

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0131256 (43) 공개일자 2012년12월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)	(71) 출원인 한밭대학교 산학협력단 대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동) 지노믹디자인 주식회사 대전광역시 대덕구 대덕대로1417번길 20 (문평동)	
(21) 출원번호 10-2011-0049292 (22) 출원일자 2011년05월25일 심사청구일자 없음	(72) 발명자 여상엽 대전광역시 서구 월평북로 11, 주공아파트 202동 1012호 (월평동) 유재호 대전광역시 유성구 지족로 343, 반석마을아파트 210-1102 (지족동)	
	(74) 대리인 김종관, 권오식, 박창희	

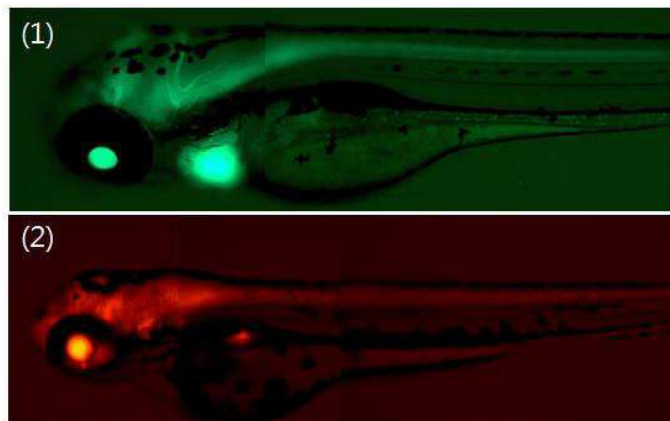
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬**

(57) 요 약

본 발명은 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬에 관한 것으로, 상기 본 발명의 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬는 목적 유전자를 신경세포에서만 특이적으로 발현시켜 신경세포 관련 질환 모델로서, 목적 유전자의 세포내 기능 및 기작을 연구에 효과적일 뿐만 아니라 유전자치료에 유용하게 적용될 수 있으며, 더 나아가 이와 관련된 인간의 질환 치료를 타겟하여 신약개발에 크게 기여할 수 있을 것이다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000381400110

부처명 중소기업청

연구사업명 산학협력실 지원사업

연구과제명 UV 유도 형광 유전자를 이용한 형질전환 제브라피쉬 library 개발

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2009.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열이 도입된 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제브라피쉬는 GAL4 유전자에 의해 신경세포 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 서열번호 1은

- 1) 서열번호 2의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터를 클로닝하는 단계;
- 2) 서열번호 3의 Gal4VP16 유전자 단편 및 서열번호 4의 2A-EosFP 유전자 단편을 클로닝하는 단계; 및
- 3) 상기 1) 단계의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터와 상기 2) 단계의 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하는 단계;로 제조되어 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 2) 단계의 서열번호 3의 Gal4VP16 유전자 단편은 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머로 증폭하는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 2) 단계의 서열번호 4의 2A-EosFP 유전자 단편은 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머로 증폭하는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 제브라피쉬는 형광단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 형광단백질은 GFP(green fluorescent protein) 또는 RFP(Red Fluorescent Protein)인 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

