctccgg	атддсттсат	гдгозодого дгодггддг
0885	გვაღამემ	саттдстаса	ясдггдггдс	адстгдсдса	таядтадтес десадтаат

ссяссседае стасудсуст садедстса десустаесе сулсалда алусадсаед 1500 0₽ТТ сдассердая устелеерс десадееа достдеседе десердеее десереда 080T таласудсся сладтесяде дедеседдед адддедаддд сдатдесласе тасуделаде ασεγαάααα ααγάρερες γουααααααα εδοσογεος αθεσαγασεα αγοαασασα 1020 таадстедде ассуадстод датосастад тосадебду тодааттоос ассатодеба 096 стостасто достастова астального врояталь выротатор устало 006 дтадосуту асудтудая утстатата усададстот стуустанот ададаассса 0₽8 азаятсаясу удасттесса адагуссуса асаастосус оссатедасу сааабуусу 087 720 астеледдду летеселяде стеслессел стуление содологи тетедоелее 099 содстаттас сатодтоато содтетедос адтасатсаа тодооотода тадооодтето 009 асусседея сасуастся судулстьс стастодося утасатося угастадиса ארכאראנקכט מאטראטטטט במאטראטטט געאנטער איז אטטטט אינטאני אינאנאני א אטעראטטט אינטער אין א גערא אינא אינער אינע 075 08Þ астуасуса атууста сатсасуус аластуссая стсуусаута сатсалугу сосдессать дасутелья абрасутату тесссатадь аасуссалья уудаетьсе 450 тудаядтессу сутасатая страсудтая атууссоусс туустуассу сосаасуасс 390 ататерора тартадета садодата скасододот актадста адоссатата 300

астестая уссуссату сседаядуст асуссадуя усусатс тестеааду

3990	ссдаттсдса	атедеедеге	дсгггясддг	αστεσεεαε	гдддсгдясс	гддсддсдяя
3600	ငင်ရအရအရငင	сдгдягяггд	дггддсгясс	အင္အရင္အရင္ရင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင္လင	дяссдстятс	მმმჺმჺმმჺმ
3240	მჺმმჺჺმმჺჺ	тсатсдаст	стттстддя	аааатддоод	атсатддтдд	сггдссдяяг
3480	gegatgeetg	gtgacccatg	ggatetegte	ငငရဲဒငရရငရဒ	gegegeætge	сяддсгсяяд
3420	аастдттсдс	მამააფმაამ	гсяддддсгс	асдаададса	датдатстдд	сдесдярсад
3360	аадооддеое	ясреддярда	ရငရအရင်အရောင်	атсдсатсда	свадсуваяс	аттедаесае
3300	ctacctgccc	стгдятссдд	дстдсатасд	ဒေဒနင်ရင်ရင်ရ	атддстдатд	адтатссатс
3240	стдссдядая	caccttgctc	ссгдгсягсг	ggcaggatct	ရအရင်ရင်ရေ	getattggge
08TE	дадясрадср	даадсдддаа	сдеедеес	сгдгдсгсдя	ссррдсвад	дзсдддсдрр
3750	ддардасяс	cggctatcgt	იმაყვავე	аастдсадда	дсссрдаард	ccrdrccddr
3060	гсаадассда	дтесссссед	მმმმсმсссმ	tgtcagcgca	<u> </u>	rgatgeegee
3000	teggetgete	саасадасаа	гдастдддса	гаттеддета	მჺმმෳმෳმმс	aaccacttaa
2940	caggttctcc	ggattgeaeg	тдаасаадат	ттедсятдат	тдадагсдг	<u>နဗ္ဗဒုရငေခဗ္ဗဗ</u>
2880	датстдатса	teeatttteg	адсттдтата	sgeteceggg	стерсаяаа	ဒေဒဒဒေဒ ဒဒဒဒဒ
0282	ασττττταα	гадтдаддад	аттесадаад	cctctgagct	ασεασεεεεα	ತರತರದಂ ಂದತರ
0972	сететтатас	стаатттт	ငေទင္ရရွင္ရရွင္ရ	atteteegee	agtteegeee	ခုနှင်ငင်ငင်ငင
0072	tecegeceet	встесдесся	сседееесря	саассатадт	ааттадтеад	сатдсатстс
2640	дгатдсааад	ရင္အရွင္ရရွင္ရရွင္ရ	вдастессея	дааадтееее	ассаддъдъд	ғтадтсадса
2580	гдсятстсяя	атдсааадса	အရွင်ခရာခရင်	<i>α</i> ςτεςεςαας	аадтесееяд	адддгдгдда
5520	եցեցեշացեե	ငင္ရရင္ရရွအအင္ရရ	сдааттаатт	ааатттаасд	дасстаасаа	торартеве
2460	гаттдутаа	αθέττταθαςα	ggattttgcc	дасссасаад	статтетте	статетеддт
2400	асастсаасс	ваесбдаяса	геттдттесая	аатадтдаас	сясдеееее	сдғғддядғс
2340	сдесерразва	дзеддееее	сдессрдяра	адъдддсаъ	гддссясдс	астадддгда
2280	рээзааасттд	ссредяессе	стттасддся	сдатттадтд	стгядддггс	ddddacccc
5550	устстааатс	гесседгеяя	ταθααβαττ	crcdccscdr	222222222	tegettett
5760	cccgctcctt	cgccctagcg	сясттдссад	дгдассдсга	гасдедеаде	<u> </u>
0072	აფიმიმმიმმ	сддсдсягга	сдесердгад	рэгососасд	сгсгяддддд	ငေತရင္ရရဲရဲရဲရဲ
2040	дсддяяядая	ддсггсгдяд	тддотстат	მმმმაღმიმმ	саддсатдст	аадасаатад
086T	даддаггддд	cagcaagggg	гдддсяддя	88888£888	стетаттего	дгяддгдгся
0261	саттутстда	ааттдсатсд	аваатдадда	тветоотто	teceaetgte	ааддъдссас
098T	стдассст <u>д</u> д	cgtgccttcc	gecectecee	тартдете	сосадсса т	ретестад
008T	βοσεροβασερ	ссдстдатса	дадттааас	сатсассать	скотсатсас	tgcataccgg
0 7 7 7 0	датстдаата	сссядаадад	ааааастсат	сссттсдаяс	дссгядаддд	сдсяястсда
089T	მფამმმამმა	дстдтасаад	gcatggacga	атсастстсд	යේදෙයිදෙයියියි	адттедтдае
079T	<u> </u>	сдатсасатд	асдадаадсд	ааадасссса	cgccctgagc	дсясссяд£с
09ST	састасстда	дсссдясяяс	ccdfgcfgcf	მმიმაიმმიი	сасссссатс	ассадсадаа
00ST	ရငငေရနငငေနငင	ငရင္ရရင္ကေရင္ရင္	<u></u> အရာအရောင်အရ	сасаасатод	саадатссдс	аддедаасте
0 # # T	аасддсатса	ငဒဒရငဒရဒအရ	гсягддссдя	аасдтстата	ငေအငေရွငငေအင	адтасааста
1380	ငေဒဒေဒရင္ရရရ	cateetgggg	аддасддсаа	дасттсаадд	даадддсатс	<u> α</u> ςατςgaget
1320	сгддгдяясс	dddcd <i>s</i> cscc	гдаадтгсда	ငရငရငငရဲအရရ	стасаадасс	асдасддсаа

