



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1524332

(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7022275

(22) 출원일자(국제) 2009년03월06일

심사청구일자 2013년11월11일

(85) 번역문제출일자 2010년10월05일

(65) 공개번호 10-2010-0135781

(43) 공개일자 2010년12월27일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/054325

(87) 국제공개번호 WO 2009/110606

국제공개일자 2009년09월11일

(30) 우선권주장

JP-P-2008-057995 2008년03월07일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JOURNAL OF VIROLOGY, 1996, Vol. 70, No. 7,
p. 4805-4810*

Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 6,
e45*

KR1020020033726 A

US5518901 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

내셔널 유니버시티 코포레이션 유니버시티 오브
토야마

일본 930-8555, 토야마, 토야마-시, 고후쿠, 3190

(72) 발명자

이소베, 마사하루

일본, 9308555 토야마, 토야마-시, 고후쿠, 3190,
내셔널 유니버시티 코포레이션 유니버시티 오브
토야마, 패컬티 오브 엔지니어링 내

쿠로사와, 노부유키

일본, 9308555 토야마, 토야마-시, 고후쿠, 3190,
내셔널 유니버시티 코포레이션 유니버시티 오브
토야마, 패컬티 오브 엔지니어링 내

(74) 대리인

청운특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 임혜준

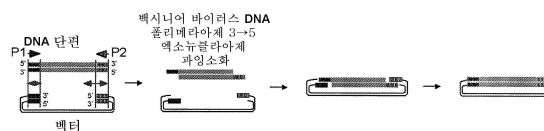
(54) 발명의 명칭 상동 재조합 방법 및 클로닝 방법 및 키트

(57) 요약

목적으로 하는 유전자를 선택적으로 상동 재조합할 수 있는 방법, 및 이 방법으로 얻어지는 재조합 DNA 분자를 제공한다.

증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물과 이 PCR 산물의 증폭용
(뒷면에 계속)

대표도 - 도4b



프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VP1 및 VP2를 가지며, P1의 안쪽 일부 서열 T1에 상동적인 염기 서열로부터 되는 상동 재조합 영역 VT1를 VP1의 말단 측에, 및/또는, P2의 안쪽 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측에 갖는 선상화된 벡터를 이용하고(T1 및 T2의 적어도 한편은, 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 가짐) 상기 PCR 산물을 상동 재조합 반응에 부쳐서 상기 벡터에 삽입하여, 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는, 상동 재조합 방법. 이 상동 재조합 방법에 의해, 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 조제하고, 얻어진 조환DNA 분자를 증폭하는 클로닝 방법.

명세서

청구범위

청구항 1

P1 서열을 포함한 PCR 증폭용 프라이머와 P2 서열을 포함한 PCR 증폭용 프라이머를 사용하여 표적 유전자를 PCR에 의해 증폭하고, 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물을 얻는 단계; 및

상기 PCR 산물과 상기 PCR 산물의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VP1 및 VP2를 가지며, 또한, P1의 안쪽 일부 서열 T1에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT1을 VP1의 말단 측, P2의 안쪽 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측, 또는 이들 양 말단 측에 갖는 선상화된 벡터를 사용하는 단계 (단, T1 및 T2의 적어도 한 쪽은 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖음),

상기 PCR 산물을 상동 재조합 반응에 부쳐서 상기 벡터에 삽입하는 단계, 및

목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 상동 재조합 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

T1 및 T2 양쪽이 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서,

증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2의 한쪽 또는 양쪽이 표적 유전자에 특유한 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

PCR 산물은, 2회의 PCR에 의해 조제된 것이고, 첫번째 PCR에서는 T1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시되고(단, P3서열은 상기 벡터가 갖는 상동 재조합 영역 VT1, VP1, VT2, 및 VP2와는 상동성을 갖지 않음), 2 번째의 PCR에서는 P1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P2서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

P1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 T1서열을 포함한 증폭용 프라이머는 부분적으로 중복하는 서열을 가지거나, P2서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머는 부분적으로 중복하는 서열을 가지거나, 또는 갖지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2는 독립적으로 10 염기 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

백터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2는 독립적으로 11 염기 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

한쪽 또는 양쪽 모두의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2는 S-올리고 프라이머 유래인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 표적 유전자가 항체 유전자이고, 상기 항체 유전자의 정상 영역 유래의 서열 및 가변 영역 유래의 서열을 포함하며, 상기 백터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2의 한쪽은 항체 유전자의 정상 영역 유래의 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 백터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2의 다른 쪽은 항체 유전자에 유래하지 않는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 상동 재조합 반응이, 레드(Red α/β) 또는 RecE/T시스템을 이용하여 세포내에서 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 상동 재조합 반응이 인퓨전(In-Fusion)법으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 1에 기재된 상동 재조합 방법에 의해, 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 백터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 조제하고, 이어서 얻어진 재조합 DNA 분자를 갖는 재조합체를 증폭하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 표적 유전자의 클로닝 방법.

청구항 14

PCR 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물을 특이적으로 백터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는 것을 포함한 상동 재조합 방법에 이용하기 위한 선상화 백터를 포함한 키트에 있어서,

상기 선상화 백터는 PCR 산물의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 영역 VP1 및 VP2를 가지며, 또한, P1의 안쪽의 일부의 서열 T1에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT1를 VP1의 말단 측에, 및/또는 P2의 안쪽 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측에 갖는 것을 특징으로 하는 선상화 백터인 키트.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 상동 재조합 방법이, 청구항 1항에 기재된 방법인 키트.

청구항 16

청구항 14 또는 15에 있어서,

상기 재조합 DNA 분자가 상기 재조합 DNA 분자를 갖는 재조합체를 증폭하는 것을 포함한 표적 유전자의 클로닝 방법에 이용되는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2008년 3월 7일 출원한 일본 특원 2008-57995호의 우선권을 주장하고, 이들 모든 기재는 여기에 특히 개시로서 인용된다.

[0002] 본 발명은, 유전자의 상동 재조합 방법 및 표적 유전자의 클로닝 방법 및 이들의 방법에 사용되는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] DNA 클로닝이란, 목적 유전자를 플라스미드(plasmid), 파지(phage), 코스미드(cosmid) 등의 자기 복제능력을 갖는 벡터에 결합하여 대장균 등의 숙주에게 도입하여 증식시킴으로써, 동일한 유전자 집단을 대량으로 만들어 내는 기술을 말한다. 대장균에 있어서의 클로닝 및 서브 클로닝은 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 방법 등에 의해 증폭된 목적 유전자를 DNA 리가제(ligase)를 사용하여 복제 개시점과 항생제의 선택 표식을 갖는 벡터에 결합하여 대장균 세포 안에 도입한 후, 항생제 내성을 조사함으로써 클로닝된 세포를 선별하는 방법으로 실시된다.

[0004] 이와 같은 통상의 클로닝 기술은 현대의 생명공학의 기초를 이루고 있으며, 인간게놈 프로젝트가 완성된 이후에 비약적인 발전을 달성하고 있는, 유전자 정보에 근거하는 대량 유전자의 클로닝 및 고속 단백질 발현 등에 폭넓게 이용되고 있다. 그러나 기존의 유전자의 조작 방법에서는 삽입 DNA와 벡터를 동일 인식 부위의 제한 효소로 절단하는 것이나, 제한 효소를 선택할 때에도 삽입 DNA나 벡터의 내부를 절단하지 않는 것을 선택하는 것, 등이 요구되는 제한이 있다. 또, 제한 효소 및 리가제를 처리하는 과정에서 고도의 기술이 필요하며, 또한, 고가의 효소를 사용하는 것에 의한 높은 제조 비용도 무시할 수 없다.

[0005] 1990년대 이후, 특정 염기 서열을 인식하여 DNA 단편간의 재조합을 유도하는 서열 특이적인 유전자 재조합 효소를 이용한 유전자 조작 기술로의 관심이 높아지고 있다. 특히, attL, attR, attB, attP 등의 특이한 DNA 서열을 인식하는 유전자 인테그라제(integrase)를 이용하여 유전자를 클로닝하는 게이트웨이·시스템(인비트로젠(주) 제조)이 개발되어, 대량의 유전자의 민첩한 클로닝 및 단백질의 발현을 위해서 범용되고 있다. 이 방법은, 통상의 제한 효소-연결 반응과 동일하게 세포 외의 유전자 조작에 의해 실시되지만, attL 또는 attR을 갖는 선상 DNA 단편을 증개하는 LR크로나제(clonase)와 attP와 attB와의 사이를 인식하는 BP크로나제를 이용하는 신규한 클로닝 방법이다. 상기 방법에서는, 우선 통상의 유전자 조작에 의해 목적 유전자를 삽입 벡터에 클론화하고, 그 삽입 벡터에 존재하는 attL, attR, attB, attP 등의 특이적 재조합 서열과 그 서열을 인식하는 크로나제라는 효소를 이용한 상동 재조합 반응에 의해, 동일한 특이적 재조합 서열을 갖는 여러 가지 발현 벡터로의 유전자의 이동을 가능하게 한다. 이 수법은 대량의 유전자의 민첩한 서브 클로닝 및 발현의 검증에 유효하지만, 최초에 우선 목적으로 하는 DNA 단편을 통상의 클로닝법에 의해 삽입 벡터에 클론화할 필요가 있어, 특이적 재조합 서열을 갖지 않는 임의의 DNA 단편의 클론화에는 적합하지 않다.

[0006] 한편, 대장균 세포에서는, 두 개 쇠사슬 절단의 수복에 관여하는 단백질 RecA, RecBCD가 상동 재조합 반응을 촉매한다. 본 재조합 반응에는, 수백 개 이상의 염기가 동일 서열을 나타내는 DNA 단편이 존재하는 경우에 상동 재조합이 일어나는 경우가 있다. 그러나 상동 DNA의 길이가 40-50개 이하인 경우는, 대장균 자체에 의한 유전자 재조합이 지극히 일어나기 어렵고, 파지 유래의 재조합 효소인 레드(Red α/β) 또는 RecE/T시스템을 도입한 경우에 한해서, 상동 유전자간의 재조합을 일으키는 것이 가능해진다. 이 짧은 상동 영역을 포함한 DNA 단편을 이용한 유전자 재조합은 미생물의 유전체를 조작하는 기술, 또는 제한 효소/리가제에 영향을 받지 않는 세포 내 클로닝 등에 이용된다(비특허 문헌 1, 특허 문헌 1)

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) JP 2002-503448 A (대응하는 W099/29837)

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001)

(비특허문헌 0002) Zhang et al., 1998, Nature Genetics, 20, 123-128, Zhang et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 1314-1317

(비특허문헌 0003) 상기 특허 문헌 1 및 비특허 문헌 1의 모든 기재는 여기에 특허 개시로서 원용된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 선상화시킨 플라스미드 벡터와 PCR 산물과의 사이의 상동 재조합 반응에 의해 세포내 클로닝을 실시하는 경우, 먼저, 삽입 DNA의 양단에 길이가 50 염기의 서열 상동 영역을 위치시키고, 벡터에서도 서열 상동 영역이 양단에 위치하도록 제한 효소에 의한 절단을 실시하고, 상동 재조합 효소(recombinase)를 갖는 대장균에 도입하는 방법이 이용된다.

[0010] 삽입 DNA는 예를 들면, PCR 산물로서 조제되지만, PCR때의 프라이머의 주형으로의 결합의 특이성이 낮은 경우나 주형에 프라이머 서열과 유사한 서열이 복수개 존재하는 경우 등에서는 비특이적 증폭 반응의 결과, 양단의 서열 상동 영역에 끼워진 영역이 클로닝의 대상인 타겟 영역이 아닌 경우도 생길 수 있다.

[0011] 서열 상동 영역에는 끼워진 영역이 클로닝의 대상인 타겟 영역이 아닌 경우도, 프라이머 중에 존재하는 서열 상동 영역을 이용하여 목적으로 하는 유전자와 동일하게 클론화되어 버린다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 상동 재조합을 이용한 유전자의 클로닝 방법에 이용하는 상동 재조합 방법에서, 목적으로 하는 유전자를 선택적으로 상동 재조합할 수 있는 방법을 제공하는 것에 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 목적으로 하는 유전자를 선택적으로 상동 재조합할 수 있는 방법을 이용하여 얻어지는 재조합 DNA 분자를 증폭하는 것을 포함한 표적 유전자의 클로닝 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 통상의 상동 재조합은, 선상화된 벡터의 양단에 존재하는 상동 재조합 영역과 증폭용 프라이머 서열에 존재하는 상동 영역은 동일하다. 이에 대해, 본 발명에 있어서의 선상화된 벡터가 갖는 상동 재조합 영역은 증폭용 프라이머의 서열에 더하여 표적 유전자에만 존재하는 증폭용 프라이머 서열의 안쪽 서열을 벡터 측에 부가함으로써, 증폭용 프라이머를 이용하여 얻어지는 증폭 산물 중에서, 표적 DNA 단편을 선택적으로 상동 재조합시킨다는 특징이 있다.

