



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101605899 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 31

(21) 申请号 200780038403. 3

C12N 15/79 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 10. 16

C12N 15/09 (2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2006-0100507 2006. 10. 16 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 04. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2007/005064 2007. 10. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02008/048037 EN 2008. 04. 24

(73) 专利权人 韩美科学株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 崔仁荣 金昌焕 李炫知 朴晟喜

权世昌 李宽淳

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006. 01)

(56) 对比文件

BLAKE M C ET AL. Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. 《MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY》. 1989, 第 9 卷 (第 11 期), 4994-5002.

MALIK N ET AL. Amplification and expression of heterologous oncostatin M in Chinese hamster ovary cells. 《DNA AND CELL BIOLOGY》. 1992, 第 11 卷 (第 6 期), 453-459, .

审查员 丁海

权利要求书1页 说明书10页

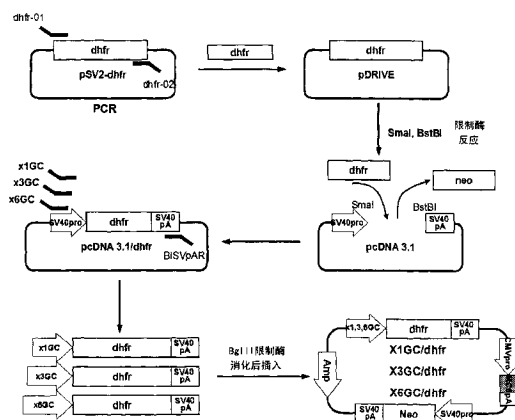
序列表28页 附图8页

(54) 发明名称

用于大量生产重组蛋白质的新载体和表达细胞系以及使用其生产重组蛋白质的方法

(57) 摘要

本发明揭示了包含二氢叶酸还原酶 (DHFR) 启动子的可诱导的高表达盒, 所述启动子中富含 GC 重复序列被部分或完全去除, 所述表达盒能够更有效地改善基因扩增系统。本发明还揭示了包含所述可诱导的表达盒和任选编码重组目的蛋白质的基因的表达式载体, 用所述表达式载体转化的动物细胞系和通过培养所述转化体大量生产和纯化重组蛋白质的方法。本发明能够缩短建立使用低浓度 DHFR 抑制剂以高水平生产重组目的蛋白质的细胞系所需的时间, 因此更高效地生产所述重组蛋白质。



1. 一种可诱导的高表达盒,其包含编码二氢叶酸还原酶的核苷酸序列和与所述核苷酸序列连接并编码三至六个 CCGCCC 重复序列被去除的二氢叶酸还原酶启动子的核苷酸序列。

2. 权利要求 1 的可诱导的高表达盒,其中所述二氢叶酸还原酶启动子含有一个或零个 CCGCCC 重复序列。

3. 权利要求 1 的可诱导的高表达盒,其具有 SEQ ID No. 7、8 或 9 的核苷酸序列。

4. 包含权利要求 1 到 3 任一项的可诱导的高表达盒的表达载体。

5. 权利要求 4 的表达载体,其还包括编码生理学活性多肽的基因。

6. 权利要求 5 的表达载体,其中所述生理学活性多肽是人促红细胞生成素。

7. 权利要求 6 的表达载体,其具有 SEQ ID No. 1、2 或 3 的核苷酸序列。

8. 权利要求 4 的表达载体,其具有 SEQ ID No. 5 或 6 的核苷酸序列。

9. 使用权利要求 8 的表达载体转化的细胞系。

10. 权利要求 9 的细胞系,其登记号为 KCTC10991BP 或 KCTC10992BP。

11. 使用权利要求 5 到 7 任一项的表达载体转化的细胞系。

12. 权利要求 11 的细胞系,其是 CHO 细胞系。

13. 权利要求 12 的细胞系,其中所述 CHO 细胞系是二氢叶酸还原酶基因缺陷的。

14. 权利要求 12 的细胞系,其登记号为 KCTC10993BP、KCTC10994BP 或 KCTC10995BP。

15. 一种生产重组蛋白质的方法,包括步骤:

(a) 使用一种表达载体转化动物细胞系,该表达载体包括权利要求 1 的可诱导的高表达盒以及编码重组目的蛋白质的基因;及

(b) 在二氢叶酸还原酶抑制剂存在下培养所述转化的动物细胞系。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述重组蛋白质是人促红细胞生成素。

17. 权利要求 16 的方法,其还包括纯化具有高唾液酸含量的促红细胞生成素。

18. 权利要求 15 的方法,其中所述可诱导的高表达盒具有 SEQ ID No. 7、8 或 9 的核苷酸序列。

19. 权利要求 15 或 16 的方法,其中步骤 (a) 的动物细胞系是二氢叶酸还原酶缺陷的 CHO 细胞系。

20. 权利要求 15 的方法,其中步骤 (b) 的转化的动物细胞系的登记号为 KCTC10993BP、KCTC10994BP 或 KCTC10995BP。

用于大量生产重组蛋白质的新载体和表达细胞系以及使用 其生产重组蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于大量生产重组蛋白质的载体,用于生产所述重组蛋白质的表达细胞系,以及使用所述细胞系生产和纯化所述重组蛋白质的方法。更特别地,本发明涉及通过人工弱化二氢叶酸还原酶基因启动子(所述启动子是所述基因的转录控制序列)而能够大大增强基因扩增效率的载体,用所述载体转化的动物细胞系以及使用所述动物细胞系表达目的蛋白质和仅纯化高糖基化形式的所述蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 多种载体和宿主已经用于大量生产重组蛋白质。大肠杆菌(*E. coli*)已被广泛使用,但是在蛋白质生产中由于需要被糖基化或具有复杂结构而具有有限应用。使用动物细胞、酵母细胞、转化的动物、转化的植物等可以克服这些问题。

[0003] 酵母在大量生产蛋白质中是有利的,但是本领域熟知酵母糖基化不同于人类糖基化而因此是高度免疫原性的(Hermeling et al., *Pharm. Res.* 21(6):897-903(2004))。转化的动物由于照料和维持动物的困难和潜在的微生物病原体的污染而尚未商品化。

[0004] 使用动物细胞系负担在于蛋白质生产的高成本和细胞系建立所需的时间和花费,但是这最通常用于重组蛋白质生产,因为这个系统生产非常类似于人类细胞中所见到的形式的重组蛋白质并且可使稳定的蛋白质生产和维持成为可能。然而,当被转化以用于重组蛋白质生产时,大多数动物细胞系显示低表达水平并因此未被用于实现高产量生产。基因扩增是常规用于克服与动物细胞表达系统相关问题的策略。两种广泛使用的扩增系统是基于二氢叶酸还原酶(DHFR)的扩增和基于谷氨酰胺合成酶的扩增,二者均能显著增加动物细胞系的重组蛋白质产量。尽管具有改良蛋白质生产的优点,基因扩增系统具有的缺点在于其需要多轮的基因扩增以使用高浓度的甲氨蝶呤(后文简单称作“MTX”),这是耗时的,而且长期传代培养细胞系导致基因丢失和不稳定的表达。

[0005] 已进行了许多尝试以克服基因扩增系统的缺点。例如,韩国专利登记号 No. 0162021 采用了置于部分缺失的 SV40 启动子控制之下的 DHFR 基因。韩国专利登记号 No. 0493703 描述了将突变导入巨细胞病毒(CMV)启动子中以改变甲基化 DNA 结合蛋白质与其启动子中识别序列的亲合性。韩国专利登记号 No. 0184778 使用免疫球蛋白重链结合蛋白质的 5'-非编码区域(Bip)作为内部核糖体进入位点(IRES)以便将 DHFR 基因置于独立启动子以及重组目的蛋白质的转录控制序列的控制之下。

[0006] 韩国专利登记号 No. 0162021 涉及通过缺失 128 到 270 个核苷酸控制 SV40 启动子的活性。但是,缺失序列的作用不明,保留序列的作用也未提及。特别地,因为这个专利未显示在不包含对照的条件下,当 MTX 浓度高于 20nM 时,基因扩增不能再产生进一步的增加,其根本不能对 DHFR 启动子活性的改变以及在 MTX 低浓度时的最佳表达提供任何支持。韩国专利登记号 No. 0493703 涉及通过修饰 CMV 启动子内甲基化 DNA-结合蛋白质的识别序列实现有效的基因扩增,但是扩增对于表达的影响低于其他方法的。韩国专利登记号

No. 0184778, IRES- 依赖性表达, 替代一个独立启动子的使用, 可在 MTX 低至几个微摩尔浓度 (μM) 的水平时仍允许基因扩增并产生大约 30 倍的表达增加。因此, 不能从一个普通启动子修饰预测 DHFR 基因的扩增, 一个修饰启动子的应用仅仅由使用多种启动子基本上实现基因扩增来确定。

[0007] 人促红细胞生成素 (EPO), 在本发明中作为一个重组蛋白质实例说明, 是一个大约 34kDa 的糖蛋白, 但是肽链 (非糖基化 EPO) 的分子量仅大约 18kDa。由于贫血, 缺氧或出血, EPO 在肾脏合成并刺激生成红细胞和维持稳态。EPO 在成人体内为大约 10 到 20mIU/mL, 肾脏功能紊乱导致严重的贫血 (Jacobson, et al., Nature, 179 :633-634(1957))。因此, EPO 被用作多种因素导致的慢性肾衰竭和贫血的治疗药物。过去, 从动物血浆或着再生障碍性贫血患者尿或血液中获得 EPO, 所述患者较健康人产生更高水平的 EPO, 但是获得的 EPO 不稳定并且产量低。从健康人尿中获得的 EPO 浓度低, 并需要高效纯化因为尿中还有 EPO 活性抑制剂 (见美国专利号 Nos. 4, 397, 840, 4, 303, 650 和 3, 865, 810)。从血液或尿中很难获得大量高纯度 EPO, 因此开发了使用遗传重组技术制备 EPO 的方法。但是因为体内 EPO 活性需要糖基化, 当 EPO 基因被克隆并在大肠杆菌或酵母中表达时, EPO 不能以它的天然形式糖基化, 因此不能表现出它的生物学活性。因此, 重组动物细胞系的使用对于 EPO 生成是必须的。在使用重组动物细胞系的情况中, 通常基于 DHFR 基因扩增系统制备 EPO (Malik et al., DNA and Cell Bio., 6 :453-459(1992))。

[0008] 发明揭示

[0009] 技术问题

[0010] 基于 Michel Fromm 和 Paul Berg 的前期研究 (J. Mol. Appl. Genet. 1983. 2(1) : 127-135), 提示与 DHFR 结构基因连接的启动子区域内的 6 个富含 GC 重复的序列对于启动子的转录活性是重要的, 本申请的发明人通过连续缺失 GC 富含序列构建动物细胞表达载体, 其在基因扩增和表达上更有效, 因此产生本发明。

[0011] 技术方案

[0012] 因此, 本发明的目的是提供一个表达载体, 其在用于在动物细胞内生产重组蛋白质的基因扩增上更有效。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一个用所述表达载体转化的动物细胞系。

[0014] 本发明更进一步的目的是提供使用所述动物细胞系大量生产重组蛋白质的方法。

[0015] 图例描述

[0016] 图 1 图例示意表达载体 X1GC/dhfr, X3GC/dhfr 和 X6GC/dhfr 的构建过程, 其包含全长或连续截短的富含 GC 的序列;

[0017] 图 2 图例示意已缺失所有 6 个富含 GC 序列的 X0GC/dhfr 表达载体的构建过程;

[0018] 图 3 图例示意克隆 gEPO 基因进入图 1 和 2 的表达载体的过程。

[0019] 图 4 到 7 显示用本发明的表达载体转化的每个细胞系中 EPO 表达水平的 ELISA 分析结果;

[0020] 图 8 显示扩增的 DHFR 基因的表达水平的蛋白质印迹结果;

[0021] 图 9 显示在上清液样品中人 EPO 表达水平的间接 ELISA 分析结果, 上清液是在实施例 6 中选择的单细胞克隆 X0GC/GEP09647 (DXB11) 的大规模培养过程中收集 9 次而获得;

[0022] 图 10 显示实施例 8 中纯化的重组 EPO 的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析结果;

[0023] 图 11 显示实施例 4 中纯化的重组 EPO 的等电点聚焦结果；

[0024] 图 12 显示在完全近似无血清条件下培养 X1GC/GEP09629 (DG44) 和 X0GC/GEP09603 (DG44) 表达的 EPO 的等电点聚焦结果。

[0025] 完成本发明的最佳模式

[0026] 为了实现上述目标,本发明提供一个用于动物细胞系的表达载体,其包含一个已缺失一些富含 GC 重复序列的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因启动子。

[0027] 如上所述,基于 DHFR 基因的扩增系统已被广泛用于诱导动物细胞内重组蛋白质的高水平表达,但是问题是由于长期使用高浓度 DHFR 抑制剂而不能保证细胞系稳定性以及耗时和价格昂贵。本发明人发现携带 DHFR 基因的表达载体在被置于富含 GC 重复序列已被部分或完全缺失的截短的 DHFR 启动子控制之下时能够诱导其中携带的 DHFR 基因和 / 或重组目的基因在短时间甚至在更低的 DHFR 抑制剂浓度下更高效表达。

[0028] 在此,术语“富含 GC 重复序列”指包含于 DHFR 启动子内的重复的 CCGCCC 序列,其是 DHFR 的转录控制序列。通过缺失或其他突变,所述重复序列被部分或完全失活,DHFR 表达最小化。当 DHFR 抑制剂加入使 DHFR 表达维持在最低水平时,细胞为存活扩增大量 DHFR 基因,同时携带 DHFR 基因的表达载体携带的重组目的基因也扩增并因此高水平表达。

[0029] 因此,一方面,本发明提供了用于高水平表达的可诱导表达盒,其包含编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因的核苷酸序列,其含有一或更多 CCGCCC 重复序列已被去除的启动子。优选可诱导的高表达盒包含含有少于 6 个 CCGCCC 重复序列的 DHFR 启动子,更优选含有少于 3 个 CCGCCC 重复序列的 DHFR 启动子,特别优选含有 0 个或 1 个 CCGCCC 重复序列的 DHFR 启动子,最优选所有重复的 CCGCCC 序列已被去除的 DHFR 启动子。

[0030] 通过核苷酸替代,缺失或依据本领域已知的遗传重组技术等实现 CCGCCC 重复序列的去除。在实施本发明中,通过部分或完全缺失含有 CCGCCC 序列的核苷酸序列将富含 GC 序列部分或完全从启动子中去除。

[0031] 另一方面,本发明提供包含可诱导的高表达盒的表达载体。

[0032] 在此,术语“载体”指将目的基因导入宿主细胞以表达基因的工具。本发明使用的载体包括质粒载体,粘粒载体,噬菌体载体和病毒载体如腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺伴随病毒载体。优选质粒载体。

[0033] 优选地,所述表达载体可还包括编码重组目的蛋白质的基因。通过表达所述表达载体可高水平表达所述重组目的蛋白质。

[0034] 典型地,所述重组目的蛋白质包括生理学活性多肽。这样的生理学活性多肽包括多种蛋白质如激素,细胞因子,白细胞介素,白细胞介素结合蛋白质,酶,抗体,生长因子,转录调控因子,凝血因子,疫苗,结构蛋白质,配体蛋白质或受体,细胞表面抗原,受体拮抗剂和其衍生物和类似物。

[0035] 详细地,生理学活性多肽的非限制性实例包括人生长激素,干扰素和干扰素受体,集落刺激因子,白细胞介素,促红细胞生成素,胰岛素,血管紧张素,骨生长因子,B 细胞因子,T 细胞因子,神经生长因子,细胞表面抗原,单克隆抗体和病毒衍生疫苗抗原。

[0036] 本领域技术人员将容易地选择能够使用当前技术被用于基于 DHFR 的基因扩增系统的重组蛋白质。本发明优选的实施方案中,所述重组蛋白质是人促红细胞生成素。

[0037] 在 DHFR 基因启动子或一个独立启动子的控制下可以表达重组目的蛋白质。优选

地,所述重组目的蛋白质可被放置于一个独立启动子的控制下。这样的启动子包括本领域已知的启动子,这样启动子的非限制性实例包括巨细胞病毒 (CMV) 启动子, LTR 启动子, EF α 启动子, SW40 启动子和 TK 启动子。本领域技术人员将容易地选择上述组中的任何一个启动子。

[0038] 本发明的表达载体,其用于诱导目的基因在动物细胞内高表达,优选可还包括用于动物细胞的抗性基因,其被用作在动物细胞内永久表达该基因的选择标记物。这种动物细胞的抗性基因的非限制性实例包括本领域内常规使用的,如新霉素抗性基因, zeomycin 抗性基因,潮霉素抗性基因和芽生霉素抗性基因。

[0039] 本发明的表达载体还可包括但不局限于载体的常规组成元件,如复制起点和聚核苷酸化信号和其他转录控制元件。

[0040] 另一方面,本发明提供了用所述表达载体转化的细胞系。

[0041] 在更详细的方面,本发明提供了用一个表达载体转化的大肠杆菌细胞系,所述载体携带含有 DHFR 启动子内一个 CCGCCC 重复序列的可诱导的高表达盒和另一个不含有任何 CCGCCC 序列的可诱导的高表达盒。所述大肠杆菌转化株于 2006 年 10 月 2 日保藏于国际保藏单位 KCTC(韩国典型培养物保藏中心 (Korean Collection for Type Cultures), Genetic Resources Center, Korean Research Institute of Bioscience and Biotenology (KRIBB), Yusong-ku, Taejon, Korea), 登记号分别为 KCTC 10991 BP 和 KCTC 10992BP。为了诱导重组目的蛋白质的高表达,所述大肠杆菌细胞系可用于构建表达载体,使用基因重组技术通过克隆步骤进一步将编码所述重组目的蛋白质的基因包括在从细胞系分离的含有可诱导的高表达盒的表达载体内。