pənuțquop-

08

6*L*

∩2 8'811'431 BC

pənuțquos-

0009	էշէցցցէցոց	ექნა <u>წ</u> ცავე	2222822220	тестездеят	асссаастда	ccactcgtgc
0769	ссдатдтаас	дядатссадт	гассдстдтт	тсааддатст	дсдаааастс	<u> </u>
0885	аттдаяяас	адъдстеяте	даастттааа	ссясятадся	саятассдсд	ငေအင်ခင္မေဌရွေရွ
5820	raccaaacar	дядттдстст	rdcddcdscc	даатадъдта	дгсяггсгдя	астсаассаа
0949	астддтдадт	стттстдгд	ссдгяядагд	дгозгдсозг	тетететает	састдсатаа
0029	дггагддсад	атсастсатд	ссдсядгдгг	адгаадггдд	сдррдава	дгосгоодяг
0799	ядстесттед	аааадсддсс	гдггдгдсяя	тдатесесея	дсдядггяся	раводабова
0855	reeddffeee	сресттенде	сгадгягадс	caccaccac	сдрддрдгая	сгясаддсяг
2220	дттдосаттд	дсдсяясдгг	ттадетеетт	адттедееад	тададтаадт	ရငေရဲရဲရဲအရဲင
0975	аттааттдт	сатссадтст	гатесдеете	сседсяясее	ငေအရအရေငုရရင	ദ്ദദഭേദദദേദദ
0079	ငငေးရငငေရဲရဲအ	аатааассад	астатсадс	ссддсгссяд	сссясдерся	Laccgcgaga
2340	дстдсаатда	гддссссядг	устассатс	асасдддадд	дагаастасд	ссдрсдрдя
5280	βςςτgaςτςς	атссатадтт	באַדָּדַבְכּמַדַבְכ	<u> α</u> ςдя <u>τ</u> ς <u>τ</u> ατς	асстатстса	t cagtgaggc
2220	саатдостаа	свасадстас	ааасттддтс	асастасан	аатстааадт	уттевато
0975	гаааатдаа	ссетттаза	теветореот	ааааддагсг	дадаттатса	ттгддгсяг
0079	сдггээдддэ	сдаааастса	сгсядгддая	дадгогдяод	стттствод	атеетттеат
0409	ссгсаадаад	адааааддаа	стасдедеад	<u></u> အရင်ရင်ငရင်ရ	reegeeege	дсаагааггг
086₽	яссдсгддгя	2388638865	стгдятссдд	дсгддгядсг	ငေရိဒ်အခေအချ	садстасст
4920	сгдсгдяядс	татстдедет	сядтаттда	астадаадаа	стясддстас	ддгддссгээ
098₽	ттстдаадт	тдстасадад	атдтадасдд	<u></u> အဌနဌငဌနဌဌင	саддаттадс	ссястддтаа
008₽	ငင္ရရွင္စအေဌငအရွ	сттатодоса	гаадасасда	гссяясссдд	гсдтсттдад	ссддгааста
0₽∠₽	тдедеестат	ရငငငရဲနငငရင	сссссдддся	дғдсясдаяс	<u> </u> ας <u>τ</u> αα α α α α α α α α α α α α α α α α α	стодотовал
089₽	дғдғяддғсд	сстсядттсд	дсғдғяддғя	сатадстсас	33c3cfffcf	ငေဒဒဒဒဒဒဒဒဒ
4620	±±55555555	ccfdfccdcc	стассдда г а	accetgeege	teetgtteeg	regraegere
095₽	ддяядсрссс	gtttccccct	авсезадас	ддас <i>та</i> тааа	вавесседаса	ತರಿತರಿರಿದರಿಂದ
005₽	сдегезядге	сааааатсда	всдводевся	caccccccfa	ссятаддстс	гддсдееее
0 4 4 4 0	αςεαεαεεαε	ссдгаааад	вддссаддаа	ддссядсяяя	дрдадсяяяя	дааадаасат
4380	датаасдсад	адаатсаддд	ддрежевся	деддгаагас	ссястсалад	ငရရင်နင်ငေနရင
4320	сғасаасаяа	ά αρτα αρτα α α	ςας£αςας£ς	стсястдяст	cactteeteg	αασαστσττο
4560	стдедгаттд	მფმფმმე	ဒ နငရငရငရငရရ	тдаатсддсс	дстдсаттаа	гдгсдгдсся
4200	ссдддааасс	сдеттесаяд	βατααστααα	аттдедтеде	астсасатта	дядгдядсгя
0₽Т₽	ддессеят	гааадсстдд	gcataaagtg	აფამაამგგა	асасаасата	сасааттсс
080₽	tgttateege	тдгаааат	адстдттсс	тсатдутсат	сттддсдтаа	сгядсгадад
020₽	ссдрсдясср	гдгогдгэгд	татстатса Гатстатса	стсатсаатд	ьььээ т дтээ	сгядтгдгдд
0968	тсастдсатт	адсассесс	сасааатаа	атсасааатт	аадсаатадс	дттасааата
3900	- деттататор	десезез	г	ttettegeee	ငေနင်ရင်ငံရွှင်ရွှ	дсддддягсг -
3840	атестесаде	сддсгддягд -	rccdddacgc	ддяягсдггг	α <u>τ</u> εδάδεεες	г статдааад
3780	accgccgccf	стедатес	сатсасдада	сссяяссрдс	ငငေဖဒရငရဲအငရ	ааатдассда
3720	aaaarrcaca	gegggæetet	дтестегая	болетата	соротьтотт	gegeategee

∩2 8'811'431 B5

E8

pənuțquos-

098T	сссястдтсс	аддъдссяст	гдассстдда	<u> Α</u> ρασερεσερ	cccctccccc	сғдғғдғғғд
008T	гдесядесяг	дссрествар	ссредяердр	сдсгдягсяд	адстаяясс	атсассаттд
0 7 7 4 0	сятсятсясс	geataeeggt	атстдаатат	ರ್ಧತಿತತಿಗಳ	аааастсатс	ссттсдаяся
0891	tctagagggc	дсяястсдад	ဒေဒဒိဒိဒိဒိဒိဒိဒိဒိဒိဒိဒိ	ရဲရငေးအေရ	стесяядетд	redeedeece
7620	cactactacg	caccaraaac	здгасдаддс	гдсгясаадс	даадддсаад	аддаддгдда
09ST	дадатсстдд	ссяссдсярс	асттсдадда	cccddcffcc	ссрдаадард	ccdccfccdc
00ST	сссяядаадс	сясстяссдс	асстдсасас	ctdscctgcc	сддредееве	အရင္ရရင္ရင္ရင္ရင္ရရရ
0440	эгддсссгдд	ccødrcccrd	racracacaa	പ്പട്ടർദ്ദേദ്ദർദ്ദ	сдрдгясдяд	ссяссдядяр
08ET	гдддядсссг	გმაამმაამნ	гдсядаасаа	ддссссдрдя	ссссдссдяс	дсяясаяст
1350	аадатсстдд	дгасааддгд	ясгдссгддг	cfddscddcd	ggacacctcc	ссдессаясся
1560	ддсггссгдя	იმჟმმჟიმმი	ссяссясста	rddagcdca	999955535C	сссресседя
00ZT	тссаадсадт	ссссдястас	тдтееддеят	атсаадтасд	сааддосетес	гдгясддсгс
0717	ясстестдея	catectgtee	годооггося	ccccfdcccf	ငရိိဒရိရိရငရိရိင	гсдяддгдяг
080T	дадатдаада	дддсясссяд	всесссрддя	മ്ദാദ്ദേദ്ദിദേഴ	ငေဒငေဒရိဒဒေအ	асттсаадтд
0201	васддеевер	ရိရိရိဇောငေရင်ရ	ссяссятсдя	сссттсяддя	даадассатд	сттдстдая
096	яссягддссг	гддааттеее	гссядгдгдд	датесаетад	နငင္ရေအရွင္ရင္ရရ	гаадсттддт
006	getggetagt	ддядясссяя	стсястатад	астаатасуа	дстатсдаа	стдеттастд
048	ададаассса	стддстаяст	дсядядсгсг	усстататая	ғсддғдддғд	drøddadrdr
084	сааатдддсд	сссяттдасд	асаастосдо	ааатдтсдта	ддястттсся	аааатсаасд
027	стердаясс	гддаядгггд	ттдасдтсаа	стесвессая	атттосаядт	астсасдддд
099	гздсддгггд	гдддсдгддз	адтасатсаа	cddrrrrddc	сяғддғдяғд	тедетатае
009	дгаттадтса	утасатстас	стасттддса	rgggacttc	сатдасстта	атдессеядта
042	geetggeatt	гааатддссс	гсаатдасдд	сстаттдасд	аадтасдесе	атсататдос
08₽	сатсаадтдт	стгддсядгя	ааастдесса	таттасудт	агдддгддад	аттдасдтса
450	адаясттес	васдесаата	тесссятадт	атдасдтатд	дасдтсаата	cccdcccsfr
360	ငငငေဗဗငဝိဗငင	гддсгдяссд	atggcccgcc	сттасддтаа	сдррасярая	raasarrcca
300	адессатата	астадстат	гг <i>э</i> сддддгс	гадтаатсаа	садстастая	дастастдас
240	сдредистр	садататасд	атдтасдддс	cfdcffcdcd	ασαεεεεασα	сгядддсгяд
081	аадаатстдс	сааттдсатд	дсттдассда	асааддсаад	стаадстаса т	сдадсаааат
120	მამხამხელ	მმფმმჺჺმჺჺ	стедедете	ctgctccctg	аадссадтат	ссдсяғадғғ
09	гдегегдагд	садтасаатс	ддгдсясгсг	датесестат	дадатстссс	дасддагсдд
					ENCE: 45	<400> SEÕN
		∂aiH-a	үш- ХрэЯгА- 1	EANDog : NO	яс: У пигояматис У	<pre><s20> FEATU <s23> OTHER </s23></s20></pre>
				icial	ANG : ITTTA :MSIN	<pre>< S13 > OKGAI < S13 > OKGAI</pre>
					LH: 6182 ID NO 45	<pre><sit> PENGL <st0> REÕ 1</st0></sit></pre>
6203		_		arc -	gecaeetgae	сссдаааадг
0819	cgcacatttc	вададаргаса	- атааасааат	вваерајја	астедаатде	дсддягясяг
0719	тдтетеятдя	гсядддггяг	даадсатта	Caatattatt	etteettet	tactcatact
0909	ааатдттдаа	ർർദേദേദർ	аддаагаад	дссдсяяяяя	задусаааат	caaaacagg