[0015] 본 발명은 이하와 같다.

[0016] [1] 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물과,

[0017] PCR 산물의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VP1 및 VP2를 가지며, 또한, P1의 안쪽 일부 서열 T1에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT1을 VP1의 말단 측에, 및/또는 P2의 안쪽의 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측에 갖는 선상화된 벡터를 사용하고(단, T1 및 T2의 적어도 한쪽은 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖음)

[0018] 상기 PCR 산물을 상동 재조합 반응에 부쳐서 상기 벡터에 삽입하고,

[0019] 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 상동 재조합 방법.

[0020] [2] T1 및 T2의 양쪽이 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 [1] 에 기재된 방법.

- [0021] [3] 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2의 한쪽 또는 양쪽이 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 [1] 또는 [2] 에 기재된 방법.
- [0022] [4] PCR 산물은, 2회의 PCR에 의해 조제된 것이고, 첫번째 PCR에서는 T1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시되고(단, P3서열은 상기 벡터가 갖는 상동 재조합 영역 VT1, VP1, VT2, 및 VP2와는 상동성을 갖지 않음), 2번째의 PCR에서는 P1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P2서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시된 것을 특징으로 하는 [1] ~ [3] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0023] [5] P1서열을 포함한 증폭용 프라이머의 3' 말단측 영역과 T1서열을 포함한 증폭용 프라이머의 5' 단측 영역은 부분적으로 중복하는 서열을 가지며, P2서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머는, 부분적으로 중복하는 서열을 가지며, 또는 갖지 않는 것을 특징으로 하는 [4] 에 기재된 방법.
- [0024] [6] 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2는 독립적으로 10 염기 이상인 것을 특징으로 하는 [1] ~ [5] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0025] [7] 벡터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2는 독립적으로 11 염기 이상인 것을 특징으로 하는 [1] ~ [6] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0026] [8] 한쪽 또는 양쪽 모두의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2는 뉴클레아제 내성 올리고 프라이머 유래인 것을 특징으로 하는 [1] ~ [7] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0027] [9] 상기 표적 유전자가 항체 유전자 또는 T세포 수용체 유전자이고, 상기 항체 유전자 또는 T세포 수용체 유전자의 정상 영역 유래의 서열 및 가변 영역 유래의 서열을 포함하며, 상기 벡터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2의 한쪽은 항체 유전자 또는 T세포 수용체 유전자의 정상 영역 유래의 서열인 것을 특징으로 하는 [1] ~ [8] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0028] [10] 상기 벡터의 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2의 다른쪽은, 항체 유전자 및 T세포 수용체 유전자에 유래하지 않는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 [9] 에 기재된 방법.
- [0029] [11] 상기 상동 재조합 반응이, 레드(Red α/β) 또는 RecE/T시스템을 이용하여 세포내에서 실시되는 것을 특징으로 하는, [1] ~ [10] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0030] [12] 상기 상동 재조합 반응이 인퓨전(In-Fusion)법으로 실시되는 것을 특징으로 하는 [1] ~ [10] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0031] [13] [1] ~ [12] 중 어느 하나에 기재된 상동 재조합 방법에 의해, 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 조제하고, 이어서 얻어진 재조합 DNA 분자를 갖는 재조합체를 증폭하는 것을 포함한, 표적 유전자의 클로닝 방법.
- [0032] [14] 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는 것을 포함한 상동 재조합 방법으로 이용하기 위한 선상화 벡터를 포함한 키트에 있어서,
- [0033] 상기 선상화 벡터는, PCR 산물의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로부터 되는 상동 영역 VP1 및 VP2를 가지며, 또한, P1의 안쪽 일부의 서열 T1에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT1을 VP1의 말단 측에, 및/또는 P2의 안쪽 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측에 갖는 선상화 벡터인, 상기 키트.
- [0034] [15] 상기 상동 재조합 방법이, [1] ~ [12] 중 어느 하나에 기재된 방법인, [14] 에 기재된 키트.
- [0035] [16] 상기 재조합 DNA 분자가 상기 재조합 DNA 분자를 갖는 재조합체를 증폭하는 것을 포함한 표적 유전자의 클로닝 방법에 이용되는 것을 특징으로 하는, [14] 또는 [15] 에 기재된 키트.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 방법(내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 이용하는 방법)에 따르면, 표적 DNA 단편과 비표적 DNA 단편이 혼재하는 경우에도, 표적 DNA 단편을 정제하는(비표적 DNA 단편을 제거함) 일 없이, 표적 DNA 단편을 효율적으로 벡터에 도입할 수 있어 이 표적 DNA 단편을 도입한 벡터를 이용함으로써, 표적 DNA 단편을 효율적으로 클로닝할 수가 있다.

[0037] 본 발명의 방법(뉴클레아제 내성 올리고 프라이머를 이용하여 증폭된 PCR 산물과 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 이용하는 방법)에 따르면, 표적 DNA 단편과 비표적 DNA 단편이 혼재하는 경우에도, 표적 DNA 단편을 정제하는(비표적 DNA 단편을 제거함) 일 없이, 상기 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 이용하는 방법에 비해, 보다 높은 확률(선택성)로 표적 DNA 단편을 벡터에 삽입할 수가 있어 이 표적 DNA 단편을 도입한 벡터를 이용함으로써, 표적 DNA 단편을 보다 효율적으로 클로닝할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 통상의 상동 재조합 방법의 반응 기구(실험 1)의 설명도.
 도 2는 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응의 반응 기구(실험 2)의 설명도.
 도 3은 S화-올리고 프라이머에 의한 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응의 반응 기구(실시예 1의 실험 3)의 설명도.
 도 4는 인퓨전(In-Fusion)법을 사용한 본 발명의 상동 재조합 반응(a도)의 반응 기구(실시예 1의 실험 6) 및 통상의 상동 재조합 반응(b도)의 설명도.
 도 5는 2회의 PCR로 PCR 산물을 조제하는 방법의 설명도.
 도 6은 자기 비즈를 이용한 cDNA 합성법(면역 글로불린 가변 영역 증폭법)의 설명도.
 도 7은 면역 글로불린 가변 영역의 상동 재조합을 이용한 벡터 도입법의 설명도.
 도 8은 실시예 1에서 사용한 DNA 단편(1)(서열 번호 15)의 염기 서열.
 도 9는 실시예 1에서 사용한 DNA 단편(2)(서열 번호 16)의 염기 서열.
 도 10은 실시예 1에서 사용한 벡터 I(서열 번호 17)의 염기 서열.
 도 11은 실시예 1으로 사용한 벡터 II(서열 번호 18)의 염기 서열.
 도 12는 실시예 1의 실험 1에 있어서의 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과.
 도 13은 실시예 1의 실험 2에 있어서의 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과.
 도 14는 실시예 1의 실험 3에 있어서의 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과.
 도 15는 실시예 1의 실험 4에 있어서의 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과.
 도 16은 실시예 1의 실험 5에 있어서의 PCR 반응액의 아가로스 겔 상기 영동의 결과.
 도 17은 실시예 1의 실험 5에 있어서의 BamHI/NotI로 절단한 플라스미드 DNA의 아가로스 겔 상기 영동의 결과. 표적 DNA 단편을 수중에 넣은 플라스미드는 BamHI/NotI 절단에 의해, 전체 길이 인간 면역 글로불린 γ 채(약 1.5kb)과 벡터(약 4kb)가 검출된다. PCR로 증폭된 인간 면역 글로불린 γ 채 가변 영역이 삽입되어 있지 않은 경우는, BamHI/NotI 절단에 의해, 인간 면역 글로불린 γ 채 정상 영역(약 0.8kb)과 벡터(약 4kb)가 검출된다.
 도18a는 실시예 1의 실험 6에 있어서의 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과.
 도18b는 실시예 1의 실험 7에 있어서의 아가로스 겔 상기 영동의 결과.
 도 19는 실시예 2에서 이용한 프라이머 서열과 DNA 단편 1의 위치 관계.
 도 20은 실시예 2에 있어서의 PCR 후의 샘플(스핀 컬럼법에 의해 정제)의 아가로스 겔 상기 영동의 결과.
 도 21은 실시예 2에 있어서의 BamHI/NotI로 절단한 플라스미드 DNA의 아가로스 겔 상기 영동의 결과.
 도 22는 실시예 2에 있어서의 각 DNA 단편과 벡터의 상동 재조합 영역을 나타내는 도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] [상동 재조합 방법]

[0040] 본 발명의 상동 재조합 방법은,

[0041] 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물과,

- [0042] 이 PCR 산물의 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VP1 및 VP2를 가지며, 또한, P1의 안쪽 일부 서열 T1에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT1을 VP1의 말단 측에, 및/또는 P2의 안쪽 일부 서열 T2에 상동적인 염기 서열로 이루어지는 상동 재조합 영역 VT2를 VP2의 말단 측에 갖는 선상화된 벡터를 이용하고(단, T1 및 T2의 적어도 한쪽은 표적 유전자에 특유의 염기 서열을 갖음),
- [0043] 상기 PCR 산물을 상동 재조합 반응에 부쳐서 상기 벡터에 삽입하고,
- [0044] 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자를 얻는 것을 포함한다.
- [0045] [통상의 상동 재조합 방법, 도 1]
- [0046] 통상의 상동 재조합 방법(ET리조합비네이션 반응)은, 도 1에 나타내는 바와 같이, 증폭용 프라이머 서열 P1 및 P2를 양말단에 갖는 PCR 산물[표적 DNA 단편(1)과 비표적 DNA 단편(2)]과 이 PCR 산물의 말단 또는 말단 부근에 위치하는, 증폭용 프라이머 서열의 일부 또는 전부로 이루어지는 상동 재조합 영역 VP1 및 VP2를 갖는 벡터(I)를 이용하여, 상기 PCR 산물을 상동 재조합에 의해 상기 벡터에 삽입한다.
- [0047] 이 경우, DNA 단편의 프라이머 서열 P1 및 P2와 선상화된 벡터의 프라이머 상동 서열 VP1 및 VP2와의 사이에 재조합이 일어난다. 이 때문에, 표적 DNA 단편(1)과 비표적 DNA 단편(2)이 혼재한 경우, DNA 단편의 길이에 극단적인 차이가 있는 등의 특별한 조건이 없는 한, 양자는 같은 확률로 벡터에 편입된다. 도 1에 나타내는 바와 같이, 표적 DNA 단편(1)과 비표적 DNA 단편(2)은 동일한 확률로 벡터(II)에 편입된다.
- [0048] 따라서, 통상의 상동 재조합 방법의 경우에는, 표적 DNA 단편(1)과 비표적 DNA 단편(2)이 혼재하는 경우에는, 미리 표적 DNA 단편(1)을 정제하고(비표적 DNA 단편(2)을 제거하여)나서, 상동 재조합 반응에 붙인다.
- [0049] [내부 서열 의존적 상동 재조합 반응, 도 2]
- [0050] 이에 대해, 본 발명에서는, 선상화된 벡터의 상동 재조합 영역은 증폭용 프라이머 서열(PCR 산물의 적어도 한쪽 말단 또는 말단 부근에 위치함) P1 (및 P2) 및 표적 DNA 단편의 증폭용 프라이머 서열의 안쪽에 존재하는 서열 T1 (및 T2)에 상동적인 염기 서열 VP1+VT1 (및 VP2+VT2)로 이루어진다. 그리고 PCR 산물의 한쪽 말단에 위치하는 증폭용 프라이머 서열의 안쪽 서열 T1 (및 T2)은, 주형 유래의 서열로 한다. 벡터의 상동 재조합 영역은, 일부가 증폭용 프라이머 서열 P1 (및 P2)에 유래하고, 나머지 일부는 표적 유전자의 서열의 일부 T1 (및 T2)에 유래한다. 이것에 의해, 증폭용 프라이머 서열을 양단에 갖지만 그 안쪽이 표적 유전자 이외의 서열을 포함한 PCR 산물에 대해서는, 증폭용 프라이머 서열 부분은 공통되지만, 표적 유전자의 서열 부분에 대해서는 상이하므로 상동 재조합 영역으로서 인식되지 않고, 상동 재조합되지 않는다. 이 때문에, 목적으로 하는 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 상동 재조합할 수가 있다. 본 발명의 방법은 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응 방법이라고 부를 수도 있다.
- [0051] 도 2에 나타나는 바와 같이, 표적 DNA 단편(1)은 양쪽 모두의 말단에, 일부가 증폭용 프라이머 서열에 유래하고, 나머지 일부는 표적 유전자의 서열의 일부에 유래하는 상동 재조합 영역 P1+T1 및 P2+T2를 갖는다. 선상화된 벡터(I)가 갖는 상동 재조합 영역 VP1+VT1 및 VP2+VT2도, 일부가 증폭용 프라이머 서열에 유래하는 서열에 상당하고, 나머지 일부는 표적 유전자의 서열의 일부에 유래하는 서열에 상당하는 것이다. 이 경우(ET리조합비네이션 반응을 이용하는 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응)는, DNA 단편의 프라이머의 상보 쇠사슬에 유래하는 서열로부터의 재조합과 벡터의 내부 서열(표적 유전자의 서열의 일부에 유래하는 서열)로부터의 재조합이 일어난다. 내부 서열을 이용하는 벡터로부터의 재조합 반응은 내부 서열을 상동 재조합 영역에 갖는, 표적 DNA 단편(1)의 특이적 재조합만이 생기고(루트 B), 내부 서열 T1 및 T2를 상동 재조합 영역을 갖지 않는, 비표적 DNA 단편(2)의 재조합은 생기지 않는다(루트 D, 내부 서열과의 상동성 없음). 그러나, DNA 단편의 프라이머 서열 P1 및 P2의 상보 쇠사슬로부터의 재조합이 일어난 경우(루트 A와 C)에는, 표적 DNA 단편(1) 및 비표적 DNA 단편(2)은 모두 벡터에 편입된다. 그 결과, 표적 DNA 단편(1) 및 비표적 DNA 단편(2)이 혼재한 경우, 표적 DNA 단편(1)의 경우는 루트 A와 B가 있는 것에 대해 비표적 DNA 단편(2)의 경우는, 루트 C만이고, 전자가 우위로 벡터에 도입된다.
- [0052] 단, PCR 산물의 말단에 위치하는 증폭용 프라이머 서열 안쪽 서열(내부 서열) T1 및 T2는, 적어도 한쪽이 주형 유래의 서열, 즉, 주형 특유(고유)의 서열이면, 상기 표적 DNA 단편의 상동 재조합의 선택성(특이성) 향상 효과는 얻어지고, 벡터로의 표적 유전자의 서열을 포함한 PCR 산물의 상동 재조합의 특이성은 큰폭으로 향상한다. 나머지의 한쪽의 내부 서열은 주형 특유(고유)의 서열이 아니어도 좋다. 그러나 T1 및 T2의, 양쪽 모두가 주형