명세서

기술 분야

본 발명은 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*)는 수정란을 대량으로 쉽게 확보할 수 있고, 발생이 매우 빨라 대부분의 조직 및 장기가 하루만에 형성되며, 척추동물로서 유전체 구성이 인간과 비슷하다는 장점이 있기 때문에, 인간 유전자의 기능분석 및 천연물이나 화합물을 대상으로 생체기능조절물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용되어 왔다.
- [0003] 상기의 장점으로 인해 형질전환 제브라피쉬에 관한 연구는 매우 활발히 진행되어왔으며, 이미 형질전환 개발기술은 미성숙 단계에 있다고 판단된다. 또 제브라피쉬의 유전체 연구가 활발히 진행되어 수 년 내에 염기서열이 완전히 분석되리라 생각된다. 제브라피쉬 형질전환 기술은 포유류에 적용되는 기술이 용이하게 적용되고 있다. 제브라피쉬의 배아(embryo)는 수적으로 풍부하여 쉽게 구할 수 있고, 투명하여 다루기 쉽다. 또 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)나 트랜스포존(transposon) 등의 다양한 벡터가 적용될 수 있는 장점이 있다.
- [0004] 한편 조직 특이적 발현양상을 갖는 유전자의 전사조절 기작에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다. 이러한 전사조절기작에 대한 연구는 향후 특정 세포에 목적 유전자를 발현시키는 기술에 근간이 되는 것으로, 기초적인 과학적 의문을 해소시키고, 유전자치료를 통한 질병치료에 매우 유용하다.
- [0005] 특히, 신경세포의 발달 과정을 연구하기 위한 목적으로 신경세포에 형광단백질이 발현하는 개체를 이용하여 돌연변이체를 제작하거나 화학물질을 처리하여 형광단백질이 발현하는 신경세포에 이상이 있는 개체를 선별하여 신경세포 관련 질환 모델을 제작하고, 이에 대한 분자적 메커니즘을 밝히는 연구가 가능하다. 위의 내용은 현재까지 시도되지 않은 내용이며 이러한 연구 내용은 신경세포 질환 모델을 제작하여 이와 관련된 인간의 질환 치료를 타겟하여 신약개발을 위한 기초가 될 수 있고, 이에 대해 상업적 목적에 기인한 제작에 경쟁이 치열해 질 것이다.
- [0006] 이러한 연구흐름에 대비하기 위해서 신경세포의 발생에 대한 전반적인 기작을 연구하기 위한 형질전환 제브라피쉬 제작이 필요하다. 이에 본 발명에서는 신경세포에 형광단백질이 발현하는 형질전환개체를 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경세포 특이적으로 형광을 발현시켜 다양한 단백질의 생체 내 기능분석이 가능한 형질전환 제브라피쉬를 제공한다.
- [0009] 본 발명에서 용어, “벡터”란 연결되어 있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터의 하나의 유형인 “플라스미드”는 그 안에 추가적으로 DNA 조각을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 말한다.
- [0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0011] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열이 도입된 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬를 제공한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 제브라피쉬는 GAL4 유전자에 의해 신경세포 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 상기 서열번호 1은 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터로서, 보다 상세하게는 Tol2 트랜스포존(transposon)과 Tol2 트랜스포존(transposon) 사이에 인헨서 트랩(enhancer trap), GAL4 및 EosFP의 유전자 단편의 순차적인 구성을 갖는 것으로, 구체적으로는 하기의 방법으로 제조될 수 있다.
- [0014] 상기 신경세포 특이적으로 발현되는 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터는
- [0015] 1) 서열번호 2의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터를 클로닝하는 단계;
- [0016] 2) 서열번호 3의 Gal4VP16 유전자 단편 및 서열번호 4의 2A-EosFP 유전자 단편을 클로닝하는 단계; 및
- [0017] 3) 상기 1) 단계의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터와 상기 2) 단계의 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하는 단계;로 제조되어 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 2) 단계의 서열번호 3의 Gal4VP16 유전자 단편은 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머

로 증폭될 수 있으며, 상기 2) 단계의 서열번호 4의 2A-EosFP 유전자 단편은 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머로 증폭될 수 있다.

[0019] 상기의 방법으로 제조된 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터는 종래 알려진 다양한 방법으로 제브라피쉬에 형질전환 시킬 수 있다. 예를 들면, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 직접근육주입법(direct muscle injection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(transposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 적용할 수 있다. 본 발명에서는 발현 벡터를 제브라피쉬의 배아에 미세주입법으로 형질전환시켰다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 제브라피쉬는 형광단백질을 더 포함할 수 있다.

[0021] 상기 형광단백질은 GFP(green fluorescent protein) 또는 RFP(Red Fluorescent Protein)인 것으로, 보다 상세하게는 신경 특이적 GFP 발현 형질전환 제브라피쉬는 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein) 유전자가 신경 특이적 발현되어 살아있는 상태에서 신경계 전체를 가시적으로 확인할 수 있어, 상기 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 신경계에 유전자변이가 유발된 신경 돌연변이체를 단 시간내에 가시적으로 선별할 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 신경세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬는 목적 유전자를 신경세포에서만 특이적으로 발현시켜 신경세포 관련 질환 모델로서, 목적 유전자의 세포내 기능 및 기작을 연구에 효과적인 뿐만 아니라 유전자치료를 유용하게 적용될 수 있으며, 더 나아가 이와 관련된 인간의 질환 치료를 타겟하여 신약개발에 크게 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터(pDestTol2CG2-EnT-Gal4VP16 2A EosFP) 내 구성을 모식화한 도면이고,

도 2는 본 발명에 따른 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터(pDestTol2CG2-EnT-Gal4VP16 2A EosFP)의 전체 염기서열을 보여주는 것이며,

도 3은 본 발명에 따른 인핸서 트랩(enhancer trap)의 염기서열을 보여주는 것이고,

도 4는 본 발명에 따른 Gal4VP16 유전자의 염기서열을 보여주는 것이며,

도 5는 본 발명에 따른 2A-EosFP 유전자 단편의 염기서열을 보여주는 것이고,

도 6은 본 발명에 따른 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFP를 이용한 형질전환 제브라피쉬를 교배하여 얻은 제브라피쉬의 24시간된 발생배아로, 신경조직에서 녹색 형광을 발현하는 것을 형광현미경으로 관찰한 결과이며,

