



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0093960
(43) 공개일자 2016년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0014913
(22) 출원일자 2015년01월30일
심사청구일자 2015년01월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
노현주
대전광역시 유성구 가정로 287
이석현
전라북도 군산시 나운3길 9, 106동 2003호
(74) 대리인
특허법인충정

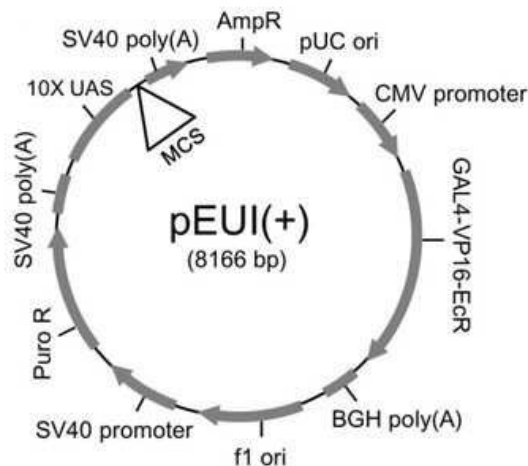
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 액디손 수용체-기반 전이유전자 유도성 벡터

(57) 요약

본 발명은 GAL4-VP16-EcR 융합유전자; 10X 업스트림 활성화 서열(UAS); 및 다중클로닝부위(MCS)를 포함하는 제조합 발현벡터 pEUI(+), 및 이를 이용한 전이유전자의 발현 조절방법에 관한 것으로, 본 발명의 pEUI(+) 유전자 유도성 시스템은 높은 민감도, 가역성 및 낮은 불완전발현(leaky expression)을 가지면서 타겟 유전자 전사의 화학적 유도에 필요한 전체 조절 유닛들이 구비된 단일 벡터(singular vector)로 구성되며, 인듀서에 의한 일관성 있는 유전자 발현을 유도할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 15/625 (2013.01)

C12N 15/66 (2013.01)

C12N 2800/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0729-01

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자(지역대학우수과학자)지원사업

연구과제명 RASopathy 질환 중 심장-안면-피부복합질환 관련 핵심인자 LNX2의 기능분석 및 동물모델 구축

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

GAL4-VP16-EcR DNA 컨스트럭트; 10X UAS(upstream activating sequence); 및 MCS(multiple cloning site)를 포함하는, 도 1a에 개시되어 있는 재조합 발현벡터 pEUI(+).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 MCS는 전이유전자(transgene)를 도입하기 위한 제한효소 인식 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터 pEUI(+).

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 숙주세포로 형질전환되어 GAL4-VP16-Ecr 융합단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터 pEUI(+).

청구항 4

전이유전자(transgene)가 삽입된 제 1항에 따른 재조합 발현벡터 pEUI(+로 형질전환된 동물세포주.

청구항 5

제 1항에 따른 재조합 발현벡터 pEUI(+에 전이유전자를 삽입한 후 동물세포에 형질전환시킨 다음, 엑디손(Ecr) 아고니스트를 처리하여 배양하는 것을 포함하는 전이유전자의 발현을 조절하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 동물세포는 HEK293 T 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 엑디손 아고니스트는 테부페노자이드(tebufenozide)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 엑디손 아고니스트는 GAL4-VP16-Ecr 융합단백질의 Ecr 부위에 결합하여 GAL4-VP16-Ecr 융합단백질이 핵에 들어가서 업스트림 활성화 서열(UAS)에 결합함으로써 전이유전자의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엑디손 수용체(Ecr)-기반 전이유전자 유도성 벡터에 관한 것으로, 구체적으로 GAL4-VP16-EcR DNA 컨

스트럭트; 10X UAS(upstream activating sequence); 및 MCS(multiple cloning site)를 포함하는 재조합 발현 벡터 pEUI(+), 및 이를 이용한 전이유전자의 발현 조절방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

다양한 소분자들의 처리, 또는 열충격(heat shock)과 같은 스트레스들의 사용에 반응하는 유도성 프로모터 또는 호르몬의 조절 하에서 전이유전자(transgene)의 정밀한 조절은 유전자 기능을 밝혀내는데 중요한 기술이다 (Rossi, F. M. et al. 1998. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-416). 유도성 유전자 발현 시스템은 특이적 방향성 유도(directional induction), 특이적 유도제(inducer)에 대한 용량 및 시간 의존적 반응, 매우 낮은 불완전 발현(leaky expression), 유도제의 고갈에 의한 유전자 발현의 폐지, 및 유도제의 극히 낮은 독성을 포함하여, 몇 가지 선택기준에 적합해야 한다 (Clackson, T. 2000. *Gene Ther.* 7:120-125). 여러 유전자 유도성 시스템 중, 유도제로서 테트라사이클린(tetracycline)을 활용하는 Tet 트랜스액티베이터(transactivator)(Tet-On/Off) 시스템이 전이유전자 발현의 유도에 널리 사용되고 있다 (Baron, U. et al. 2000. *Methods Enzymol.* 327:401-421). Tet 시스템의 이원적 특성(binary feature)은 불완전 발현(leaky expression)을 억제하기 위해 도입되었으나, 최소 2라운드의 선별과정이 필요하기 때문에 다루기 힘들고 전이유전자를 생산하는데 시간이 많이 소요된다. 게다가, 불완전 발현은 Tet 트랜스액티베이터(Tet-On/Off) 시스템의 쟁점이 되어 왔다. 우태아혈청에 있는 잔여 테트라사이클린이 불완전 발현을 유발하는 것으로 여겨졌으나, 테트라사이클린 없는 검증된 FBS를 사용해도 종종 불완전 발현을 유발하기 때문에, 그것이 온전히 불완전성(leakiness)의 원인이 될 수는 없다.