특유(고유)의 서열인 쪽이 표적 DNA 단편의 상동 재조합의 선택성 향상 효과가 높아 그 쪽이 바람직하다.

[0053] [S화-올리고 프라이머에 의한 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응, 도 3]

[0054] 통상의 올리고 DNA를 프라이머로서 증폭한 DNA 단편을 선상화된 벡터와 함께 대장균에 도입하여 ET리컴비네이션 반응을 실시하면, 상기 DNA 단편은 균체내에서 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 소화를 받는다. 그 결과, DNA 단편의 3' 말단이 돌출한 구조가 형성된다. 본 3' 돌출단은 PCR에 이용한 프라이머 서열에 유래한다. 동일하게, 선상화된 벡터도 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 소화를 받고, 그 결과 벡터의 3' 말단이 돌출한 구조가 형성된다(도 2의 왼쪽에서 2번째의 상태). 벡터의 3' 돌출단은 내부 서열에 유래한다.

[0055] 선상화된 벡터의 3' 돌출단이 DNA 단편의 상동 영역과 재조합 반응을 실시하는 경우(경로 B 및 D)는 내부 서열을 이용하기 때문에, 표적 DNA만이 벡터에 편입된다(도 2의 경로 B). 내부 서열을 갖지 않는 비표적 DNA는 이 경로에서는 상동 재조합이 일어나지 않고 벡터에 삽입되지 않는다(도 2의 경로 D). DNA 단편의 3' 돌출단이 벡터와 상동 영역과 재조합 반응을 실시하는 경우(경로 A 및 C)는 프라이머 서열을 이용하기 때문에, 표적 DNA 단편(도 2의 경로 A)뿐만이 아니고, 비표적 DNA 단편(도 2의 경로 C)도 벡터에 삽입되는 경우가 있는 것은 상술한 바와 같다.

[0056] DNA를 구성하는 뉴클레오타이드 분자는 인산을 통한 포스포디에스테르 결합으로 연결하고 있으며, 세포내의 DNA 분해 효소는 포스포디에스테르 결합을 절단하는 활성을 갖는다. 그러나 포스포디에스테르가 S화(포스포로티오에이트화)된 DNA나 2' 4' -BNA화(Bridged Nucleic Acid화)된 DNA는 DNA 분해 효소에 내성을 나타낸다. 본 발명에서는, 이들 DNA 분해 효소에 내성을 나타내는 올리고 프라이머를 뉴클레아제 내성 올리고 프라이머라고 부른다. 뉴클레아제 내성 올리고 프라이머의 대표적인 예는, S화(포스포로티오에이트화) 올리고 프라이머이지만, 뉴클레아제 내성 올리고 프라이머는, S화 올리고 프라이머로 한정되는 의도는 아니다. S화 올리고 DNA(SP1, SP2)를 프라이머로서 PCR 반응에 의해 증폭된 S화 DNA 단편은, 그 5' 측에 S화된 서열을 갖기 때문에, 특히 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 소화를 받기 어려워진다. 따라서 상기 DNA 단편을 벡터와 함께 대장균에 도입하여 ET리컴비네이션 반응을 실시하면, S화 DNA 단편은 5' 측이 S화 되어 있기 때문에 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 소화를 받지 않는다(도 3의 왼쪽에서 2번째의 상태). 그 결과 프라이머의 상보 서열에 유래하는 3' 돌출단을 형성할 수 없고, S화 DNA 단편에서 벡터를 향한 상동 재조합은 일어나지 않는다(경로 A, C, 재조합 생기지 않음). 한편 선상화된 벡터는 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 소화를 받기 때문에, 벡터의 3' 말단이 돌출한 구조가 형성된다. 본 3' 돌출단은 내부 서열에 유래하기 때문에, 본 영역과 상동성을 갖는 표적 S화 DNA 단편만이 상동 재조합 반응의 기질이 된다(경로 B).

[0057] 이와 같이, DNA 단편의 5' 측은 S화-올리고 DNA에 유래하기 때문에, 5'→3' 엑소뉴클레아제 소화에 내성이 된다. 이 때문에 DNA 단편에서 벡터측로의 상동 재조합 반응이 억제된다. 한편, 선상화된 벡터의 5' 말단은 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의해 소화되어 한 개 쇠사슬이 된 3' 말단의 내부 서열이 표적 DNA 단편과만 상동 재조합 반응을 실시할 수가 있다. 이 결과, 비록 표적 DNA가 비표적 DNA의 5분의 1량에서도 표적 DNA 단편만이 벡터에 선택적으로 도입된다.

[0058] S화-올리고 DNA(SP1, SP2)를 프라이머로서 얻어진 PCR 산물을 상동 재조합용 DNA 단편으로서 이용하는 것으로, 도 3의 B만이 상동 재조합 반응 경로가 된다. 이것에 대해 통상의 프라이머를 이용하여 얻어지는 PCR 산물을 상동 재조합용 DNA 단편으로서 이용한 경우는, 도 2의 A, B, C가 상동 재조합 반응 경로가 된다. 이 중 경로 C는 비표적 DNA 단편이 편입되는 반응 경로이다. 본 반응에 이용되는 올리고 프라이머는 5' 측이 적어도 1 염기 이상 DNA 분해 효소에 내성이면, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 5' 측이 32' 4' -BNA화된 올리고 프라이머일 수도 있다.

[0059] [상동 재조합 반응]

[0060] 본 발명에 있어서의 상동 재조합 반응은, ET리컴비네이션법[Red α/β) 또는 RecE/T시스템]인 것 외에, 인퓨전법일 수도 있다.

[0061] ET리컴비네이션법은, RecE 또는 Red α에 의한 5'→3' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 소화에 의해 형성된 3' 돌출단을 이용한, 균체내에서 실시되는 상동 재조합 반응이다(비특히 문헌 1, 특허 문헌 1에 참조). RecE 또는 Red α 중 어느 하나를 이용하여도 본 발명을 실시할 수가 있다. 상동 재조합 반응 자체는 통상의 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0062] 인퓨전법은, 백시니아(Vaccinia) 바이러스 DNA 폴리메라아제(polymerase)의 3'→5' 엑소뉴클레아제 소화에 의해 형성된 5' 돌출단을 이용한, 시험관 내에서 실시되는 상동 재조합 반응이다. 본 반응에는 DNA 단편단과 직쇄

상 벡터단과의 사이에 약 15 bp정도의 상동 영역이 필요하다. 백시니아 바이러스 DNA 폴리메라아제의 3'→5' 엑소뉴클레아제 소화가 내부 서열을 소화할 단계에까지 도달하면, 표적 DNA 단편이 벡터에 편입된다.

[0063] 인퓨전법의 원리는, 이하의 논문에서 설명되고 있으며, 실시예 있어서는, 다카라 바이오/Clontech사에서 판매되고 있는 상동 재조합 시약을 그대로 이용할 수가 있다.

[0064] Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 1 143-151

[0065] Michael et.al.

[0066] Duplex strand joining reactions catalyzed by vaccinia virus DNA polymerase

[0067] 인퓨전법을 이용한, 통상의 상동 재조합 반응은 도 4b에 나타낸다. 백시니아 바이러스 DNA 폴리메라아제가 DNA 단편 및 벡터의 3'말단을 소화한다. 이것에 의해, DNA 단편과 선상화된 벡터간에 상보 영역이 출현한다. 본 상보 쇠사슬 영역이 서로 어닐링함으로써 DNA 단편의 벡터로의 삽입이 실시된다.

[0068] 이에 대한 본 발명의 상동 재조합 반응은, 도 4a에 나타낸다. 백시니아 바이러스 DNA 폴리메라아제의 3'→5' 엑소뉴클레아제 소화가 내부 서열을 소화할 단계에까지 도달하면 표적 DNA 단편(1)과 선상화된 벡터(I)와의 사이에 상보 쇠사슬 영역이 출현한다. 그 결과, 재조합 반응이 일어난다. 그에 대해, 비표적 DNA 단편(2)에서는, 프라이머 서열을 통해 벡터와 상보쇠사슬 영역이 형성되지만, 비표적 DNA 단편(2)과 상동성을 갖지 않는 벡터의 내부 서열이 존재하기 때문에 재조합 반응이 일어나지 않는다.

[0069] [표적 유전자]

[0070] 본 발명의 방법에 이용되는 표적 유전자는, 특별히 제한되지 않는다. 표적 유전자는, 예를 들면, 항체 유전자일 수가 있으며 항체 유전자를 포함한 PCR 산물의 한쪽 말단에 위치하는 증폭용 프라이머 서열 안쪽 서열은, 항체 유전자의 정상 영역 유래의 서열일 수가 있다. 표적 유전자는, 항체 유전자 외에 T세포 수용체 유전자, 스플리싱 배리언트(splicing variant) 등의 프라이머 영역 및 그에 인접하는 안쪽 서열이 일정하지만, 내부에 가변 부위를 갖는 DNA일 수도 있다.

[0071] PCR 산물은, 2번째 PCR에 의해 조제된 것이고, 첫번째 PCR에서는, T1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시되고(다만, P3서열은 상기 벡터가 갖는 상동 재조합 영역 VT1, VP1, VT2, 및 VP2와는 상동성을 갖지 않음), 2번째의 PCR에서는, P1서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P2서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시된 것일 수 있다. 각 서열의 위치 관계를 도 5에 나타낸다. 상기 P3서열은 상동 재조합에는 직접 관여하지 않고, 네스티드(nested) PCR를 실시할 때 첫번째에 사용하는 프라이머로서 이용된다. P1서열을 포함한 증폭용 프라이머의 3' 말단측 영역과 T1서열을 포함한 증폭용 프라이머의 5' 말단측 영역은 부분적으로 중복하는 서열을 가지며, P2서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3서열을 포함한 증폭용 프라이머는 부분적으로 중복하는 서열을 갖는 것도, 갖지 않는 것일 수도 있다.

[0072] 이하에, 면역 글로불린 유전자 정상 영역을 표적 유전자 서열로 하는 경우를 예로, 도 6에 근거하여 이하에 설명한다. 도 6에 나타내는 프라이머 B(의 일부)가, 도 2 및 5의 프라이머 T1에 상당하며, 프라이머 D와 C가 도 2 및 5의 서열 P1와 P2에 상당한다. 도 6의 프라이머 A는 프라이머 P3에 대응한다.

[0073] (1) PCR 산물

[0074] 자기 비즈를 이용한 cDNA 합성법의 도 6(면역 글로불린 가변 영역 증폭법)을 참조.

[0075] 주형에 폴리 dG를 3' 말단에 부가한 면역 글로불린 cDNA(자기 비즈상에 합성), 프라이머 A(면역 글로불린 유전자 정상 영역)와 B(폴리 dG에 결합하기 위한 것)를 이용하여, 첫번째 PCR를 실시한다.