[0042] 另一个详细的方面,本发明提供了用所述表达载体转化的细胞系,其还包括编码重组目的蛋白质的基因。

[0043] 在优选方面,需要在动物细胞中表达所述重组目的蛋白质。考虑到本发明目的,本发明中适用的动物细胞实例包括但不局限于中国仓鼠卵巢癌 (CHO) 细胞,猴肾细胞 (COS7), NS0 细胞, SP2/0 细胞, W138 细胞, 幼仓鼠肾 (BHK) 细胞, MDCK 细胞, 骨髓瘤细胞, HuT 78 细胞和 293 细胞。本领域技术人员能容易地选择适用于本发明的基于 DHFR 的扩增系统中的动物细胞系。

[0044] 实际上,使用 CHO 细胞。详细地,使用二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺陷的中国仓鼠卵巢癌细胞系 (CHO/dhfr⁻)。即用携带编码本发明的重组人促红细胞生成素的基因的载体转化 DHFR 缺陷 CHO 细胞。在转化的 CHO 细胞中,甚至在甲氨蝶呤浓度少于 100nM 和优选甚至少于 50nM 时基因扩增产生足够数量的拷贝。因此,本发明提供了这种动物细胞系。将在实施例中详细描述 CHO 转化体于 2006 年 10 月 2 日保藏于 KCTC (Genetic Resources Center, KRIBB, Yusong-ku, Taejon, Korea), 登记号为 KCTC10993BP, KCTC 10994BP 和 KCTC 10995BP。

[0045] 在另一方面,本发明提供了使用本发明的动物细胞表达载体转化动物细胞系生产重组蛋白质的方法,所述载体包括含有已部分或完全去除富含 GC 序列的启动子的编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的基因;以及培养转化的动物细胞系。

[0046] 在本发明中,“转化”动物细胞包括核酸导入生物体,细胞,组织或器官的任何方法,本领域已知转化可以通过选择动物细胞系的合适标准技术进行。没有细胞壁的哺乳动

物细胞可使用磷酸钙沉淀转化 (Graham et al., 1978, Virology, 52:456-457)。在美国专利号 No. 4, 399, 216 中描述了转化哺乳动物宿主细胞的常规方法和特征。详细地, 使用 lipofectamine 将表达重组蛋白质的载体导入 CHO 细胞。动物细胞可在本领域已知的适合的培养基和适合的培养条件下培养。所述培养条件可被本领域技术人员容易地调整以适合选择的动物细胞系。依据分批培养, 床分批培养 (bed-batch culture) 和连续培养的细胞生长特性, 在悬浮或贴壁状态下进行培养。用于培养的培养基应满足特定细胞系的生长需要。

[0047] 用于动物细胞培养的培养基包含多种碳源, 氮源和微量元素。可获得的碳源的实例包括碳水化合物如葡萄糖, 蔗糖, 乳糖, 果糖, 麦芽糖, 淀粉和纤维素, 脂肪如大豆油, 葵花油, 蓖麻油和椰子油, 脂肪酸如棕榈酸, 硬脂酸和亚油酸, 醇如甘油和乙醇, 以及有机酸如乙酸。这些碳源可单独或组合 2 或多种使用。可获得的氮源实例包括有机氮源, 如蛋白胨, 酵母提取物, 肉膏, 麦芽汁, 玉米浆 (CSL) 和大豆乳清 (soybean whey), 以及无机氮源, 如尿素, 硫酸铵, 氯化铵, 磷酸铵, 碳酸铵和硝酸铵。这些氮源可单独或组合 2 或多种使用。所述培养基还可包括氨基酸, 维生素, 适合的前体等。

[0048] 同时培养基中也可添加 DHFR 抑制剂, 如甲氨蝶呤。这是因为如上所述, 本发明的目的是在短时间内有效地建立一个系统, 通过所述系统用本发明的表达载体转化 DHFR 缺陷动物细胞以及将 DHFR 抑制剂给予细胞以扩增重组基因而扩增和选择载体中携带的 DHFR 基因。

[0049] 在一个优选的实施方案中, 考虑到细胞系稳定性和制备成本, 优选短时间内使用尽可能低浓度的 DHFR 抑制剂。因为低浓度 DHFR 抑制剂的使用确保稳定大量生产目的蛋白质和缩短表达细胞系建立所需要的时间。详细地, 本发明提供了生产重组蛋白质的方法, 通过用重组蛋白质表达载体转化 DHFR- 缺陷 CHO 细胞并在给予细胞少于 100nM 的甲氨蝶呤、优选少于 50nM 的甲氨蝶呤进行。

[0050] 当在上述细胞系内生产促红细胞生成素时, 所述方法还包括大规模纯化含有高唾液酸含量的促红细胞生成素, 唾液酸能够增强促红细胞生成素的生物学活性。

[0051] 在本发明的一个实施方案中, DHFR 启动子内含有的富含 GC 序列无活性以最小化 DHFR 表达, 然后通过添加 DHFR 抑制剂扩增 DHFR 基因。产生基因扩增的转化细胞进行限制稀释以获得单细胞来源的克隆群。因此获得的单细胞克隆在无血清培养基中大规模培养以生产重组人促红细胞生成素。基于含有高含量唾液酸的促红细胞生成素 (EPO) 用低盐浓度洗脱和含有低含量唾液酸的 EPO 用高盐浓度洗脱的事实, 生产的 EPO 加入柱并使用递增的盐梯度自柱洗脱。纯化的有高含量唾液酸的 EPO 的活性未受损失。

[0052] 发明模式

[0053] 通过如下用于说明但不是限制本发明的实施例可更好地理解本发明。

[0054] 实施例 1: 含有全长或截短的富含 GC 序列的表达载体的构建

[0055] 制备 DHFR 基因表达盒以将 DHFR 基因置于截短的启动子控制之下, 该启动子的一些富含 GC 重复序列已被缺失, 如下。为扩增 DHFR 基因, 使用 pSV2-dhfr 质粒 (ATCC No. 37146) 和一对引物: dhfr-01 引物带有 SmaI 位点 (5' -GCG CCC GGG ATG GTT CGA CCA TTG AAC TGC-3') 和 dhfr-02 引物带有 BstBI 位点 (5' -CAC TTA GAA CCT GTT AGT CTT TCT TCT CGTAGA C-3') 进行 PCR。PCR 产物约 200bp, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳并使用凝

胶提取试剂盒 (QIAGEN Cat No. 28706) 纯化。DNA 片段克隆进入 pDRIVE 载体 (Qiagen) 并进行 DNA 测序。DNA 测序揭示扩增的 DHFR 基因无误。然后使用 SmaI 和 BstBI 消化 pDRIVE-dhfr 质粒以切除 DHFR 基因, 并采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。使用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN Cat No. 28706) 纯化大约 200bp 的 DHFR 基因片段并插入已使用同样限制性酶预先消化的 pcDNA3.1 (Invitrogen)。使用生成的 pcDNA3.1-dhfr 质粒作为模板, 进行 PCR, 其中带有 BamHI 位点并与不同的富含 GC 重复序列互补的引物, x1GC(5' -TCA GGA TCC ATT CTC CGC CCC ATG GCT GAC TAA-3'), x3GC(5' -CAT GGA TCC TAA CTC CGC CCA GTT CCG CCC ATT CT-3') 和 x6GC(5' -CAT GGA TCC CAT AGT CCC GCC CCT AAC TCC GCC C-3'); 带有 BamHI 位点并与和 DHFR 基因结构上连接的聚腺苷酸化信号序列互补的引物 BISVpAR(5' -TCA GGA TCC CAG ACA TGA TAA GAT ACA TTGATG-3') 以获得 2 个含有部分截短的富含 GC 序列的基因盒和 1 个含有全长富含 GC 序列的基因盒。然后, 将基因盒插入已使用 BglIII 预先消化的 pcDNA3.1 (Invitrogen)。使用限制性内切酶图谱选择具有与载体的 CMV 启动子同样方向的克隆, 从而获得 X1GC/dhfr, X3GC/dhfr 和 X6GC/dhfr 质粒。促红细胞生成素基因得自人基因组 DNA 并克隆进入每个质粒。此外, 作为对照, 如下构建含有所有富含 GC 序列已被缺失的 DHFR 启动子的表达载体。

[0056] 为了获得 DHFR 基因和 SV40 病毒聚腺苷酸化序列, 合成含有 BamHI 位点的引物, X0GC(5' -CGA TGG ATC CGA CAT GAT AAG ATA CATTGA T-3') 和 X0GCRR(5' -CGT TGG ATC CAC AGC TCA GGG CTG CGATTT C-3')。使用 pSV2-dhfr 作为模板和所述引物进行 PCR。获得约 1.5kb 的 PCR 产物, 其跨越 SV40 病毒聚腺苷酸化序列到 DHFR 基因的 5'-非编码区。扩增的 DNA 片段采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶提取试剂盒 (QIAGENCat No. 28706) 纯化, 并插入已被 BglIII 预先消化的 pcDNA 3.1 (Invitrogen)。使用限制性内切酶图谱选择一个克隆, 其中 DHFR 基因与 CMV 启动子反向。使用 NdeI 和 DraIII 消化载体的多克隆位点以去除一些限制性内切酶识别位点, 切割的基因片段被插入已被同样限制性酶预先消化的 pRcCMV (Invitrogen), 因此获得 X0GC/dhfr 载体。

[0057] 在图 1 和 2 中图例显示克隆步骤。

[0058] 实施例 2 :gEPO 基因的克隆

[0059] 使用 XhoI 和 EcoRI 消化 pCI-neo/gEPO 质粒, 在它的粘性末端使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段补平产生平端, 并采用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。使用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Cat No. 28706) 纯化相应于人基因组 EPO 基因的大约 2.2kb 的 DNA 片段。使用 EcoRV 消化 pRcCMV 载体 (Invitrogen) 并使用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN, Cat No. 28106) 纯化。基因组 EPO 基因连接到所述载体的 EcoRV 位点。使用限制性内切酶图谱选择一个克隆, 其中 EPO 基因具有与 CMV 启动子同样方向。采用 BamHI 和 XhoI 消化实施例 1 制备的 X0GC/dhfr, x1GC/dhfr, x3GC/dhfr 和 x6GC/dhfr 并用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Cat No. 28706) 纯化。依据同样方法, 克隆进入 pRcCMV 的基因组 EPO 基因片段被纯化并插入 x0GC/dhfr, x1GC/dhfr, x3GC/dhfr 和 x6GC/dhfr 载体的多克隆位点的 BamHI/XhoI 位点。这样获得的载体经 DNA 测序确认无误, 并分别命名为 X0GC/GEPO, X1GC/GEPO, X3GC/GEPO 和 X6GC/GEPO。克隆步骤图例显示于图 3, 最终的核苷酸序列显示在附录的序列表中。

[0060] 实施例 3 :转化 DHFR 缺陷的 CHO 细胞

[0061] 在添加 10% 胎牛血清 (Welgene, Cat No. S101-01) 和 1% 青霉素-链霉素 (Gibco,

Cat No. 15140-122) 的 DMEM/F12 培养基 (Welgene, Cat No. LM002-04) 中在 5 % CO₂ 培养箱中在 37 °C 传代培养 DHFR 缺陷的 CHO 细胞 (CHO/DXB11 和 CHO/DG44 株)。为了使用 X0GC/GEPO, X1GC/GEPO, X3GC/GEPO 和 X6GC/GEPO 质粒转化 DHFR 缺陷的 CHO 细胞, 将 1×10^6 细胞种入 6cm 的培养皿, 在 5 % CO₂ 培养箱、37 °C 培养 24 小时并使用 Opti-MEM 培养基 (Gibco, Cat No. 31985-070) 洗两次。将 1ml 的 LipofectamineTM 试剂 (Invitrogen, Cat No. 18324-020) 与溶于 1ml 的 Opti-MEM 的 10 μ g 每种质粒 DNA 混合, 并在室温放置 20min。DNA-lipofectamine 复合物滴加入备用的 DHFR 缺陷的 CHO 细胞, 在 5 % CO₂ 培养箱、37 °C 培养细胞 18 小时。然后, 培养基更换为添加 10 % 胎牛血清和 1 % 青霉素 - 链霉素的 DMEM/F12 培养基, 细胞再培养 48 小时。为了选择转化的细胞, 使用 0.5 % 胰蛋白酶 - EDTA (Gibco, Cat No. 15400-054) 处理细胞, 离心收集细胞, 并将细胞种入含有补加了 10 % 透析的 FBS (Welgene) 和 1 % 青霉素 - 链霉素和 800 μ g/ml 的遗传霉素 (Mediatech, Cat No. 61-234RG) 的 α -MEM 选择培养基 (Welgene, Cat No. LM008-02) 的 T25 培养瓶。细胞在 5 % CO₂ 培养箱、37 °C 生长至超过 90 % 汇合。使用同样浓度的遗传霉素和相同培养条件继续进行转化细胞的选择。当大量富含 GC 重复序列缺失时, 转化细胞更快地选择。在 DHFR 缺陷的 CHO 细胞株之间未观察到显著差异。

[0062] 实施例 4 : 重组细胞系的选择和 EPO 基因的扩增

[0063] 为了增加使用遗传霉素选择的转化细胞 (CHO/DXB11 株或 CHO/DG44 株) 中 EPO 的表达水平, 将 2×10^4 细胞种入含有上述同样选择培养基的 24 孔板, 并添加 20nM 甲氨蝶呤 (MTX, Sigma, Cat No. M-8407) 和在 5 % CO₂ 培养箱、37 °C 培养 2 个星期。为了选择高水平表达 EPO 的转化细胞, 当细胞达到 100 % 汇合时, 使用 PBS (Welgene, Cat No. LB 001-02) 洗细胞 2 次, 每孔加入 200 μ l 的 EPO 生产培养基 CHO-A-SFM (Gibco, Cat No. 05-5072EF)。细胞培养 24 小时后, 收集培养上清液并使用 EPO ELISA 试剂盒 (R&Dsystems, Cat No. DEP00) 分析。此外, 转化细胞在添加 30nM 甲氨蝶呤的选择培养基中培养 2 个星期, 使用 ELISA (酶联免疫吸附测定) 试剂盒 (R&Dsystems, Cat No. DEP00) 测量转化细胞的 EPO 表达水平。如图 4-7 显示, 在同样的 MTX 浓度下, X0GC/GEPO 和 X1GC/GEPO 质粒呈现最高的 EPO 表达水平, 之后是 X3GC/GEPO 和 X6GC/GEPO。这些结果显示在同样的 MTX 浓度下, 去除大量富含 GC 重复序列增加基因扩增。并发现所有富含 GC 重复序列被去除的 X0GC/GEPO 在基因扩增上有效。因此, 发现当富含 GC 重复序列最少时, 基因扩增最大化。此外, 当选择培养基中的 MTX 浓度增加到 40nM 到 60nM 时以确定最大化基因表达的 MTX 浓度, 观察到基因表达或酸性异构体含量没有显著增加。基于这些结果, 如实施例 6 所述, 限制稀释用 X0GC/GEPO 和 X1GC/GEPO 转化的 2 个 CHO 细胞株。

[0064] 实施例 5 : DHFR 基因扩增的评估

[0065] 实施例 4 获得的转化细胞使用 D-PBS 洗 1 次, 使用胰蛋白酶 - EDTA 从培养瓶消化细胞, 并在 1000rpm 离心 3 分钟。使用 D-PBS 洗收获的细胞 1 次并使用血细胞计数器 (Incyto) 计数。 3×10^6 细胞离心后, 细胞沉淀悬浮于 1.5ml 细胞裂解缓冲液 (PBS, 5mM EDTA, 1 % NP-40), 4 °C 裂解 30 分钟, 12000rpm 离心 10 分钟以获得上清。

[0066] 20 μ l 的每种细胞裂解液和作为阴性对照的 CHO/dhfr⁻ 细胞裂解液与 10 μ l 的样品缓冲液混合, 100 °C 煮 5 分钟, 上样到 12.5 % 的 SDS-PAGE 凝胶。作为阳性对照, 20ng 到 100ng 的二氢叶酸还原酶 (Sigma, Cat No. D6566) 与样品缓冲液混合, 上样到 SDS-PAGE 凝

胶。凝胶在 30mA 电泳。然后将凝胶置于 PVDF 膜上并夹在 Whatman 3M 滤纸之间。使用 Hoefer Semi-PhorSemi-Dry 转移设备在 90mA 将蛋白质转移到 PVDF 膜上 1 小时。然后用溶于 10ml 含 0.5% 脱脂奶粉的 TBS-T 中的抗-DHFR 小鼠抗体 (1 : 500 稀释, BDBiosciences, Cat No. 610697) 探查印迹 1 小时, 轻轻搅动。使用 TBS-T 洗印迹 5 次, 每次 10 分钟, 并与溶于 10ml 含 0.5% 脱脂奶粉的 TBS-T 中的辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠抗体 (1 : 3000 稀释, Amersham Biosciences, Cat No. RPN2108) 温育 1 小时, 轻轻搅动。使用 TBS-T 洗印迹 5 次, 每次 10 分钟, ECL 蛋白质印迹分析系统的检测试剂 1 和 2 (Amersham Biosciences, Cat No. RPN2108) 1 : 1 混匀, 加到印迹上, 反应 1 分钟。将印迹暴露于 X 光片, 将膜显影。蛋白质印迹结果显示在图 9 中。如图 9 所示, 转化细胞呈现 DHFR 基因表达增加。同样细胞密度, X0GC/GEPO 和 X1GC/GEPO 转化的细胞呈现更高的 DHFR 表达。