[0003]

Tet 시스템에 내재하는 이러한 단점들을 해결하기 위해, 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*) 엑디손 수용체(ecdysone receptor, EcR)-기반 유전자 유도성 시스템을 포함하여, 다른 여러 전이유전자 조절 모듈이 개발되고 있다 (Karzenowski, D. et al. 2005. *BioTechniques* 39:191-200). 핵 호르몬 수용체(nuclear hormone receptor)인 EcR 및 그 헤테로다이머 파트너인 USP(ultraspiracle)는 곤충의 형태학적 변화를 조절한다 (Suzuki, Y. et al. 2011. p. 285-309. In K. Xu (Ed.), *Viral Gene Therapy*). EcR/USP 헤테로다이머(heterodimer)에 결합될 때, 엑디손은 DNA 조절 요소(DNA regulatory elements)에 EcR의 결합을 유도한다 (Yao, T. P. et al. 1993. *Nature* 366: 476-479). 곤충 USP의 오솔로그(ortholog)인, 척추동물의 레티노이드 X 수용체(retinoid X receptor, RXR)는 EcR과 헤테로다이머를 형성하여 전사 활성을 획득할 수 있다 (Esengil, H. et al. 2007. *Nat. Chem. Biol.* 3:154-155). 척추동물은 USP를 가지고 있지 않기 때문에, 엑디손 또는 그 아고니스트(agonist)에 의해 대상 유전자를 유도하기 위해서는 EcR과 RXR은 척추동물 세포 또는 조직에서 공동-발현되어야 한다. 내인성 RXR은 EcR-기반의 유전자 유도 수준의 헤테로다이머 특성을 방해할 수 있기 때문에, Padidam 등은 'EcR DNA-결합 및 활성화 영역'을 'EcR의 리간드 결합 영역과 융합된 이종(heterologous) GAL4 DNA-결합 및 VP16 활성화 도메인'으로 대체하였다 (Padidam, M. et al. 2003. *Transgenic Res.* 12:101-109). 이러한 융합 단백질은 내인성 RXR에 결합하지 않고 호모다이머(homodimer)를 형성하여 전사 포텐셜(transcriptional potential)을 획득한다 (Padidam, M. et al. 2003. *Transgenic Res.* 12:101-109). 최근에는, GAL4 DNA-결합 도메인 및 변형된 EcR과 최소(minimal) VP16 활성화 도메인(GV-EcR)으로 구성된 키메라 구성체(chimeric construct)가 엑디손 아고니스트인, 테부페노자이드(tebufenozide, Teb)가 없는 경우에 시토플라스트에서 호모다이머를 형성하는 것으로 보고되었다 (Knopf, F. et al. 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:19933-19938). 그러나 Teb가 있는 경우, GV-EcR은 핵에 들어가서 업스트림 활성화 서열(upstream activation sequence, UAS)에 결합함으로써 전사 액티베이터(activator)로 작용한다.

[0004]

이에 본 발명자들은 이전에 보고된 EcR-기반 전이유전자 유도성 시스템을 단순화하기 위해, 전이유전자 발현을 유도하는데 필요한 모든 요소들을 포함하는 단일 벡터(singular vector)로서 재조합 발현 벡터 pEUI(+)를 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

따라서 본 발명의 목적은 EcR-기반 전이유전자 유도성 시스템으로서, 전이유전자의 발현을 유도하는데 필요한 모든 요소들을 하나의 유닛으로 포함하는 재조합 발현 벡터 pEUI(+)를 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은, 재조합 발현벡터 pEUI(+)에 전이유전자를 삽입한 후 동물세포에 형질전환시킨 다음, 엑디손 아고니스트를 처리하여 배양하는 것을 포함하는 전이유전자의 발현을 유도하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 한 양태에 따르면, GAL4-VP16-EcR DNA 컨스트럭트(construct); 10X UAS(upstream activating sequence); 및 MCS(multiple cloning site)를 포함하는 재조합 발현벡터 pEUI(+)를 제공한다.

[0008] 본 발명에 있어서, 상기 “GAL4-VP16-EcR DNA 컨스트럭트”는 전사 활성 도메인인 VP16과 DNA 결합 도메인인 GAL4, 그리고 엑디손 수용체(ecdyson receptor, EcR)로 구성되는 융합유전자이며, 공지된 유전자 GAL4, VP16, EcR에 대한 염기서열로부터 적절한 클로닝 기술을 이용하여 획득할 수 있다. 이러한 GAL4-VP16-EcR DNA 컨스트럭트는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 이 융합유전자는 구성적 프로모터(constitutive promoter)인 CMV 프로모터에 의해 발현이 유도될 수 있으며, 발현된 GAL4-VP16-EcR 융합단백질은 호모다이머를 형성하고 엑디손 또는 엑디손 아고니스트가 존재할 경우 업스트림 활성화 서열(UAS)에 결합함으로써 전사 액티베이터(activator)로 작용한다.

[0009] 또한 상기 “UAS(upstream activating sequence)”는 시스-액팅 조절 서열(cis-acting regulatory sequence)로서 인접한(neighbouring) 유전자의 발현을 유도하고 증가시키므로 기능적으로 프로모터의 역할을 한다. 구체적으로, 엑디손 또는 그 아고니스트에 의해 GAL4-VP16-EcR이 UAS에 결합하게 되면 UAS에 인접한 MCS에 삽입된 전이유전자(transgene)가 발현하게 된다. 상기 MCS는 전이유전자를 도입하기 위한 제한효소 인식 서열을 포함하고 있다.

[0010] 또한 본 발명에서 상기 벡터는 GAL4-VP16-EcR를 코딩하는 유전자 또는 전이유전자의 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함할 수 있다. 이러한 요소는, 예를 들면, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 바와 같이, 이들 요소는 바람직하게는 목적하는 유전자 서열에 작동적으로 연결되며, 조절 요소는 바람직하게는 이들이 투여될 중에서 작동될 수 있도록 선택된다.

[0011] 본 발명에 따른 상기 구성 요소들을 포함하는 재조합벡터는 도 1a에 개시되어 있으며, 서열번호 2의 염기서열로 표시될 수 있다. 이러한 본 발명의 재조합벡터는 숙주세포로 형질전환되어 GAL4-VP16-EcR 융합단백질을 발현할 수 있다.

[0012] 본 발명의 재조합 발현벡터는 적절한 동물세포(예: HEK293 T 세포)에 도입하여 이 발현벡터를 안정적으로 포함하는 형질전환 동물세포주를 제조할 수 있다. 형질전환된 세포주는 안정적으로 엑디손 수용체를 발현할 수 있는 세포주이다. 이렇게 얻어진 본 발명의 형질전환 동물세포주는 인두서(inducer: 발현 유도제)가 없는 경우 발현율은 매우 낮으며, 인두서로서 엑디손 아고니스트(예: tebufenozide)가 첨가되면 높은 유도율로 발현이 증가한다 (도 2c 참조).

[0013] 본 발명에 따른 재조합벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있다 (Wu et al., *J. Bio. Chem.*, 267:963-967, 1992; Wu and Wu, *J. Bio. Chem.*, 263:14621-14624, 1988).