[0076] 첫번째 PCR 종료후, 이것을 예를 들면, 100배 정도로 희석한 것을, 2번째의 PCR의 주형으로서 이용한다. 사용하는 프라이머는 D와 C이다. D는, 3'측의 서열이 첫번째의 PCR에서 사용한 프라이머 B의 5'측과 오버랩 하도록 설계하고, 이 영역에 D의 3' 말단측 영역을 결합시킨다. 프라이머 C는 정상 영역에 위치하고, 첫번째 PCR로 사용한 프라이머 A의 안쪽에 위치하도록 설계한 프라이머이다. 단, 프라이머 C는 프라이머 A와 일부가 오버랩하는 서열을 가질 수도 있으나, 프라이머 A와 오버랩 하지 않는 서열을 가질 수도 있다. 첫번째의 PCR에서 면역 글로불린의 정상 영역을 포함한 DNA 단편이 증폭되고 있으면 프라이머 C와 D를 이용함으로써 한층 더 면역 글로불린의 정상 영역을 포함한 DNA 단편을 증폭할 수가 있다. 5' RACE-PCR(rapid amplification of cDNA end)로 불리는 PCR법의 하나다.

- [0077] 프라이머 D+B서열은, 2번째 PCR 반응에서 프라이머 B와 D에 의해 합성된 인공적인 서열이며, 주형의 서열에 특유(고유)의 서열은 갖지 않는다. 이 부위가 벡터의 상동 재조합용 서열의 1개가 된다.
- [0078] 2번째의 유전자 증폭 반응에서는, 프라이머 D가 특이적으로, 첫번째의 PCR에서 증폭된 DNA 단편의 3'말단측 영역에 결합하고(프라이머 B의 서열을 가지기 때문에), 프라이머 C가 프라이머 A의 보다 안쪽의 면역 글로불린 정상 영역에 결합한다. 그 결과, 특이적인 증폭이 실시된다. 이 경우는 반드시 PCR 산물의 한쪽 편에는 D+B의 서열이 존재하게 된다. 그러나 실제로, 사용한 프라이머가 이것과 유사한 염기 서열을 갖는 비표적 DNA에 결합한 결과, 비특이적인 PCR 산물이 합성되어 버리는 것도 있다. 예를 들면, 프라이머 D가 비특이적으로 다른 DNA 단편에 결합한 경우에는, 합성된 DNA 단편에는 프라이머 D의 서열이 그 단말에 존재하지만, 그 안쪽에는 프라이머 B의 서열은 존재하지 않는다. 이러한 서열을 갖는 DNA 단편은 프라이머 D+B서열을 갖지 않기 때문에, 내부 서열 의존적 상동 재조합의 대상이 되지 않는다(도 7, 면역 글로불린 가변 영역의 상동 재조합을 이용한 벡터 도입법 참조). 따라서 프라이머 B의 프라이머 D와 오버랩하지 않는 서열은 도 5에도 나타내는 바와 같이, 내부 서열로서 작용하고, 표적 DNA 단편의 상동 재조합의 선택성을 향상시킨다.
- [0079] 또, 만약 프라이머 C가 이것과 유사한 염기 서열을 갖는 비표적 DNA에 결합하여 DNA 증폭이 실시된 경우, 이 DNA 단편에는 도 7으로 나타낸 +α에 해당하는 정상 영역의 서열이 존재하지 않는다. +α에 해당하는 서열은 표적 DNA인 면역 글로불린 쇠사슬 특유(고유)의 서열이다. 따라서, 상동 영역으로서 +α를 갖지 않는 DNA 단편은, 상동 재조합의 대상이 되지 않고, 벡터에는 삽입될 것은 없다(도 7, 면역 글로불린 가변 영역의 상동 재조합을 이용한 벡터 도입법 참조). 프라이머 C가 특이적으로 표적 유전자인 면역 글로불린 유전자의 정상 영역에 결합하여 DNA가 증폭되었을 때에만, 프라이머 C+α 서열이 DAN 단편의 말단에 나타난다. 이 서열이 벡터와의 상동 재조합의 대상이 된다(도 7).
- [0080] 본 발명의 방법은, 비특이적으로 증폭된 PCR 산물은 벡터에 도입되지 않고, 특이적으로 증폭된 PCR 산물만이 벡터에 자동적으로 도입되는 방법이다. 종래 방법에서는, 목적으로 하는 특이적 증폭 산물을 벡터에 도입하기 위해서는, PCR 반응 후, 겔 전기 영동법 또는 스핀 컬럼법 등을 이용한 특이적 증폭 산물의 분리 정제 작업이 필요하다. 또 얻어진 플라스미드의 유전자 서열 해석도 실시해야만 하고, 수고와 비용이 든다.
- [0081] 상기와 같이, PCR 산물은, 2회의 PCR에 의해 조제된 것이고, 첫번째의 PCR에서는 T1와 P3의 서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시되며, 2번째의 PCR에서는, P1와 P2의 서열을 포함한 증폭용 프라이머를 이용하여 실시된 것일 수가 있다. P1의 서열을 포함한 증폭용 프라이머와 T1의 서열을 포함한 증폭용 프라이머는 5' RACE-PCR에서는 부분적으로 중복하는 서열을 갖는다. 또, P2의 서열을 포함한 증폭용 프라이머와 P3의 서열을 포함한 증폭용 프라이머에 대해서도, 부분적으로 중복하는 서열을 가질 수도 있지만, 갖지 않는 것일 수도 있다.
- [0082] 각 증폭용 프라이머 서열은, PCR의 프라이밍의 성능을 고려하여, 예를 들면, 10 염기 이상일 수가 있고, 바람직하게는 14~35 염기의 범위이다.
- [0083] 프라이머 서열 P1 및 P2에 유래하는 상동 재조합 영역은, 예를 들면, 10 염기 이상일 수가 있으며, 바람직하게는 14~35 염기의 범위이다.
- [0084] 상동 재조합 영역의 일부의 서열과 상동적인 염기 서열인 증폭용 프라이머 서열 안쪽 내부 서열 T1 및 T2는 1 염기 이상의 범위이고, 바람직하게는 5~1000 염기의 범위이다. 또한, 증폭용 프라이머 서열과의 합계 P1+T1 및 P2+T2는, 각각 독립적으로 11 염기 이상의 범위일 수가 있으며, 바람직하게는 25~1000 염기의 범위이다.
- [0085] [클로닝 방법]
- [0086] 본 발명은, 상기 본 발명의 방법에 의해 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입한 재조합 DNA 분자(재조합 벡터)를 증폭하는 것을 포함한, 표적 유전자의 클로닝 방법을 포함한다. 재조합 DNA 분자의 증폭에는 통상의 방법을 이용할 수가 있다. 발현 벡터에 편입되어 증폭된 재조합 DNA 분자(재조합 벡터)는, 세포 등으로 발현시켜서 단백질을 얻고, 또한 얻어진 단백질의 기능 해석에 이용할 수가 있다. 목적 유전자가 항체 유전자의 경우, 분리된 항체(단백질)가 목적의 항원에 결합할지, 조사할 수가 있다.
- [0087] 또, 증폭된 재조합 DNA 분자(재조합 벡터)에 포함되는 표적 유전자는, 예를 들면, 제한 효소 처리에 의해 벡터로부터 잘라나오고, 필요에 의해 정제된다. 표적 유전자의 분리 및 정제는 통상의 방법에 의해 실시할 수가 있다. 표적 유전자의 분리 및 정제로서는, 예를 들면, 겔 추출이나 컬럼 정제 등을 들 수가 있다. 분리 및 정제된 표적 유전자는, 예를 들면, 염기 서열의 결정, 발현 벡터에 편입되고, 표적 유전자의 기능 해석 등에 이용할 수가 있다.

의 서열이 존재하고, 또한 안쪽(표적 DNA측)에는 인간 면역 글로불린 감마-(Ig γ 쇠사슬 정상 영역 유래의 서열이 존재한다(상기 DNA 단편 I염기 서열 참조).

[0102] DNA 단편(2)은, 비표적 DNA로 그 말단에 PCR용의 프라이머(a) 서열 유래의 서열이 존재하고, 이미 한쪽 말단에는, 프라이머(b) 서열 유래의 서열이 존재한다(DNA 단편 II염기 서열 참조).

[0103] 직쇄상 벡터(I)는 상동 재조합 영역으로서 프라이머(a) 유래 서열 및 그 안쪽에 폴리 dG/dC서열을 가지며, 타단에는 프라이머(b) 유래 서열 및 그 안쪽에 면역 글로불린 감마-(Ig γ) 쇠사슬 정상 영역 유래 서열을 갖는다(벡터 I서열 참조).

[0104] 직쇄상 벡터(II)는 상동 재조합 영역으로서 프라이머(a) 유래 서열 및 프라이머(b) 유래 서열만을 갖는다(벡터 II서열 참조).

[0105] 프라이머(a):(pCMV EGFP N1 멀티 클로닝 사이트 유래)

[0106] 5' -CTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGA-3' (서열 번호 1)

[0107] 프라이머(b): (인간 Ig γ 쇠사슬 정상 영역 유래)

[0108] 5' -AGCCGGAAGGTGTGCACGCCGTG-3 (서열 번호 2)

[0109] 내부 서열(폴리 dG/dC)

[0110] 5' -TCCCCCCCCCCCC-3' (서열 번호 3)

[0111] 3' -AGGGGGGGGGGGG-5' (서열 번호 4)

[0112] 내부 서열(인간 Ig γ 쇠사슬 정상 영역 유래)

[0113] 5' -CGTGGAAGTTCAGGCGCCCTGAC-3' (서열 번호 5)

[0114] 3' -GCACCTTGAGTCCGCGGGACTG-5' (서열 번호 6)

[0115] 벡터(I) 상동 재조합 서열: 프라이머 서열(a)+ 내부 서열(폴리 dG/dC)

[0116] 5' -CTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCCCCCCCCCCC-3' (서열 번호 7)

[0117] 3' -GAAGCTTAAGACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCTAGGGGGGGGGGGG-5' (서열 번호 8)

[0118] 벡터(I) 상동 재조합 서열: 내부 서열(인간 Ig γ 쇠사슬 정상 영역 유래) +프라이머 서열(b)

[0119] 5' -CGTGGAAGTTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT-3' (서열 번호 9)

[0120] 3' -GCACCTTGAGTCCGCGGGACTGGTCGCCGCACGTGTGGAAGGGCCGA-5' (서열 번호 10)

[0121] 벡터(II) 상동 재조합 서열: 프라이머 서열(a)

[0122] 5' -CTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGA-3' (서열 번호 11)

[0123] 3' -GAAGCTTAAGACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCT-5' (서열 번호 12)

[0124] 벡터(II) 상동 재조합 서열: 프라이머 서열(b)

[0125] 5' -CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT -3' (서열 번호 13)

[0126] 3' -GTCGCCGCACGTGTGGAAGGGCCGA -5 (서열 번호 14)

[0127] DNA 단편(1)(도 8, 서열 번호 15)은 인간 면역 글로불린 γ 쇠사슬 가변 영역과 일부의 정상 영역을 갖는 683bp의 표적 DNA 단편에서, PCR 증폭을 위한 프라이머(a) 및 프라이머(b) 서열을 갖는다. 또 내부 서열 특이적 상동 재

조합 반응에 이용되는 서열로서 프라이머(a)의 안쪽에 폴리 dG/dC서열, 프라이머(b) 서열의 안쪽에 면역 글로불린 감마-쇄사슬 정상 영역 유래 서열을 각각 갖는다. 증폭에 이용한 프라이머(a), (b)의 위치를 화살표로 나타냈다.

[0128] DNA 단편(2)(도 9, 서열 번호 16)은 628bp의 GFP 유전자에 유래하는 DNA 단편에서 그 양단에 PCR 증폭을 위해 이용하는 프라이머(a) 서열과 프라이머(b) 서열을 갖는다. 양프라이머 서열의 안쪽에는 내부 서열 특이적 상동 재조합 반응에 이용되는 서열은 존재하지 않고, GFP 유전자 유래의 서열이 존재한다.

[0129] pCMV EGFPN1(Clontech사)의 Eco RI와 NotI 사이트에 도 8의 서열을 삽입하여 벡터 I(도 10, 서열 번호 17)를 작성하였다. 본 플라스미드는 Eco RI사이트 하류에 상동 재조합을 위한 프라이머(a) 서열 및 5' -RACE PCR를 이용하여 증폭한 인간 면역 글로불린 γ 쇄사슬 DNA 단편을 특이적으로 편입하기 위한 내부 서열로서 폴리 dC/dG서열을 갖는다. 폴리 dC/dG서열의 하류에는, 제한 효소 절단으로 직쇄상이 되지 않았던 플라스미드가 도입된 대장균내를 자당 함유 배양지상에서 죽이기 위한 음성 선택(negative selection) 마커인 SacB 유전자(2 kb)가 EcoRV 사이트(서열 번호 17의 62위와 63위의 사이)에 삽입된다. SacB 유전자 하류에는, 5' -RACE PCR를 이용하여 증폭한 인간 면역 글로불린 γ 쇄사슬 DNA 단편을 특이적으로 편입하기 위해 또 하나의 내부 서열로서 인간 면역 글로불린 γ 쇄사슬 정상 영역의 서열이 존재한다. 그 하류에는 프라이머(b) 서열이 존재한다.