†8

S8

pənuțquos-

4200	стдсаттаат	<u> α</u> τε <u>α</u> τ <u>α</u> εεα <u>α</u>	сдддааасст	<u> α</u> στττος αστ	ctcactgccc	εεδαδεεδαδ
0₽Т₽	стсасаттаа	адтдадстаа	дгдссгэзгд	ааадсстддд	сатааадтдт	дядссддяяд
080₽	сасаасатас	сасааттсса	дсгяссасс	дтаваятс	getgttteet	сятддтсята
4020	ттддсдтаат	гадстададс	cdrcdsccrc	дгагдгэга	атотатота	тсатсаатдт
0968	свевостртт	гадттдтддт	састдеатте	дсятттттт	сасааатааа	тсасааатт
3900	воделеворе	стасааатаа	сссясяясаа	статтдсад	ссссяясррд	городосся
3840	атдотдаадт	сддддяғсғс	teeteesgeg	ддагддагда	ငငရဲရဲရဲအငရဲငင	даатсдтттт
3780	ffgggcffcg	сгягдааадд	ccdccdccff	бортаротт	атсасдадат	ccaacctgcc
3720	ငေအရင်ရင်ငေ	аатдассдас	адаггсасая	ငေရရအင္နေငေနရ	стотогодад	гсггдясдяд
3990	тетатедеет	cdcstcdcct	сдяттсдсяд	redeederee	стттасддта	arraaradra
3600	მმმალმაალმ	ддеддедяяг	тдаададстт	дгдягяггдс	ссессосс	გვალეფელი
3240	вотвтовоов	მმჺმჺმმჺმმ	гддссддсгд	саяссдяссд	тттстадаят	ааатддссдс
3480	гсятддтдда	ттдосдаата	cdatgcctgc	rgacccatgg	<u> </u> αεςεαεςα	ငရိဗငေရိရငရိဗရိ
3420	cdcdcstdcc	аддсгсаадд	астдттсдсс	ငရငငေအရငငရအ	сяддддсгсд	ငရအရအရငအင
3360	атдатстдда	дгсдягсядд	ядссддрсрр	сгсддягддя	сдадсасдга	гсдсягсдяд
3300	аадсдаааса	совосасс	гасстдесса	ttgateegge	ctgcatacgc	<u></u> အင္ရရင္ရရင္ရရ
3540	rggetgatge	дтатссатса	гдеедадааа	яссредсесс	стдтсятстс	дсяддатстс
3180	<u>အ</u> အgtgccggg	crattgggggg	გვალეფილე	аадсдддаад	αττατοφοτα	гдгдсгсдяс
3750	ငင်ငံရင်ရင်အရင	နင်ရင်ရင်နင်	дсгддссясд	αβαταταστα	ရအရိုင်အရှင်ရင	နငင်ရင္ခေရရခင
3060	сссрдаарда	сғағссааға	ငေအရွေနငေငျအင	tetttttgt	მმმიმიიმმ	дгсядсдсяд
3000	rgtteeggget	dørdccdccd	caactactct	аасадасаат	дясгдддсяс	аттеддетат
0462	гддададсг	accacttaaa	вадересса	<u>αεττ</u> αςαcgc	даасаадатд	тсдсятдатт
0882	даддатсдтт	дадасаддаt	атстдатсаа	ccattttcgg	дстедтата	defeeedddy
2820	стедсааааа	ддссряддср	стетердая	9959999999999	ттссадаадт	стстдядстя
0972	ccdccfcfgc	გგავავებაც	тастатдса	נממנננננננ	сатддстдас	tteteedeee
2700	дрродосся	ястесдесся	сссдссссся	стеедеееят	седеессераа	аассатадтс
2640	аттадтсадс	атдсатстса	сагдсааадс	седдседеед	ддарассаяд	ааадъсссса
2280	ငငေးရဲရင်ရင်ရရ	гадтсадсаа	дсятстсяд	тдсааадсат	ддсядаадга	стесесадся
5250	အ ရင်ငငငေအေရရ	ддддддзя	дғдғсядғғя	тдтадаятдт	дааттааттс	адтеранов
0942	аттаасааа	ааатдадстд	аттуутааа	ուենցցցցե	βαττττασσα	өрьвтатть
2400	саттетте	гятстсддтс	светсаяссе	астддаасаа	стгдтгссяя	атадъдааст
2340	асдтестта	дггддядгсс	дееерразов	асддітіс	десердагад	α <u>τ</u> αααςστς
2280	ддрраясдря	ттададатат	ааааасттда	сгодясссся	стродовас	датттадтдс
2220	стадддеесс	3333cfcccf	стстааатсд	ссссдрсявд	cdccddcfff	tegeeaegtt
0972	settesttes	cgetttette	ccgeteettt	βςςςταgege	асттдссадс	гдяссдсгяс
0012	နင်ရင်ရင်နိုင်ငရ	rgrggrggrt	යියෙයියියියියියි මියෙයියියියියියි	ддсдсяггаа	geeetgeage	атсссссясдс
2040	тстадддддг	ငေအရင္ရေရရရင	ငေရာနေရာနေရင	<u>αςττςτ</u> αα <u>α</u> α	ддассстатд	მმშაቲցכցցէ
086T	аддсатдстд	адасаатадс	аддассддда	9969999999	მმმმсяддяс	მმმმჺმმმმჺ
1920	ретаттери	тадутдтсат	вебдодбдде	attgcatcgc	ааатдадаа	бтьбтортт

дслллдвяся ддлядлдвял длдвосодвя вдддсдлдвл свллсвсляс слдллсввад 09

> <223> OTHER INFORMATION: ShRNA-BoxC/D- Bcl-xL <2220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <rp><212> TYPE: RNA <5130 EENGLH: 03</pre><5130 EEO ID NO 43</pre>

<400> ZEÕNENCE: 43

2819						pt
0879	ссясстдасд	ссдаааадъд	остатесс	ddddffccdc	ставсавата	стедалал
0779	стсдаатдта 	сддагасага	дсссясдяд	сядддргяр	аадсаттат	втаттата
0909	tteettteet	астеятаете	аатдттдаат	дсдясясддя	6668878866	ссдсяяяяя
0009	аддсяяяяда	ааааасадда	ငင္ရရဲရဲရင္ရရဲအရင	ассадсдеее	стетастес	стесядсятс
0769	сссяястдат	сястсдтдся	сдатдтаасс	адатесадтт	яссдсрдррд	сааддатстт
0885	сдаааастст	££6££63333	стддаааасд	дедереярся	аастттаааа	свсятадсад
2820	аатассдеде	аатасуудат	acccaaca£c	адттдстстт	მამმამან	аатадтдтат
0925	ссяттетдад	стсаассаад	ငင္ရရွင္ရရွအရွင္ရန	гегегдгда	ငရင်နေရရင်ရင	стерссетс
0049	сесесечаер	астдсатаат	статддсадс	саестсатдд	сдсяд£д££я	дғяядғғддс
0799	дғғдғсядяя	гссгссдягс	α ςεςςεεςαα	ааадсддтта	дғғдғдсяяя	датесесеат
0855	сдадстасас	асдатсаадд	ссддррссся	тсаттсадст	тддтатддст	<u> α</u> ςεαεςαεε
2220	drddrdrcsc	гасаддсатс	ttgccattgc	сдсяясдггд	саатадстед	<u> </u>
0975	ададтаадта	ငငရဲရဲရဲအရဲငင္	стааттдттд	атосадтота	атеедеетее	стдсаасттт
00₽9	адаадтддтс	പ്പട്ടാട്ടു	ငေရင္ခင်ေရရအရ	ореоревете	борботрата	ငေရင်ငငေအရအ
2340	ссясдетеве	၁ဧဠနေဌဒနဒဒန	стдсаатдат	გვალამემ	сттассатст	င်ရင်ဗင်မှ အဖွဲ့ရေ
5280	вровтовете	сдрсдрдгяд	сстдястссс	ссатадттд	воттеротть	сдятстдтст
5220	сстатстсад	ဒေရင်ရအရှင်နေ	аатдстаат	дасадттасс	аасттддтст	атрартатат Сабарта
0975	атогаадта	вэтвветтт	равертававе	стеразата	отереторео	ттотерреве
0015	адаттатсаа	стеддесяед	дстаадддат	уаааастсас	ссадъдаас	მმჺჺჺმაჺვი
0409	ббавтаттт	ссерранос	вравравото	дардаааддас	гасдедеада	адсадсадат
086₽	геедеегася	сддеддеее	ငငရငင္ရရဲရင္ရအရ	6006660666	rtgateegge	стддтадстс
4920	ರಿರ್ಧಕ್ಕಿಂಗ	адтассттс	тдетдаадее	атстдедете	адсасссддс	стадаадаас
098₽	ғасддсғаса	дғадссғяяс	ссседаадед	ရင်နင့အမှုအမှင	င်ရင်နေဗွဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္ဗဗ္	ရအရင်ရအရေန
008₽	аддастадса	састддтаас	ဥဗဒင္စန္ဒေရင္ခ	скоссас	၁ဧဗ္ဗ၁န၁နဗ္ဗန	၃၉၉၁၁၁၉၉၁၁
0776	сдгсггдядг	сддгаастаг	ασασετατο	ငငငရဲနငငရင်	ငငငငရင္နင္ဒရရ	၁၁၉၉၃၁၉၁၉၂
089₽	գեցցցեցեց	ревосторот	rgtaggtegt	сгсядггсдд	стдтаддтат	всьстоветь
4620	acacttete	ရိဒိရိအခွင်ငံရင်	tteteeette	ctgtccgcct	скассддатас	cccfgccgcf
095₽	ссгдггссдя	շցեցշցշեշե	даадстесет	tttccccctd	врессаддод	дастатаад
005₽	<u></u> အင္လင္ရင္မွအင္အရွ	ရအရင်ရေဒရ	дстсаадтса	серотевеве	၁၉၁၃၉၁၉၉၃	geceecetga
04440	сатаддетее	αβαβεεεεεα	ccdcdffdcf	ငရင်ခနေနေဖျာ	၃၉၄၄၃၃၇၃၄၄	ရငေနဗငနေခရ
4380	гдадсаааад	ааадаасатд	атаасдсадд	дватсадддд	дггягссяся	сддгаагасд
4320	светеваяда	ggtatcagct	င္ရရင္ရရွင္ရရွင္ရ	<u> α</u> τεάττεάας	<u> α</u> εεβεβεεεδ	стастдастс
4560	acttcctcgc	ασαστσττσσ	rgcgtattgg	ададдсддст	နငရငရငရငရရရ	даатсддсса