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 재조합 발현벡터 pEUI(+)에 전이유전자를 삽입한 후 동물세포에 형질전환시킨 다음, 엑디손 아고니스트를 처리하여 배양하는 것을 포함하는 전이유전자의 발현을 유도하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 전이유전자 발현 유도 방법에서, 상기 동물세포는 HEK293 T 세포이며, 상기 엑디손 아고니스트는 테부페노자이드(tebufenozide)를 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 엑디손 아고니스트는 GAL4-VP16-EcR 융합단백질의 EcR 부위에 결합하여 GAL4-VP16-EcR 융합단백질이 핵에 들어가서 업스트림 활성화 서열(UAS)에 결합함으로써 전이유전자의 발현을 유도하게 된다.

- [0016] 이하, 본 발명에 따른 Ecr-기반 전이유전자 발현 시스템을 각 구성 요소를 참조하여 설명하면 다음과 같다.
- [0017] (i) GAL4-VP16-Ecr 융합단백질을 코딩하는 유전자는 발현 시스템의 드라이버(driver)로서 역할을 하고,
- [0018] (ii) 업스트림 활성화 서열(UAS) 및 전이유전자(transgene)는 상기 드라이버에 반응하는 이펙터(effector)로서 역할을 하고,
- [0019] (iii) 상기 드라이버와 이펙터를 동시에 포함하는 재조합백터 시스템은 2개의 개별적인 유닛(드라이버 및 이펙트 플라스미드)이 아닌 하나의 유닛으로 작동하는 단일 특성(singular feature)을 갖고,
- [0020] (iv) 상기 재조합백터는 숙주세포에 안정적으로 포함되어, 인두서(inducer)로서 역할을 하는 엑디손 아고니스트로 처리 시 상기 드라이버로부터 발현된 GAL4-VP16-Ecr 결합체의 Ecr 부위에 결합하여 GAL4-VP16-Ecr 결합체가 UAS에 결합함으로써 전이유전자의 발현을 유도하게 된다.
- [0021] (v) 이러한 Ecr-기반 유도성 발현 시스템은 인두서가 없으면 전이유전자의 발현이 점차 기본 수준(basal levels)으로 감소하여 전이유전자 유도의 가역성(reversibility)을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따르면, 신규하게 개발된 pEUI(+) 유전자 유도성 시스템은 높은 민감도, 가역성 및 낮은 불완전발현(leaky expression)을 가지면서 타겟 유전자 전사의 화학적 유도에 필요한 전체 조절 유닛들이 구비된 단일 백터(singular vector)로 구성되며, 인두서에 의한 일관성 있는 유전자 발현을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 pEUI(+) 백터는 유전자 기능의 철저한 분석에 유용한 분자 세포적 수단이 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] **도 1**은 엑디손 수용체-기반 단일(singular) 유전자 스위치가 강력함과 낮은 백그라운드로 전이유전자 발현을 유도함을 나타낸 것이다.

도 1a는 화학적 인두서인, 테부페노자이드(Teb)의 조절 하에 전이유전자 발현에 최적화된 pEUI(+) 백터의 구성도이다.

도 1b는 제한효소 인식 부위를 가진 pEUI(+)의 MCS의 뉴클레오티드 서열이다.

도 1c는 테트라사이클린에 반응하는 단일(singular) pTet 백터의 개략도이다.

도 1d는 반딧불이 루시페라아제 활성의 측정을 통한 pEUI(+) 및 pTet 백터 능력의 비교 분석한 결과이다. pEUI(+)-Luc로 트랜스펙션된 세포는 pTet-Luc 트랜스펙션된 세포(pGL3-Basic 비해 ~18.7배)와 비교할 때 매우 낮은 백그라운드 발현(~1.7배)을 보여준다. pEUI(+)-Luc는 Teb-용량 의존적 전이유전자 자극을 보여준다. 루시페라아제 활성은 함께 트랜스펙션된 *Renilla* 루시페라아제 활성으로 정규화되었다.

도 1e는 pEUI(+)-EGFP 트랜스펙션된 세포에서 형광의 강도는 Teb-용량 의존적 방식으로 증가한다 (E' -H'). 프로모터가 결핍된 mini-Tol2-EGFP 백터는 트랜스펙션 대조군으로 사용되었다 (A' - D'). 지시된 플라스미드 구성체로 트랜스펙션된 HEK293T 세포는 Teb (0 ~ 5 μ M)으로 12시간 동안 처리된 다음, 형광 현미경 하에서 조사되었다. A' 에서 스케일 바는 200 μ m.

도 2는 pEUI(+)-ANKRD13A를 안정적으로 포함하는 세포(#293-13A)가 Teb 처리에 따라 ANKRD13A를 강력하고 가역적으로 유도함을 나타낸 것이다.

도 2a는 적어도 3시간 동안 Teb (10 μ M) 처리 후 #293-13A 세포주에서 명백해지는 FLAG 에피토프 태그된 ANKRD13A 발현의 유도를 나타낸다 (open arrowhead). ANKRD13A의 발현 수준은 72시간까지 시간이 흐르면서 축적된다. Teb 처리 없는 샘플에서는 ANKRD13A의 희미한 내인성 발현이 항-ANKRD13A 항체로 검출되었다 (dark arrowhead). 외인성으로 형질도입된(transduced) ANKRD13A 발현은 항-FLAG 항체를 이용하여 면역블로팅에 의해 재확인되었다. 전이유전자의 불완전발현(leaky expression)은 검출되지 않았다. 흰색 별표(asterisk)는 미확인 교차-활성종(cross-reactive species)을 의미한다.

도 2b는 3중 분석에 기초한 qPCR 수율의 비교한 결과이다. #293-13A 세포는 지시된 기간 동안 Teb 빠져나간 배지에서 세포를 재배양하기 전에 24시간 동안 Teb(10 μ M)으로 처리된 후, cDNA 합성 과정이 진행되었다. ANKRD13A 전사체의 상대적인 양은 ANKRD13A 특이적 프라이머로 PCR에 의해 측정되었다.

도 2c는 pEUI(+) 시스템에서 Teb 의존적 전이유전자 유도의 개념도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실시예 1. 단일 특성을 갖는 Ecr-기반 전이유전자 유도성 벡터

[0026] 이전에 보고된 Ecr-기반 전이유전자 유도성 시스템을 단순화하기 위해, 본 발명자들은 상기 시스템의 이원적 특성(binary feature)을 전이유전자 발현을 유도하는데 필요한 모든 요소들을 포함하는 단일 특성(singular feature)으로 변환한 다음, 신규하게 디자인된 플라스미드로서 pEUI(+) 벡터를 고안하였다. 이 pEUI(+) 벡터를 NCBI에 2014.11.11.자로 제출하여 Genebank에서 2014.11.12.자로 accession number KP123436를 부여받았다.