[0067] 实施例 6 : 分离和选择单细胞克隆

[0068] 实施例 4 中发现具有 EPO 最高表达的 X0GC/GEPO 和 X1GC/GEPO 转化的细胞被转移入 6 孔培养板。为了分离单细胞克隆, 使用添加甲氨蝶呤的选择培养基进行限制稀释使 96 孔培养板中每孔达到 0.5 个细胞的密度, 将细胞种入培养板。在 5% CO₂ 培养箱、37℃ 将 96 孔培养板温育大约 2 到 3 个星期。选择含有单菌落的孔, 单菌落被转移到 24 孔培养板中生长。如实施例 4 所述, 使用间接 ELISA 测量 EPO 表达水平。

[0069] 最终, 呈现高表达水平和涉及等电点聚焦二聚体的酸性异构体高比例的 X0GC/GEPO9647 (DXB11), X1GC/GEPO9629 (DG44) 和 X0GC/GEPO9603 克隆被分离为单细胞克隆, 并检验表达水平和等电点聚焦二聚体模式。

[0070] 发现 X0GC/GEPO9647 (DXB11) 克隆表达水平大约为 80 μ g/10E6 细胞 / 天。这些结果揭示仅仅通过 2 步基因扩增, X0GC/GEPO 或 X1GC/GEPO 就能够建立高表达细胞系, 因此促进了用低传代培养物进行蛋白质生产的单细胞克隆的建立。

[0071] 实施例 7 : 大规模培养单细胞克隆

[0072] 为了大量生产人 EPO, 实施例 6 中选择的单细胞克隆中的 X0GC/GEPO9647 (DXB11) 克隆在一个 T-175 培养瓶中传代培养, 并逐渐扩增到 120 个 T-175 培养瓶。用每个 Cell Factory 大约 2.5×10^8 个细胞共接种 8 个 Cell Factory (Nunc, Cat No. 170009), 在 5% CO₂ 培养箱、37℃ 温育大约 48 小时。每个 Cell Factory 使用 1L 磷酸缓冲液洗 2 次, 细胞在补料 1L 的添加了 0.3mM 丁酸钠 (Sigma, Cat No. B-5887) 的 EPO 大量生产培养基 CHO-A-SFM (Gibco, Formula No. 05-5072EF), 在 5% CO₂ 培养箱、33℃ 培养。每 2 天收集 9 次包含表达的 EPO 的培养上清液。通过离心和使用 0.2- μ m 滤器从培养上清液中去除包含细胞碎片的固体悬浮物。使用间接 ELISA 分析培养上清液中 EPO 表达水平和使用等电点聚焦检测酸性等电点聚焦二聚体含量。如图 10 所示, 甚至在大规模培养条件下克隆表达的 EPO 水平高达 40-50mg/L。尽管未经过纯化步骤, 表达的 EPO 有高含量的 Nos. 6 到 8 异构体, 它们是高唾液酸含量的指示物。

[0073] 实施例 8 : 分离和纯化含有高唾液酸含量的人 EPO

[0074] 使用装备了 JLA-8.1000 转子的 Beckman XL-90 离心机将实施例 7 制备的细胞上清液 7000rpm 离心以去除悬浮物。收集离心上清并通过 0.2- μ m 滤器, 然后通过超滤膜以浓缩其到 1/10 体积。浓缩液与等体积的 20mM 磷酸钠 (pH7.4) 混合, 并上样到已预先使用 20mM 磷酸钠 (pH7.4) 平衡的 Blue FF 柱 (Amersham)。使用 5 倍柱体积的 20mM 磷酸钠 (pH7.4)

洗柱。使用 2 倍柱体积的缓冲液 B(20mM 磷酸钠, pH 7.4) 加 2M NaCl 的线性梯度自柱洗脱 EPO。

[0075] 收集含有 EPO 的主要级分, 在 20mM 磷酸钠 pH5.4 的 Sephadex G-25 柱上脱盐并上样到 20mM 磷酸钠 pH5.4 预先平衡的 SP HP 柱 (Amersham)。使用 5 倍柱体积的 20mM 磷酸钠 pH5.4 洗柱。使用 12 倍柱体积的缓冲液 B(20mM 磷酸钠, pH7.4) 加 1M NaCl 的线性梯度自柱洗脱 EPO。基于有高含量唾液酸的 EPO 以低盐浓度洗脱和有低含量唾液酸的 EPO 以高盐浓度洗脱的事实, 约占全部级分 30% 的用高盐浓度洗脱的级分被排除, 收集其余级分。收集使用 SP HP 柱纯化的 EPO 级分, 经 10mM Tris, pH7.5 的 SephadexG25 脱盐并上样到 10mM Tris, pH7.5 预先平衡的 Source 15Q 柱 (Amersham)。使用 6 倍柱体积的缓冲液 B(10mM Tris, pH7.5) 加 0.25M NaCl 的线性梯度自柱洗脱 EPO。收集超过 15 个含有 EPO 的级分。使用 SDS-PAGE 分析每个级分, 等电点聚焦和毛细管区带电泳 (CZE) 分析带电异构体分布。最终收集含有 10 个唾液酸部分而不含有高盐级分杂质的 EPO 级分。经过纯化步骤, 制备出大约 20 μ g/ml 的含有超过 10 摩尔唾液酸的人重组 EPO。

[0076] 实施例 9 :EPO 性质的评估

[0077] 1) SDS-PAGE 和蛋白质印迹

[0078] 实施例 8 中纯化的重组 EPO 在两块 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳。一块胶使用考马斯亮蓝染色并脱色。另一个胶用 Semi-Dry 转移设备置于 PVDF 膜 (Roche) 上。然后, 用抗 EPO 人抗体 (1 : 5,000 稀释, R&D systems, Cat No. AB-286-NA) 探查印迹。洗印迹并用碱性磷酸酶缀合的抗小鼠兔抗体 (Amersham, Cat No. NA934V) 温育。将印迹用于磷酸盐缓冲液中的 0.5% Tween 20 充分洗并用 Amersham ECL 蛋白质印迹检测试剂盒 (Cat No. RPN2108) 处理。暗室中将印迹暴露于胶片上, 使用自动显影液显影胶片。SDS-PAGE 凝胶上的条带为 EPO, 不同分子量的 EPO 条带取决于 EPO 糖基化程度 (见图 10)。

[0079] 2) 等电点聚焦 (IEF)

[0080] 培养浓缩上清液以及实施例 4 中纯化的重组 EPO 与样品缓冲液 (Invitrogen, Cat No. LC5371) 以 1 : 1 比例混匀, 连同 BRP 重组 hEPO (European Pharmacopoeia Commission Cat No. E1515000) 和 IEF 标准标记物上样至等电点聚焦凝胶 (Invitrogen, Cat No. EC6655B)。等电点聚焦开始采用低电压然后以高电压完成。以含有 12% TCA 和 3% 磺基水杨酸的固定液固定 IEF 胶 30 分钟, 轻轻搅动, 并使用考马斯亮蓝 R250 (Amresco Cat No. 6104-59-2) 染色。可观察到 EPO 的等电点 (见图 11)。

[0081] 3) 使用 TF-1 细胞评价效价和活性

[0082] TF-1 细胞 (ATCC Cat No. CRL-2003) 培养于 RPMI 1640 (Welgene Cat No. LM 011-03) 培养基中, 培养基中添加 10% 胎牛血清, 10 μ M β -巯基乙醇, 20 μ g/ml 运铁蛋白和 12ng/ml 的 GM-CSF, 经 1000rpm 离心 5min 收集细胞。使用磷酸缓冲液洗 TF-1 细胞 2 次, 使用含有 2% FBS, 100 μ g/ml 运铁蛋白, 2mg/ml 无蛋白酶牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的检测培养基洗 TF-1 细胞一次。96 孔板的每孔加入 50 μ l 检测培养基。25 μ l 样品和标准品加入第一个孔, 连续稀释 3 次以使终浓度达到 1 μ g/ml。使用检测培养基洗的 TF-1 细胞以 2×10^4 / 50 μ l / 孔的密度加入每孔。培养板于 5% CO₂ 培养箱、37°C 温育 72 小时后, 每孔加入 20 μ l 的 CellTiter One Solution Reagent (Promega Cat No. G4102)。在 5% CO₂ 培养箱、37°C 温育培养板 4 小时以显色。充分旋转培养板后, 使用 ELISA reader (Molecular

Dynamics) 测量 490nm 的吸收值。X0GC/GEPO 表达的重组 EPO 的活性与标准品之间未观察到明显不同。

[0083] 实施例 10 :单细胞克隆对无血清培养基的适应

[0084] X1GC/GEPO9629(DG44) 和 X0GC/GEPO9603(DG44) 细胞株在 2 个 T-175 培养瓶中生长超过 90% 汇合, 瓶中含有补加了 α -MEM(Welgene, CatNo. LM008-02), 10% 透析的胎牛血清, 1% 青霉素 - 链霉素和 800 μ g/ml 遗传霉素 (Mediatech, Cat No. 61-234RG) 的选择培养基。使用 0.5% 胰蛋白酶 (Gibco., Cat No. 15400-054) 消化细胞并离心。细胞沉淀悬浮于添加 8mM 谷氨酰胺的 JRH' s EX-CELL CD CHO (Cat No. 14360) 培养基中。无血清培养基中的细胞悬浮液放入 T-175 培养瓶中在 CO₂ 培养箱中固定培养。3 天后, 经离心收集悬浮细胞并转入 T-25 培养瓶中固定培养。9 天后, 又收集悬浮细胞并检测细胞数, 生长率和存活。重复这个步骤直到细胞大约在 24 小时内分裂和细胞存活高于 80%。为确定 X0GC/GEPO9603(DG44) 和 X1GC/GEPO9629(DG44) 细胞在完全相似于无血清条件下的表达方式, 在 500ml 转瓶 (Bellco) 中接种 1.0×10^5 细胞 /ml 并在 50rpm 搅动培养, 所述转瓶含有 200ml 培养基。7 天后, 100ml 培养基换为新鲜培养基, 在 33°C 培养细胞。间隔 24 小时收集细胞上清液并分析表达 EPO 的酸性异构体含量。如图 12 显示, X0GC/GEPO9603(DG44) 和 X1GC/GEPO9629(DG44) 细胞, 在完全相似于无血清条件下, 呈现的等电点聚焦谱与在细胞工厂内常规生产的 EPO 的相似。

[0085] 工业实用性

[0086] 如此前所述, 本发明提供了含有其中富含 GC 序列已被部分或完全去除的 DHFR 启动子的载体和用该载体转化的细胞系。在较短时间内使用较低浓度的 DHFR 抑制剂, 所述载体能够选择生产人 EPO 的细胞系, 从而缩短了建立生产高水平 EPO 的细胞系所需的时间。同时, 所述细胞系能够以高产量大量生产所需的重组蛋白质。因此, 本发明能够更有效地改善作为在动物细胞内生产所需蛋白质的策略的基因扩增系统。

序列表

<110> 韩美药品工业株式会社

<120> 用于大量生产重组蛋白质的新载体和表达细胞系以及使用其生产重组蛋白质的方法

<160>18

<170>KopatentIn 1.71

<210>1

<211>9227

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X0GC/GEPO vector

<400>1

gacggatcgg gagatccgac atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaaacta	60
gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa	120
ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatitt atgtttcagg	180
ttcaggggga ggtgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtgggtatgg	240
ctgattatga tctctagtca aggcaactata catcaaatat tccttattaa cccctttaca	300
aattaaaaag ctaaagggtac acaatttttg agcatagtta ttaatagcag acactctatg	360
cctgtgtgga gtaagaaaaa acagtatgtt atgattataa ctgttatgcc tacttataaa	420
ggttacagaa tatttttcca taattttctt gtatagcagt gcagcttttt cctttgtggt	480
gtaaatagca aagcaagcaa gagttctatt actaaacaca gcatgactca aaaaacttag	540
caattctgaa ggaaagtcct tggggctctc tacctttctc ttcttttttg gaggagtaga	600
atgttgagag tcagcagtag cctcatcatc actagatggc atttcttctg agcaaaacag	660
gttttctca ttaaaggcat tccaccactg ctccattca tcagttccat aggttggat	720
ctaaaataca caaacaatta gaatcagtag tttaacacat tatacactta aaaattttat	780
atttacctta gagcttttaa tctctgtagg tagtttgtcc aattatgtca caccacagaa	840
gtaaggttcc ttcacaaaga tccaaagcca gcaaaagtcc catggtctta taaaaatgca	900
tagcttttagg aggggagcag agaacttgaa agcatcttcc tgttagtctt tcttctcgta	960
gaattcaaac ttataacttga tgcccttttc ctccctggacc tcagagagga cgccctgggta	1020
ttctgggaga agtttatatt tccccaaatc aatttctggg aaaaacgtgt cactttcaaa	1080
ttcctgcatg atccttgtca caaagagtct gaggtggcct gggttgattca tggtcttctg	1140

gtaaacagaa	ctgcctccga	ctatccaaac	catgtctact	ttacttgcca	attccggttg	1200
ttcaataagt	cttaaggcat	catccaaact	tttggaaga	aaatgagctc	ctcgtggttg	1260
ttctttgagt	tctctactga	gaactatatt	aattctgtcc	tttaaaggte	gattcttctc	1320
aggaatggag	aaccaggttt	tectacccat	aatcaccaga	ttctgtttac	cttccactga	1380
agaggttgtg	gtcattcttt	ggaagtactt	gaactcgttc	ctgagcggag	gccagggtag	1440
gtctccgttc	ttgccaatcc	ccatattttg	ggacacggcg	acgatgcagt	tcaatggctg	1500
aacatgatg	gcagcgggga	taaaatccta	ccagccttca	cgctaggatt	gccgtcaagt	1560
ttggcgcgaa	atcgagccc	tgagctgtgg	atctcccgat	cccctatggt	gcactctcag	1620
tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagtatctg	ctccctgctt	gtgtgttga	1680
ggtcgctgag	tagtgcgcg	gcaaaattta	agctacaaca	aggcaaggct	tgaccgacaa	1740
ttgcatgaag	aatctgctta	gggttaggcg	ttttgcgctg	cttcgcgatg	tacgggccag	1800
atatacgcgt	tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cggggtcatt	1860
agttcatagc	ccatatatgg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaagt	gcccgcctgg	1920
ctgaccgccc	aacgaccccc	gccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	ccatagtaac	1980
gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	ttacggtaaa	ctgcccactt	2040
ggcagtacat	caagtgtatc	atatgccaa	tacgccccct	attgacgtca	atgacggtaa	2100
atggcccgc	tggcattatg	cccagtacat	gaccttatgg	gactttccta	cttggcagta	2160
catctacgta	ttagtcateg	ctattacat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acatcaatgg	2220
gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagcttc	caccccatg	acgtcaatgg	2280
gagtttgttt	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctgtaaca	actccgcccc	2340
attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggte	tatataagca	gagctctctg	2400
gctaactaga	gaacccactg	cttactggct	tatcgaaatt	aatacgactc	actataggga	2460
gacccaagct	tgggtaccgag	ctcggtacca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	2520
tgcagattcg	aggtecgacg	tatcgataag	cttccaagcg	cggagatggg	ggtgcacggt	2580
gagtactcgc	gggctgggcg	ctcccgcgcg	cccgggtccc	tgtttgagcg	gggatttagc	2640
gccccggcta	ttggccagga	ggtggctggg	ttcaaggacc	ggcgacttgt	caaggacccc	2700
ggaaggggga	ggggggtggg	gcagcctcca	cgtgccagcg	gggacttggg	ggagtccttg	2760
gggatggcaa	aaacctgacc	tgtgaagggg	acacagtttg	ggggttgagg	ggaagaaggt	2820
ttgggggttc	tgctgtgcca	gtggagagga	agctgataag	ctgataacct	gggcgctgga	2880
gccaccactt	atctgccaga	ggggaagcct	ctgtcacacc	aggattgaag	tttggccgga	2940
gaagtggatg	ctggtagctg	ggggtgggg	gtgcacacgg	cagcaggatt	gaatgaaggc	3000
caggagggca	gcacctgagt	gcttgcatgg	ttggggacag	gaaggacgag	ctggggcaga	3060
gacgtgggga	tgaaggaagc	tgctcttcca	cagccaccct	tctccctccc	cgctgactc	3120
tcagcctggc	tatctgttct	agaatgtcct	gcctggctgt	ggcttctcct	gtccctgctg	3180
tcgtccctc	tgggcctccc	agtcctgggc	gccccaccac	gcctcatctg	tgacagccga	3240
gtcctggaga	ggtacctctt	ggaggccaag	gaggccgaga	atatcacggt	gagacccctt	3300
ccccagcaca	ttccacagaa	ctcacgtca	gggcttcagg	gaactcctcc	cagatccagg	3360
aacctggcac	ttggtttagg	gtggagtggg	gaagctagac	actgcccccc	tacataagaa	3420
taagtctggt	ggccccaaac	catacctgga	aactaggcaa	ggagcaaagc	cagcagatcc	3480