(좌: Dorsal view, 우: Lateral view)

도 7은 본 발명에 따른 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFP 또는 UAS:RFP를 이용한 형질전환 제브라피쉬를 교배하여 발생 3일이 지난 제브라피쉬(1) 및 발생 2일이 지난 제브라피쉬(2)를 형광현미경으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 구체적인 실시 예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에 종사하는 업자에게는 명백한 것이다.

[0025] 이 때, 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다.

[0026] 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

- [0027] **[실시예 1]. EnT minimal promoter의 클로닝**
- [0028] EnT minimal promoter(Genbank ID : 100037748)를 p5E 다중 클로닝 위치 벡터(multiple cloning site vector, 미국 Chien Lab에서 제공)에 클로닝 하기 위해 Tol2-EnT-Gal4VP16 벡터(일본 Kawakami lab에서 제공받음)를 제한효소 *SaI*I과 *Bam*HI으로 각각 1 unit을 같이 혼합하고, 2시간 동안 37℃ 배양기에서 보관 후 Agarose 전기영동을 통해서 EnT minimal promoter를 분리한 뒤, 역시 제한효소 *SaI*I과 *Bam*HI으로 각각 1 unit로 37℃배양기에서 2시간동안 처리된 p5E 벡터를 다중 클로닝 위치에 클로닝 하여 p5E-EnT 벡터를 제조하였다. 각각의 제한효소는 37℃에서 2시간 동안 반응하여 143 bp의 EnT minimal promoter와 2808 bp의 p5E 벡터를 다중 클로닝 위치에 분리 및 정제하였으며, 상온에서 Ligation Mix(Takara Co.)를 이용하여 30분간 라이게이션(ligation) 한 뒤, 이를 DH5 α 대장균 균주에 형질전환 하여 p5E-EnT 벡터를 제작하였다.
- [0029] 상기 플라스미드 DNA의 정제는 MACHEREY-NAGEL에서 판매하는 NucleoBond XtraMidi kit을 이용하였고, 각각의 벡터의 염기서열은 SolGent에 분석을 의뢰하여 도 2의 염기서열을 확인할 수 있었다.
- [0030] **[실시예 2] Gal4VP16 및 2A-EosFP의 클로닝**
- [0031] Gal4VP16-2A-EosFP를 pME 다중 클로닝 위치 벡터(multiple cloning site vector, 미국 Chien Lab에서 제공)에 클로닝 하기 위하여, 우선 PCR을 통하여 하기의 프라이머 세트를 이용하여 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 증폭하였다. PCR조건은 annealing 온도 60℃(40초), extension 온도는 72℃(40초), denaturation 온도는 94(1분)으로 하여 30회 운전하였다.
- [0032] 상기 유전자 단편은 2A(GenBank: FJ863663.1), Gal4vp16(GenBank: GU452684.1), EosFP(GenBank: AY765217.1)를 이용하였다.
- [0033] 서열번호 5: Gal4VP16(F) HindIII (ataagcttTGGACCATGAAGCTACTGTCT),
- [0034] 서열번호 6: Gal4VP16(R) BamHI (atggatccCATATCCAGAGCGCGTAGG),
- [0035] 서열번호 7: 2A peptide EosFP(F) BamHI
(GtggatccGGAGCCACGAACCTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAACCCCGTCCCATGGATATGAGTGCGA),
- [0036] 서열번호 8: EosFP(R) XbaI (tctagaTTATCGTCTGGCATTGTC)
- [0037] 상기 증폭된 유전자 단편의 염기서열을 확인한 결과, 도 4의 염기서열을 가진 651 bp의 Gal4VP16 유전자 단편과 도 5의 염기서열을 가진 753 bp의 2A-EosFP 유전자 단편을 수득할 수 있었다.
- [0038] 상기 증폭된 유전자 단편을 제한효소 *Hind*III, *Bam*HI 및 *Xba*I을 각각 1unit씩 37℃에서 2시간동안 처리한 후, pME 벡터를 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)에 클로닝하여, pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터를 제작하였다.
- [0039] **[실시예 3] 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터의 제조**
- [0040] 상기 실시예 1의 p5E-EnT 벡터 및 상기 실시예 2의 pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터를 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하기 위하여 LR 재조합 시스템(recombination system)을 사용하였다.
- [0041] 상기 클로닝된 p5E-EnT 벡터, pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터 및 p3E polyA 벡터(미국 Chien Lab에서 제공)는 각각 10 fmole, pDestTol2CG2 게이트웨이 벡터(invitrogen cat#: 12537-103)는 20 fmole의 양을 1.5 ml 튜브에 전체 양을 7 ul에 맞추도록 TE 버퍼를 사용하였고, 다음에 LR 리컴비네이즈(recombinase) 2 ul를 천천히 혼합하여 상온에서 16시간 동안 반응하였다. 이후 프로테이나제 K(proteinase K)를 1 ul(2 ug/ul)를 넣은 후 37℃배양기에서 15분간 처리한 후, DH5 α 대장균 균주에 형질전환하여, pDestTol2CG2-EnT-Gal4VP16-2A-EosFP-pA 벡터(서열번호 1)를 제조하였다.
- [0042] 참조: p5E MCS, pME MCS 및 pDestTol2CG2 vector
- [0043] 정보: Tol2 kit(http://chien.neuro.utah.edu/tol2kitwiki/index.php/Main_Page)
- [0044] **[실시예 4] 제브라피쉬를 이용한 재조합 벡터의 미세주입**
- [0045] 상기 실시예 3에서 만들어진 재조합 벡터를 이용하여 제브라피쉬의 배아에 미세주입 하였다. 미세주입방법은 일반적인 제브라피쉬의 미세주입방법으로 제브라피쉬 1세포기 발생배아에 미세주입을 위해 하루 전날 밤에 암컷과 수컷을 교미상자(mating cage)에 넣고 암처리화 하였다. 다음날 아침에 암수를 섞어서 교배시키면서 산란된 발