[0027] 종래 이원적(Binary) 시스템은 조절(regulatory) 플라스미드 벡터와 반응(response) 플라스미드 벡터를 이용하는 이원화된 벡터 시스템으로서 비경제적이고, 최소한 두 종류의 항생제 표지마커를 이용하여야 하며 세포주 제작에 있어서 1차, 2차 세포주를 따로 구축하여야 한다는 어려움이 있었다.

[0028] 본 발명에서 신규 제작된 pEUI(+) 벡터의 경우, 단일화된 모듈을 구축하여, 단 하나의 플라스미드 벡터를 이용. 실험적 편리성을 고려하였으며 동시에 기존의 binary 시스템의 문제점 (혈청에 의한 노이즈 발현 및 발현 유도 물질 고농도 처리 시 세포 내 독성 유발)을 극복할 수 있다.

표 1

[0029]

	발현유도물질	요구벡터수량	선별 마커
Tet On/Off 시스템	Doxycycline, tetracycline	2	최소 2개가 필요
Tebufecnozide 시스템	Tebufenozide	1	1개 (Puromycin)

[0030] 도 1a는 화학적 인두서인 테부페노자이드(Teb)의 조절 하에 전이유전자 발현에 최적화된 pEUI(+) 벡터의 구성도이고, 도 1b는 제한효소 인식 부위를 가진 pEUI(+)의 MCS의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

[0031] 도 1a와 1b에서 볼 수 있듯이, 상기 pEUI(+) 벡터에서, 드라이버(driver)에 반응하는 이펙터(effector)는 E1b 최소 프로모터(minimal promoter) 옆에 있는 10배 일렬 반복된 UAS, 및 5' -EcoR I, Pml I, Nhe I, Bnt I, Afe I, Afl II-3' 인식 서열들을 포함하는 다운스트림 MCS(multiple cloning site), 그리고 다음의 SV40 poly(A) 시그널 서열이다. 추가적으로, 트랜스펙션된 세포의 선별을 용이하게 하기 위해, SV40 프로모터-조종되는 (driven) 퓨로마이신 N-아세틸-트랜스페라제(puromycin N-acetyl-transferase, PAC) 유전자가 상기 드라이버(driver)와 이펙터(effector) 영역 사이에 위치되었다. pEUI(+)는 주로 LIC(ligation-independent cloning) 방법으로 구성되었다 (Jeong, J. Y. et al. 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5440-5443).

[0032] 실시예 2. pEUI(+) 벡터의 활성 및 불완전성 평가

[0033] pEUI(+)의 활성 및 불완전성(leakiness)을 평가하기 위해, 먼저 반딧불이 루시페라아제(luciferase, Luc)를 코딩하는 유전자를 MCS에 있는 EcoR I 사이트에 삽입하고, X-tremeGENE 9 DNA 트랜스펙션 시약(Roche)을 이용하여 HEK293 T 세포에 상기 구성체(construct)를 일시적으로 트랜스펙션 시킨 후, 12시간 동안 다양한 양의 Teb를 세포에 첨가한 다음, 듀얼-루시페라아제 리포터 분석 시스템(Promega)을 이용하여 리포터의 발현 수준을 정량화하였다. Luc 유전자를 포함하는 pGL3-기본 벡터(Promega)는 대조군으로 사용되었다. 비교를 위해, 본 발명자들은

또한 pcDNA 6/TR 인두서(inducer)와 pcDNA 4/TO 이펙터(effecter)를 Luc 리포터 유전자(Invitrogen)와 결합시킴으로써 테트라사이클린 의존성 전이유전자 유도 시스템을 위한 단일 벡터(singular vector)(pTet-Luc)를 제조하였다 (도 1의 C).

[0034] 도 1c는 비교군으로서 테트라사이클린에 반응하는 단일(singular) pTet 벡터의 개략도이고, 도 1d는 반딧불이 루시페라아제(Luc) 활성의 측정을 통한 pEUI(+) 및 pTet 벡터 능력을 비교한 결과이고, 도 1e는 pEUI(+)-EGFP 트랜스펙션된 세포에서 형광의 강도가 Teb-용량 의존적 방식으로 증가함을 나타낸 결과이다.

[0035] 도 1d에 나타난 바와 같이, Luc 활성은 비처리된 pTet-Luc 트랜스펙션된 세포에서 대조군(pGL3-basic)과 비교하여 18.7배 이상 증가한 것과 대조적으로, 비처리된 pEUI(+)-Luc 트랜스펙션된 세포들은 매우 낮은 기본 활성(basal activity)을 나타내었다 (pGL3-basic과 비교하여 ~1.7배 증가). 5 μ M 테트라사이클린(Tet)의 첨가는 대조군(pTet-Luc 0 μ M)과 비교하여 pTet 형질전환체(transfectants)에서 대략 12.4배 리포터 활성을 증가시켰다. pTet 시스템에 의한 전이유전자 발현의 강력한 유도는 그것의 상대적으로 높은 불완전발현(leaky expression)에 의해 상쇄되었다. 유도된 발현에서 불완전발현의 감소(subtraction)는 pEUI(+)가 pTet 보다 더 강력한 전이유전자 유도성 시스템을 나타낸 것이다 (각각 5 μ M 인두서에 의해 47.5배 vs. 12.4배). 하기 표 2는 도 1d를 정규화한 결과이다.

표 2

	Relative Luc activity (mean)
pGL3-Basic	1.11185
pTet-Luc (0 uM tetracycline)	20.9007
pTet-Luc (5 uM tetracycline)	259.6817
pEUI-Luc (0 uM tebufenozide)	1.9295
pEUI-Luc (1 uM tebufenozide)	3.46775
pEUI-Luc (5 uM tebufenozide)	91.60335
pEUI-Luc (10 uM tebufenozide)	169.8327

[0037] 또한 도 1e에서, Luc 대신 EGFP 유전자를 포함하는 pEUI(+) (‘pEUI(+)-EGFP’ 라고 함)로 트랜스펙션된 HEK293 T 세포는 비처리된 경우 식별가능한 불완전발현이 없었고 용량 의존적 방식으로 Teb에 의한 강한 유도를 나타내었다. 어떠한 기능적 프로모터도 없는 mini-Tol2-EGFP를 코딩하는 벡터는 트랜스펙션 대조군으로 사용되었다 (Urasaki, A. et al. 2006. *Genetics* 174:639-649). 도 1e에 나타나 바와 같이, mini-Tol2-EGFP 트랜스펙션된 세포는 5 μ M Teb 처리에서조차 반응하지 않았는데, 이러한 결과는 pEUI(+) 시스템 발현에서 전이유전자 유도가 엄격하게(tightly) 조절되고 있음을 시사한다.