tacggcctgt	gggccagggc	cagagccttc	agggaccctt	gactccccgg	gctgtgtgca	3540
tttcagacgg	gctgtgctga	acactgcage	ttgaatgaga	atatcactgt	cccagacacc	3600
aaagttaatt	tctatgcctg	gaagaggatg	gaggtgagtt	cctttttttt	tttttttcct	3660
ttcttttggg	gaatctcatt	tgcgagcctg	atttttggatg	aaagggagaa	tgatcgaggg	3720
aaaggtaaaa	tggagcagca	gagatgagge	tgccctgggcg	cagaggctca	cgtctataat	3780
cccaggctga	gatggccgag	atggggagaat	tgcttgagcc	ctggagtttc	agaccaacct	3840
aggcagcata	gtgagatccc	ccatctctac	aaacatttaa	aaaaattagt	caggtgaagt	3900
ggtgcatggt	ggtagtccca	gatatttggg	aggctgagge	gggaggatcg	cttgagccca	3960
ggaatttgag	gctgcagtga	gctgtgatca	caccactgca	ctccagcctc	agtgcagag	4020
tgaggccctg	tctcaaaaaa	gaaaagaaaa	aagaaaaata	atgagggctg	tatggaatac	4080
attcattatt	cattcactca	ctcactcact	cattcattca	ttcattcatt	caacaagtct	4140
tattgcatat	cttctgtttg	ctcagcttgg	tgcttggggc	tgctgagggg	caggagggag	4200
agggtgacat	gggtcagctg	actcccagag	tccactccct	gtaggtcggg	cagcaggccg	4260
tagaagtctg	gcagggcctg	gccctgctgt	cggaagctgt	cctgcggggc	caggccctgt	4320
tggtcaactc	ttcccagccg	tgggagcccc	tgcaactgca	tgtggataaa	gccgtcagt	4380
gccttcgcag	cctcaccact	ctgcttcggg	ctctggggagc	ccaggtgagt	aggagcggac	4440
acttctgctt	gccctttctg	taagaagggg	agaagggctt	tgctaaggag	tacaggaact	4500
gtccgtatct	cttcccttcc	tgtggcactg	cagcgacctc	ctgttttctc	cttggcagaa	4560
ggaagccatc	tcccctccag	atgcggcctc	agctgctcca	ctccgaacaa	tcactgctga	4620
cactttccgc	aaactcttcc	gagtctactc	caatttccct	cggggaaagc	tgaagctgta	4680
cacaggggag	gcctgcagga	caggggacag	atgaccagct	tgatatcgaa	ttatccatca	4740
cactggcggc	cgctcgagca	tgcatctaga	gggccctatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	4800
tagagctcgc	tgatcagcct	cgactgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttgccc	4860
ctcccccgctg	ccttccctga	ccctggaagg	tgccactccc	actgtccctt	cctaataaaa	4920
tgaggaaatt	gcatcgcat	gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtggggtggg	4980
gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	5040
ctctatggct	tctgaggcgg	aaagaaccag	ctggggctct	aggggggtatc	cccacgcgcc	5100
ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgtctacact	5160
tgccagcgcc	ctagcgcccg	ctcctttcgc	tttcttccct	tccttttctcg	ccacgttcgc	5220
cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	gggttccgat	ttagtgcttt	5280
acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgatta	gggtgatggg	tcacgtagt	ggccatcgcc	5340
ctgatagacg	gtttttcgcc	ctttgacgtt	ggagtccacg	ttcttttaata	gtggactctt	5400
gttccaaact	ggaacaacac	tcaaccctat	ctcggtctat	tcttttgatt	tataagggat	5460
tttgccgatt	tgggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	5520
ttaattctgt	ggaatgtgtg	tcagttaggg	tgtggaaaagt	ccccaggctc	cccagcagge	5580
agaagtatgc	aaagcatgca	tctcaattag	tcagcaacca	ggtgtggaaa	gtccccagge	5640
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	catagtcccc	5700
cccctaacte	cgcceatccc	gccctaact	ccgcccagtt	ccgcccattc	tccgcccatt	5760
ggctgactaa	ttttttttat	ttatgcagag	gccgaggccg	cctctgcctc	tgagctatct	5820

cagaagtagt	gaggaggctt	ttttggagge	ctaggctttt	gcaaaaagct	cccgggagct	5880
tgtatatcca	ttttcggatc	tgatcaagag	acaggatgag	gatcgtttcg	catgattgaa	5940
caagatggat	tgcacgcagg	ttctccggcc	gcttgggtgg	agaggctatt	cggctatgac	6000
tgggcacaa	agacaatcgg	ctgctctgat	gccgccgtgt	tccggctgtc	agcgcagggg	6060
cgccccgttc	tttttgtcaa	gaccgacctg	tccgggtgcc	tgaatgaact	gcaggacgag	6120
gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	ggcgttcctt	gcgcagctgt	gctcgacgtt	6180
gtcactgaag	cgggaaggga	ctggctgcta	ttgggcgaag	tgccggggca	ggatctcctg	6240
tcatctcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	tccatcatgg	ctgatgcaat	gcggcggctg	6300
catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	gaccaccaag	cgaaacatcg	catcgagcga	6360
gcacgtactc	ggatggaagc	cggtcttgct	gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	6420
gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcgc	gcatgcccga	cggcgaggat	6480
ctcgtcgtga	cccatggcga	tgcctgcttg	ccgaatatca	tgggtggaaa	tggccgcttt	6540
tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	gtggcggacc	gctatcagga	catagcgttg	6600
gctacccgtg	atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	ctgaccgctt	cctcgtgctt	6660
tacggtatcg	ccgctcccga	ttcgcagcgc	atcgccctct	atcgccctct	tgacgagttc	6720
ttctgagcgg	gactctgggg	ttcgaaatga	ccgaccaagc	gacgcccac	ctgccatcac	6780
gagatttcga	ttccaccgcc	gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttccggg	6840
acgccggctg	gatgatectc	cagcgcgggg	atctcatgct	ggagtctctc	gcccacccca	6900
acttgtttat	tgcagcttat	aatgggtaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	6960
ataaagcatt	tttttactg	cattctagtt	gtggtttgct	caaactcatt	aatgtatctt	7020
atcatgtctg	tataccgtcg	acctctagct	agagcttggc	gtaatcatgg	tcatagctgt	7080
ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacia	catacgagcc	ggaagcataa	7140
agtgtaaagc	ctggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	7200
tgcccgcttt	ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	7260
cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgct	cttcgccttc	ctcgtcact	gactcgtgc	7320
gctcggctgt	tggctgcgg	cgagcggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	7380
ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	7440
ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	7500
atcacaaaaa	tcgacgtca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	ttaaagatacc	7560
aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	7620
gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgtgtga	7680
ggtatctcag	ttcgggtgtg	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	7740
ttcagcccca	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaaagc	7800
acgacttate	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	7860
gcgggtgtac	agagtctctg	aagtgggtgg	ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	7920
ttgggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	7980
ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	8040
gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggtct	gacgctcagt	8100
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	8160

agatcctttt aaatttaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt	8220
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	8280
gttcatccat agttgcctga ctecccgctg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac	8340
catctggccc cagtgtctga atgataccgc gagaccacgc ctcaccggct ccagatttat	8400
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg	8460
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	8520
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtagt gtcacgctcg tcgtttggta	8580
tggcttcatt cagctccggg tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	8640
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag	8700
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	8760
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	8820
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	8880
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	8940
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcactttta	9000
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa	9060
taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca	9120
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	9180
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtc	9227

<210>2

<211>8635

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X1GC/GEPO vector

<400>2

gacggatcgg gagatccatt ctccgcccc tggctgacta atttttttta tttatgcaga	60
ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg	120
cctaggtttt tgcaaaaagc tcccgggatg gttegaccat tgaactgcat cgtcgccgtg	180
tcccaaaata tggggattgg caagaacgga aacctaccct ggcctccgct caggaacgag	240
ttcaagtact tccaaagaat gaccacaacc tcttcagtgg aaggtaaaca gaatctggtg	300
attatgggta ggaaaacctg gtctctcatt cctgagaaga atcgaccttt aaaggacaga	360
attaatatag ttctcagtag agaactcaaa gaaccaccac gaggagctca ttttcttgcc	420
aaaagtttgg atgatgcctt aagacttatt gaacaaccgg aatttgcaag taaagtagac	480
atggttttga tagtcggagg cagttctgtt taccaggaag ccatgaatca accaggccac	540
ctcagactct ttgtgacaag gatcatgcag gaatttgaaa gtgacacgtt tttcccagaa	600
attgatttgg ggaaatataa acttctccca gaatacccag gcgtcctctc tgagggtccag	660

gaggaaaaag	gcatcaagta	taagtttgaa	gtctacgaga	agaaagacta	acaggttcga	720
aatgaccgac	caagegacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	780
ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgTTTT	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	840
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccaaacttg	tttattgcag	cttataatgg	900
ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaatTT	cacaaataaa	gcattTTTTT	cactgcattc	960
tagttgtggt	ttgtccaaac	tcataaatgt	atcttatcat	gtctgggata	tcccgatccc	1020
ctatggtgca	ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgcat	agttaagcca	gtatctgctc	1080
cctgcttggt	tggttgaggt	cgctgagtag	tgcgcgagca	aaatttaagc	tacaacaagg	1140
caaggcttga	ccgacaattg	catgaagaat	ctgcttaggg	ttaggcgttt	tgcgctgctt	1200
cgcgatgtac	gggccagata	tacgcgttga	cattgattat	tgactagtta	ttaatagtaa	1260
tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagcccc	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	1320
gtaaattggcc	cgcctggctg	accgccccac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	1380
tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	1440
cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	1500
gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	1560
tttctacttt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggt	gatgcggttt	1620
tggcagtaca	tcaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	1680
cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	1740
cgtacaact	ccgccccatt	gacgcaaattg	ggcggttaggc	gtgtacgggtg	ggaggtctat	1800
ataagcagag	ctctctggct	aactagagaa	cccactgctt	actggcttat	cgaatattaat	1860
acgactcact	ataggagagac	ccaagctggc	tagcgtttaa	acttaagctt	ggtaccgagc	1920
tcggatccac	tagtaacggc	cgccagtgtg	ctggaattct	gcagattcga	ggtcgacggt	1980
atcgataagc	ttccaagcgc	ggagatgggg	gtgcacgggtg	agtactcgcg	ggctgggcgc	2040
tccgccccgc	ccgggtccct	gtttgagcgg	ggatttagcg	ccccggctat	tggccaggag	2100
gtggctgggt	tcaaggaccg	gcgacttgtc	aaggaccccg	gaagggggag	gggggtgggg	2160
cagcctccac	gtgccagcgg	ggacttgggg	gagtccttgg	ggatggcaaa	aacctgacct	2220
gtgaagggga	cacagtttgg	gggttgaggg	gaagaagggt	tgggggttct	gctgtgccag	2280
tggagaggaa	gctgataagc	tgataacctg	ggcgctggag	ccaccactta	tctgccagag	2340
gggaagcctc	tgtcacacca	ggattgaagt	ttggccggag	aagtggatgc	tggtagctgg	2400
gggtgggggtg	tgcacacggc	agcaggattg	aatgaaggcc	agggaggcag	cacctgagtg	2460
cttgcatggt	tggggacagg	aaggacgagc	tggggcagag	acgtggggat	gaaggaagct	2520
gtccttccac	agccaccctt	ctccctcccc	gcctgactct	cagcctggct	atctgttcta	2580
gaatgtcctg	cctggctgtg	gtttctcctg	tccctgctgt	cgctccctct	gggcctccca	2640
gtcctgggcg	ccccaccacg	cctcatctgt	gacagccgag	tcctggagag	gtacctcttg	2700
gaggccaagg	aggccgagaa	tatacgggtg	agaccccttc	cccagcacat	tccacagaac	2760
tcacgctcag	ggcttcaggg	aactcctccc	agatccagga	acctggcact	tggtttaggg	2820
tggagttagg	aagctagaca	ctgccccctt	acataagaat	aagtctgggtg	gccccaaacc	2880
atacctggaa	actaggcaag	gagcaaagcc	agcagatcct	acggcctgtg	ggccagggcc	2940
agagccttca	gggacccttg	actccccggg	ctgtgtgcat	ttcagacggg	ctgtgctgaa	3000

cactgcagct	tgaatgagaa	tatcactgtc	ccagacacca	aagttaattt	ctatgcctgg	3060
aagaggatgg	aggtgagttc	cttttttttt	ttttttcctt	tcttttggag	aatctcattt	3120
gcgagcctga	ttttggatga	aagggagaat	gatcgaggga	aaggtaaaat	ggagcagcag	3180
agatgaggct	gcctgggcgc	agaggctcac	gtctataatc	ccaggctgag	atggccgaga	3240
tgggagaatt	gcttgagccc	tggagtttca	gaccaacctc	ggcagcatag	tgagatcccc	3300
catctctaca	aacattttaa	aaaattagtc	aggtgaagtg	gtgcatgggt	gtagtcccag	3360
atattttgaa	ggctgaggcg	ggaggatcgc	ttgagcccag	gaatttgagg	ctgcagttag	3420
ctgtgatcac	accactgcac	tccagcctca	gtgacagagt	gaggccctgt	ctcaaaaaag	3480
aaaagaaaaa	agaaaaataa	tgagggtgtg	atggaataca	ttcattattc	attcactcac	3540
tcactcactc	attcattcat	tcattcattc	aacaagtctt	attgcatacc	ttctgtttgc	3600
tcagcttggg	gcttggggct	gctgaggggc	aggagggaga	gggtgacatg	ggtcagctga	3660
ctcccagagt	ccactccctg	taggtcgggc	agcaggccgt	agaagtctgg	cagggcctgg	3720
ccctgctgtc	ggaagctgtc	ctgcggggcc	aggccctgtt	ggtcaactct	tcccagccgt	3780
gggagcccct	gcagctgcat	gtggataaag	ccgtcagtgg	ccttcgcagc	ctcaccactc	3840
tgcttcgggc	tctgggagcc	caggtgagta	ggagcggaca	cttctgcttg	ccctttctgt	3900
aagaagggga	gaagggtctt	gctaaggagt	acaggaactg	tccgtattcc	ttccctttct	3960
gtggcactgc	agcgacctcc	tgttttctcc	ttggcagaag	gaagccatct	cccctccaga	4020
tgcggcctca	gctgctccac	tccgaacaat	cactgctgac	actttccgca	aactcttccg	4080
agtctactcc	aatttccctc	ggggaaagct	gaagctgtac	acaggggagg	cctgcaggac	4140
aggggacaga	tgaccagctt	gatatcgaat	tatccatcac	actggcggcc	gctcgagtct	4200
agagggcccc	tttaaaccgc	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagttg	ccagccatct	4260
gttgttttgc	cctccccctg	gccttccctg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	4320
tcctaataaa	atgaggaaat	tgcacgcgat	tgtctgagta	ggtgtcattc	tattctgggg	4380
ggtgggggtg	ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	4440
gatgcggtgg	gctctatggc	ttctgaggcg	gaaagaacca	gctggggctc	tagggggtat	4500
ccccacgcgc	cctgtagcgg	cgcattaagc	gcggcgggtg	tgggtggttac	gcgcagcgtg	4560
accgctacac	ttgccagcgc	cctagcgccc	gctcctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	4620
gccacgttcg	ccggctttcc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	4680
tttagtgctt	tacggcacct	cgaccccaaa	aaacttgatt	aggggtgatg	ttcacgtagt	4740
gggccatcgc	cctgatagac	ggtttttcgc	cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	4800
agtggaactc	tgttccaaac	tggaacaaca	ctcaacccta	tctcgggtcta	ttcttttgat	4860
ttataaggga	ttttgccgat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttacaaaaaa	4920
tttaacgcga	attaattctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaaag	tcccagagct	4980
ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	5040
agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcactctcaat	tagtcagcaa	5100
ccatagtcce	gcccctaact	ccgcccatac	cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	5160
ctccgcccga	tggctgacta	atttttttta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctctgcct	5220
ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	tttttggagg	cctaggcttt	tgcaaaaaagc	5280
tcccgggagc	ttgtatatcc	attttcggat	ctgatcaaga	gacaggatga	ggatcgtttc	5340