pənuțquop-

88

L8

63

-continued

cag	
-----	--

<210> SEQ ID NO 44 <211> LENGTH: 82 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-BoxC/D-BclxL template <400> SEQUENCE: 44 ctgctttgaa caggtagtga atgatcacgc cctttcgggt cacattcact acctgttcaa 60 82 agctatagtg agtcgtatta gc <210> SEQ ID NO 45 <211> LENGTH: 62 <212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-BoxC/D mut-Bcl-xL <400> SEQUENCE: 45 gcuuugaaca gguagugaau gugcccgaaa gggcgucauc auucacuacc uguucaaagc 60 aq 62 <210> SEQ ID NO 46 <211> LENGTH: 81 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-BoxC/D mut-BclxL template <400> SEQUENCE: 46 ctgctttgaa caggtagtga atgatgacgc cctttcgggc acattcacta cctgttcaaa 60 gctatagtga gtcgtattag c 81 <210> SEQ ID NO 47 <211> LENGTH: 59 <212> TYPE: RNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-Bcl-xL <400> SEQUENCE: 47 gcuuugaaca gguagugaau gaacuagcau agaguucauu cacuaccugu ucaaagcag 59 <210> SEQ ID NO 48 <211> LENGTH: 78 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: shRNA-Bcl-xL template <400> SEQUENCE: 48 ctgctttgaa caggtagtga atgaactcta tgctagttca ttcactacct gttcaaagct 60 78 atagtgagtc gtattagc

<210> SEQ ID NO 49 <211> LENGTH: 3930 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: pENTR/H1/TO-shRNA-BoxC/D-Bcl-xL

2340	ататтсаасд	дггягдядсс	гасааддддг	гааасадтаа	гогдоггаса	дтовеветев
2280	сатсатдаас	аааататат	тдсасаадат	датдттасат	саааатстст	<u> α</u> εεεαεαεεε
2220	ggcagctctg	ασταττεσε	сатдутсата	адсодсаста	сссгягадгд	адстдататс
09TZ	стросятос	аааатсатта	садтсаааат	аддтсястат	гдсяясдаяс	атсааттсдг
00TZ	адсаттдстт	астасаздаа	ငဒဒဒရင်ငုဒ်ရင	стесерая	сгядясссяд	тесяетадт
2040	астететдда	адететееат	гссггсдддя	ттдтсдядст	сааадсттт	астасстдтт
086T	дгдагсаггс	ငငရဲဒအရရရင	гдаатдтдас	ရဲဒေဒေဒရင်နှင့	асассустт	адгдагадад
076T	дттесстатс	адасттатаа	гсядгдагад	дааатссста	ссятааасдт	гдддааагса
098T	статдтдтс	стдсятдгсд	датстаатат	сссссрсдзя	дгяссдддсс	астддатссд
008T	ааттсадтсд	гаааддаасс	<u></u> အရင္အရွင္ရင္	стдтасаааа	аатдееаает	деттттат
0₽∠⊺	датдадсаат	дсаасааатт	сседеесдее	сгдагадгда	тертттертт	ааатаатдат
089T	сгедддееее	садтсттаад	<u></u> အနှင်ဌနငေဌင္ဌ	сдясдггдгя	ттсссадтся	сатддатдтт
079T	стаясдетад	даадддсдаа	tteeacagee	стдасасаса	сасассстаа	дддаегггс
09ST	rggggagcer	τεστασστασ	сттдсятяс	gagatgcatg	стдастаатт	сясстддттд
00ST	ддясттгсся	ရိရိရအရင်ငော်ရရ	շբզշշեցշեց	ттовтаст	gatgeatget	дастааттда
0₽₽1	тастдагс	მმმმсმმმ96	ддсддядддя	адасааазға	дсддядггяд	მამშაგანეფ
08ET	ငေရာအရေအရာရရ	ತರ್ದಿತ್ ರದರ್ಧ	ааааттадте	атаатаааа	caacctctac	ရႊရရင်ရင်ငင
1350	сгсядяддся	ссгддаагад	сстеяетает	ааааадсст	сгяддеегее	срававадс
0921	сдддядсггг	соторевовт	азаатдуата	атсадатссд	асасдъдсъд	сталтдтся
1200	атдоодатда	ссдататаст	стасастасд	ссттдтсдта	тадттестса	ggccatggtt
01740	тдағсаястт	263990280 26309090	ggtgagcacc	cdrcdcdcdc	geteeggega	даастедаес
080T	ggtcggtcca	аасссдадсс	дрессададад	ссросасдаа	дсдяядрсдр	дяссясяссд
0201	carcarcca	аасадддса	сдсдсрдурд	адресрадяе	ggcaccatct	aafaffafco
096	сссяддссяд	сдсясссяся	άροσθασοα	сдгясядсгс	<u> </u> αεςεεςεαα	сясдяссрсс
006	адттедтдаа	дедрессадая	ငေဒရငငေရေဒအရ	cggtcatggc	тсдеедатет	ccscdgctgc
048	actecegeee	ငရငၶရရရငရ	aaccaaaafcaa	cdcødffdcc	асдаадтдса	creereddee
082	gtcagtcctg	сдғядсясдғ	атсдааатст	ငေဒိရငေဒိရိင္ရရဲဒီန	рсатадаадд	дсссяясстт
720	сдаттссдаа	гсссддаааа	იიომიიმმიმ	ддаддагсаг	receededer	садсатдада
099	сдаадаастс	rraaaaraaa	аатааасаад	сагаадстдс	ттдтаяссат	аттдосттат
009	ттдтдагдсг	ттевдаваат	ааатдстта	дсядґдааа	саастадаат	ддясяяясся
075	гдагдадггг	таадатасат	стадасатда	сороддеес	ясрередедр	geagtteeet
087	сгдягдссгд	тесдееече	дястдадсст	ссядтеттес	<u></u> အငေဌနနေျော်ဌင္	саасадатаа
420	сяссдясяяя	გმამამაწ	дгесгясгея	сддсддяггг	аатесдетес	асаасусса
390	ссдердос	secereedaa	ccfdcccdcc	բձձշձձձշձբ	гддсядтта	дееедаесс
300	стесбегга	rcaggatggc	вдассярссд	ваасусаааа	дадстедгад	гадссаддаа
240	ငရငရင္နနင္နင္ငရင	дсааттаата	гдядсдсяяс	နေရငရရရငအရ	ငငငရဲဒင္ရရရဲဒ	cdacaggttt
08T	მიჟმიემიჟ	аттсаттаат	acarraaca	cteteccede	ငရငဒဒဒငငရင	дедееевата
οζτ	аадсудаада	ರ್ದಿದಿ ಇದಿ ಇದಿ ದ	ငေရင်ရအရှင်ငေရ	ငေရႊငငေရအရငရ	ငရငဒရငငရဒ	rscgerege
09	အဌင်ရအျင်င်ရအ	вседеерра	таяссдтатт	аттетдтдаа	статесесетд	erreerded
					ENCE: 40	<400> SEQUI