생배아를 수집하여 인젝션용 1% 아가로즈 플레이트(agarose plate)의 일직선의 홈에 차례로 정렬시킨 뒤 끝이 둥근 미세 유리관을 이용하여 발생배의 세포방향이 미세주입기구(microinjector)를 향하도록 하였다. 미세유리관(microcapillary)을 이용하여 재조합 된 벡터를 100 ng/ul 농도로 발생배아의 세포질에 적당량(~50 pl)을 주입한 후, 발생배들을 egg water에 옮긴 뒤 28.5℃에서 배양하여 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다. 배양 후 24시간이 지나서 재조합 벡터의 EosFP에 의한 형광발현을 관찰할 수 있다.

[실시예 5] 신경세포 특이적인 유전자 발현

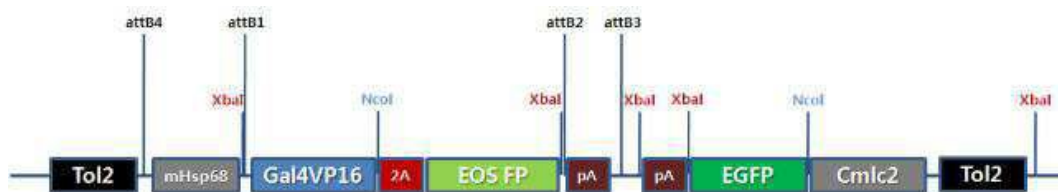
본 발명에 따른 상기 실시예 4로부터 제조된 형질전환 제브라피쉬 내 GAL4 유전자가 신경세포 특이적으로 발현이 되는지를 확인하기 위해서, 상기 실시예 4의 GAL4를 포함하고 있는(pDestTo12CG2-EnT-Gal4VP16 2A EosFP) 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFPcaxx 형질전환 제브라피쉬를 교배하여, 신경세포에서 형광단백질(GFP 또는 RFP)이 발현을 확인하였다.

상기 UAS:GFPcaxx는 GAL4에 의해서 녹색 형광단백질이 세포막에 부착되어 발현되도록 제조된 재조합 단백질이고, UAS:RFP는 Red Fluorescent Protein으로 실시예에서는 H2A mcherry를 사용하여 GAL4에 의해서 발현될 경우, 세포핵에서 붉은 형광을 띄도록 제조된 재조합 단백질이다.