gcatgattga	acaagatgga	ttgcacgcag	gttctccggc	cgcttgggtg	gagaggctat	5400
tcggtatga	ctgggcacaa	cagacaatcg	gctgctctga	tgccgccgtg	ttccggctgt	5460
cagcgcaggg	gcgcccgtt	ctttttgtca	agaccgacct	gtccgggtgcc	ctgaatgaac	5520
tgcaggacga	ggcagcgcgg	ctatcgtggc	tggccacgac	gggcgttcct	tgcgcagctg	5580
tgctcgacgt	tgctactgaa	gcgggaaggg	actggctgct	attgggcgaa	gtgccggggc	5640
aggatctcct	gtcatctcac	cttgcctcctg	ccgagaaagt	atccatcatg	gctgatgcaa	5700
tgcggcggct	gcatacgctt	gatecggcta	cctgcccatt	cgaccaccaa	gcgaaacatc	5760
gcatcgagcg	agcacgtact	cggatggaag	ccggtcttgt	cgatcaggat	gatctggacg	5820
aagagcatca	ggggctcgcg	ccagccgaac	tgttcgccag	gctcaaggcg	cgcatgcccg	5880
acggcgagga	tctcgtcgtg	acccatggcg	atgcctgctt	gccgaatatc	atggtggaaa	5940
atggccgctt	ttctggattc	atcgactgtg	gccggctggg	tgtggcggac	cgctatcagg	6000
acatagcggt	ggctacccgt	gatattgctg	aagagcttgg	cggcgaatgg	gctgaccgct	6060
tcctcgtgct	ttacggtatc	gccgctcccg	attcgcagcg	catcgccctc	tatcgccctc	6120
ttgacgagtt	cttctgagcg	ggactctggg	gttcgaaatg	accgaccaag	cgacgccccaa	6180
cctgccatca	cgagatttcg	attccaccgc	cgccctctat	gaaaggttgg	gcttcggaat	6240
cgttttccgg	gacgcggct	ggatgatcct	ccagcgcggg	gatctcatgc	tggagtctct	6300
cgcccccccc	aacttgttta	ttgcagctta	taatggttac	aaataaagca	atagcatcac	6360
aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	tgtggtttgt	ccaaactcat	6420
caatgtatct	tatcatgtct	gtataccgtc	gacctctagc	tagagcttgg	cgtaatcatg	6480
gtcatagctg	tttctgtgtg	gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	acatacgagc	6540
cggaagcata	aagtgtaaag	cctgggggtgc	ctaattgagt	agctaactca	cattaattgc	6600
gttgcgctca	ctgcccgctt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	6660
cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattgggcgc	tcttccgctt	cctcgtcac	6720
tgactcgctg	cgctcggctg	ttcggtcgcg	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcgg	6780
aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	6840
gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttccata	ggctccgccc	6900
ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	6960
ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttccgaccct	7020
gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	7080
ctcacgctgt	aggtatctca	gttcggtgta	ggctgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	7140
cgaaccccc	gttcagcccg	accgctgcgc	cttatccgg	aactatcgtc	ttgagtccaa	7200
cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	7260
gaggtatgta	ggcgggtgta	cagagtctct	gaagtgggtg	cctaactacg	gtacactag	7320
aagaacagta	tttgggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	7380
tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggt	ttttttgttt	gcaagcagca	7440
gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcccttg	atcttttcta	cggggtctga	7500
cgctcagttg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	7560
cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	7620
gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	7680

tctatttctgt	tcatecatag	ttgcctgact	ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	7740
gggcttacca	tctggcecca	gtgctgcaat	gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	7800
agattttatca	gcaataaacc	agccagccgg	aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	7860
tttatecgcc	tccatccagt	ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	7920
agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgtacaggc	atcgtggtgt	cacgctcgtc	7980
gtttggtatg	gcttcattca	gtccgggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	8040
catgtttgtgc	aaaaaagegg	ttagctcctt	cggctcctccg	atcgtttgtca	gaagtaagtt	8100
ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	8160
atccgtaaga	tgcttttctg	tgactggtga	gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	8220
tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	8280
cagaacttta	aaagtgtctca	tcattggaaa	acgttcttcg	gggcgaaaac	tctcaaggat	8340
cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	8400
atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaca	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	8460
aaagggaata	aggcgacac	ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	8520
ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	8580
aaataaacia	ataggggttc	cgcgcacatt	tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtc	8635

<210>3

<211>8657

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X3GC/GEPO vector

<400>3

gacggatcgg	gagatcccta	actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	60
taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	120
agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gctcccggga	tggttcgacc	180
attgaactgc	atcgtcgccg	tgtcccaaaa	tatggggatt	ggcaagaacg	gaaacctacc	240
ctggcctccg	ctcaggaacg	agttcaagta	cttccaaaga	atgaccacaa	cctcttcagt	300
ggaaggtaaa	cagaatctgg	tgattatggg	taggaaaacc	tggttctcca	ttcctgagaa	360
gaatcgacct	ttaaaggaca	gaattaatat	agttctcagt	agagaactca	aagaaccacc	420
acgaggagct	cattttcttg	ccaaaagttt	ggatgatgcc	ttaagactta	ttgaacaacc	480
ggaattggca	agtaaagtag	acatggtttg	gatagtcgga	ggcagttctg	tttaccagga	540
agccatgaat	caaccaggcc	acctcagact	ctttgtgaca	aggatcatgc	aggaatttga	600
aagtgcacag	tttttcccag	aaattgattt	ggggaaatat	aaacttctcc	cagaataccc	660
aggcgctctc	tctgagggtc	aggaggaaaa	aggcatcaag	tataagtttg	aagtctacga	720
gaagaaagac	taacagggtc	gaaatgaccg	accaagcgac	gccaacctg	ccatcacgag	780

atttcgattc	caccgcegcc	ttctatgaaa	ggttgggctt	cggaatcggt	ttccgggacg	840
ccggctggat	gatectccag	cgcggggate	tcatgctgga	gttcttcgcc	caccccaact	900
tgtttattgc	agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	catcaciaat	ttcaciaata	960
aagcattttt	ttactgcat	tctagtgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttate	1020
atgtctggga	tctcccgatc	ccctatgggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	1080
atagttaage	cagtatctgc	tccctgcttg	tgtgttggag	gtcgtgagt	agtgcgcgag	1140
caaaatttaa	gtacaacaa	ggcaaggctt	gaccgacaat	tgcataaga	atctgcttag	1200
ggttaggcgt	tttgcgctgc	ttcgcatgt	acgggccaga	tatacgcggt	gacattgatt	1260
attgactagt	tattaatagt	aatcaattac	ggggtcatta	gttcatagcc	catatatgga	1320
gttccgcgtt	acataactta	cggtaaattg	cccgcctggc	tgaccgcca	acgacccccg	1380
cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	ctttccattg	1440
acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgccacttgg	gcagtacatc	aagtgtatca	1500
tatgccaagt	acgcccccta	ttgacgtcaa	tgacggtaaa	tggcccgctt	ggcattatgc	1560
ccagtacatg	accttatggg	actttcctac	ttggcagtac	atctacgtat	tagtcatcgc	1620
tattaccatg	gtgatgcggt	tttggcagta	catcaatggg	cgtggatagc	ggtttgactc	1680
acggggattt	ccaagtctcc	acccatttga	cgtcaatggg	agtttgtttt	ggcaccaaaa	1740
tcaacgggac	tttccaaaat	gtcgtaacaa	ctccgcccc	ttgacgcaaa	tgggcggtag	1800
gcgtgtacgg	tgggaggtct	atataagcag	agctctctgg	ctaactagag	aaccactgc	1860
ttactggctt	atcgaaatta	atacgactca	ctataggag	acccaagctg	gctagcgttt	1920
aaacttaage	ttggtaccga	gtcggatcc	actagtaacg	gccgccagtg	tgctggaatt	1980
ctgcagattc	gaggtegacg	gtatcgataa	gcttccaggc	gcggagatgg	gggtgcacgg	2040
tgagtactcg	cgggctgggc	gtccccgcc	gcccgggtcc	ctgtttgagc	ggggatttag	2100
cggcccggt	attggccagg	aggtggctgg	gttcaaggac	cggcgacttg	tcaaggaccc	2160
cgggaagggg	aggggggtgg	ggcagcctcc	acgtgccagc	ggggacttgg	gggagtcctt	2220
ggggatggca	aaaacctgac	ctgtgaagg	gacacagttt	gggggttgag	gggaagaagg	2280
tttgggggtt	ctgctgtgcc	agtggagagg	aagctgataa	gctgataacc	tgggcgctgg	2340
agccaccact	tatctgccag	agggaagcc	tctgtcacac	caggattgaa	gtttggccgg	2400
agaagtggat	gctggtagct	gggggtgggg	tgtgcacacg	gcagcaggat	tgaatgaagg	2460
ccagggaggc	agcacctgag	tgcttgcatg	gttggggaca	ggaaggacga	gctggggcag	2520
agacgtgggg	atgaaggaag	ctgtccttcc	acagccaccc	ttctccctcc	ccgcctgact	2580
ctcagcctgg	ctatctgttc	tagaatgtcc	tgcttgctg	tggcttctcc	tgtccctgct	2640
gtcgtccct	ctgggcctcc	cagtcctggg	cgccccacca	cgctcatct	gtgacagccg	2700
agtcctggag	aggtacctct	tggaggccaa	ggaggccgag	aatatcacgg	tgagaccctt	2760
tccccagcac	attccacaga	actcacgtc	agggttcag	ggaactcctc	ccagatccag	2820
gaacctggca	cttggtttag	ggtggagtig	ggaagctaga	cactgcccc	ctacataaga	2880
ataagtctgg	tggccccaaa	ccatacctgg	aaactaggca	aggagcaaa	ccagcagatc	2940
ctacggcctg	tgggccagg	ccagagcctt	cagggaccct	tgactccccg	ggctgtgtgc	3000
atttcagacg	ggctgtgctg	aacactgcag	cttgaatgag	aatatcactg	tcccagacac	3060
caaagttaat	ttctatgcct	ggaagaggat	ggaggtgagt	tccttttttt	ttttttttcc	3120

tttcttttgg	agaatctcat	ttgcgagcct	gatttttggat	gaaagggaga	atgatcgagg	3180
gaaaggtaaa	atggagcagc	agagatgagg	ctgcctgggc	gcagaggctc	acgtctataa	3240
tcccaggctg	agatggccga	gatgggagaa	ttgcttgagc	cctggagttt	cagaccaacc	3300
taggcagcat	agtgagatec	cccattctcta	caaacattta	aaaaaattag	tcaggtgaag	3360
tggtgcatgg	tggtagtccc	agatatattg	aaggctgagg	cgggaggatc	gcttgagccc	3420
aggaatttga	ggctgcagtg	agctgtgate	acaccactgc	actccagcct	cagtgcacaga	3480
gtgaggccct	gtctcaaaaa	agaaaagaaa	aaagaaaaat	aatgaggggct	gtatggaata	3540
cattcattat	tcattcactc	actcactcac	tcattcattc	attcattcat	tcaacaagtc	3600
ttattgcata	ccttctgttt	gctcagcttg	gtgcttgggg	ctgctgaggg	gcaggaggga	3660
gagggtgaca	tgggtcagct	gactcccaga	gtccactccc	tgtagggtcgg	gcagcaggcc	3720
gtagaagtct	ggcagggcct	ggccctgctg	tcggaagctg	tcctgcgggg	ccaggccctg	3780
ttggtcaact	cttcccagcc	gtgggagccc	ctgcagctgc	atgtggataa	agccgtcagt	3840
ggccttcgca	gcctcaccac	tctgcttcgg	gctctgggag	cccagggtgag	taggagcgga	3900
cacttctgct	tgccctttct	gtaagaaggg	gagaagggtc	ttgctaagga	gtacaggaac	3960
tgtccgtatt	ccttcccttt	ctgtggcact	gcagcgacct	cctgttttct	ccttggcaga	4020
aggaagccat	ctcccctcca	gatgcggcct	cagctgctcc	actccgaaca	atcactgctg	4080
acactttccg	caaactcttc	cgagtctact	ccaatttcct	ccggggaaag	ctgaagctgt	4140
acacagggga	ggcctgcagg	acaggggaca	gatgaccagc	ttgatatcga	attatccatc	4200
acactggcgg	ccgctcgagt	ctagaggggc	cgtttaaac	cgtgatcag	cctcgactgt	4260
gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	cccccccc	gtgccttcct	tgacctgga	4320
aggtgccact	cccactgtcc	tttctaata	aaatgaggaa	attgcatcgc	attgtctgag	4380
taggtgtcat	tctattcttg	ggggtgggg	ggggcaggac	agcaaggggg	aggattggga	4440
agacaatagc	aggcatgctg	gggatgcggt	gggtcttatg	gcttctgagg	cggaaagaac	4500
cagctggggc	tctaggggg	atccccacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	4560
tgtggtgggt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	4620
cgttttcttc	ccttcccttc	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	4680
ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgaccca	aaaaacttga	4740
ttaggggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	4800
gttgaggtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaaccc	4860
tatctcggtc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccg	atttcggcct	attggttaaa	4920
aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattaattc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	4980
gggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctcaat	5040
tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	5100
atgcatctca	attagtgcgc	aaccatagtc	ccgccccctaa	ctccgccccat	cccgccctta	5160
actccgcccc	gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	5220
gaggccgagg	ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttgga	5280
ggcctagget	tttgcaaaaa	gtccccggga	gcttgatat	ccatttttcgg	atctgatcaa	5340
gagacaggat	gaggatcggt	tcgcatgatt	gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	5400
gccgcttggg	tggagaggct	attcggtctat	gactgggcac	aacagacaat	cggtctctct	5460

gatgccgccc	tgttccggct	gtcagcgcag	gggcgcccgg	ttctttttgt	caagaccgac	5520
ctgtccggtg	ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	5580
acgggcgttc	cttgcgcagc	tgtgctcgac	gttgtcactg	aagcgggaag	ggactggctg	5640
ctattgggcg	aagtgcgggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	5700
gtatccatca	tggtgatgc	aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccc	5760
ttcgaccacc	aagcgaaaca	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	agccggtctt	5820
gtcgatcagg	atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	5880
aggctcaagg	cgcgcgatgc	cgacggcgag	gatctcgctg	tgacccatgg	cgatgcctgc	5940
ttgccgaata	tcatggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	tcatcgactg	tggccggctg	6000
ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	6060
ggcggcgaat	gggctgaccg	cttctcgtg	ctttacggta	tcgccgctcc	cgattcgcag	6120
cgcategcct	tctatgcct	tcttgacgag	ttcttctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	6180
tgaccgacca	agcgacgccc	aacctgccat	cacgagatit	cgattccacc	gccgccttct	6240
atgaaagggt	gggcttcgga	atcgttttcc	gggacgccgg	ctggatgatc	ctccagcgcg	6300
gggatctcat	gctggagttc	ttcgcccacc	ccaacttggt	tattgcagct	tataatggtt	6360
acaaataaag	caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atttttttca	ctgcattcta	6420
gttgttggtt	gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	tcgacctcta	6480
gctagagctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	tatccgctca	6540
caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaattgag	6600
tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	6660
cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	6720
gctcttccgc	ttctcgcctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	cggcgagcgg	6780
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	6840
agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	6900
cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	6960
ggtggcgaaa	cccagacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	7020
tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	7080
gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	taggtcgttc	7140
gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	7200
gtaactatcg	tcttgagtcc	aacctggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	7260
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	ttgaagtggg	7320
ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	7380
ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	7440
gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	7500
tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	7560
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaataa	tgaagtttta	7620
aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaacct	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	7680
aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgctg	7740
tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgcctgca	atgataccgc	7800

gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg	7860
agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg	7920
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag	7980
gcategtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggtttcatt cagctccggt tcccaacgat	8040
caaggcgagt tacatgatec cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc	8100
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc	8160
ataattctct tactgtcatg ccatecgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa	8220
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac	8280
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt	8340
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc	8400
gtgcacccaa ctgatcttca gcattcttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa	8460
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca	8520
tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	8580
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa	8640
aagtgccacc tgacgtc	8657