pənuțquos-

I6

02 8'811't31 B2

78 LEP'IL8'8 SO

†6

£6

pənurquop-

<212> TYPE: DNA <SJT> FENGLH: 02 <5710> REÕ ID NO 20 9930 αβασετετας ταθοσετετα στοασατατε стедтеждуу ууусудадает суссадеала суссадеале усудетст тасудтеет 3900 στατοτται αστοστστος σστττοσοσα σοτοτοσαστι σασοστοσαι ττιτστσαισ 3840 адгаадоддо адддгоддаа саддадод сасдадддад стгосадддд дааасдоогд 3180 асадодгдад статдадааа додосасдог госодааддд адаааддодд асаддгагос 3120 адададереса расчезовае соядоррадая дедаяеся расчеседаяе раядяряеср 3660 ссгезосодо геодаессая дасоатадег ассодатаад додоадоде содоаседаас 3600 тасатасото дототдата состдттасо адтддотдот досадтддод атаадтодтд 3240 tactgttott otagtgtage ogtagttagg ceaceactte aagaaetotg tageaeogee 3480 ссаядадста ссадастет стеседадде адебдеетс адеададеде адабасада 3450 сугаатстус тустусала салалалос ассустасся усуучуть устусосуда 3360 стуадодсоя дасосодгад аладатсала аддаготост гулдагоост стетесбоо 3300 годасддаяс дасасячаст сыгдассала агсосттаас дгалдггасд сдгсога 3540 readerere raareagaar regeraareg gregeade regeagada readeread 3780 создание оделета агострана далавато одогоди и состати 3750 דכדדקככת כדתדקקתתני קככלכקקלקת קדנדכלככל לכתנהכתקת תתפקקכוננ 3060 3000 ададаватся асадатедся тедатогод асдадеодда агодоадасо дагасоадда 0462 oreacedgar reagregred crearegred recreater garaacera reregaega 2880 суядодгаят дустдусту ггдаясаядт стдуааядая агдсагааса гстсуссагт 2820 сседессяд дедечесяе динелия сддегеддее дисловадед исседиеди дедееддеед систедеят седеедея седеесее алондаго деделеед 0912 адгаттадая даятагоогд аттоаддая ааагагддгг дагдоогдад садгдгоог 2700 содгастост датдатдоат дутастояс састдодата садоатьсса 0492 קארטטנכאלא כלאאמניטט לאמטאני נארטכלכלל ככטאככאלכא אטכאלוואל 089Z тосседая тедетседа алеатодсал адугадодет десальдату телелдатда 2520 адогододый амбародос амбоядого дасамборай одогодоа дааадоосода 09₽2 дававсуссу адуссусат саватсосая сасудатуст дагігатату удгагааагу 2400

<220> FEATURE: <213> ORGANISM: Artificial <212> TYPE: DNA <JUS AL STO> SEO ID NO ET

<code control con

<223> OTHER INFORMATION: BoxC/D Bcl-xL Top strand

эвеее

כמככקכדבק במכמקלבקל קמתלקלקככ כקמתקקקכק בקתבכתובכת כבתככבקדבכ

S 9

09

<400> REONENCE: 20

<213> ORGANISM: Artificial

<220> FEATURE:

<400> REQUENCE: 51

∩2 8'811'431 BC

S6

pənuțquos-

086T	сатсаттса	сдяяядддсд	rgaatgtgcc	даасаддгад	асассустт	адгдагадад
026T	дттасстита	адасттатаа	ссадтдатад	дааатссста	ссатааасдт	гдддааатса
098T	статдтдтс	ггдсягдгсд	датстаатат	сссссрадая	дгяссдддсс	астддатссд
008T	вотреоттее	гаааддаасс	аадсаддст	евевовт <u>р</u> тт	аатдееаает	детететат
0740	дағдадсаат	дсаасааатс	ссгдггсдгг	сгдагадгда	ьвттттетта	ааатаатдат
089T	crcdddcccc	садтсттаад	<u></u> အနှင်ဌနငေဌင္ဌင	сдасдттдта	Ботреосотт	сатддагдтг
0797	сгаасдогад	ರಿತತರಿರಿರಿಂರಿತತ	ccacagee	сгдасасаса	сясассстаа	дддаеггс
09ST	гддддздссг	rterdeerde	сттдсятас	дадатдсатд	стдастаатт	сяссгддггд
00ST	ддясттеса	പ്പട്ടുക്കുന്നും	craccracra	ттовтасьт	датдсатдст	дастааттда
0 7 4 4 0	гатддттдст	പ്പുട്ടുക്കുന്നും	ддсддядггя	адасааазға	дсддядггяд	дсддяясгдд
08ET	сддядаагдд	адссатдддд	азаяттадтс	всевствеств	cddccrcrdc	døddcddccc
1350	сгсядяддся	разавруст	согояогао	ааааадсст	сгяддссгсс	срававдс
0921	сдддядсрр	гасаадетес	аааатдаата	атсадатссд	асасдѣдсѣд	Ботртавтт
0021	атдеедатда	ссдататаст	стасастасд	ссредесара	гадтестса	მმავალმმლ
07140	тддгаястт	ရရာအငရိုင်နင	გეხვაცია	ငရင္ငရင္ရရင္ရရင	geteeggega	၁၁ဧ၉၁၃၁၉၉
080T	ddfcddfccg	ခရင္ေငရဲခရင္	arcccaaasa	ссресяедая	gegaggeege	ရိုဒငေခၚေဒၚေ
0201	carcarcca	васадддсса	ငေရငရင္ရရေအနာရ	ддресрддяс	ддаясаягаг	aararrarcc
096	ငငငေးရရငငေးရ	ငရင္ခင္ခင္ရင္ရ	arccødacca	ငရင်နငန္တငင္	gaccactcgg	င္အင္ရေအငင္ရင္ရင
006	адттедтдда	дсдросоддя	୧୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦୦	ငရိရင္ေၾငရရင	гсдссдягсг	ငေးငရဲရင်ငံရင
048	actecegece	ടർടേർർർടർട	მმაამმელიმ	ငရငေဗရင္နရင္ရင	всдаадтдса	creereddee
082	дгсядгссгд	сдгядсясдг	атсдааатст	ငေရင်ငေရင်ငရင်န	ссятадаада	дсссяясстт
027	сдаттссдаа	гсссддяяяя	ငေទဒငငေဒဒငေဒ	ддяддягсяг	receededer	ငေရငခင်ရခရခ
099	сдаадаастс	rraaaaraaa	аатааасаад	сатадотдо	ттдтаяссят	аттдорта
009	ттдтдагдаг	тттдгдааат	ааатдстта	дсяд£дяяяя	саастадаат	ggacaaacca
075	тдатдадтт	таадатасат	стадасатда	саяттедеее	ясрередедр	geagtteeet
08₽	сгдягдссгд	тесдетета	дясгдядссг	ссядтеттес	аасдаааддс	саасадатаа
450	сяссдясяяя	გეფეფელე	дгесгясгся	сддсддяггг	аатссдстсс	асаасдееса
360	ccdffdcffc	ясссресддд	ccfdcccdcc	բձձcձձձձգ	гддсядсся	дееедяедсс
300	стестдетта	ссяддягддс	аддссярссд	ваасусаааа	дадстедгад	гядссяддая
240	ငရငရင္နနင္နင္ရေင	дсааттаата	гдадсдсаас	везбадаева	сссдясгддя	сдясяддрр
08T	дсядс£ддся	аттсаттаат	მამგემმანმ	ctctccccdc	сдсяяяссдс	дедееевата
120	вадсддаада	მჺმჾმჺმჾმმ	сядсдядгся	ငရိဗငငရဲဗရိငရိ	сдсядссдяя	гяссдереде
09	адъдадсъда	яссдессссса	таассдтатт	аттстдтдда	статосостд	offfoofgog
					ENCE: 52	<400> SEQUE
	scl-xL	I-JUM (\)X08	а-дияда-от .	тн ятизд : W	: аяц з пиғояматтс	<pre><220> FEAT(<223> OTHEF</pre>
				icial	AND : AVD : Artifi	<pre><213> TYPE: <212> ORGAI</pre>
					TH: 3929 TD NO 52	<pre><sit> PENG: <sio> REÕ 1</sio></sit></pre>
						~
92	c	-	~ ~ ~		c	aaaqc
09	отарторыто	дгсясаттся	geeetttegg	даатдатсас	аасаддтадт	рэээрстер

כפככקכבבק שמכמקקבמב קששבקלכככ קששמקקקכקב כשבכשבבכשכ בשככבקבבכש 60

<400> REQUENCE: 53

<SID> SEQ ID NO 53
<SID> SEQ ID NO 53
<SID> CTHER INFORMATION: BOXC/D mut Bcl-xL Top strand
<SID> CARANISM: Artificial
<SID> CARANISM: Artificial
<SID> CARANISM: Artificial
<SID> CARANISM: Artificial
</SUD>