[0038] 실시예 3. Teb에 대한 pEUI(+) 시스템의 반응성 검증

[0039] Teb에 대한 pEUI(+) 시스템의 반응성(responsiveness)을 검증하기 위해, 본 발명자들은 우선 FLAG 에피토프 태그된 ANKRD13A(ankyrin repeat domain 13A) 유전자를 pEUI(+)의 *EcoR* I 사이트에 삽입하여 (‘pEUI(+)-ANKRD13A’ 라고 함) pEUI(+)-ANKRD13A를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주를 확립하였다 (이하 ‘#293-13A’ 라고 함). 다음으로, 이 안정적인 세포주를 Teb (10 μ M)로 자극하고, ProEXTM CETi Lysis Buffer (TransLab, Daejeon, Korea)로 용해시켜, 항-ANKRD13A (abcam, catalog #ab103364) 또는 항-FLAG M2 항체 (Sigma-Aldrich, catalog #F3165) 및 ProNATM ECL Ottimo (TransLab, Daejeon, Korea) 기질을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0040] 도 2a는 최소 3시간 Teb (10 μ M) 처리 후 #293-13A 세포주에서 명백해지는 FLAG 에피토프 태그된 ANKRD13A 발현의 유도를 나타낸 웨스턴 블롯 결과이다 (open arrowhead).

[0041] 도 2a에 나타난 바와 같이, ANKRD13A 발현은 Teb (10 μ M)로 처리 3시간 후에 나타나기 시작하여, 전이유전자 산물은 시간이 흐름에 따라 축적되었다. 가장 중요한 것은, 본 발명자들이 더 길게 노출된 블롯에서조차 전이유전자의 백그라운드 발현을 전혀 검출할 수 없었다는 것이며, 이러한 결과는 pEUI(+)에 의한 전이유전자 유도

를 엄격하게 조절함을 다시 검증한 것이다.

[0042] **실시예 4. pEUI(+) 시스템에 의한 전이유전자 유도의 가역성**

[0043] 타겟 유전자의 발현에 대한 Teb 효과가 얼마나 오래 지속되는지 평가하기 위해, 상기 #293-13A 세포주를 10 μ M Teb로 24시간 동안 자극한 후, 수집하고, PBS로 여러 번 철저히 세척하여 남은 Teb가 없도록 완벽히 제거하고, 새로운 세포배양 플레이트상에 다시 씨딩하고, 지시된 시간 동안 Teb가 없는 성장배지에서 배양한 후, 총 RNA 추출을 수행하였다. 그 결과로 얻은 RNA로부터 M-MLV RTase (ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)로 합성된 cDNA는 ANKRD13A 및 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)에 대한 특이적 프라이머 세트와 Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)를 이용하여 qPCR 반응에 제공되었다. ANKRD13A qPCR 산물의 수율은 GAPDH 앰플리콘으로 정규화하였다.

[0044] 도 2b에 나타나 바와 같이, ANKRD13A의 전사는 24시간 동안 Teb 자극에 의해 88배 증가하였으며, Teb 제거에 따라 점차적으로 감소하였다. Teb 고갈된 배지에서 3시간 동안 세포의 배양은 전이유전자의 발현을 55%까지 감소시켰고, 전사 수율은 제거 후 72시간에 기본 수준(basal levels)으로 감소되었다. 이러한 결과는 pEUI(+) 시스템에 의한 전이유전자 유도의 가역성(reversibility)을 나타낸다.

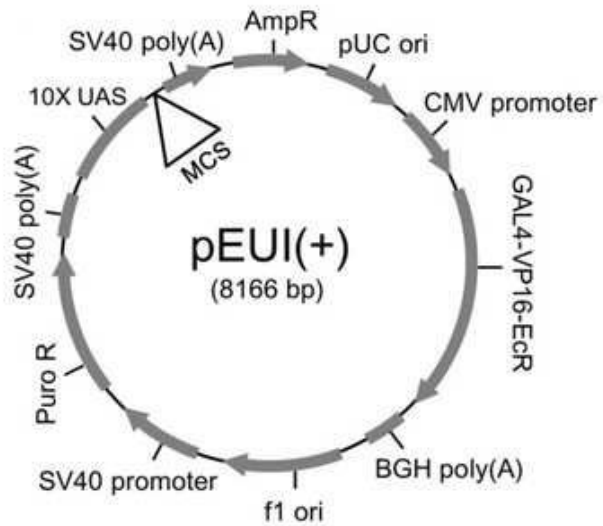
[0045] **결과해석**

[0046] 통상적으로 사용가능한 전이유전자 유도성 시스템을 이용하여 세포에서 유전자를 발현시킬 경우 주된 장애(bottleneck)는 타겟 세포로 2개의 개별적인 유닛(드라이버 및 이펙트 플라스미드)을 전달하는 것이 필수적인데, 이는 종종 두 유닛의 발현을 불균형하게 하여, 인두서(inducer)에 의한 일관성이 없는 유도를 초래한다. 본 발명에서 개발된 pEUI(+) 유전자 유도성 시스템은 높은 민감도, 가역성 및 낮은 불완전발현을 가지면서 타겟 유전자 전사의 화학적 유도에 필요한 전체 조절 유닛들이 구비된 단일 벡터(singular vector)이며, 이러한 시스템은 발현 수준에서 제한된 변동(limited variation)으로 유전자 발현을 유도할 수 있다 (도 2c 참조). 종합하면, pEUI(+) 벡터는 유전자 기능의 철저한 분석에 유용한 분자 세포적 수단이 될 것이다.

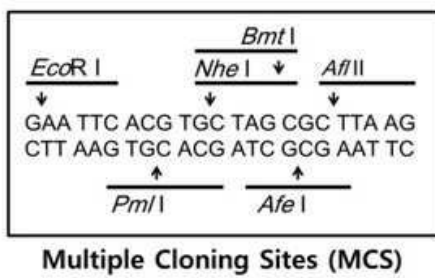
[0047] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