[0130] 본 벡터를 EcoRV로 절단 후 에탄올 침전에 의해 직쇄상 플라스미드 DNA를 회수하여 최종 농도 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 조제하였다(도 7).

[0131] pCMV EGFPN1(Clontech사)의 Eco RI와 NotI 사이트에 도 9의 서열을 삽입하여 벡터 II(도 11, 서열 번호 18)를 작성하였다. 본 플라스미드는 Eco RI사이트 하류에 상동 재조합을 위한 프라이머(a) 서열을 갖는다. 프라이머(a) 서열의 하류에는 상동 재조합을 실시하지 않았던 플라스미드가 도입된 대장균내를 자당 함유 배양지상에서 죽이기 위한 음성 선택 마커인 SacB 유전자(2 kb)가 EcoRV 사이트(서열 번호 18의 51위와 52위의 사이)에 삽입된다. SacB 유전자 하류에는, 상동 재조합을 위한 프라이머(b) 서열이 존재한다.

[0132] 본 벡터를 EcoRV로 절단한 후 에탄올 침전에 의해 직쇄 형태의 플라스미드 DNA를 회수하여 최종 농도 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 조제하였다.

[0133] (실험 1)

[0134] 통상의 ET리조합비네이션법을 이용한 상동 재조합 반응

[0135] [방법]

[0136] DNA 단편 1 및 2가 삽입된 플라스미드를 주형으로 하고, 프라이머(a) 및 (b)을 이용하여 PCR 반응을 실시하여 DNA 단편 1 및 2를 증폭하였다. PCR 반응은 $50\mu\text{l}$ 의 반응계에, 주형 플라스미드 DNA 2ng, 각 프라이머 10 pmol, dNTP 10nmol을 더해 다카라 바이오사제 PrimeSTAR 내열성 DNA 폴리메라아제를 이용하고 94°C 30초- 68°C 40초의 반응을 30 사이클로 실시하였다. 증폭된 DNA 단편을 스핀 컬럼법에 의해 정제하여 $50\text{ng}/\mu\text{l}$ 의 농도로 조제하였다.

[0137] 콘피넨트셀은 GeneBridges사의 Red/ET Recombination system에 따라 조제하였다. DNA 단편 1, 2 및 벡터(II)를 50ng:50ng:100ng의 비율로 혼합한 용액 $3\mu\text{l}$ 를 대장균에 도입하였다. 얻어진 약제 내성균의 콜로니로부터, 프라이머(a) 및 (b)를 이용한 콜로니 PCR법을 실시하여 벡터에 삽입된 DNA 단편을 증폭하였다.

[0138] 콜로니 PCR법은, 대장균 콜로니를 $50\mu\text{l}$ 의 PBS-0.1% TritonX 용액에 현탁시키고, 이것을 95°C 에서 5분 가열하여 균체로부터 플라스미드 DNA를 용출시켰다. PCR 반응은 상기균체 가열 용액 $1\mu\text{l}$ 에 프라이머(a) 및 (b)를 10pmol, dNTP 10nmol를 더해 $50\mu\text{l}$ 의 반응계에서 다카라 바이오의 PrimeSTAR 내열성 DNA 폴리메라아제를 이용한 PCR 반응(94°C 30초- 68°C 40초의 반응을 30 사이클)을 실시하였다. 반응액 2°C 를 1%아가로스 겔에서 상기 영동을 실시하여 증폭된 DNA 단편을 분리하였다.

[0139] [결과]

[0140] 콜로니 PCR 산물의 상기 영동의 결과(도 12), IgG에 유래하는 683bp의 DNA 단편(1)이 삽입되고 있는 것은 6개. GFP에 유래하는 628 bp의 DNA 단편(2)이 삽입되고 있는 것은 5개, DNA 단편 1 및 2가 삽입되어 있지 않은 것이 1개 검출되었다. 즉, 통상의 ET리조합비네이션법에서는 표적 DNA 단편과 비특이적 DNA 단편이 혼재한 경우에, 표적 DNA 단편만을 효율적으로 벡터에 도입하는 것은 곤란하다는 것이 판명되었다.

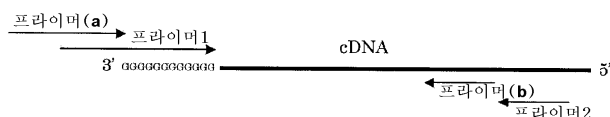
[0141] (실험 2)

- [0142] 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 이용한 표적 DNA의 선택적 클론화
- [0143] [방법]
- [0144] 실험 1에서 조제한 DNA 단편 1, 2 및 벡터(I)를 50ng:50ng:100ng의 비율로 혼합한 용액 3 μ l를 대장균에 도입하였다. 얻어진 약제 내성균의 콜로니로부터 벡터(I)에 도입된 DNA 단편을 실험 1과 동일한 방법으로 증폭하여 전기 영동법으로 해석하였다.
- [0145] [결과]
- [0146] 콜로니 PCR 산물의 전기 영동의 결과(도 13), IgG에 유래하는 DNA 단편 1이 삽입되고 있는 것은 8개. GFP에 유래하는 DNA 단편 2가 삽입되고 있는 것은 2개, DNA 단편 1 및 2가 삽입되어 있지 않은 것이 2개 검출되었다. 이상의 결과로부터, 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 실시함으로써 표적 DNA 단편과 비표적 DNA 단편이 혼재한 경우에서도, 표적 DNA 단편을 효율적으로 벡터에 도입할 수 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0147] (실험 3)
- [0148] S화-올리고 프라이머를 이용한 내부 서열 의존적 상동 재조합법
- [0149] 프라이머(a) 및 (b)의 5' 말단 3 염기를 S화한 올리고 프라이머를 이용하여 실험 1과 같은 방법으로 S화 DNA 단편 1, 2를 조제한 것이다.
- [0150] 본 S화 DNA 단편 1, 2 및 벡터(I)를 50ng:50ng:100ng의 비율로 혼합한 용액 3 μ l를 대장균에 도입하였다. 약제 내성균의 콜로니로부터 프라이머(a) 및 (b)를 이용하여 콜로니 PCR법을 실시하여 벡터에 삽입된 DNA 단편을 증폭하였다. 그 결과(도 14), IgG에 유래하는 DNA 단편 1이 삽입된 것은 9개. GFP에 유래하는 DNA 단편 2가 삽입된 것은 0개, DNA 단편 1 및 2가 삽입되어 있지 않은 것이 2개 검출되었다.
- [0151] (실험 4)
- [0152] 실험 3에서 조제한 S화 DNA 단편 1, 2 및 벡터(I)를 10ng:50ng:100ng의 비율로 혼합한 용액 3 μ l를 대장균에 도입하고, 같은 방법으로 벡터에 삽입된 DNA 단편을 해석하였다. 그 결과(도 15), IgG에 유래하는 DNA 단편 1이 삽입되는 것은 7개, GFP에 유래하는 DNA 단편 2가 삽입되는 것은 1개, DNA 단편 1 및 2가 삽입되어 있지 않은 것이 3개 검출되었다. 이상의 결과로부터 S화-올리고 프라이머로 증폭된 PCR 산물과 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응을 이용함으로써 표적 DNA를 35배의 정확성으로 벡터에 삽입하는 것이 가능해졌다.
- [0153] (실험 5)
- [0154] ET리콰비네이션법을 이용한, 인간 말초피 B임파구 면역 글로불린 γ 최사슬 가변 영역 DNA 단편의 벡터로의 도입
- [0155] 인간 말초피 B임파구 1개를, 올리고 dT25가 결합한 자기 비즈(다이나비즈) 3 μ g가 들어간 세포 용해액 3 μ l (100mM Tris HCl (pH7.5), 500mM LiCl, 1% 도데실 황산 Li (LiDS) 5mM dithiothreitol)에 더하여 세포내의 mRNA를 자기 비즈에 결합시켰다. 이어서, 자기 비즈를 3 μ l의 mRNA 세정용 용액 A(10mM Tris HCl (pH7.5), 0.15M LiCl, 0.1% LiDS), 이어서 3 μ l의 mRNA 세정용 용액 B(75mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.1% TritonX, 0.5mM dNTP, 5mM DTT, 2 unit RNase inhibitor)로 1회 세정한 후, cDNA 합성을 실시하였다. 즉 세정 후의 자기 비즈에 cDNA 합성용 용액 3 μ l(50mM Tris HCl (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.5mM dNTP, 5mM DTT, 2 unit RNase inhibitor, 10 unit SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen)를 더해 50℃에서 1시간 반응시켰다. 이어서, 자기 비즈를 3' 테일링 세정 용액 3 μ l(50 mM인산 칼륨(pH7.0), 0.5mM dGTP, 0.1% Triton X-100, 4mM 염화 마그네슘)으로 세정하고, 새롭게 3' 테일링 반응 용액 3 μ l(50mM인산 칼륨(pH7.0), 0.5mM dGTP, 0.1% Triton X-100, 4mM 염화 마그네슘, terminal deoxynucleotidyl transferase 10U)를 더하여 37℃에서 30분간 반응을 실시하였다.
- [0156] 자기 비즈를 3 μ l의 TE용액(10mM Tris HCl(pH7.5), 1mM EDTA, 0.1% TritonX)으로 세정한 후, 5'-RACE PCR법을 이용하여 인간 면역 글로불린 γ 유전자의 증폭을 실시하였다. 첫번째의 PCR 반응은 자기 비즈에 25 μ l의 PCR 반응 용액(프라이머 1 및 2 각 10pmol, dNTP 10nmol, 다카라 바이오 PrimeSTAR 내열성 DNA 폴리메라아제 1 U)을 더하고 94℃ 30초-68℃ 40초의 반응을 35 사이클 실시하였다. 프라이머 1의 서열은 5'-CGGTACCGCGGCCGGGATCCCCCCCCCCCCDN-3' (서열 번호 19)에서 TdT에 의해 cDNA의 3' 말단에 부가된 폴리 dG에 어닐링한다. 프라이머 2의 서열은 5'-ACGCTGCTGAGGAGTAGAGTCCTGAG-3' (서열 번호 20)에서 인간 면역 글로

불린 γ 유전자 정상 영역에 유래한다. 반응 후 PCR 용액에 물 225 μ l를 더하여 10배 희석한 용액 1 μ l를 주형으로 하고, 프라이머(a) 5' - CTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGA-3' (서열 번호 1) 및 (b) 5' - AGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTG-3' (서열 번호 2)를 이용하여 첫번째 PCR과 동일한 조건으로 반응을 실시하였다. 프라이머(a)는 첫번째 PCR로 증폭된 DNA 단편의 프라이머 1 서열과 상보적인 영역에 어닐링한다. 프라이머(b)는 인간면역 글로불린 γ 유전자 정상 영역에 유래하여 첫번째 PCR에 이용한 프라이머 2의 상류에 위치한다.

[0157] 이하에 프라이머의 위치 관계를 나타냈다.

[0158] [반응식 2]



[0159]

[0160] 도 16에 나타내는 바와 같이, 얻어진 PCR 반응액 2 μ l를 아가로스 겔 전기 영동법에 의해 분리한 바, 목적으로 하는 면역 글로불린 γ 유래하는 DNA 단편(약 0.8 kb)에 더하여 100-300bp부근에 스미아(smear) 형태의 비특이적 증폭에 유래하는 DNA 단편이 검출되었다.

[0161] 본 PCR 반응액 0.5 μ l와 EcoRV 절단에 의해 직쇄화한 벡터(I) 100ng를 혼합한 용액 2 μ l를 이용하여, ET리콤비네이션 반응을 실시하였다. 대장균을 0.5%자당을 함유하는 카나마이신(kanamycin) 아가-플레이트상에서 증식시켜서 형성된 콜로니 5개를 2ml의 LB배양지에서 하룻밤 배양하여, 균체로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA를 BamHI/NotI로 절단 후, 아가로스 겔 전기 영동법을 이용하여 표적 인간 면역 글로불린 γ 가변 영역 DNA 단편의 벡터로의 도입 효율을 조사하였다. 그 결과(도 17), 해석한 5개 모든 콜로니에서 표적 DNA 단편이 올바르게 벡터에 편입되고 있다는 것이 판명되었다.

[0162] (실험 6)

[0163] 인퓨전법을 이용한 내부 서열 의존적 상동 재조합 반응

[0164] 실험 1에서 조제한 DNA 단편 1, 2 및 벡터(I)를 50ng:50ng:100ng로 혼합한 용액 10 μ l를, 다카라 바이오/Clontech사의 In-Fusion II dry-down 시약에 더하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분 반응을 실시하였다. TE용액으로 5배에 희석한 반응액 2 μ l를 케미컬콘피넨트 셀(competent cells)에 도입하여 형질 전환을 실시하였다. 얻어진 약제 내성의 대장균 콜로니를 이용하여, 실험 1과 동일한 수법으로 콜로니 PCR를 실시하고, 벡터에 삽입된 DNA 단편을 증폭하였다. 그 결과(도18a), IgG에 유래하는 DNA 단편 1이 삽입된 것은 7개, GFP에 유래하는 DNA 단편 2가 삽입된 것은 0개, DNA 단편 1및 2가 삽입되어 있지 않은 것이 4개 검출되었다. 이상의 결과로부터 내부 서열 의존적 상동 재조합법은 ET리콤비네이션법 뿐만 아니라 In-Fusion법에도 적용할 수 있다는 기술인 것이 판명되었다.