3929				тсасатдтт	ageetttege	geetttget
3900	асддеесед	caacetete	ရငနေရငနေနငရ	эвевевердъ	ရရင်ရရေးရင်	fcgtcagggg
3840	сетдедатдс	адедредарг	стстдясттд	ағседесяс	<u> </u>	сасстетата
3780	ааасдеетдд	ffccsddddd	ခင္မရွင္စရွင္စရင္က	ခြင်္ဂခရာရှင်ရင	дддгсддяяс	дгээдсддсэ
3720	ငေရရှင်နင်ငေရှ	ရအအရေဒရေဒရအ	ငငငရဲဒဒရရရဲ	ငရငဒေဒငရင္နင္	равадааад	ငေရင်ရင်ရအရင
3990	дадатасста	асассдааст	ငရအင္စရအင္စင	ငေနရငင်ငံရရအရ	ဝင္ရင္ရင္ရင္ရင္လင္ရင္လင္ရင္လင္ရင္လင္ရင္က	ааааагсаг
3600	ရိဒိရိဒင္ရရဲအခုင္ရရဲ	ငရငေဗရငရရင္	ငငရရနင္နနရရရ	асдатадтта	гддастсаад	сггяссдддг
3240	таадтедтдт	ငေತರ್ದಧಿರದಿತ	<u> </u> β <u></u> <u></u> β β <u></u> β β β β β β β β β β β β β	воовттртоо	стегдегааг	асатасстсд
3480	адсассдсст	адаастстдт	сассасттса	дгядггаддс	садедеасс	астдттсттс
3420	дағассааат	ရင္ရေဒရင္ရင္လင္ရ	воттовртов	ьтераздуга	саастетт	саададстас
3360	ттгдооддаг	շՅՅբՅՅբբբՅ	ငငရင္နနင္နင္နင္မေရ	8338888666	усттусаяас	дгаатстдст
3300	rrrcrdcdc	дадатеетт	ддатеттет	ввертерьве	всессдтада	гдадсдтсад
3240	дгедггесяс	сдадттасдс	роветторот	ввверрертв	дедеяядере	င်ခုင်ရွှ်ရှိခုင်ရှ
08TE	тасдстдаст	ეგივმაციან	тергаясаст	ддтааттдд	аатсадаатт	дядееееее
3120	датдстсдат	адтесате	аатаааттдс	ссседагаед	дғаттдағаа	сааааататд
3060	асддеттт	састасадаа	tttetetett	ငငင္ငငရဲရင္ရရဲအရဲ	сасддаастд	сттдесятес
3000	атассаддат	рорадассд	сдадссддаа	гдатдтгдда	таддтед	ввээвверее
0460	стераедад	атазссттат	стерезерт	тсатддтдат	сядтедтеяс	тсассддатт
2880	сттессетт	тусатаааст	с99ааадааа	сдаасаадтс	<u> α</u> ςτααςςτας	дадсдтаатд
2820	стераераес	атдсдадтда	<u> </u>	завтавртав	cgcaatcacg	сгедегеядд
5760	cgtatttcgt	асадсдатсд	тдтостта	тдетедеаас	аттедаттес	caccaaffac
2700	адъдъъссъд	နင်ရင်ရင်ငံရရင	аататтдтта	стсадд г даа	аататсстда	дғастадаад
0492	адсаттесад	၁၉၉၉၉၉၉၉၁၁	астдсдатсс	устастсасс	атдатдсатд	сдғастсстд
5280	усаттттатс	сдассатсаа	атдеетете	дасддааттт	тааастддст	атддтсадас
5520	гасадатдад	ссаатдатдт	адғядсағға	асатддсааа	тдетестдаа	ရငရငငေအရအရင္
2460	даадсссдат	αςτταταταα	асаатстатс	атсаддъдсд	атдтеддаса	дстсдсдата
2400	дғағаағдд	астататав	атдаатдстд	аааттссаас	ддссдсдяғғ	дааасдёсда
2340	гаттсаасдд	статдадсса	асааддддб	ааасадтаат	стдеттасат	атаааастдт
2280	атсатдааса	аааатататс	дсясяядаға	атдтасатт	аааатстстд	ςοσθεθεσες
2220	<u> α</u> ςασεεεεαα	стдтттсстд	атддтсатад	дгсдгяггас	сстатадтда	дстдататсс
0912	ттдосятося	ааатсаттат	адтсаааата	ддесясеясс	дсяасдааса	тсаятттдтт
0012	дсяттдстта	статадааа	ааадттддса	стестедеяс	tagacccagc	ссястадттс
0402	тесетеддат	дстстссята	ссрродая	тдтедадетт	азадсттт	стасстдттс

pənurquop-

• ·

079T	стаасдетад	даадддсдаа	ссевсядсс	стдасасаса	сясассстаа	ададясрерс
09ST	гддддядссг	τεστασσεασ	сттдсятас	дадатдсатд	стдастаатт	сясседдеед
00ST	ддясттсся	ရရအရေင႕ရရ	craccracra	ттдеятяетт	датдсатдст	дастааттда
0 7 4 4 0	гатддтгдст	მმმმამმმ	ддсддядддя	дддсдддугд	дсддядггад	дсддээсгдд
08ET	сддадаагдд	вдссягдддд	ааааттадтс	атаатаааа	caaccfcfac	døddcddccr
0787	сгсядяддся	ретьердаатад	ссгеястает	ааааадсст	сгяддеегее	срававадс
09ZT	сдддядсрр	ротовевовт	аааатддага	атсадатесд	ясясдъдсъд	Ботратеват
0021	атдосдатда	ссдататаст	ртастастата	ссредесара	гадттоста	ддссягддгг
07140	тдағсаастт	ддяясддсяс	ddfdadcacc	ດລີຼເດລີດລີດ	dereeddeda	дяястедаес
080T	адгаддгаая	ээбебэээее	дгасаддаяд	ссресяедяя	dcdsadtcgt	გავავავე
οτοτ	carcarcca	васадддсса	сдсдсгдягд	адгосгадяс	ggcaccatct	адгаггагсс
096	сссяддссяд	сдсясссяся	дресяддеед	сдгясядсгс	дяссястедд	сясдясстсс
006	адттедтдая	дсдрессадая	റേറ്ററോറ്റി	cddfcsfddc	годосдягог	ссясддсгдс
048	actecegece	ദേദേർർർദേഴ	ддссддддссд	cdcødffdcc	асдаадтдса	creereddee
084	<u> α</u> τς α α τς ς τ α	cgtagcacgt	атсдааатст	ငရိရိငရိရိင္ရရိရိဖ	ссатадаадд	дсссяясстт
027	сдаттссдаа	гсссддяяяя	ငေအရငငေရရငရ	ддаддатсат	teceededet	cagcatgaga
099	сдаадаастс	rraaaaraaa	аатааасаад	сетадогдо	терсавстртт	аттдеттгат
009	ттдтдагдсг	тттдгдааат	ааатдетта	дсядұдааа	саастадаат	9398689999
075	тдатдадттт	таадатасат	стадасатда	саястсдесе	actetegegt	geagtteect
08₽	էբցաէցշշեց	בבפקבבבשב	дястдадсст	ссядтеттес	<u></u> အငေဌနနေျ	саасадатаа
420	сяссдясяяя	გმფმფმიმբ	дгесгясгея	сддсддяггг	аятссдстсс	асаасуттса
360	ccdffgcffc	accctccggg	ccfgcccgcc	բՅՅԵՅՅՅԵՅբ	гддсядсса	gtttgatgcc
300	сттстдсття	ссяддагддс	аддссярссд	ааасдсаааа	дадстедгад	гадссаддаа
240	ငရငရင္နနင္နင္ငရင	дсааттаата	сдадсдсаас	везбббзбее	сссдясгддя	cgacaggttt
08T	ရငနင္ခင္ရင္ခင္လင္ဆင္လ	аттаттат	მამგგემაამ	ctctccccdc	ငရငနေနငင္ရေင	втьвооорор
120	вавсудавда	ရင်ရအရင်ရအရရ	садсдадтса	ငေရႊငေရအရငရ	ငရငၶရငငရအ	гяссдегеде
09	адъдадсъда	яссдесрра	таассдтатт	астесдедда	статесестд	сгесседаа
					INGE: 22	400> SEÕNE
 <210> SEQ ID NO 55 <211> LENGTH: 3926 <212> CRGANISM: Artificial <213> ORGANISM: Artificial <223> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: PENTR/H1/TO-aARNA-Bc1-xL 						
₽9						aagc
09	тасстдттса т	усасаттовор	αςςςτττςαgg	даатдатдас	аасаддтадт	аааадстттд
					MCE: 24	<400> SEÕNE
	pı	астан мотлоб	nıt Bcl-xL F	icial (Visial)	D NO 54 H: 64 DNA ISM: Artifi ISM: Artifi IRE: S INFORMATIC	 <223 > 01HEH <223 > 05GAN <213 > 05GAN <212 > 17PE: <211 > LENGT <210 > 320