<210>4

<211>8691

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x6GC/GEPO vector

<400>4

gacggatcgg gagatcccat agtcccgcgc ctaactccgc ccatcccgcc cctaactccg	60
cccagttccg cccattctcc gcccattggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc	120
gaggccgcct ctgcctctga gctattccag aagtagtgag gaggtttttt tggaggccta	180
ggctttttgca aaaagctccc gggatggttc gaccattgaa ctgcatcgtc gccgtgtccc	240
aaaatatggg gattggcaag aacggaaacc taccctggcc tccgctcagg aacgagttca	300
agtacttcca aagaatgacc acaacctctt cagtggaaagg taaacagaat ctggtgatta	360
tgggtaggaa aacctggttc tccattcctg agaagaatcg acctttaaaag gacagaatta	420
atatagtctt cagtagagaa ctcaaagaac caccacgagg agctcatttt cttgccaaaa	480
gtttggatga tgccttaaga cttattgaac aaccggaatt ggcaagtaaa gtagacatgg	540
tttggatagt cggaggcagt tctgtttacc aggaagccat gaatcaacca ggccacctca	600
gactctttgt gacaaggatc atgcaggaat ttgaaagtga cacgtttttc ccagaaattg	660
atttggggaa atataaactt ctcccagaat acccaggcgt cctctctgag gtccaggagg	720
aaaaaggcat caagtataag ttigaagtct acgagaagaa agactaacag gttcgaaatg	780
accgaccaag cgacgcccaa cctgccatca cgagatttcg attccaccgc cgcttctat	840

gaaaggttgg gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgacct ccagcgcggg	900
gatctcatgc tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac	960
aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt	1020
tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gggatctccc gatccccat	1080
ggtgcactct cagtacaatc tgcctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg	1140
cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag	1200
gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg	1260
atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaataca	1320
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa	1380
atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg	1440
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt	1500
aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtagccc cctattgacg	1560
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta tgggactttc	1620
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgtattac catggtgatg cggttttggc	1680
agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca	1740
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta	1800
acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa	1860
gcagagctct ctggctaact agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga	1920
ctcactatag ggagacccaa gctggctagc gtttaaactt aagcttggtta ccgagctcgg	1980
atccactagt aacggccgcc agtgtgctgg aattctgcag attcgaggtc gacggtatcg	2040
ataagcttcc aagcgcggag atgggggtgc acggtgagta ctgcgggct gggcgctccc	2100
gcccgcggg gtcctgttt gagcggggat ttagcgcccc ggctattggc caggaggtgg	2160
ctgggttcaa ggaccggcga cttgtcaagg accccggaag ggggaggggg gtggggcagc	2220
ctccacgtgc cagcggggac ttgggggagt ccttggggat ggcaaaaacc tgacctgtga	2280
aggggacaca gtttgggggt tgagggaag aaggtttggg ggttctgctg tgccagtgga	2340
gaggaagctg ataagctgat aacctgggcg ctggagccac cacttatctg ccagagggga	2400
agcctctgtc acaccaggat tgaagtttg ccggagaagt ggatgctggt agctgggggt	2460
ggggtgtgca cacggcagca ggattgaatg aaggccaggg aggcagcacc tgagtgttg	2520
catggttggg gacaggaagg acgagctggg gcagagacgt ggggatgaag gaagctgtcc	2580
ttccacagcc acccttctcc ctccccgct gactctcagc ctggctatct gttctagaat	2640
gtcctgcctg gctgtggctt ctctgtccc tgctgtcgct ccctctgggc ctcccagtcc	2700
tgggcgcccc accacgcctc atctgtgaca gccgagtcct ggagaggtag ctcttgagg	2760
ccaaggaggc cgagaatata acggtgagac cccttcccc gcacattcca cagaactcac	2820
gctcagggtc tcagggaact cctcccagat ccaggaacct ggcacttggg ttagggtaga	2880
gttgggaagc tagacactgc cccctacat aagaataagt ctggtggccc caaaccatac	2940
ctggaaacta ggcaaggagc aaagccagca gatcctacgg cctgtgggcc agggccagag	3000
ccctcaggga cccttgactc cccgggctgt gtgcatttca gacgggctgt gctgaacact	3060
gcagcttgaa tgagaatata actgtccag acaccaaggt taatttctat gcctggaaga	3120
ggatggaggt gagttccttt ttttttttt ttcctttctt ttggagaatc tcatttgcga	3180

gcctgatttt	ggatgaaagg	gagaatgate	gagggaaagg	taaaatggag	cagcagagat	3240
gaggctgcct	gggcgcagag	gtcacgtct	ataatcccag	gctgagatgg	ccgagatggg	3300
agaattgctt	gagccctgga	gtttcagacc	aacctaggca	gcatagttag	atcccccatc	3360
tctacaaaca	tttaaaaaaa	ttagtcaggt	gaagtgggtc	atgggtggtag	tcccagatat	3420
ttggaaggct	gaggcgggag	gategcttga	gcccaggaat	ttgaggctgc	agttagctgt	3480
gatcacacca	ctgcactcca	gcctcagtga	cagagttagg	ccctgtctca	aaaaagaaaa	3540
gaaaaaagaa	aaataatgag	ggctgtatgg	aatacattca	ttattcattc	actcactcac	3600
tcactcattc	attcattcat	tcattcaaca	agtcttattg	cataccttct	gtttgctcag	3660
cttgggtgctt	ggggctgctg	aggggcagga	gggagagggt	gacatgggtc	agctgactcc	3720
cagagtccac	tccctgtagg	tcgggcagca	ggccgtagaa	gtctggcagg	gcctggccct	3780
gctgtcggaa	gctgtcctgc	ggggccaggc	cctgttggtc	aactcttccc	agccgtggga	3840
gccctgcag	ctgcatgtgg	ataaagccgt	cagtggcctt	cgcagcctca	ccactctgct	3900
tcgggctctg	ggagcccagg	tgagtaggag	cggacacttc	tgcttgccct	ttctgtaaga	3960
aggggagaag	ggtcttgcta	aggagtacag	gaactgtccg	tattccttcc	ctttctgtgg	4020
cactgcagcg	acctcctgtt	ttctccttgg	cagaaggaag	ccatctcccc	tccagatgcg	4080
gcctcagctg	ctccactccg	aacaatcact	gctgacactt	tccgcaaact	cttccgagtc	4140
tactccaatt	tcctccgggg	aaagctgaag	ctgtacacag	gggaggcctg	caggacaggg	4200
gacagatgac	cagcttgata	tcgaattatc	catcacactg	gcggccgctc	gagtctagag	4260
ggcccgttta	aaccgcgtga	tcagcctcga	ctgtgccttc	tagttgccag	ccatctgttg	4320
tttgcccctc	ccccgtgcct	tccttgacct	tggaaagggtc	cactcccact	gtcctttcct	4380
aataaaatga	ggaaattgca	tcgcattgtc	tgagtaggtg	tcattctatt	ctgggggggtg	4440
gggtggggca	ggacagcaag	ggggaggatt	gggaagacaa	tagcaggcat	gctgggggatg	4500
cgggtgggctc	tatggcttct	gaggcggaaa	gaaccagctg	gggctctagg	gggtatcccc	4560
acgcgccctg	tagcggcgca	ttaagcgcgg	cgggtgtggt	ggttacgcgc	agcgtgaccg	4620
ctacacttgc	cagcgcctta	gcgcccgcctc	ctttcgcttt	cttcccttcc	tttctcgcca	4680
cgttcgccgg	ctttccccgt	caagctctaa	atcgggggct	cccttttaggg	ttccgattta	4740
gtgcttttacg	gcacctcgac	cccaaaaaac	ttgattaggg	tgatggttca	cgtagtgggc	4800
catcgccctg	atagacgggt	tttcgccctt	tgacgttggg	gtccacgttc	tttaatagtg	4860
gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	ggtctattct	tttgatttat	4920
aagggatattt	gccgatttcg	gcctattggg	taaaaaatga	gctgatttaa	caaaaattta	4980
acgcgaatta	attctgtgga	atgtgtgtca	gttaggggtg	ggaaagtccc	caggctcccc	5040
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtag	gcaaccagg	gtggaaagtc	5100
cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	5160
agtcgccccc	ctaactccgc	ccatcccgc	cctaactccg	cccagttccg	ccattctctc	5220
gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	ctgcctctga	5280
gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	tggaggccta	ggctttttgca	aaaagctccc	5340
gggagcttgt	atatccattt	tcggatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcac	5400
gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	5460
ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	5520

gcaggggcgc	ccggttcctt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	5580
ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	5640
cgacgttgte	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	5700
tctcctgtca	tctaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	5760
gcggctgcat	acgcttgatc	cggtacctg	cccatcgac	caccaagcga	aacatcgcat	5820
cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	tcttgctgat	caggatgac	tggacgaaga	5880
gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgcagg	5940
cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	6000
ccgcttttct	ggattcctcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	6060
agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	6120
cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatc	gcagcgcac	gccttctatc	gccttcttga	6180
cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtc	gaaatgaccg	accaagcgac	gccccacctg	6240
ccatcacgag	atttcgattc	caccgcgcgc	ttctatgaaa	ggttgggctt	cggaatcggt	6300
ttccgggacg	ccggctggat	gacctccag	cgcggggatc	tcatgctgga	gttcttcgcc	6360
cacccaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttacaat	aaagcaatag	catcacaat	6420
ttcacaata	aagcattttt	ttactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	6480
gtatcttate	atgtctgtat	accgtcgacc	tctagctaga	gcttggcgta	atcatggtca	6540
tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaatc	cacacaacat	acgagccgga	6600
agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagtgagct	aactcacatt	aattgcgttg	6660
cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	6720
caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgcgtatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	6780
tcgctgcgct	cggctgttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggtaata	6840
cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	6900
aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	tccataggct	ccgccccct	6960
gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagagggtgc	gaaacccgac	aggactataa	7020
agataccagg	cgtttccccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	7080
cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	7140
cgtgttaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	7200
cccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	7260
gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	7320
tatgtaggcg	gtgtacaga	gttcttgaag	tgggtgccta	actacggcta	cactagaaga	7380
acagtatttg	gtatctgcgc	tctgttgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	7440
tcttgatccg	gcaaacaac	caccgtgggt	agcggttttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	7500
acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	7560
cagtgaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggtcatga	gattatcaaa	aaggatcttc	7620
acctagatcc	ttttaaat	aaaatgaagt	tttaaatcaa	tctaaagtat	atatgagtaa	7680
acttggctctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	gatctgtcta	7740
tttcgttcat	ccatagtctg	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	acgggagggc	7800
ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	ggctccagat	7860

ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtgggtcc	tgcaacttta	7920
tccgcctcca	tccagtctat	taattgtttg	cgggaagcta	gagtaagtag	ttcgccagtt	7980
aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tggtgtcacg	ctcgtcgttt	8040
ggtatggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	atcccccatg	8100
ttgtgcaaaa	aagcggttag	ctccttcggg	cctccgatcg	ttgtcagaag	taagttggcc	8160
gcagtgttat	cactcatggg	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	catgccatcc	8220
gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtag	tcaaccaagt	cattctgaga	atagtgtatg	8280
cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgta	atacgggata	ataccgcgcc	acatagcaga	8340
actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	aaggatctta	8400
ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacce	actcgtgcac	ccaactgatc	ttcagcatct	8460
tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	cgcaaaaaag	8520
ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcatactct	tcctttttca	atattattga	8580
agcattttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	8640
aaacaaatag	gggttcgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	c	8691

<210>5

<211>7022

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X0GC/dhfr vector

<400>5

gacggatcgg	gagatccgac	atgataagat	acattgatga	gtttggacaa	accacaacta	60
gaatgcagtg	aaaaaaatgc	tttattttgtg	aaattttgtga	tgctatttgct	ttattttgtaa	120
ccattataag	ctgcaataaa	caagttaaca	acaacaattg	cattcatttt	atgtttcagg	180
ttcaggggga	ggtgtgggag	gttttttaaa	gcaagtaaaa	cctctacaaa	tggtgtatgg	240
ctgattatga	tctctagtca	aggcactata	catcaaatat	tccttattaa	cccccttaca	300
aattaaaaag	ctaaaggtac	acaatttttg	agcatagtta	ttaatagcag	acactctatg	360
cctgtgtgga	gtaagaaaaa	acagtatgtt	atgattataa	ctgttatgcc	tacttataaa	420
ggttacagaa	tatttttcca	taattttctt	gtatagcagt	gcagcttttt	cctttgtggt	480
gtaaataagca	aagcaagcaa	gagttctatt	actaaacaca	gcatgactca	aaaaacttag	540
caattctgaa	ggaaagtcct	tggggctctc	tacctttctc	ttcttttttg	gaggagtaga	600
atgtttgagag	tcagcagtag	cctcatcacc	actagatggc	atttcttctg	agcaaaacag	660
gttttctca	ttaaaggcat	tccaccactg	ctcccatcca	tcagttccat	aggttgggaat	720
ctaaaataca	caaacaatta	gaatcagtag	tttaacacat	tatacactta	aaaattttat	780
atttacctta	gagcttttaa	tctctgtagg	tagtttgtcc	aattatgtca	caccacagaa	840
gtaaggttcc	ttcacaagaa	tccaaagcca	gcaaaagtcc	catgggtctta	taaaaatgca	900
tagcttttagg	aggggagcag	agaacttgaa	agcatcttcc	tgtagtctt	tcttctcgta	960

gacttcaaac ttataacttga tgcctttttc ctcctggacc tcagagagga cgcctgggta	1020
ttctgggaga agttttatatt tccccaaatc aatttctggg aaaaacgtgt cactttcaaa	1080
ttcctgcatg atccttgtca caaagagtct gaggtggcct ggttgattca tggcttcctg	1140
gtaaacagaa ctgcctccga ctatccaaac catgtctact ttacttgcca attccggttg	1200
ttcaataagt ctttaaggcat cateccaaact tttggcaaga aaatgagctc ctcgtgggtg	1260
ttctttgagt tctctactga gaactatatt aattctgtcc tttaaaggte gattcttctc	1320
aggaatggag aaccagggtt tectacccat aatcaccaga ttctgtttac cttccactga	1380
agaggttgtg gtcattcttt ggaagtactt gaactcgttc ctgagcggag gccagggtag	1440
gtctccgttc ttgccaatcc ccatattttg ggacacggcg acgatgcagt tcaatggtcg	1500
aaccatgatg gcagcgggga taaaatccta ccagccttca cgctaggatt gccgtcaagt	1560
ttggcgcgaa atcgcagccc tgagctgtgg atctcccgat cccctatggg gcactctcag	1620
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtatctg ctccctgctt gtgtgttga	1680
ggtcgctgag tagtgcgcgga gcaaaattta agctacaaca aggcaaggct tgaccgacaa	1740
ttgcatgaag aatctgctta gggttaggcg ttttgcgctg cttcgcatg tacgggccag	1800
atatacgctg tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt	1860
agttcatagc ccatatatgg agttcccgct tacataactt acggtaaatg gccgcctgg	1920
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac	1980
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt	2040
ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa	2100
atggccccgc tggcattatg ccagtlacat gacctatgg gactttccta cttggcagta	2160
catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg	2220
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg	2280
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc	2340
attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggte tatataagca gagctctctg	2400
gctaactaga gaaccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga	2460
gacccaagct tgggtaccgag ctcggtacca ctagtaacgg ccgccagtg gctggaattc	2520
tgcagatata catcacactg gcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc ctattctata	2580
gtgtcaccta aatgctagag ctgctgate agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc	2640
atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctcccactgt	2700
cctttcctaa taaaatgagg aaattgcate gcattgtctg agtaggtgtc attctattct	2760
gggggggtgg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc	2820
tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcgaaaga accagctggg gctctagggg	2880
gtatccccac gcgccctgta gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag	2940
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gccgcctcct ttcgctttct tcccttcctt	3000
tctcgccacg ttcgccggct tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt	3060
ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg	3120
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt	3180
taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt	3240
tgattttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca	3300

aaaatttaac	gcgaattaat	tctgtggaat	gtgtgtcagt	taggggtgtgg	aaagtcccca	3360
ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccaggtgt	3420
ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	3480
gcaaccatag	tcccgccect	aactecgccc	atcccgccecc	taactccgcc	cagttccgcc	3540
cattctccgc	cccatggctg	actaatTTTT	tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctct	3600
gcctctgagc	tattccagaa	gtagttagga	ggctTTTTtg	gaggcctagg	cttttgcaaa	3660
aagctcccgg	gagcttgtat	atccattttc	ggatctgata	aagagacagg	atgaggatcg	3720
tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	3780
ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	ctgatccgc	cgtgttccgg	3840
ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttctTTTT	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	3900
gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca	3960
gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	tgtatttggg	cgaagtgccg	4020
gggcaggatc	tcctgtcacc	tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	4080
gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaag	4140
catcgcatcg	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	4200
gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	4260
cccgcggcgc	aggatctcgt	cgtgacctat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	4320
gaaaatggcc	gcttttcttg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	4380
caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	4440
cgttctctcg	tgttttacgg	tatcgccgct	cccgatccgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	4500
cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	4560
ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	4620
gaatcgTTTT	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	4680
tcttcgcccc	ccccaaattg	tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	4740
tcacaaatTT	cacaaataaa	gcattTTTT	cactgcattc	tagttgttgt	ttgtccaaac	4800
tcataaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	cgtcgacctc	tagctagagc	ttggcgtaat	4860
catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	4920
gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaata	agttagctaa	ctcacattaa	4980
ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	5040
gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtatttg	gcgctcttcc	gcttctcgc	5100
tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaaagg	5160
cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	5220
gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggtccc	5280
gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gagggtggcg	aacccgacag	5340
gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	5400
ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgctg	gcgtttctc	5460
atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggctgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	5520
tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaactat	cgtcttgagt	5580
ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	5640

gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca	5700
ctagaagaac agtattttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag	5760
ttggtagctc ttgatecggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca	5820
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg	5880
ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa	5940
aaaggatctt cacctagatc cttttaaat taaaatgaag ttttaaatca atctaaagta	6000
tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag	6060
cgatctgtct atttcgttca tccatagtgt cctgactccc cgctcgtgtg ataactacga	6120
tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac	6180
cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc	6240
ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta	6300
gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac	6360
gctcgtcgtt tggtaggtc tcatcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat	6420
gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa	6480
gtaagtggc cgcagtgtta tcatcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg	6540
tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag	6600
aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc	6660
cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct	6720
caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat	6780
cttcagcate ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg	6840
ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc	6900
aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta	6960
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg	7020
tc	7022