[0165] (실험 7)

[0166] 인퓨전법을 이용한, 인간 말초피 B임파구 면역 글로불린 γ 가변 영역 DNA 단편의 벡터로의 도입

[0167] 실험 5에서 조제한 표적 인간 면역 글로불린 γ 가변 영역 DNA 단편, 및 벡터(I)를 50ng:100ng로 혼합한 용액 10 μ l를 다카라 바이오/Clontech사의 In-Fusion II dry-down 시약에 더하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분, 그 후 50 $^{\circ}$ C에서 15분 반응을 실시하였다. TE용액으로 5배에 희석한 반응액 2 μ l를 케미컬 콘피넨트 셀에 도입하여 형질 전환을 실시하였다. 얻어진 약제 내성의 대장균 콜로니로부터, 실험 5와 같은 수법을 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA를 BamHI/NotI로 절단 하여 아가로스 겔 전기 영동법에 의해 표적 인간 면역 글로불린 γ 가변 영역 DNA 단편의 벡터로의 도입 효율을 조사하였다. 그 결과(도18b), 해석한 12개 모든 콜로니에 있어 표적인 면역 글로불린 유전자 단편이 올바르게 벡터에 편입되고 있다는 것이 판명되었다. 이상의 결과보다 본 발명은, ET리콤비네이션법과는 반응 기구가 다른 상동 재조합법인 In-Fusion법에서도 목적으로 하는 PCR 산물을 특이적으로 벡터에 삽입하는 것이 가능하다고 하는 것이 실증되었다.

[0168] 실시예 2

[0169] DNA 단편의 조제

[0170] 실험 1에서 사용한 DNA 단편 I를 주형으로 하여, 프라이머 1(5' - CGGTACCGCGGGCCCGGGATCCCCCCCCCCCCDN-3') (서열 번호 19) 및 이하에 나타낸 프라이머(b)로부터 (e)를 각각

이용하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응 조건은 실험 1에 준거하여 실시하였다.

[0171] 이하에 이용한 프라이머 서열과 DNA 단편 1의 위치 관계를 도 19에 나타냈다.

[0172] 프라이머(b) 5' -AGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTG -3' (서열 번호 21)

[0173] 프라이머(c) 5' -AGGTGTGCACGCCGCTGGTC-3' (서열 번호 22)

[0174] 프라이머(d) 5' -CACGCCGCTGGTCAGGGCGCCTG-3' (서열 번호 23)

[0175] 프라이머(e) 5' -CTGGTCAGGGCGCCTGAGTTCCA-3' (서열 번호 24)

[0176] PCR 후의 샘플을 스핀 컬럼법에 의해 정제한 후, 용액 1 μ l를 아가로스 겔 상기 영동으로 해석하였다. 그 결과 예상된 사이즈의 DNA 단편이 확인되었다(도 20). 실험 1에서 조제한 벡터(I) 100ng와 각 DNA 단편 25ng를 혼합한 용액 2 μ l를 이용하여, Red/ET리콤비네이션법을 이용한 상동 재조합 반응을 실시하였다. 대장균을 0.5%자당을 함유하는 카나마이신 아가-플레이트상에서 증식시켜서 형성된 콜로니수를 조사하였다. 얻어진 콜로니수는 146개(DAN 단편 1-(b)), 125개(DAN 단편 1-(c)), 144개(DAN 단편 1-(d)), 80개(DAN 단편 1-(e))였다.

[0177] 형성된 콜로니 5개를 2ml의 LB배양지에서 하룻밤 배양하여 균체로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA를 BamHI/NotI로 절단하여 아가로스 겔 전기 영동법에 의해 각 DNA 단편의 벡터로의 도입 효율을 조사하였다(도 21). 표적 DNA 단편을 편입한 플라스미드는 BamHI/NotI 절단에 의해, 전체 길이 인간 면역 글로불린 γ 쇄사슬(약 1.5kb)과 벡터(약 4kb)가 검출된다.

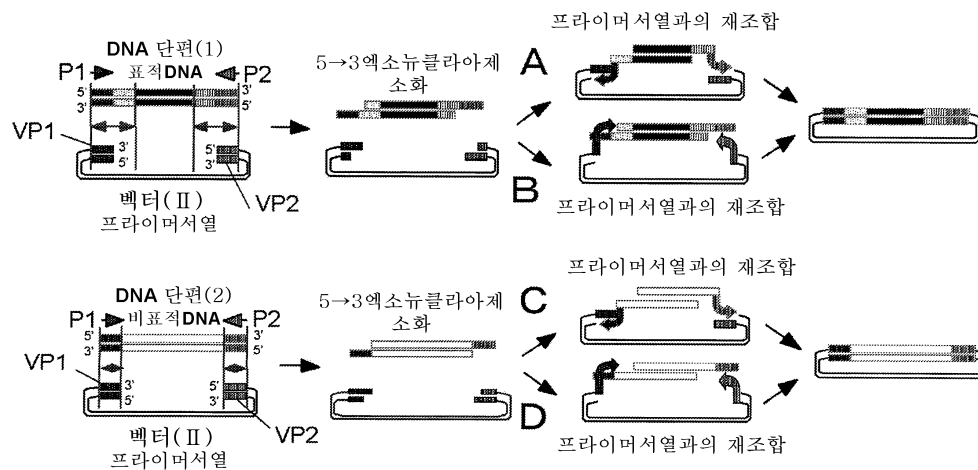
[0178] 그 결과(도 21), DAN 단편 1-(b)을 이용한 경우는 100%, 1-(c) B, 1-(d) C를 이용한 경우는 80%, 1-(e)를 이용했을 경우는 60%의 비율로 목적 DNA 단편이 벡터에 도입되었다. 이상의 결과로부터 내부 서열 의존적 상동 재조합에는 적어도 한쪽 측 2 염기 이상의 내부 서열에 더하여 증폭용 프라이머 서열과의 합계 25 염기 이상이 필요하다는 것이 밝혀졌다. 각 DNA 단편과 벡터의 상동 재조합 영역도를 도 22에 나타낸다.

[0179] (산업상의 이용 가능성)

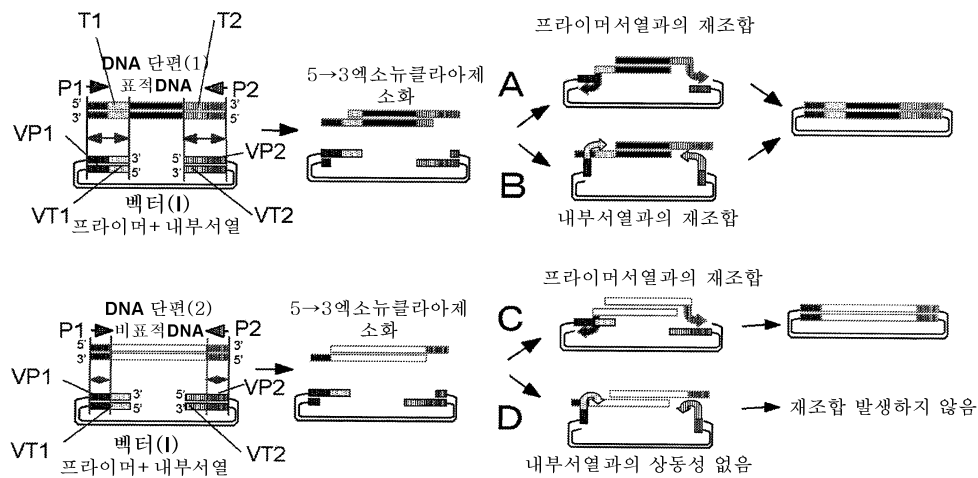
[0180] 본 발명은 유전자 공학의 분야에 유용하다.