그 결과, 도 7에서도 확인한 수 있듯이, 교배를 통해 얻은 발생배아로부터 신경세포 특이적으로 형광단백질(GFP, RFP)이 GAL4 유전자에 의해 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

도면

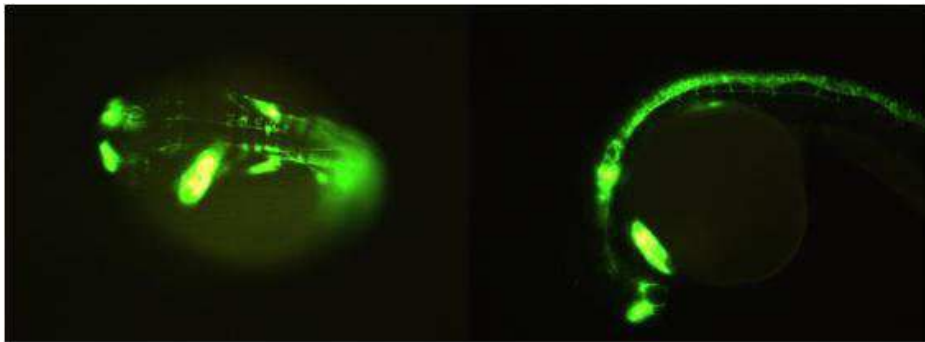
도면1



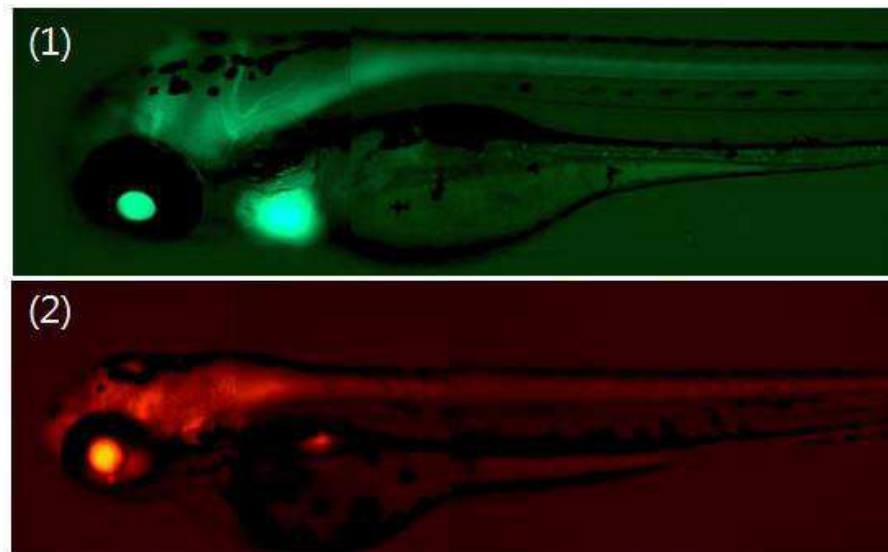
도면5

ggatccggagccacgaacttctctctgttaaagcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcccatggatatgag
tgcgattaaagccagacatgaagatcaacctccgtatggaaggcaacgtaaacgggcaccactttgtgatcgacggag
atggtacaggcaggccttttgagggaacacagagtatggatcttgaagtcaaagagggcggacctctgccttttgc
tttgatatactgaccactgcattccattacggcaacagggtattcgccgaatatccagaccacatacaagactattt
taagcagtcgtttcctaaggggtattcgtgggaacgaagcttgactttcgaagacgggggcatttgcatgtccagaa
acgacataacaatggaaggggacactttctataataaagttcgatttcacggtacaaactttcccgccaatggtcca
gttatgcagaagaagacgctgaaatgggagccctccactgagaaaatgtatgtgcgtgatggagtgtgacgggtga
tattcacatggctttgttgcctgaaggaatgccattaccgatgtgacttcagaactacttacaagctaaggaga
agggtgtcaagttaccaggctaccactttgtggaccactgcattgagattttaagccatgacaaagattacaacaag
gttaagctgtatgagcatgctgttgcctcattctggattgcctgacaatgccagacgataa (서열번호 4,
2A-EosFP)

도면6



도면7



서열 목록

<110> Hanbat National University Industry-Academic Cooperation Foundation
Genomic Design Bioengineering Company

<120> Neurons that are specifically expressed transgenic Zebrafish
 <160> 8
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 8226
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220><223> pDestTol2CG2 EnT Gal4VP16 2A EosFP vector sequence

<400> 1

attatacata gttgataatt cactggccgt cgttttacgg taccatcgat gatgatccag 60

acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat 120

gctttatttg tgaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 180

aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca gggttcagggg gaggtgtggg 240

agggttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ggctgattat gatcctctag 300

atcagatctc ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 360

tttcacaaat aaagcatttt ttctactgca ttctagtgtt gggtttgtcca aactcatcaa 420

tgtatcttat catgtctgga tctacgtaat acgactcact atagtcttag aggctcgaga 480

ggggccgctt tacttgtaca gctcgtccat gccgagagtg atcccggcgg cggtcacgaa 540

ctccagcagg accatgtgat cgcgtttctc gttggggtct ttgctcaggg cggactgggt 600

gctcaggttag tggttgtcgg gcagcagcac ggggccgtcg ccgatggggg tgttctgctg 660

gtagtggtcg gcgagctgca cgctgccgtc ctcgatgttg tggcggatct tgaagttcac 720

cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagacg ttgtggctgt ttagttgta 780

ctccagcttg tgccccagga tgttgccgtc ctcttgaag tcgatgccct tcagctcgat 840

gcggttcacc aggggtgtcg cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt agttgccgtc 900

gtccttgaag aagatgggtg gctcctggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa 960

gtcgtgctgc ttcatgttgt cggggttagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtcagggt 1020

ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt 1080

cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc ctgccggac acgctgaact tgtggccgtt 1140

tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct cctcgccctt 1200

gtcaccatg gtcactgtct gctttgctgt tggctctgggc tctgggtca ctggcttact 1260

aatggagtct ttatgtatga ggactcttat caattgttct tctataaagg tctgcagtgt 1320

ttctgttcgt ccctacatg gacaccaga gcctcctaaa tacaggagcc ctgataactg	1380
cacaagtgct cagattccag cagggtggaa aatgagataa agtgtgcaga tggggagggg	1440
gacgtgaatg agagatttga gggatgaaaa ggatggatga acgcattgaa aatagcccct	1500
ttcacaaaat aataccagta aattgtcata taattaatga ccagaccttt acctgtaaat	1560
gatgtgatgt tcatatacag aagaatgcca acaatttaca gatgatttta caaattctta	1620
attttccttt tctaaatgga ttgtttcaca cattatctct tcaaagcaat tgaattttct	1680
ggaaaagatt ggctgtgtgt gtaaaagggt ctactgagga atttaatgtg acatggaatg	1740
aagcaaacag cagcctaaga caggatggca ggaaaaatgt cacatgttta aaataagagt	1800
gaaaccaacg acctggactt atagagactg tgtgtcctta ggcaaagctc ttgtacaaac	1860
agtgtctgtg actgtgaaat tcggggtttg cctggattgt gttaaagtgt tgcttggatg	1920
tatcataaaa aagaatcggg tctctgtatt tgacattttc tgtaatttat ctaaagttac	1980
aactggctat gcctgatttt tatcactatt gaatcaatca ttttaaagaa tgtaagtct	2040
gctgatttgg agagctcatt tacatttatt ttgaatgtct cttatttaac acaactgatt	2100
taagctttag atctgcgaag atacggccac ggggtgctctt gatcctgtgg ctgattttgg	2160
actgtgctgc tcgcagctgc tgatgaatca catacttctt ccattttctt ccactgattg	2220
actgttataa ttccctaata ttccagggtca aggtgctgtg cattgttgta atagatgtga	2280
catgacgtca cticcaaagg accaatgaac atgtctgacc aatttcatat aatgtgaaaa	2340
cgattttcat aggcagaata aataacattt aaattaaact gggcatcagc gcaattcaat	2400
tggtttggtg atagcaaggg aaaatagaat gaagtgtctt ccaaaaaata agtacttttt	2460
gactgtaaat aaaattgtaa ggagtaaaaa gtactttttt ttctaaaaaa atgtaattaa	2520
gtaaaagtaa aagtattgat ttttaattgt actcaagtaa agtaaaaaat cccaaaaata	2580
atacttaagt acagtaatca agtaaaatta ctcaagtact ttacacctct ggttcttgac	2640
ccctacctt cagcaagccc agcagatcca ctagtcttag agcggccgcc accgcggtgg	2700
agctccagct ttgtttccct ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggta	2760
tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga	2820
agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg	2880
cgctcactgc ccgttttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc	2940
caacgcgcgg ggagaggcgg ttgctgtatt gggcgctctt ccgtttctc gctcactgac	3000
tcgtgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata	3060

cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa	3120
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	3180
gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	3240
agataaccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgct ctctgtttcc gaccctgccg	3300
cttaccggat accgtgccg ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca	3360
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa	3420
cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg	3480
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	3540
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaagg	3600
acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcgaaaaag agttggtagc	3660
tcttgatccg gcaaaaaac caccgtggt agcgggtggt ttttgtttg caagcagcag	3720
attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac	3780
gctcagtggc acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc	3840
ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag	3900
taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt	3960
ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag	4020
ggcttaccat ctggccccg tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca	4080
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact	4140
ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgcgggaag ctagagtaag tagttcgcca	4200
gttaatatgt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg	4260
tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	4320
atgttgtgca aaaaagcggc tagctccttc ggtctccga tcgttgtcag aagtaagttg	4380
gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca	4440
tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg	4500
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	4560
agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc	4620
ttaccgtgt tgagatccag ttcatgtaa cccactctg cacccaactg atcttcagca	4680
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa	4740
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatc tcttctttt tcaatattat	4800
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatitagaaa	4860
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctaa attgtaagcg	4920