<210>6

<211>6422

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X1GC/dhfr vector

<400>6

gacggatcgg gagatccatt ctccgcccc tggctgacta atttttttta tttatgcaga	60
ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg	120
cctaggtttt tgcaaaaagc tcccgggatg gttcgaccat tgaactgcat cgtcgccgtg	180
tcccaaaaata tggggatttg caagaacgga aacctaccct ggccctccgt caggaacgag	240
ttcaagtact tccaaagaat gaccacaacc tcttcagtgg aaggtaaaca gaatctgggtg	300

attatgggta	ggaaaacctg	gttctccatt	cctgagaaga	atcgaccttt	aaaggacaga	360
attaatatag	ttctcagtag	agaactcaaa	gaaccaccac	gaggagctca	ttttcttgcc	420
aaaagtttgg	atgatgcctt	aagacttatt	gaacaaccgg	aattggcaag	taaagtagac	480
atggttttga	tagtcggagg	cagttctgtt	taccaggaag	ccatgaatca	accaggccac	540
ctcagactct	ttgtgacaag	gatcatgcag	gaatttgaaa	gtgacacggt	tttcccagaa	600
attgattttg	ggaaatataa	acttctccca	gaatacccag	gcgtcctctc	tgagggtccag	660
gaggaaaaag	gcatcaagta	taagtttgaa	gtctacgaga	agaaagacta	acagggttcga	720
aatgaccgac	caagecgacg	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	780
ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	840
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccacttgg	tttattgcag	cttataatgg	900
ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	960
tagtttgtgt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	gtctgggata	tcccgatccc	1020
ctatggtgca	ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgcat	agttaagcca	gtatctgctc	1080
cctgcttggt	tgttggaggt	cgctgagtag	tgcgcgagca	aaatttaagc	tacaacaagg	1140
caaggcttga	ccgacaattg	catgaagaat	ctgcttaggg	ttaggcgttt	tgcgctgctt	1200
cgcgatgtac	gggccagata	tacgcgttga	cattgattat	tgactagtta	ttaatagtaa	1260
tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	1320
gtaaatggcc	cgcctggctg	accgccccac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	1380
tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	1440
cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	1500
gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	1560
tttctacttt	ggcagtagat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggt	gatgcggttt	1620
tggcagtaca	tcaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	1680
cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	caccaaatac	aacgggactt	tccaaaatgt	1740
cgtacaactc	ccgccccatt	gacgcaaata	ggcggttagc	gtgtacgggt	ggagggtctat	1800
ataagcagag	ctctctggct	aactagagaa	cccactgctt	actggcttat	cgaatattaat	1860
acgactcact	ataggagagc	ccaagctggc	tagcgtttaa	acttaagctt	ggtaccgagc	1920
tcggatccac	tagtccagtg	tgggtggaatt	ctgcagatat	ccagcacagt	ggcggccgct	1980
cgagtctaga	gggcccgttt	aaaccgcgtg	atcagcctcg	actgtgcctt	ctagttgcca	2040
gccatctgtt	gtttgccccct	cccccgctgc	ttccttgacc	ctggaagggt	ccactcccac	2100
tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	atcgcatgtg	ctgagtaggt	gtcattctat	2160
tctggggggg	ggggtggggc	aggacagcaa	gggggaggat	tgggaagaca	atagcaggca	2220
tgttggggat	gcggtgggct	ctatggcttc	tgaggcgga	agaaccagct	ggggctctag	2280
gggggtatccc	cacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	2340
cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgccct	agcgcccgct	cctttcgctt	tcttcccttc	2400
ctttctcgcc	acgttcgccc	gctttccccg	tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	2460
gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatgggtc	2520
acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacggt	2580
ctttaatagt	ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccttatct	cgggtctatc	2640

ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta	2700
acaaaaattt aacgcgaatt aattctgttg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc	2760
ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg	2820
tgtggaaagt ccccaggctc cccagcagge agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag	2880
tcagcaacca tagtcccgc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc	2940
gccattctc cgccecatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc	3000
tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc	3060
aaaaagctcc cgggagcttg tatatccatt ttcggatctg atcaagagac aggatgagga	3120
tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag	3180
aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggtc gctctgatgc cgccgtgttc	3240
cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg	3300
aatgaactgc aggacgagge agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc	3360
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg	3420
ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct	3480
gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg	3540
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat	3600
ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc	3660
atgcccagcg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg	3720
gtggaaaatg gccgcttttc tggattcacc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc	3780
tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct	3840
gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat	3900
cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgaaatgacc gaccaagcga	3960
cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct	4020
tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg	4080
agttcttcgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata	4140
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttactgca ttctagttgt ggtttgtcca	4200
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac ctctagctag agcttggcgt	4260
aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaaat ccacacaaca	4320
tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat	4380
taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt	4440
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcc	4500
cgtcactga ctgcctgcgc tcggctgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa	4560
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	4620
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccatagge	4680
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgga	4740
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	4800
cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt	4860
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	4920
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg	4980

agtccaaccc ggtaagacac gacttategc cactggcagc agccactggt aacaggatta	5040
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtaggcct aactacggct	5100
acactagaag aacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	5160
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggttttt tttgtttgca	5220
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg	5280
ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcattg agattatcaa	5340
aaaggatctt cacctagatc ctttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta	5400
tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag	5460
cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctcgtgtag ataactacga	5520
tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac	5580
cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc	5640
ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccggaagct agagtaagta	5700
gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgtcac	5760
gctcgtcgtt tggtaggtct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat	5820
gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgacg gttgtcagaa	5880
gtaagttagc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg	5940
tcattgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtagagta ctcaaccaag tcattctgag	6000
aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc aatacgggat aataccgcgc	6060
cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct	6120
caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat	6180
cttcagcate ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg	6240
ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc	6300
aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta	6360
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg	6420
tc	6422

<210>7

<211>1572

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x0GC/dhfr cassette

<400>7

gacatgataa gatacattga tgagtttggc caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa	60
tgcttttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat	120
aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg	180
gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aatgttggtg ttgctgatta tgatctctag	240

tcaaggcact atacatcaaa tattccttat taaccctttt acaaattaaa aagctaaagg	300
tacacaatttt ttgagcatag ttattaatag cagacactct atgcctgtgt ggagtaagaa	360
aaaacagtat gttatgatta taactgttat gcctacttat aaaggttaca gaatattttt	420
ccataatttt cttgtatage agtgcagctt tttcctttgt ggtgtaaata gcaaagcaag	480
caagagttct attactaaac acagcatgac tcaaaaaact tagcaattct gaaggaaagt	540
ccttgggggc ttctaccttt ctctcttttt ttggaggagt agaattgtga gagtcagcag	600
tagcctcate atcactagat ggcatttctt ctgagcaaaa caggttttcc tcattaaagg	660
cattccacca ctgctcccat tcatcagttc cataggttgg aatctaaaat acacaaacaa	720
ttagaatcag tagtttaaca cattatacac ttaaaaattt tatatttacc ttagagcttt	780
aaatctctgt aggtagtttg tccaattatg tcacaccaca gaagtaagg tccctcacia	840
agatccaaag ccagcaaaag tcccatgggc ttataaaaat gcatagcttt aggaggggag	900
cagagaactt gaaagcatct tctgttagt ctttcttctc gtagacttca aacttatact	960
tgatgccttt ttcctcctgg acctcagaga ggacgcctgg gtattctggg agaagtttat	1020
atttcccaa atcaatttct gggaaaaacg tgtcactttc aaattcctgc atgatcctg	1080
tcacaaagag tctgaggtgg cctggttgat tcatggcttc ctggtaaaca gaactgcctc	1140
cgactatcca aaccatgtct actttacttg ccaattccgg ttgttcaata agtcttaagg	1200
catcatcaa acttttggca agaaaatgag ctctcgtgg tggttctttg agttctctac	1260
tgagaactat attaatctg tcttttaaag gtcgattctt ctcaggaatg gagaaccagg	1320
ttttcctacc cataatcacc agattctgtt taccttccac tgaagagggt gtggtcattc	1380
tttgaagta cttgaactcg ttctgagcg gaggccagg taggtctccg ttcttgccaa	1440
tcccatatt ttgggacacg gcgacgatgc agttcaatgg tcgaaccatg atggcagcgg	1500
ggataaaatc ctaccagcct tcacgctagg attgccgtca agtttggcgc gaaatcgag	1560
ccctgagctg tg	1572

<210>8

<211>988

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x1GC dhfr cassette

<400>8

attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg	60
cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggccctaggc ttttgcaaaa	120
agctcccggg atggttcgac cattgaactg catcgctgcc gtgtcccaaa atatggggat	180
tggcaagaac ggaaacctac cctggcctcc gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag	240
aatgaccaca acctcttcag tggaaggtaa acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac	300
ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaata tagttctcag	360

tagagaactc aaagaaccac cacgaggagc tcatttttctt gccaaaagtt tggatgatgc	420
cttaagactt attgaacaac cggaattggc aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg	480
aggcagttct gtttaccagg aagccatgaa tcaaccaggc cacctcagac tctttgtgac	540
aaggatcatg caggaatttg aaagtgcac gtttttccca gaaattgatt tggggaaata	600
taaacttctc ccagaatacc caggcgctct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa	660
gtataagttt gaagtctacg agaagaaaga ctaacagggt cgaaatgacc gaccaagcga	720
cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct	780
tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg	840
agttcttcgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata	900
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttactgca ttctagttgt ggtttgtcca	960
aactcatcaa tgtatcttat catgtctg	988

<210>9

<211>1010

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x3GC dhfr cassette

<400>9

ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat	60
gcagaggccg aggccgcctc tgccctctgag ctattccaga agtagtgagg aggccttttt	120
ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccc ggatggttcg accattgaac tgcatcgtcg	180
ccgtgtccca aaatatgggg attggcaaga acggaaacct accctggcct ccgctcagga	240
acgagttcaa gtacttccaa agaatgacca caacctcttc agtggaaggt aaacagaatc	300
tgggtgattat gggtaggaaa acctggttct ccattcctga gaagaatcga cctttaaagg	360
acagaattaa tatagttctc agtagagaac tcaaagaacc accacgagga gtcattttc	420
ttgccaaaag tttggatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag	480
tagacatggt ttggatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag	540
gccacctcag actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaaagtgac acgtttttcc	600
cagaaattga tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgct ctctctgagg	660
tccaggagga aaaaggcatc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg	720
ttcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc	780
gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatectc	840
cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacccca acttgtttat tgcagettat	900
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttactg	960
cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg	1010

<210>10

<211>1044

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x6GC dhfr cassette

<400>10

catagtcccg cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc	60
tccgccccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc	120
tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct	180
cccgggatgg ttcgaccatt gaactgcate gtcgccgtgt cccaaaatat ggggattggc	240
aagaacggaa acctaccctg gcctccgctc aggaacgagt tcaagtactt ccaaagaatg	300
accacaacct cttcagtgga aggtaaacag aatctggtga ttatgggtag gaaaacctgg	360
ttctccattc ctgagaagaa tcgaccttta aaggacagaa ttaatatagt tctcagtaga	420
gaactcaaag aaccaccacg aggagctcat ttctcttgcca aaagtttgga tgatgcctta	480
agacttattg aacaaccgga attggcaagt aaagtagaca tggtttgat agtcggaggc	540
agttctgttt accaggaagc catgaatcaa ccaggccacc tcagactctt tgtgacaagg	600
atcatgcagg aatttgaaag tgacacgttt ttcccagaaa ttgatttggg gaaatataaa	660
cttctccag aataccagg cgctctctct gaggtccagg aggaaaaagg catcaagtat	720
aagtttgaag tctacgagaa gaaagactaa caggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc	780
caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg	840
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	900
cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat	960
cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact	1020
catcaatgta tcttatcatg tctg	1044