도면

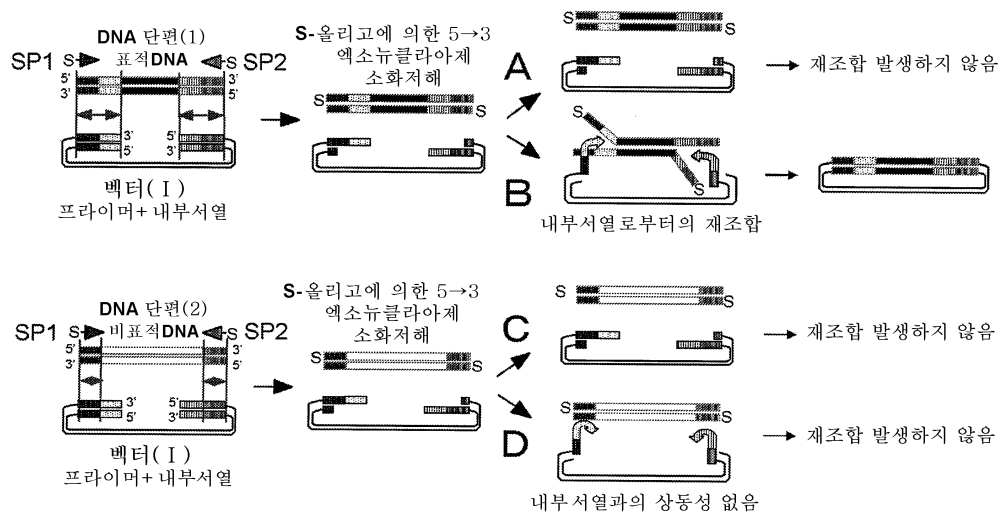
도면1



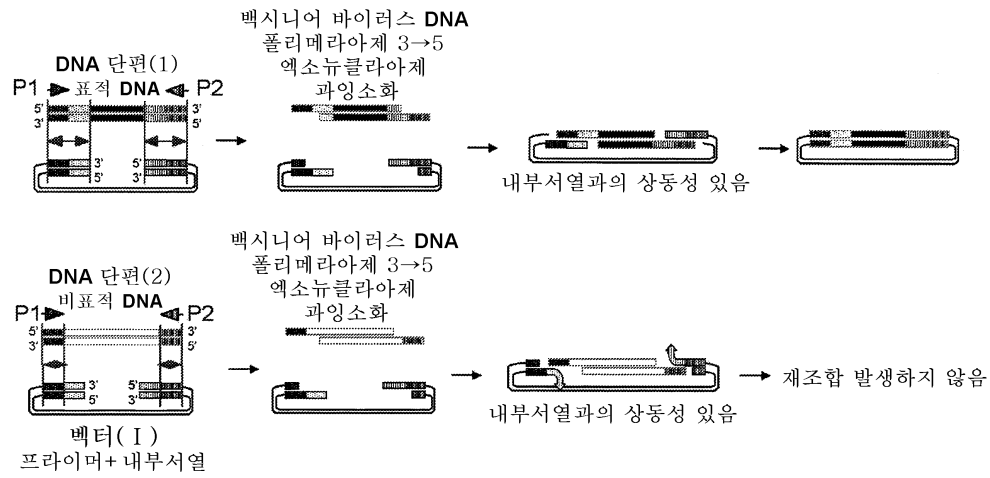
도면2



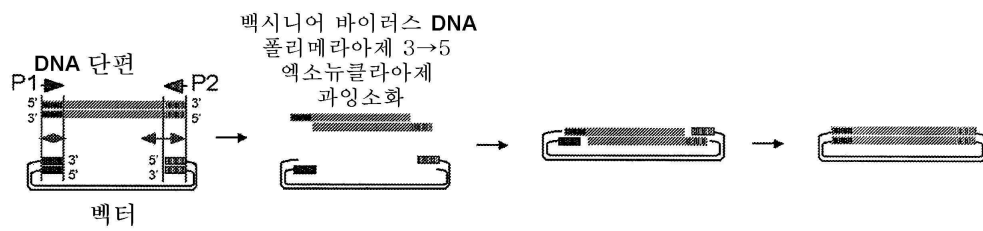
도면3



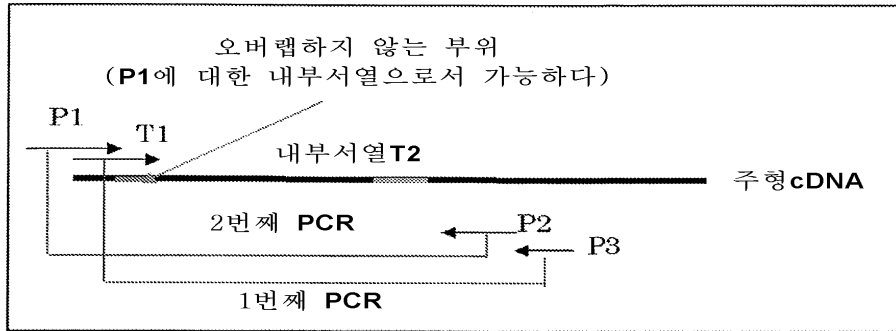
도면4a



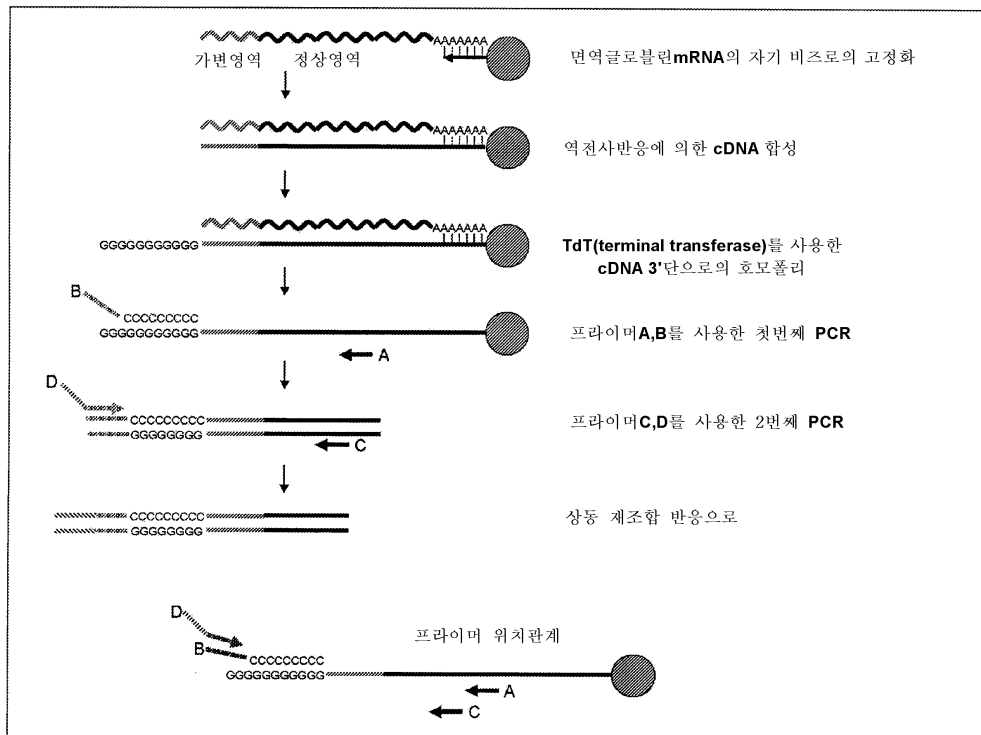
도면4b



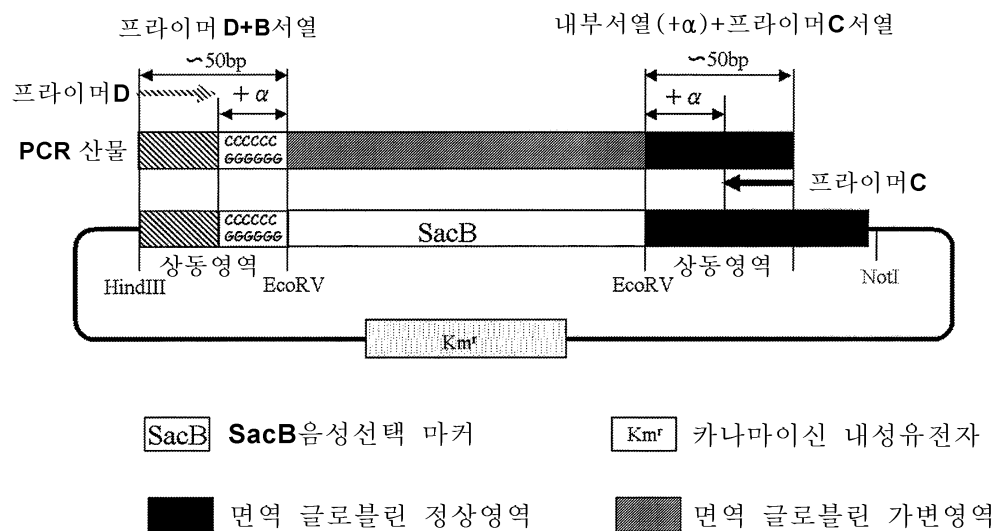
도면5



도면6



도면7



도면8

DNA단편 1 염기서열 (음영부:상동재조합영역, □:내부서열, →:프라이머서열)

프라이머 (a)

CTTCGAATTCTCGAGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGATCCCCCCCCCCCGACATAACAACCGAATCCTCCTCTAAAG
AAGCACCTGGGAGCACAGCTCATCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTGTGGTGGCAGCAGCTACAGGTGTCCA
GTCCCAGGTCACAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTG
GAGGCACCTTCAGCAGCTATACTTTACCTGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGATGGGAAGGATCATC
CCCAATGTGGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGCTTATCGCGGACAAATTCACGAATTCAAC
GTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTTTATTTTGTGCCGAGACCCCTCGGGCCACTCACATG
ACTACTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCTTGGCGCCCTGC
TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGT
GAACTCAGGCGCCCTGACGACGGCGGTGCACACCTTCCCGGCT

프라이머 (b)

도면9

DNA단편2염기서열(음영부:상동재조합부, →:프라이머서열)

프라이머(a)

CTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTGCGCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
CACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGG
GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTG
ACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCAGGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCGCGCGGAGGTGAAGTTCG
AGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG
GAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCG
CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCT

프라이머(b)

도면10

벡터 I서열(음영부:상동재조합영역, □:내부서열, 밑선:제한효소 절단서열)

HindIII 프라이머(a) EcoRV
AAGCTTCTGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCCGGGGGGGGATATC-----SacB
EcoRV
negative selection marker gene (2.Kb)-----GATATC
CGTGGAACTCAGCGGCCCTGACGACGGGGTGCACACGTTCCGGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC

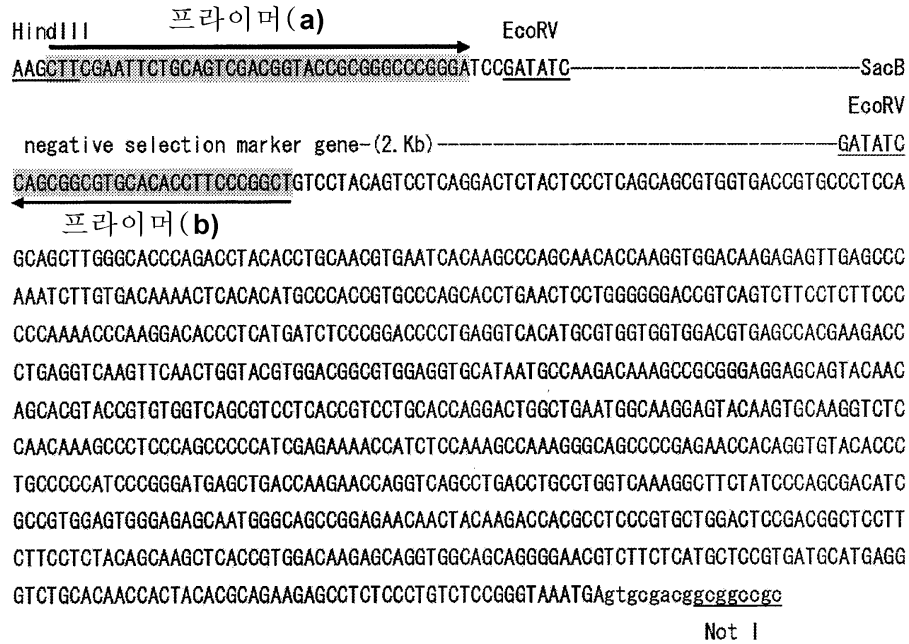
프라이머(b)

AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAA
GGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCGCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACACAGGTGTACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCG
TGCTGGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGGTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAgtgog
acggcgggcgcg

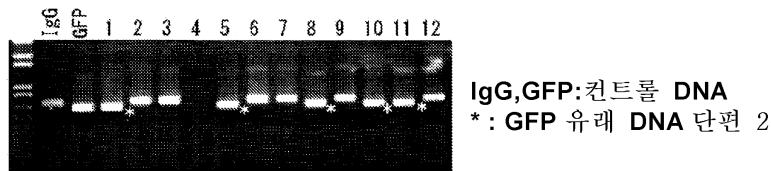
Not I

도면11

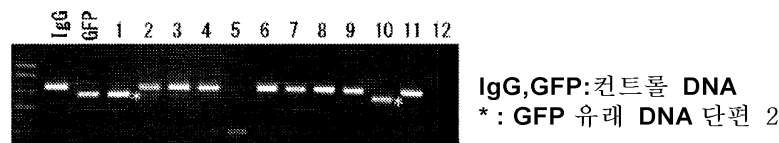
벡터 II서열(음영부:상동재조합영역, 밑줄: 제한효소 절단서열)