ttaatatTTTt gttaaaattc gcgttaaatt ttgttaaatt cagctcattt tttaaccaat	4980
aggccgaaat cggcaaaatc ctttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagt	5040
ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc	5100
gaaaaaccgt ctatcagggc gatggccac tacgtgaacc atcacccata tcaagttttt	5160
tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag	5220
cttgacgggg aaagccgggc tggctaagaa ctcatcagcc tccccgggcc atctaccac	5280
gtaccaatgc accaattggc cacaatgacg gctactacat ggtgccattc ctctctctt	5340
ataggaatgg agactacctc ctgtccaaca aggtctcttg atacgagtac gcctacctgt	5400
tggaccagg tcattgcaca acaccagaaa tggcctctga tctgcaaaag acgtgaatat	5460
ctgttcagac acccatatcc actctgttcc acacaggtca gaggtttgtc caggagtct	5520
tgacagaggt gtaaaaagta ctcaaaaatt ttactcaagt gaaagtacaa gtacttaggg	5580
aaaatTTTt tcaattaaaa gtaaaagtat ctggctagaa tcttacttga gtaaaagtaa	5640
aaaagtactc cattaaaatt gtacttgagt attaaggaag taaaagtaa agcaagaaag	5700
aaaactagag attcttgttt aagcttttaa tctcaaaaa cattaaatga aatgcataca	5760
aggTTTTt ctgctttaga actgtttgta tttattatc aaactataag acagacaatc	5820
taatgccagt acacgtact caaagttgta aaacctcaga tttacttca gtagaagctg	5880
atttcaaaa ttgttagtgt caagcctagc tctttgggg ctgaaaagca atcctgcagt	5940
gctgaaaagc ctctcacagg cagccgatgc gggaagaggt gtattagtct tgatagagag	6000
gctgcaaata gcaggaaacg tgagcagaga ctccctgggtg tctgaaacac aggccagatg	6060
ggccctcgag caggaaacag ctatgacat gattaccca agctatcaac ttgtataga	6120
aaagtgttaa tacgactcac tatagggcga attgggtacc gggcccccc tcgaggtcga	6180
cctgcaggcg gccgcgaatt cactagtgat tatcgatctc gggtcgatca ggaagcgggg	6240
ggttgagcc gcccgctcgg tctctctccc gcataaaat tctccaacca aagcgtttt	6300
cttcatcttt ctgttacctg gcaaaggga gcagcagctg aggagtatc tctcaatctt	6360
gggatccact agttctagag cggccgccac cgcggtggag ctccagcttt tgttccctt	6420
agtgagggtt aatcaagttt gtacaaaaa gcaggcttaa tacgactcac tataggcgca	6480
attgggtacc gggcccccc tcgaggtcga cggtatcgat aagctttgga ccatgaagct	6540
actgtcttct atcgaaacag catgcgatat ttgccgactt aaaaagctca agtgctcaa	6600
agaaaaaccg aagtgcgcca agtgtctgaa gaacaactgg gagtgtcgt actctccaa	6660
aacaaaagg tctccgtga ctagggcaca tctgacagaa gtggaatcaa ggctagaaag	6720
actggaacag ctattttctac tgatttttcc tcgagaagac cttgacatga ttttgaaat	6780