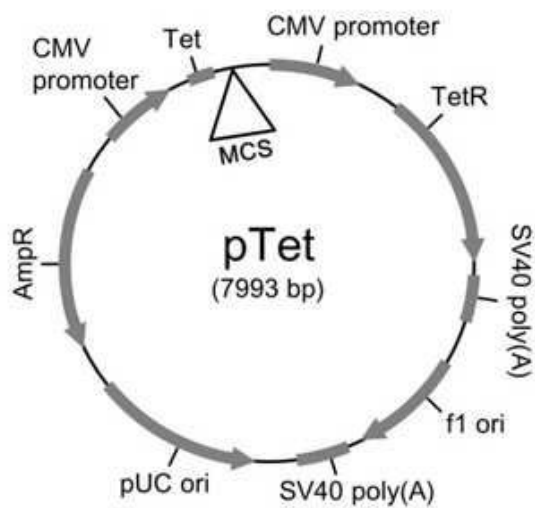
도면1a



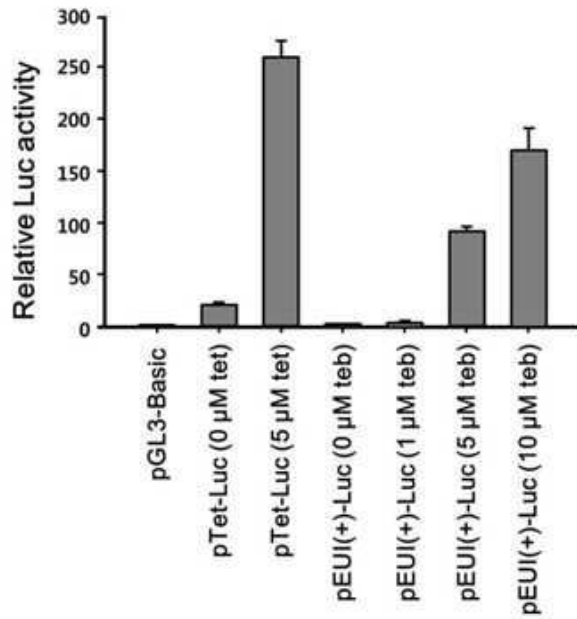
도면1b



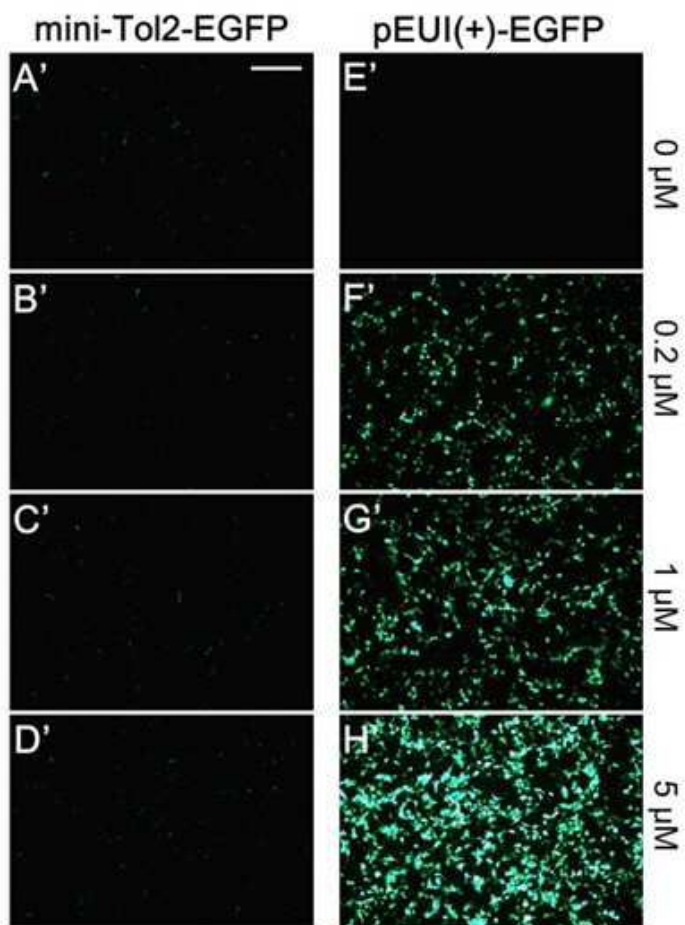
도면1c



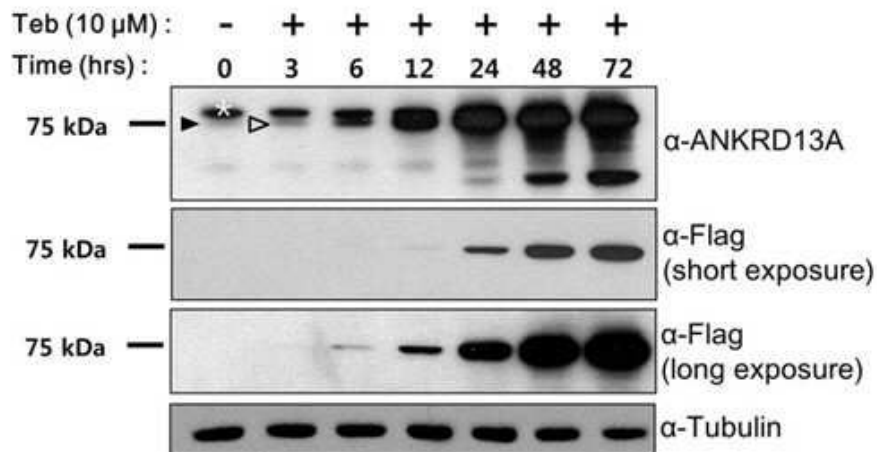
도면1d



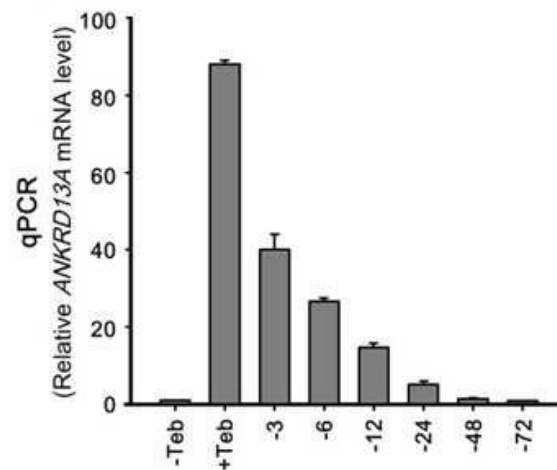
도면1e



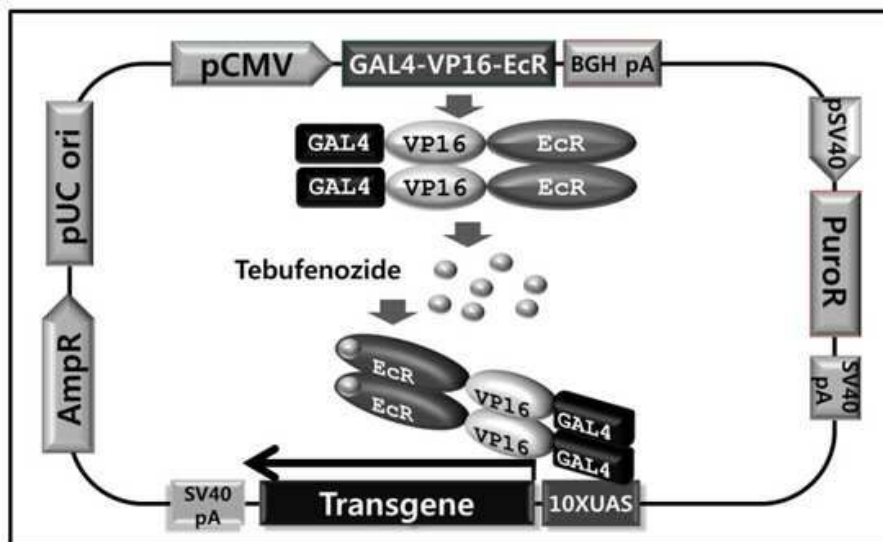
도면2a



도면2b



도면2c



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Ecdysone receptor-based transgene inducible vector
 <130> NP14-1343
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> GAL4 VP16 EcR DNA construct

<400> 1

atgaagctac agtctttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag	60
tgtctcaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac	120
tctcccaaaa caaaaggctc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg	180
ctagaaagac tggaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt	240
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat	300
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta	360
acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt	420
caaagacagt tgactgtaga gttcctggat atggccgact tcgagtttga gcagatgttt	480
accgatgccc ttggaattga cgagtacggt gggctgcaga tgaggcctga atgtgtcata	540
caggagccca gtaaaaataa agacaggcaa agacaaaaga aagacaaagg aatattatta	600
cctgttagta cgaccacagt cgaagaccac atgccccga tcatgcaatg tgateccact	660
ccgcccgagg ccgccaggat tcacgaagtc gtcccagggt atctttcgga gaagctgatg	720
gagcagaaca ggcagaagaa cataccacca ttgtcgcgca atcagaagtc tctgatcgcg	780
aggctcgtgt ggtaccagga gggatatgag cagccctccg acgaggatct caaaagagta	840
acgcagactt ggcagtcgga tgaagaggac gaggaatccg atctaccctt ccgccagatc	900
acggagatga cgatcttaac ggtccagttg atcgtcgagt tcgccaaggg tctaccgggc	960
ttttcgaaga tatcacagtc tgatcaaatc acctatttaa aagcctcgtc cagcgaggtg	1020
atgatgctgc ggggtggcgag gcgatacgac gccgcgtccg acagcattct gttcgccaac	1080
aacaaggcgt acacgcgcga caactaccgc aaggcgggca tggccgaggt catcgaagac	1140
ctcctacact tctgccggtg catgttcgcg atgggcatgg acaatgtgca ctttgactg	1200
ctcacggcca tcgttatatt ctcagatcgg cccgggctcg agcagccgtc gctggtagaa	1260

gagatccaga gatactacct gaacacgttg cgaatttaca tcatcaacca gaacagcgcg	1320
tcgtcgcgct gcgccgtgat ctacggcagg atcctgagcg tgctgaccga gctacgcacg	1380
ctcggcacgc aaaactccaa catgtgcatc tcgctgaagc tgaagaacag gaagctgccg	1440
ccgttctctg aggagatctg ggacgtggcg gaggtggcca cgacgcatcc cacggtgctg	1500
ccgcccacca acccggtggt gctatag	1527
<210> 2	
<211> 8166	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> recombinant vector pEUI plus	
<400> 2	
tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga	60
ggaagcggaa gagcgctga tgcggtatit tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca	120
ccgcatagtt aggcgttttg cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca	180
ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata	240
tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga	300
ccccgcacca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt	360
ccattgacgt caatgggtgg agtatcttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt	420
gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca	480
ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt	540