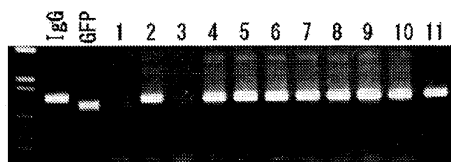
도면12



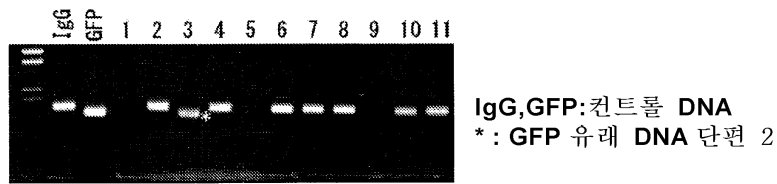
도면13



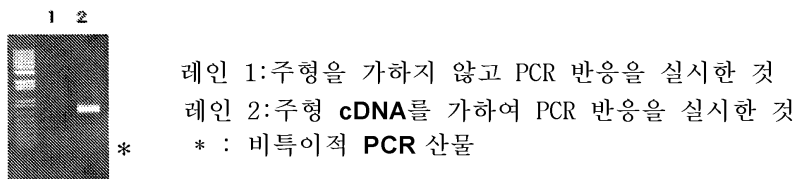
도면14



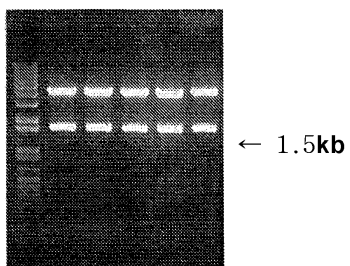
도면15



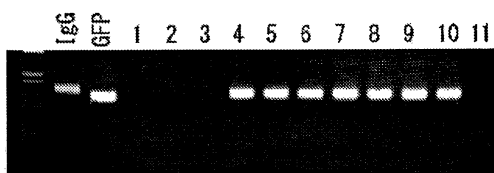
도면16



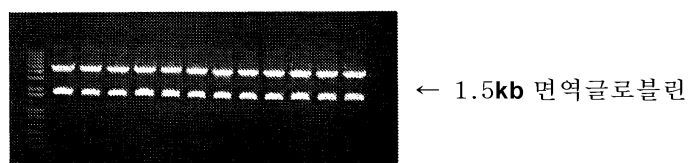
도면17



도면18a

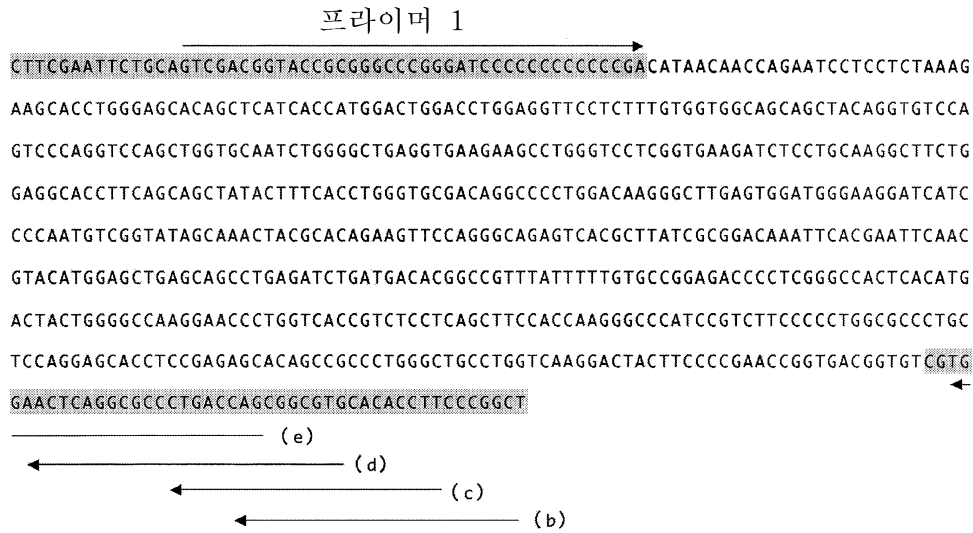


도면18b

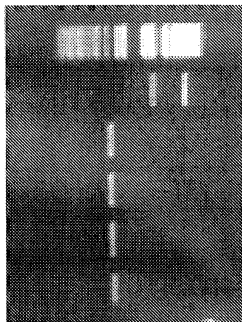


도면19

음영부:상동재조합영역

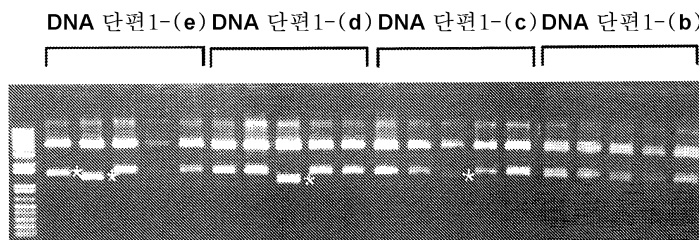


도면20



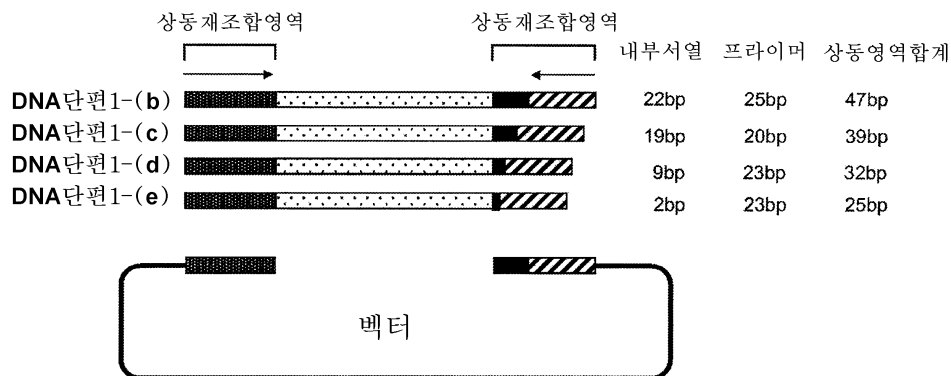
벡터 1
DNA 단편 1-(e)
DNA 단편 1-(d)
DNA 단편 1-(c)
DNA 단편 1-(b)

도면21



* 비특이적 DNA 단편

도면22



CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT 벡터서열

CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT 프라이머 (b)

CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT 프라이머 (c)

CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG 프라이머 (d)

CGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAG 프라이머 (e)

서열 목록

- <110> University of Toyama
- <120> Homologous recombination method ,cloning method and kit
- <130> A95013H
- <150> JP2008-057995
- <151> 2008-03-07
- <160> 24
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 38
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Primer
- <400> 1

cttcgaattc tgcagtcgac ggtaccgcgg gcccggga

38

- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Primer

<400>	2	
agccgggaag gtgtgcacgc cgctg		25
<210>	3	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Internal sequence	
<400>	3	
tccccccccc cccc		14
<210>	4	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Internal sequence	
<400>	4	
gggggggggg ggga		14
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Internal sequence	
<400>	5	
cgtaggaactc aggcgcctg ac		22
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Internal sequence	
<400>	6	
gtcagggcgc ctgagttcca cg		22
<210>	7	
<211>	52	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> misc_recomb

<400> 7

cttcgaattc tgcagtcgac ggtaccgcgg gcccgggatc cccccccccc cc

52

<210> 8

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> misc_recomb

<400> 8

gggggggggg gggatcccgg gcccgcggtc ccgtcgactg cagaattcga ag

52

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> misc_recomb

<400> 9

cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggct

47

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> misc_recomb

<400> 10

agccgggaag gtgtgcacgc cgctggctcag ggcgcctgag ttccacg

47

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> misc_recomb

<400> 11

cttcgaattc tgcagtcgac ggtaccgcgg gcccgggga

38

<210> 12

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> misc_recomb
 <400> 12
 tcccgggccc gcggtaccgt cgactgcaga attcgaag 38
 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> misc_recomb
 <400> 13
 cagcggcgtg cacaccttcc cggt 25
 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> misc_recomb
 <400> 14
 agccgggaag gtgtgcacgc cgctg 25
 <210> 15
 <211> 683
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA fragment
 <400> 15
 cttcgaattc tgcagtcgac ggtaccgcgg gcccgggatc ccccccccc cgacataaca 60
 accagaatcc tcctctaaag aagcacctgg gagcacagct catcaccatg gactggacct 120
 ggaggttcct ctttgtggtg gcagcagcta caggtgtcca gtcccaggtc cagctggtgc 180
 aatctggggc tgaggtaag aagcctgggt cctcggtgaa gatctcctgc aaggettctg 240
 gaggcacett cagcagctat actttcacct gggtgcgaca ggccccctgga caagggttg 300
 agtggatggg aaggatcatc ccaatgtcg gtatagcaaa ctacgcacag aagttccagg 360
 gcagagtcac gcttatcgcg gacaaattca cgaattcaac gtacatggag ctgagcagcc 420

tgagatctga tgacacggcc gtttattttt gtgccggaga cccctcgggc cactcacatg	480
actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag ggcccatccg	540
tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc	600
tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca	660
gcggcgtgca caccttcccg gct	683
<210> 16	
<211> 628	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA fragment	
<400> 16	
cttcgaattc tgcagtcgac ggtaccgcgg gcccgggatc caccggtcgc caccatggtg	60
agcaaggcgaggaggctgtt caccgggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac	120
gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag	180
ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccc tgccctggcc caccctcgtg	240
accaccctga cctacggcgt gcagtgcttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac	300
gacttcttca agtcgcccat gccggaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag	360
gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac	420
cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg	480
gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc	540
aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac	600
taccagcggc gtgcacacct tcccggct	628
<210> 17	
<211> 2856	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Vector DNA	
<400> 17	
aagcttcgaa ttctgcagtc gacggtaccg cgggccccggg atcccccccc ccccgatat	60
cgatccgacg tccacatata cctgccgttc actattattt agtgaaatga gatattatga	120
tattttctga attgtgatta aaaaggcaac tttatgcccc tgcaacagaa actataaaaa	180
atacagagaa tgaaaagaaa cagatagatt ttttagttct ttaggcccggt agtctgcaaa	240

tccttttatg attttctatc aaacaaaaga ggaaaataga ccagttgcaa tccaaacgag	300
agtctaatag aatgaggctg aaaagtaaat cgcgcgggtt tgttactgat aaagcaggca	360
agacctaaaa tgtgtaaagg gcaaagtgtat tactttggcg tcaccctta catattttag	420
gtcttttttt attgtgcgta actaacttgc catcttcaaa caggagggtt ggaagaagca	480
gaccgctaac acagtaacata aaaaaggaga catgaacgat gaacatcaaa aagtttgcaa	540
aacaagcaac agtattaacc ttactaccg cactgctggc aggaggcgca actcaagcgt	600
ttgcgaaaga aacgaacca aagccatata aggaacata cggcatttcc catattacac	660
gccaatgatat gctgcaaatc cctgaacagc aaaaaaatga aaaatatcaa gttcctgagt	720
tgcattcgtc cacaattaaa aatatctctt ctgcaaaagg cctggacgtt tgggacagct	780
ggccattaca aaacgctgac ggcaactatc caaactatca cggtaccac atcgtctttg	840
cattagccgg agatcctaaa aatgcggatg acacatcgtt ttacatgttc tatcaaaaag	900
tcggcgaaac ttctattgac agctggaaaa acgctggcgg cgtctttaaa gacagcgaca	960
aattcgtatc aaatgattct atcctaaaag accaaacaca agaattgtca ggttcagcca	1020
catttacatc tgacggaaaa atccgtttat tctacactga tttctccggt aaacattacg	1080
gcaaacaaac actgacaact gcacaagtta acgtatcagc atcagacagc tctttgaaca	1140
tcaacgggtg agaggattat aaatcaatct ttgacgggtg cggaaaaacg tatcaaaatg	1200
tacagcagtt catcgatgaa ggcaactaca gctcaggcga caaccatagc ctgagagatc	1260
ctcactacgt agaagataaa ggccacaaat acttagtatt tgaagcaaac actggaactg	1320
aagatggcta ccaaggcgaa gaatctttat ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat	1380
cattcttcgg tcaagaaagt caaaaacttc tgcaaaagcga taaaaaacgc acggtgagt	1440
tagcaaacgg cgctctcgg atgattgagc taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga	1500
tgaaccgct gattgcatct aacacagtaa cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtcttta	1560
aaatgaacgg caaatggtac ctgttactg actcccgcgg atcaaaaatg acgattgacg	1620
gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg gttatgttgc taattcttta actggcccat	1680
acaagccgct gaacaaaact ggcccttggt taaaaatgga tcttgatcct aacgatgtaa	1740
cctttactta ctcacacttc gctgtacctc aagcgaaagg aaacaatgct gtgattacaa	1800
gctatatgac aaacagagga ttctacgcag acaacaatc aacgtttgcg cctagcttcc	1860
tgctgaacat caaaggcaag aaaacatctg ttgtcaaaga cagcatcctt gaacaaggac	1920
aattaacagt taacaaataa aaacgcaaaa gaaaatgccg atatccgtgg aactcaggcg	1980

ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc 2040
 tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac acctgcaacg 2100
 tgaatcacia gccccagcaac accaagggtgg acaagagagt tgagcccaaa tcttgtgaca 2160
 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc 2220
 tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg 2280
 tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactgttac gtggacggcg 2340
 tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 2400

tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 2460
 aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa gccaaagggc 2520
 agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc 2580
 aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg 2640
 agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tccgtgctg gactccgacg 2700
 gctcttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 2760
 tcttctcatg ctccgtgatg catgagggtc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct 2820

ccctgtctcc gggtaaatga gtgcgacggc ggccgc 2856

<210> 18

<211> 2823

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vector DNA

<400> 18

aagcttcgaa tctgcagtc gacggtaaccg cgggcccggg atccgatatc gatccgacgt 60
 ccacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag atattatgat attttctgaa 120
 ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccat gcaacagaaa ctataaaaaa tacagagaat 180
 gaaaagaaac agatagattt tttagtctt taggcccgtg gtctgcaaat ccttttatga 240
 ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat ccaaacgaga gtctaataga 300

atgaggtcga aaagtaaatc gcgcgggttt gttactgata aagcaggcaa gacctaaaat 360
 gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac atattttagg tcttttttta 420
 ttgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac aggagggtctg gaagaagcag accgctaaca 480
 cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa agtttgcaaa acaagcaaca 540
 gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa ctcaagcgtt tgcgaaagaa 600
 acgaacaaaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc atattacag ccatgatatg 660

ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag ttcttgagtt cgattcgtcc	720
acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt gggacagctg gccattacaa	780
aacgtgacg gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca tcgtctttgc attagccgga	840
gatacctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct atcaaaaagt cggcgaaact	900
tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaag acagcgacaa attcgatgca	960
aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag gttcagccac atttacatct	1020
gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccgta aacattacgg caaacaaca	1080
ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct ctttgaacat caacggtgta	1140
gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt atcaaatgt acagcagttc	1200
atcgatgaag gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc tgagagatcc tctactagta	1260
gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca ctggaactga agatggctac	1320
caaggcgaag aatctttatt taacaaagca tactatggca aaagcacatc attcttccgt	1380
caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca cggctgagtt agcaaacggc	1440
gctctcggta tgattgagct aaacgatgat tacacactga aaaaagtgat gaaaccgtg	1500
attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga acgtctttaa aatgaacggc	1560
aaatggtacc tgttactga ctcccgcgga tcaaaaatga cgattgacgg cattacgtct	1620
aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa ctggcccata caagccgctg	1680
aacaaaactg gccttgtgtt aaaaatggat cttgatecta acgatgtaac ctttacttac	1740
tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg tgattacaag ctatatgaca	1800
aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc ctgacttctt gctgaacatc	1860
aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg aacaaggaca attaacagtt	1920
aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tatccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg	1980
tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct	2040
tgggcaccca gacctacacc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca	2100
agagagtga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg	2160
aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga	2220
tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg	2280
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg	2340
aggagcagta caacagcacg tacctgttgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact	2400

ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg 2460
 agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 2520
 catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 2580
 atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 2640
 ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg 2700
 acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gagggctctgc 2760
 acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggcggc 2820

cgc 2823

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 19

cggtaccgcg ggccccggat ccccccccc cccdn 35

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 20

acgtctgctga gggagtagag tcctgag 27

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 21

agccgggaag gtgtgcacgc cgctg 25

<210> 22

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	22	
	aggtgtgcac gccgctggtc	20
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	23	
	cacgccgctg gtcagggcgc ctg	23
<210>	24	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	24	
	ctggtcaggg cgctgagtt cca	23