ggattcttta caggatataa aagcattgtt aacaggatta tttgtacaag ataatgtgaa 6840

taaagatgcc gtcacagata gattggcttc agtggagact gatatgcctc taacattgag 6900

acagcataga ataagtgcga catcatcatc ggaagagagt agtaacaaag gtcaaagaca 6960

gttgactgta tcttcgaggt cgaccccggt aattcagatc tctcgagccg ccccccgac 7020

cgatgtcagc ctgggggacg agctccactt agacggcgag gacgtggcga tggcgcatgc 7080

cgacgcgcta gacgatttcg atctggacat gttgggggac ggggattccc cgggtccggg 7140

atttaccccc cagactccg cccctacgg cgctctggat atgggatccg gagccacgaa 7200

cttctctctg ttaaagcaag caggagacgt ggaagaaaac cccggtccca tggatatgag 7260

tgcgattaag ccagacatga agatcaacct ccgtatggaa ggcaacgtaa acgggcacca 7320

ctttgtgatc gacggagatg gtacaggcag gccttttgag ggaaaacaga gtatggatct 7380

tgaagtcaaa gagggcggag ctctgccttt tgcctttgat atctgacca ctgcattcca 7440

ttacggcaac aggttattcg ccgaatatcc agaccacata caagactatt ttaagcagtc 7500

gtttcctaag ggttattcgt gggaacgaag cttgactttc gaagacgggg gcatttgcac 7560

tgccagaaac gacataaaca tggaagggga cactttctat aataaagttc gatttcacgg 7620

tacaaacttt cccgccaatg gtccagttat gcagaagaag acgctgaaat gggagccctc 7680

cactgagaaa atgtatgtgc gtgatggagt gctgacgggt gatattcaca tggctttgtt 7740

gcttgaagga aatgccatt accgatgtga cttcagaact acttaciaaag ctaaggagaa 7800

gggtgtcaag ttaccaggct accactttgt ggaccactgc attgagattt taagccatga 7860

caaagattac aacaaggtta agctgtatga gcatgctgtt gctcattctg gattgcctga 7920

caatgccaga cgataatcta gagcgccgc caccgcggtg gagctccagc ttttgttccc 7980

tttagtgagg gttaataccc agctttcttg tacaaagtgg gggatccaga catgataaga 8040

tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt 8100

gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac 8160

aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggttttttcc 8220

aacttt 8226

<210> 2

<211> 180

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> enhancer trap

<400> 2

ctgcaggcgg ccgcaattc actagtatt atcgatctcg ggtcgatcag gaagcggggg 60
gttcagccg gccgtcggc cctctcccg catataaatt ctccaacaa agcgtttttc 120
ttcatctttc tgttacctgg caaaggggag cagcagctga ggagtgatct ctcaatcttg 180

180

<210> 3
<211> 650
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> Gal4VP16
<400> 3

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
tctccaaac caaaaggctc ccgctgacta gggcacatct gacagaagtg gaatcaaggc 180
tagaaagact ggaacagcta tttctactga tttttcctcg agaagacctt gacatgattt 240
tgaaaatgga ttctttacag gatataaaag cattgttaac aggattattt gtacaagata 300

atgtgaataa agatgccgtc acagatagat tggttcagt ggagactgat atgcctctaa 360
cattgagaca gcatagaata agtgcgacat catcatcgga agagagtagt aacaaaggctc 420
aaagacagtt gactgtatct tcgaggtcga ccccggaat tcagatctct cgagccgcc 480
ccccgaccga tgtcagcctg ggggacgagc tccacttaga cggcgaggac gtggcgatgg 540
cgcatgccga cgcgctagac gatttcgac tggacatgtt gggggacggg gattccccgg 600
gtccgggatt tccccccac gactccgcc cctacggcgc tctggatatg 650

<210> 4
<211> 753
<212> DNA

<213> Unknown
<220><223> 2A-EosFP sequence
<400> 4

ggatccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc 60
gggccatgg atatgagtc gattaagcca gacatgaaga tcaacctccg tatggaaggc 120
aacgtaaagc ggcaccactt tgtgatcgac ggagatggta caggcaggcc tttttaggga 180
aaacagagta tggatcttga agtcaaagag ggcggacctc tgccttttgc ctttgatata 240
ctgaccactg cattccatta cggcaacagg gtattcgccg aatatccaga ccacatacaa 300

gactatTTTA agcagtcgTt tcctaagggg tattcgTggg aacgaagcTt gactTtcgaa	360
gacgggggca tttgcattgc cagaaacgac ataacaatgg aaggggacac tttctataat	420
aaagtTcgat tTcacggTac aaactTtccc gccaatggTc cagTtatgca gaagaagacg	480
ctgaaatggg agccctccac tgagaaaatg tatgtgcgtg atggagtgct gacgggtgat	540
attcacatgg cTttgtTgct tgaaggaaat gcccatTacc gatgtgactt cagaactact	600
tacaaagcta aggagaaggg tgtcaagtta ccaggctacc actTtTgTga ccactgcatt	660
gagattTtaa gccatgacaa agattacaac aaggTtaagc tgtatgagca tgctgtTgct	720
cattctggat Tgcctgacaa Tgccagacga taa	753
<210> 5	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 5	
ataagcTttg gaccatgaag ctactgtct	29
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 6	
atggatccca tatccagagc gccgtagg	28
<210> 7	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 7	
gtggatccgg agccacgaac ttctctctgt taaagcaagc aggagacgtg gaagaaaacc	60
ccggtcccat ggatatgagt gcga	84
<210> 8	
<211> 24	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 8

tctagattat cgtctggcat tgtc

24