catcgctatt accatgggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt	600
tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cactgacgtc aatgggagtt tgttttgga	660
ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg	720
cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat aagcagagct ctctgctaa ctagagaacc	780
cactgcttac tggtttatcg aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttatcg	840
atatgaagct acagtcttct atcgaacaag catgcgatat ttgccgactt aaaaagctca	900
agtgtcccaa agaaaaaccg aagtgcgcca agtgtctgaa gaacaactgg gagtgtcgct	960
actctcccaa aacaaaaagg tctccgctga ctagggcaca tctgacagaa gtggaatcaa	1020
ggctagaaag actggaacag ctatttctac tgatttttcc tcgagaagac cttgacatga	1080
ttttgaaat ggattcttta caggatataa aagcattggt aacaggatta tttgtacaag	1140
ataatgtgaa taaagatgcc gtcacagata gattggcttc agtggagact gatatgcctc	1200

taacattgag acagcataga ataagtgcga catcatcatc ggaagagagt agtaacaaag	1260
gtcaaagaca gttgactgta gagttcctgg atatggccga cttcgagttt gagcagatgt	1320
ttaccgatgc ccttggaatt gacgagtacg gtgggctgca gatgaggcct gaatgtgtca	1380
tacaggagcc cagtaaaaat aaagacaggc aaagacaaaa gaaagacaaa ggaatattat	1440
tacctgttag tacgaccaca gtcgaagacc acatgcccc gatcatgcaa tgtgatccac	1500
ctccgcccga ggccgccagg attcacgaag tcgtcccag gtatctttcg gagaagctga	1560
tggagcagaa caggcagaag aacataccac cattgtcggc gaatcagaag tctctgatcg	1620
cgaggctcgt gtgttaccag gagggatatg agcagccctc cgacgaggat ctcaaaagag	1680
taacgcagac ttggcagtcg gatgaagagg acgaggaatc cgatctacc ttccgccaga	1740
tcacggagat gacgatctta acggtccagt tgatcgtcga gttcgccaag ggtctaccgg	1800
gcttttcgaa gatatcacag tctgatcaaa tcaccttatt aaaagcctcg tccagcgagg	1860
tgatgatgct gcgggtggcg aggcgatacg acgccgcgtc cgacagcatt ctgttcgcca	1920
acaacaaggc gtacacgcgc gacaactacc gcaaggcggg catggccgag gtcacgaag	1980
acctctaca cttctgccgg tgcatgttcg cgatgggcat ggacaatgtg cactttgcac	2040
tgctcacggc catcggtata ttctcagatc ggccccggct cgagcagccg tcgctggtag	2100
aagagatcca gagatactac ctgaacacgt tgcgaattta catcatcaac cagaacagcg	2160
cgctcgcgcg ctgcgccgtg atctacggca ggatcctgag cgtgctgacc gagctacga	2220
cgctcggcac gcaaaactcc aacatgtgca tctcgtgaa gctgaagaac aggaagctgc	2280
cgccgttcc tgcaggagatc tgggacgtgg cggagggtggc cagcagcat cccacggtgc	2340
tgccgcccac caaccgggtg gtgctatagt ctgagggcc ctattctata gtgtcaccta	2400
aatgctagag ctgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt	2460
tgccctccc ccgtgccttc cttgacctg gaagggtcca ctccactgt cctttcctaa	2520
taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg	2580
gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc cggggatgcg	2640
gtgggctcta tggtttctga ggccgaaaga accagctggg gctctagggg gtatccccc	2700
gcgcctgta gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtgtgg ttacgcgag cgtgaccgt	2760
acacttgcca gcgcctage gcccgctct ttcgtttct tcccttctt tctcgccacg	2820
ttcgccggt ttccccgta agctctaaat cggggcatcc ctttaggggt ccgatttagt	2880
gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gattaggtg atggttcac tagtgggcca	2940
tcgcctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga	3000
ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	3060