<210>11

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>dhfr 01 primer

<400>11

gcgcccggga tggttcgacc attgaactgc	30
----------------------------------	----

<210>12

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>dhfr-02 primer

<400>12

cacttagaac ctgttagtct ttcttctcgt agac 34

<210>13

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x 1GC primer

<400>13

tcaggatcca ttctccgccc catggctgac taa 33

<210>14

<211>35

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x 3GC primer

<400>14

catggatcct aactccgccc agttccgccc attct 35

<210>15

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>x6GC primer

<400>15

catggatccc atagtcccgc ccctaactcc gccc 34

<210>16

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X0GC primer

<400>16

cgatggatcc gacatgataa gatacattga t 31

<210>17

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>X0GCRR primer

<400>17

cgttggatcc acagctcagg gctgcgattt c 31

<210>18

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>BISVpAR primer

<400>18

tcaggatccc agacatgata agatacattg atg 33

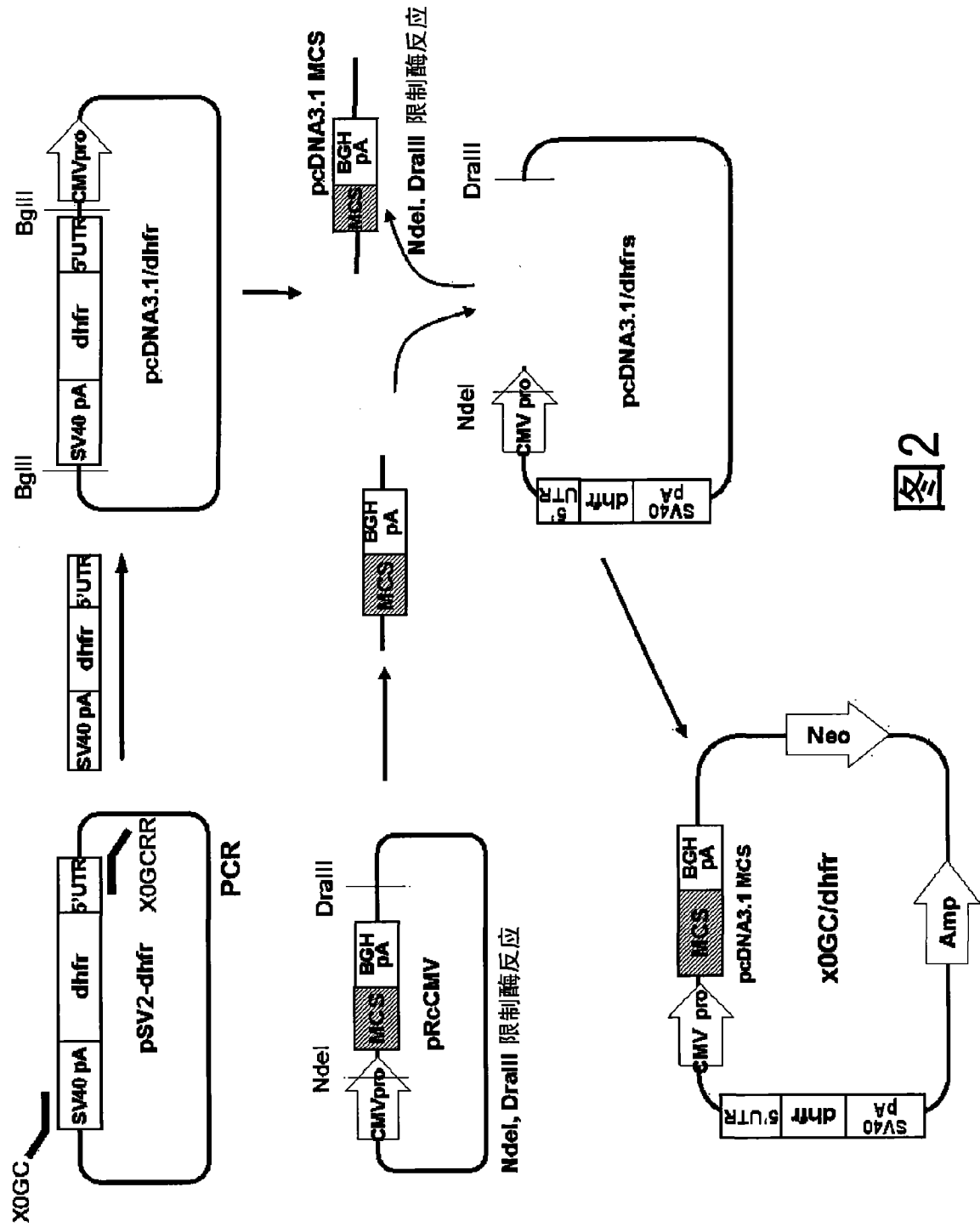


图2

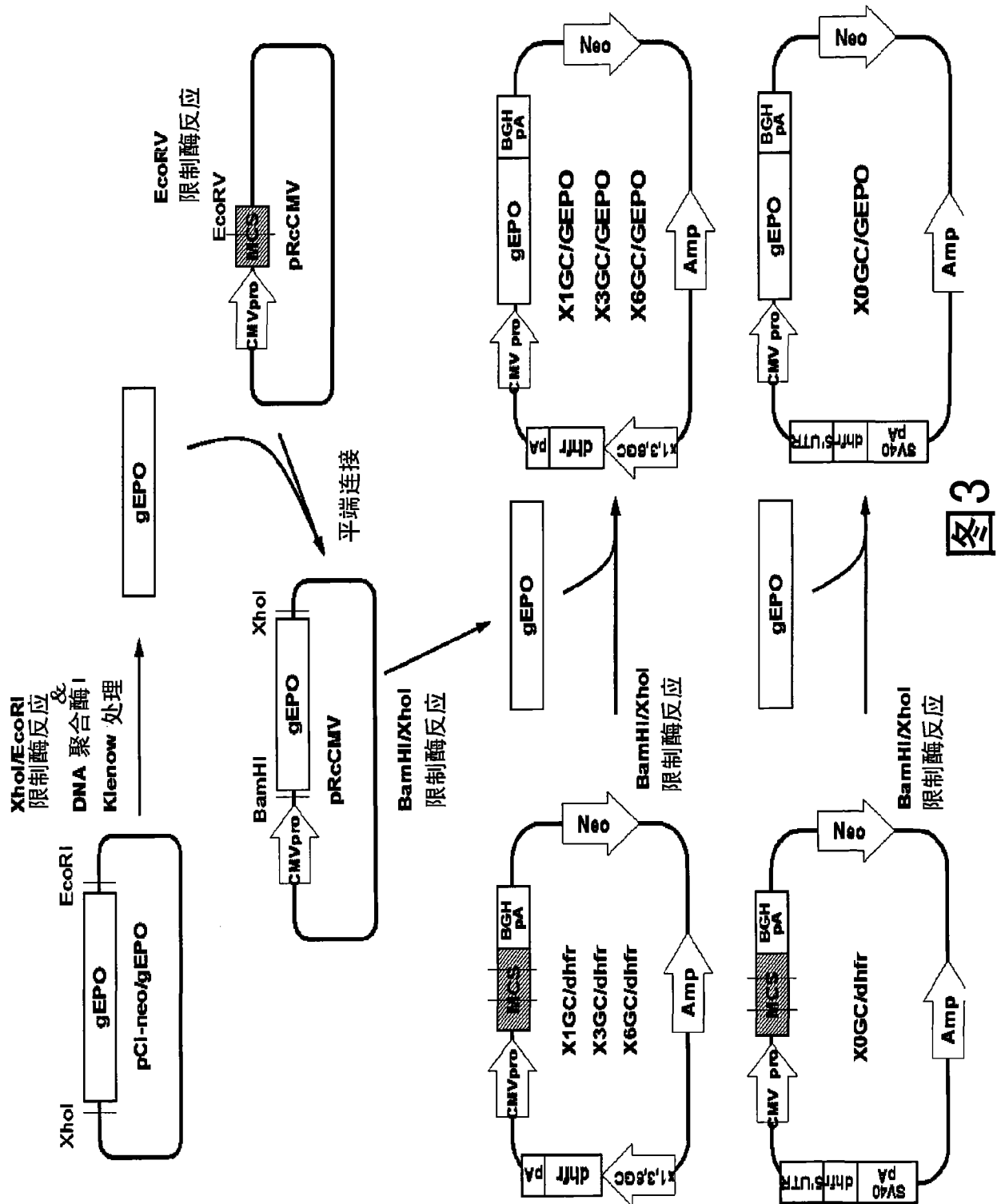


图3

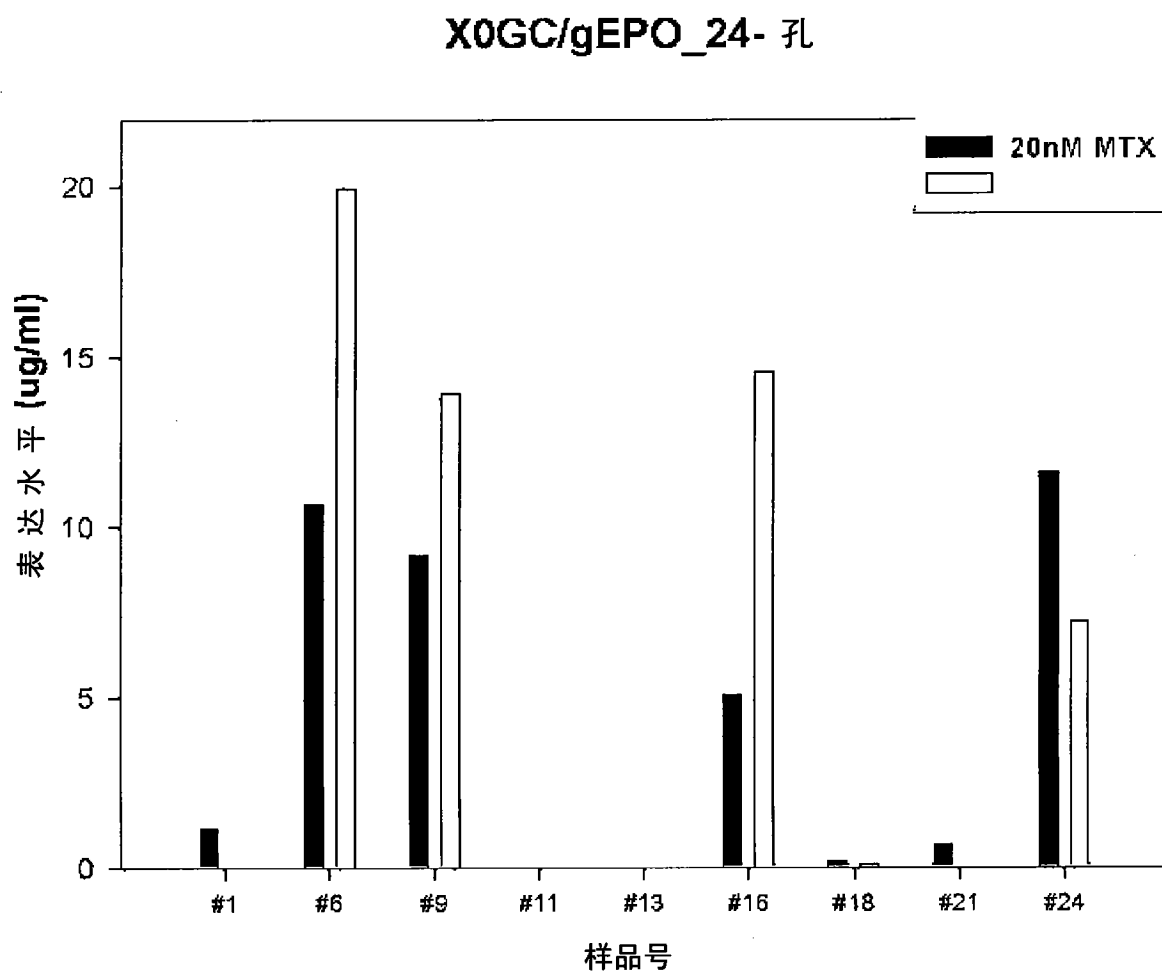


图 4

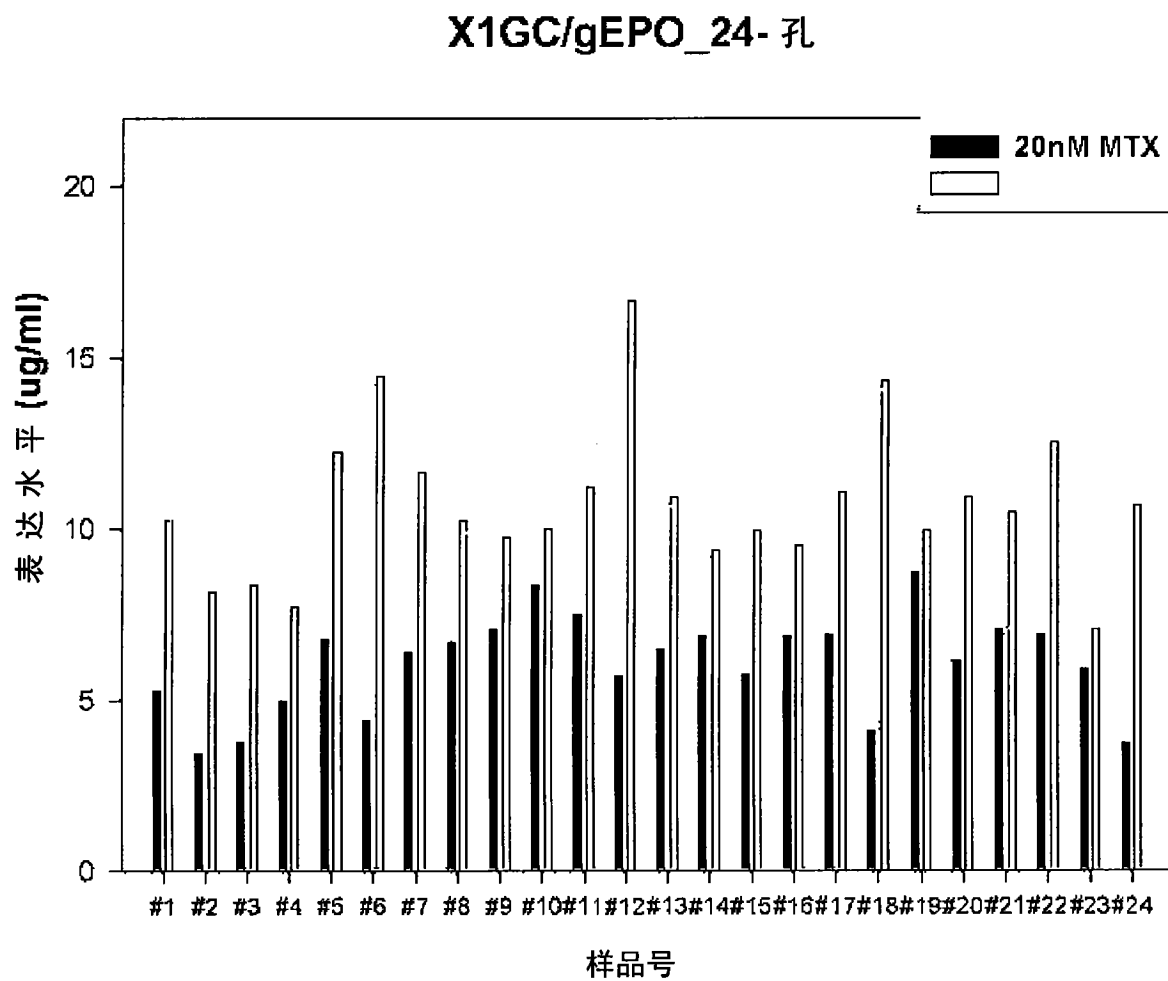


图 5

X3GC/gEPO_24-孔

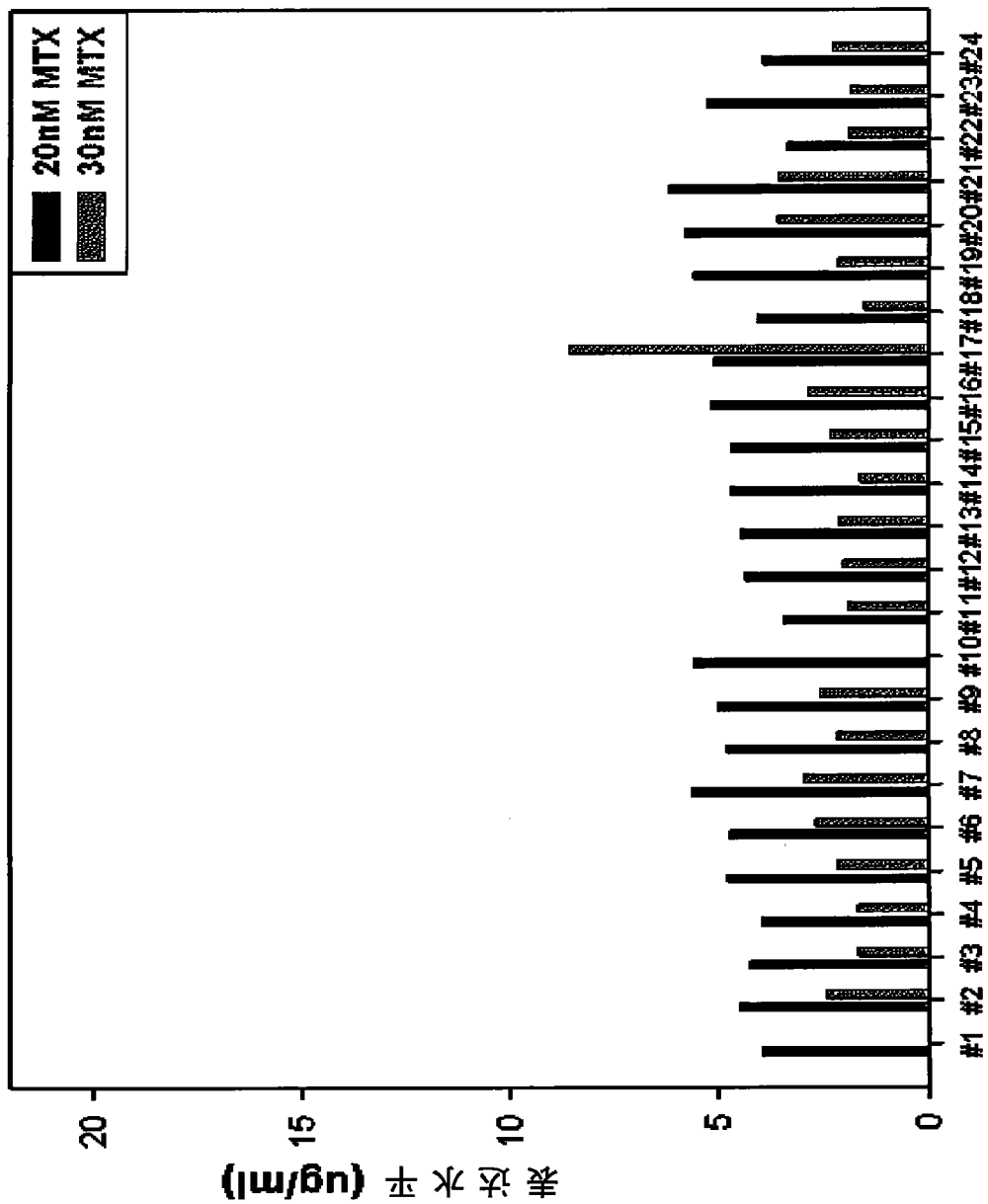


图6

样品号

X6GC/gEPO_24-孔

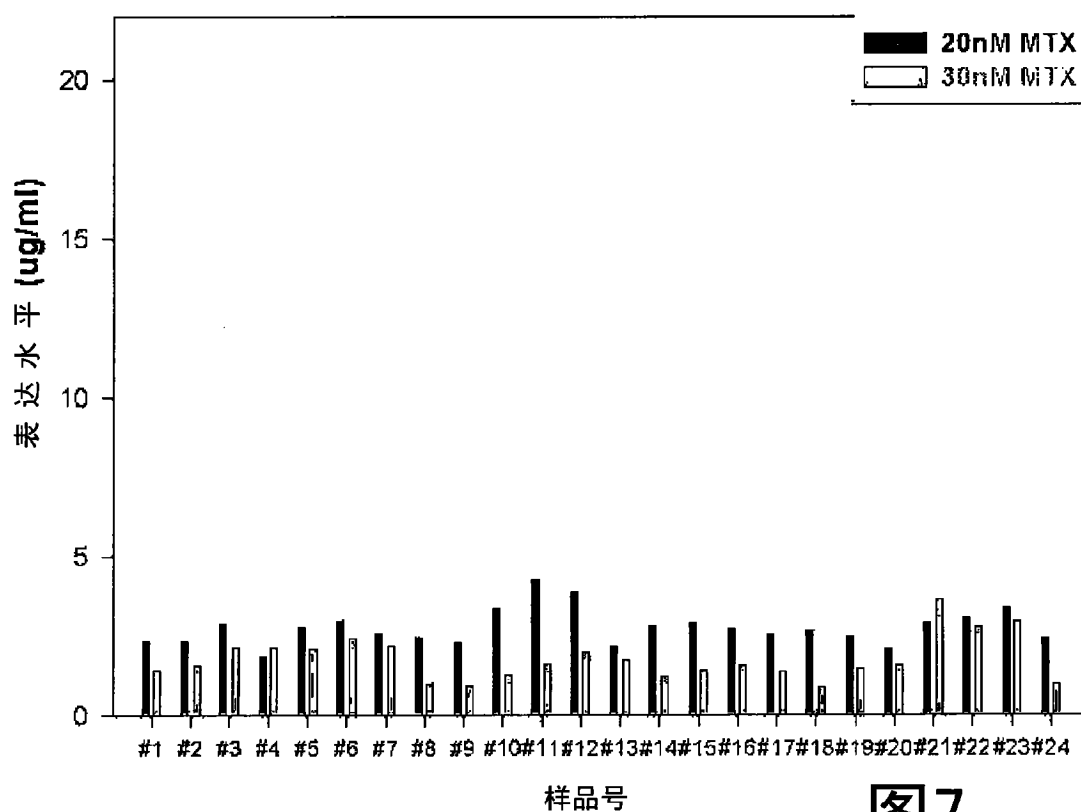


图7

DHFR CHO
100ng (dhfr-) X0GC X1GC X3GC X6GC



1st 2nd 3rd 4th 5th 6th 8th 7th 9th BRP



图8

图9

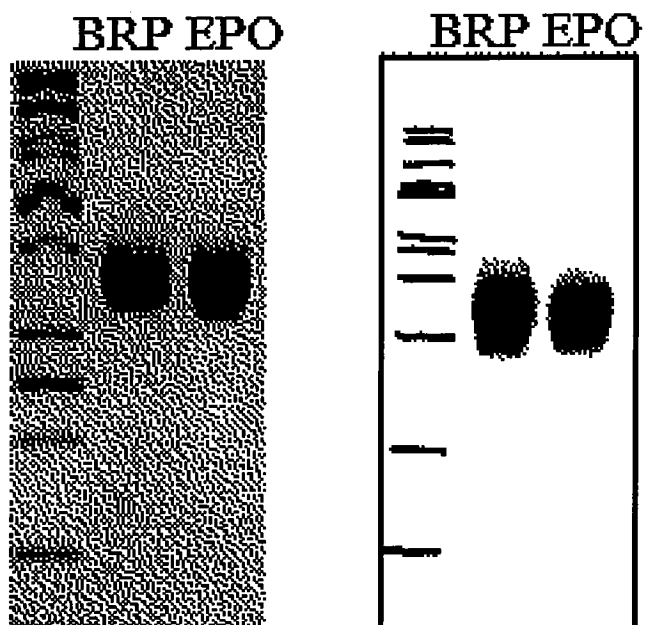


图10



图11