aagc

pənuțquos-

66

₽9

- courțuneq

3840 αττελιαστό αταταθάτι τοσοσφορία τσαστισασό ατοσφείτει αταφέσετος адсудсядуд соддаасада ададсасас аддудадстес садудудааа суссбудеас 3180 condaderar dadagadee caederrees daadddadaa addeddaead drareeddra 3120 детесутдея саездоссад струдадода асуастаса содаастдад атасстасад 3660 эссдддсгдд эсгсээдэсд эгэдггэссд дэгээддсдс эдсддагсддд сгдээсдддд 3600 raceregere recraated gergereded gergees gregeraa gregeder 3240 3480 дегессяя сдеядеедся дегяддеече смегесяядя жегегдеяде жесдеегаем даястала стотото уладитало удостоляся дадододан ассалатаст 3450 ассдогдог гдоаласала алассого огасоядодо гдоггдогс досоддагола 3360 3300 дедесядяее седеяваяя дясезаяддя сересрдая асесрерс реродеда 3540 сдддасддсд саадстеатд ассалатесе стгалодгда дтгасдсде дтгосастда стетелат садаатедут таатедуте таасастус адаусаттас устуастеда 08TE авататудта ттуататос туататуаат азаттусадт ттоаттуат устоуатуау 3750 веоттато доявесное содерадете сесестеят сасадавасо дететела 3060 азаятьая уттутельно соводалов врокодаль соводать соводансть 3000 σοддатьсад тодеолее тодебатьсе теаетбата асетельть тодедодод 0462 сугалтууст уустутия асадугстуу аладалатус агаласттт уссатстса 088Z αστοαθασας αατοασαατ σααταασαστ ττσσττσατα σσαστσττ τσατσασασ 0282 оддеедачее сдаетсоеде седеластде состелася додаесдоде астосдеосо 09/.7 стадаладаль асостдатьс аддедалаль астдетдагд сдотддоадь дебостдодо 00/JZ астостдату атдоатдуга астологает усульсосод даалалада аттоодуба 0492 дсоядастая астодостуа удааттато сотосода ссатоадоа теталосут 0897 ccagagerge recedance eggcanager agogregoca argargerac agargagerg 5250 cocorrecto reconcerete addreades aretaredet totarogoas geocoarded 0972 acgregagge egegateaaa tteeaacatg gatgetgatt tatatgggta taaatggget 2400 азастусте стасатала саугаледся дуууста гулуссатат ссалсуудал 2340 2280 дедессаяя асседает стасатедся саядагаяза агагасаго агдаасаага 5550 gararcocor aragrégere grarracare groaragore recordgoa gororggood 5760 астергося асудастур састалсяде садалада годелего содессадсе 5700 стадитера асседеть стиделезая дисудения надаладся изочные сосдетсалая доететете одядотесот годддалдот отоследетет тетддагоса 0402 адедагадад асасодогее даасаддеад гдаагдааст адоагададе гоагсоаста 086T судуалатся ссаталасут улальсоста гозутдатау адастатал утсостато 1920 астдуатсод угасоддусе сесестодая датетатт теусатугоу статугусте 0981 устетета затуссвает теутасявая авусадует таваууалос алтесаутсу 008T авачаять тттатттуя стуатадтуя сотуттодтт усаясавать дагуадсаат 0740 כאנקטאנקננ ננככמקנכת כקתכקנקנת אאתכקמכ כאקנכננשמק כנכקקקקכככ 0891

создададас даядостата далаласос адсалодод соттетелод детостдаос

ברברקפרקקפ פברבדקפרפת פתנקבר

3926

US 8,871,437 B2

103

-continued

<pre><210> SEQ ID NO 56 <211> LENGTH: 61 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificia <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: <400> SEQUENCE: 56 caccgctttg aacaggtagt gaa c <210> SEQ ID NO 57 <211> LENGTH: 61</pre>	al Bcl-xL Top strand atgaacta gcatagagtt	cattcactac	ctgttcaaag	60 61	
<pre><212> ORGANISM: Artificia <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION:</pre>	al Bcl-xL Bottom stra:	nd			
<400> SEOUENCE: 57					
aaaaqctttg aacaggtagt gaa	atgaacto tatoctaott	cattcactac	ctqttcaaaq	60	
c			J	61	
<210> SEQ ID NO 58 <211> LENGTH: 6173 <212> TYPE: DNA <213> ORGANISM: Artificial <220> FEATURE: <223> OTHER INFORMATION: pcDNA-AmCyan-myc-His6					
<400> SEQUENCE: 58					
gacggatcgg gagatctccc gat	cccctat ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	60	
ccgcatagtt aagccagtat ctg	jeteeetg ettgtgtgtt	ggaggtcgct	gagtagtgcg	120	
cgagcaaaat ttaagctaca aca	aggcaag gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	180	
ttagggttag gcgttttgcg ctg	jcttcgcg atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	240	
gattattgac tagttattaa tag	jtaatcaa ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	300	
tggagttccg cgttacataa ctt	acggtaa atggcccgcc	tggctgaccg	cccaacgacc	360	
cccgcccatt gacgtcaata atg	jacgtatg ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	420	
attgacgtca atgggtggag tat	ttacggt aaactgccca:	cttggcagta	catcaagtgt	480	
atcatatgcc aagtacgccc cct	attgacg tcaatgacgg:	taaatggccc	gcctggcatt	540	
atgeccagta catgacetta tgg	jgactttc ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	600	
tcgctattac catggtgatg cgg	jttttggc agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660	
actcacgggg atttccaagt ctc	cacccca ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720	
aaaatcaacg ggactttcca aaa	itgtcgta acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	780	
gtaggcgtgt acggtgggag gto	tatataa gcagagctct:	ctggctaact	agagaaccca	840	
ctgcttactg gcttatcgaa att	aatacga ctcactatag:	ggagacccaa	gctggctagt	900	
taagettggt accgageteg gat	ccactag tccagtgtgg:	tggaattccc	accatggctc	960	
tttcaaacaa gtttatcgga gat	:gacatga aaatgaccta	ccatatggat	ggctgtgtca	1020	
atgggcatta ctttaccgtc aaa	iggtgaag gcagcgggaa	gccatacgaa	gggacgcaga	1080	
cctcgacttt taaagtcacc atg	Jgccaacg gtgggcccct	tgcattctcc	tttgacatac	1140	
tatctacagt gttcatgtat gga	aatcgat gctttactgc	gtatcctacc	agtatgcccg	1200	
actatttcaa acaagcattt cct	:gacggaa tgtcatatga	aaggactttt	acctatgaag	1260	

pənuțquos-

0098	ασττοστοδτ	гдддсгдясс	гддсддсдяя	стдаададст	сдғдяғяғғд	дттддстясс
0758	аддасатадс	дяссдсгягс	მმმჺმჺმმcმ	<u> </u> β <u></u> <u></u> ββββββββββββββββββββββββββββββ	тсатсдаст	стттстадая
0848	аааатддссд	атсатддтдд	сттдосдаат	gcgatgcctg	βτθαςςςατg	<u> </u>
0248	ငငေရဲဗငေရဲရငရဲဗ	ელეველიცი	сяддсссяяд	адстдтсдс	მამაავებამ	ссяддддсгс
0988	ತಂರತತರತರಿಂತ	датдатстдд	гдгсдягсяд	вадосддгог	астсддатдд	ရငရဲအရင်အင်ရင်
0058	атедеатеда	свадсдавас	аттедаесае	ctacctgccc	сггдягоодд	дстдсатасд
0428	csatgeggeg	атддстдатд	адтатссатс	стдссдадаа	caccttgctc	ссғдғсяғсғ
08T8	ддсяддярср	двадедседд	getattggge	გმმაღემვე	даадсдддаа	сдеедесясе
0218	стдгдсгсдя	ငင္နင္ရင္ရင္ရင္ရင္ရ	ရႊငေရရရငရင္င	ддагддаава	ငရရင်နင်ငရင်	දේෂයිරියෙහිදය
0908	застдсадда	дсссрдяярд	ccrdrccddr	гсяадассда	θττσττττα	8888666666
0008	с садодоа	<u> </u>	гдягдссдсс	ταδαεεδεεε	свасадасаа	гдясгдддся
0462	с аттодоста	მჺმმෳმෳმმი	<u> </u>	сяддррссс	ддяггдсясд	тдаасаадат
0887	стедеатдат	тдадатсдт	ададасадда	датстдатса	teestttteg	адсттдтата
0282	sgeteeeggg	стерсавая	аддеерадде	865555556	гадтдаддад	аттессадаад
0923	ссрераздер	accacc¢c¢	<u>နဗဒဒဒဒဒေနခ</u>	сеттета	стаатттт	ссятддстда
0072	atteteegee :	agtteegeee	алстосдоос	tecegeceet	ясреедееея	сссдссссся
0797	саассатадт	ааттадтсад	сатдсатстс	дгатдсааад	പടക്കാറ്റാറ്റ	аддетессея
0852	дваядтесес	နငင္ေအရွင္ရင္ရင္ရ	ғтадтсадса	гдсатстсаа	ворьвворть	аддсадаадt
0250	дерессеяде	аадтесееад	аддугдгддаа	tgtgtcagtt	сғдғддяяғд	сдааттаатт
0940	ааатттаасд	датттасаа	аааатдадст	гастдустаа	αθέττταθααα	ggattttgcc
0042	датттатад	статтетте	стятстоддт	роввотовов	ваеседдавев	гостдетося
0462	затадтдас	сясдеесее	ငရင္နင္ရရဲအရင္	сдесеррра	дясддееее	сдеестдата
0822	agtggggcat	tggttcacgt	астадддгда	аааааасттд	ငငင္ငင္ပေဒၚငင္ရင	сттасддся
0222	сдатттадтд	сттадддттс	aaaaacccc	устстаяатс	гесседгеяя	tegeeggett
0917	crcdccscdr	ccettcette	tegetttett	сседересср	ငရငငင္ရေ အရငရ	сясттдссад
0012	дгдяссдсгя	racgegeage	<u> </u>	ഴർദർദർർദർ	сддсдсяггя	сдесердруд
0402	рагоссасд	ссссяддддд	ငေႊရင္ရေရရရ	дсддяяядяя	дастсстдад	тдадстстат
0861	მმმმ წემმ შე	сяддсяғдсғ	аадасаатад	მფმმფჺჺმმმ	ငေအရငအအရရရရ	гддддсяддя
0261	33333£3333	стотать	дгяддгдгся	саттутства	ааттдсатсд	аааатдадда
0981	сттесталт	teceaetgte	ааддёдссас	стдассст <u>д</u> д	cdfdccffcc	δεεεετεεεε
0081	ταταττάττε :	стдесадеса	гдеерреяд	βοστοβαστα	ссдсрдярся	дадстааас
0740	сатсаесатт	сатсатсас	tgcataccgg	датстдаата	сссядаадад	ааааастсат
0891	сесттедаяс	дссгядяддд	сдсаастсда	მფამმმამმა	tgtccctttc	таясстстдт
0291	дттдсасата	ეეგავიფიე	стездераст	მმсяясяд£д	тдасаааддт	ддяссдясср
0951	сдсяггдсдя	ддгддаасаг	сааассатдс	асдађдссас	аааассддъд	асаадасааа
0051	сасастстст	эттверортв	дсааттасад	ငေနရွင်ရွှင်ငံ	сстсятдстд	tcsccgcgtt
0₽₽1	аадддтдатд	тдаататтд	сғдғсғдсдя	дадаааасда	cccatcttt	сгддггдддя
0861	аадатдасаа	էցէցձէցցշց	ctgatggacc	аястттсстд	сагддадгд	аатесаедтт
0261	с страдсяся	аддсяястдс	гаадссттаа	адстдддааа	состасадос	асдаадаад

90I

		1060	~ ~
-7 H /	571	188	SIL

L01

τασοστατέ βαθατοσαστ τοθατθέαας σοαστοστός ασοσααστόα τοττοασσα 0765 азастетала дусустолее астудалале устетеруу усулаласте солаудатет 0885 сосододяес дядредстор рассодосод свярясдодя ракрасодод соясярядся 2830 содгаздату стетесусу астудтуац астоласова усолегота улагаусы 09/.9 ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttetettaet gteatggcaat 0045 сдеедевая аваадоддее адоессетод десстоодае одееда адеаадеедд 0799 стаделеда стелетелда сосдетсого аледателад дедадетаса сдагососол 0855 reareduct gegeaaegut gutgeeattg etaeaggeat eguggtea egetegtegt 2220 сассососсь сабсоздьст астальбыт досододалдо тададсалд адтьсоосалд 0975 атретсядся чабалассад ссадосоддая додосодадос садалародо собосалост 0075 детелелье тудеессадт детдельтая таседедада сеследетел седдетелад 0769 татттодть атосатадть достдаетое седтедта дагаастаед атаеддадд 2280 0225 адетсудье судеядетые садестая седерадде деселесед дедатерие теасстадат сеттталат салалатов верлалата талаганда агагагдад 0915 0075 стездеддая судаластся сусталудуя стетудется аладуатет стасусусая алаланууа тоголадану атосттуят оттеготасу ууустуасу 0405 стедатосуд саласаласо ассустудта усудете стетутерс алусадал 086₽ садеяетсяя сыссусовое стораядо садетасове содалалая дебовадсе 4650 атдтаддодд тдотасадад ттоттдаадт ддтддоогаа стасддогас астадаадаа 0987 таядасасуа сттатсусса студсадсад ссастудтаа саууаттаус ауаусуауут 008₽ соссодерся досодяесде расбасерие соддринати родерсава росина 01/10 остолья сстоядется дедеводется стоястсева догодостой дедевоевае 0891 רבאככטטאבא ככבטרככיני בדביניכיני כטטטאאטיטיע טטכטיניני באראטכינאי 0797 αθεφεςφάδε αρεροσοσε άδαφαρεσος ροδράσδες ροσράρεσα φοοσράσοδο 0997 авальтору коляротолька сускатор воздерение колести 009₽ аддосаддая содеязаяд доододеедо еддодееее соягаддого одоососод 0 # # # 08£₽ адгелесаяс адалесадод дагасосад даладалсяг дгдадсалая ддосадолая 4350 сдердедере ддредресда срасдаедая садрягсяда резореяяна деддряярас aseggegggg gagaggeggt regegrated ggegetee egeteereg eteaetgaet 4560 астелетдее сустетееля гедудлялее тутедеел устусля балабедее 4500 дсягааядтд гааадостдд ддтдостаат дадгдадста астолотта аттдодтьдо 07140 080₽ адстдттесе тдтдталат тдттатесод теасаатесе асасаата сдадседдаа татеттатеа тутетата седтедаест стадетада сттудедтаа театудтеат 4050 τοαραακταα αφοαττιττ τοαστφοατι σταφτόφη τιτφτορααα στοαισατφ 0968 алевезезте уртантар улавно уравната алусальнуе атологов 3 3 0 0 3840 reedddaede edderddard areefeeade gegddgaret eargerddag rferfegeee сатсасдада стесодаетсе ассуссуст сстагдалад устудусте удальсутс 3180 аргосрая доддаяслор даддреодод яяярдясодя сояядодяод сосяясордо 3150 αστιτασασι ατοασοτο οσααττοσοα σοσοατοσος τιστατοσος ττοτισασα 3660 pənurquop-

стегезсте сассадсяет гогодорада салаласяда ладосальна досусальна

0009
US 8,871,437 B2

-	_	^
		u
	v	7
		-

				0011011	noon	
agggaataag	ggcgacacgg	aaatgttgaa	tactcatact	cttccttttt	caatattatt	6060
gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	gcggatacat	atttgaatgt	atttagaaaa	6120
ataaacaaat	aggggttccg	cgcacatttc	cccgaaaagt	gccacctgac	gtc	6173

The invention claimed is:

1. An RNAi control system responsive to a protein expressed in a cell, the system comprising:

- a vector for expression of an shRNA comprising: a guide strand having a sequence complementary to an mRNA of a target sequence; a passenger strand which forms a ¹⁵ duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, the linker strand comprising a Box CD sequence,
- wherein the binding of an L7Ae protein or L7Ae proteincontaining fusion protein expressed in the cell to the ²⁰ shRNA inhibits the cleavage of the shRNA by Dicer.

2. An RNAi control method responsive to a protein expressed in a cell, the method comprising the step of:

- introducing into the cell a vector for expression of an shRNA comprising a guide strand having a sequence ²⁵ complementary to an mRNA of a target sequence; a passenger strand which forms a duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, the linker strand comprising a Box CD sequence, ³⁰
- wherein the binding of an L7Ae protein or L7Ae proteincontaining fusion protein expressed in the cell to the shRNA inhibits the cleavage of the shRNA by Dicer.

3. The RNAi control system according to claim **1**, wherein the target sequence of the shRNA is Bc1-xL mRNA, and the ³⁵ RNAi control system controls the expression of an apoptosis regulatory protein.

4. An shRNA comprising: a guide strand having a sequence complementary to an mRNA of a target sequence; a passen-

¹⁰ ger strand which forms a duplex with the guide strand; and a linker strand which links the guide strand and the passenger strand, the linker strand comprising a Box CD sequence,

110

wherein in response to an L7Ae protein or L7Ae proteincontaining fusion protein expressed in the cell, the cleavage of the shRNA by Dicer is inhibited to control the expression of a protein encoded by the mRNA of the target sequence.

5. The RNAi control system according to claim **1**, further comprising a vector for intracellular expression of the L7Ae protein or L7Ae protein-containing fusion protein.

6. The RNAi control system according to claim **1**, wherein the target sequence of the shRNA is GFP mRNA.

7. The RNAi control method according to claim 2, wherein the target sequence of the shRNA is Bc1-xL mRNA, and the RNAi control method controls the expression of an apoptosis regulatory protein.

8. The RNAi control method according to claim **2**, further comprising the step of introducing a vector for intracellular expression of the L7Ae protein or L7Ae protein-containing fusion protein into the cell.

9. A method for quantifying the expression of an intracellular marker protein without destroying a cell, comprising the steps of:

introducing to the cell the shRNA of claim 4 wherein the target sequence is a GFP mRNA; and

measuring the fluorescence intensity of the GFP.

* * * * *