gggatttttg ggatttcggc ctatttggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	3120
gcgaattaat tctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtcacca ggctcctatg	3180
gtgcaactctc agtacaaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagctgt ggaatgtgtg	3240
tcagtttaggg tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca	3300
tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat	3360
gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc	3420
gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa tttttttat	3480
ttatgcagag gccgaggccg cctcgccctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt	3540
ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct tgcatgcctg caggtcggcc gccacgaccg	3600
gtgccgccac catccccga cccacgcccc tgaccctca caaggagacg accttccatg	3660
accgagtaca agccacggg gcgcctcgcc acccgcgacg acgtccccg ggccgtacgc	3720
acctcgccg ccgcgttcgc cgactacccc gccacgcgcc acaccgtcga cccggaccgc	3780
cacatcgagc gggtcaccga gctgcaagaa ctcttcctca cgcgcgtcgg gctcgacatc	3840
ggcaagggtg gggtcgcgga cgacggcgcc gcggtggcgg tctggaccac gccggagagc	3900
gtcgaagcgg gggcggtgtt cgccgagatc ggcccgcgca tggccgagtt gagcggttcc	3960
cggttgccg cgagcaaca gatggaaggc ctcttgccg cgacccggcc caaggagccc	4020
gcgtggttcc tggccaccgt cggcgtctcg cccgaccacc agggcaaggg tctgggcagc	4080
gccgtcgtgc tccccgaggt ggaggcggcc gagcgcgccg gggtgccgc ctctctggag	4140
acctcgccg cccgcaacct ccccttctac gagcggtcgc gcttcaccgt caccgccgac	4200
gtcgagtgcc cgaaggaccg cgcgacctgg tgcatgaccc gcaagcccgg tgcctgacgc	4260
ccgccccacg accgcagcg cccgaccgaa aggagcgcac gaccccatgg ctccgaccga	4320
agccgacccg ggcggccccg ccgacccgc acccgcccc gagggcccacc gactctagag	4380
gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca	4440
cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc	4500
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt	4560
ttcactgcat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttacc atgtctggat	4620
ccccaggaag ctctctgtg tctcataaa cctaacctc ctctacttga gaggacattc	4680
caatcatagg ctgcccattc acctctgtg tctctctgtt aattaggtca cttacaaaa	4740
aggaaattgg gtaggggttt ttcacagacc gcttttctaag ggtaatttta aaatatctgg	4800

gaagtcctt ccactgctgt gttccagaag tgttggtaaa cagcccacaa atgtcaacag	4860
cagaaacata caagctgtca gctttgcaca agggcccaac accctgctca tcaagaagca	4920
ctgtggttgc tgtgttagta atgtgcaaaa caggaggcac attttccca cctgtgtagg	4980
ttccaaaata tctagtgttt tcatttttac ttggatcagg aaccagcac tccactggat	5040
aagcattatc cttatccaaa acagccttgt ggtcagtgtt catctgctga ctgtcaactg	5100
tagcattttt tggggttaca gtttgagcag gatatttggc cctgtagtgt gctaacacac	5160
cctgcagctc caaaggttcc ccaccaacag caaaaaaatg aaaatttgac ccttgaatgg	5220
gttttccagc accattttca tgagtttttt gtgtccctga atgcaagttt aacatagcag	5280
ttacccaat aacctcagtt ttaacagtaa cagcttccca catcaaaaata tttccacagg	5340
ttaagtcctc atttaaatta ggcaaaggaa ttgctcaact ttgtatagaa aagttggtaa	5400
tacgactcac tataggcgca attgggtacc gggccccccc tcgaggctga cggtatcgat	5460
aagcttaggc ctccaaggcg gagtactgtc ctccgggctg gcggagtact gtcctccggc	5520
aaggtcggag tactgtcctc cgacactaga ggtcggagta ctgtcctccg acgcaaggcg	5580
gagtactgtc ctccgggctg cggagtactg tcctccggca aggtcggagt actgtcctcc	5640
gacactagag gtcggaglac tgtcctccga cgcaaggcgg agtactgtcc tccgggctgg	5700
cggagtactg tcctccggca agggctgact ctagagggtg tataatggat cccatcgct	5760
ctcagcctca ctttgagctc ctccacacgg agcttgatgt aggtgacact atagaataca	5820
agctacttgt tctttttgca ggatcccatc gattcgaatt cacgtgctag cgcttaagaa	5880
attcaaggcc tctcgagcct ctagaactat agtgagtcgt attacgtaga tccagacatg	5940
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaag aaaatgcttt	6000
atttgtgaaa ttgtgatgc tattgcttta ttgttaacca ttataagctg caataaaca	6060
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg ttccaggttc agggggaggt gtgggaggtt	6120
ttttaattcg cggccgcggc gccaatgcat tgggcccggt acccagcttt tgttcccttt	6180
agtgagggtt aattgcgcgc ttggcgtaat catggtcata gctgttaatt ctgaagacg	6240
aaaggccctc gtgatacgcc tatttttata ggtaaatgtc atgataataa tggttttcta	6300
gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta	6360
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	6420
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttccgtgtc gcccttattc cttttttgc	6480
ggcattttgc cttcctgttt ttgtcacc cagaaacgtg gtgaaagtaa aagatgctga	6540
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	6600
tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg	6660

tggcgcggtat ttatcccggtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta	6720
ttctcagaat gacttgggtg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	6780
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt	6840
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	6900
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	6960
gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc aacaacgttg cgcaactat taactggcga	7020
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc	7080
aggaccactt ctgcgctcgg cccctccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	7140
cggtagagcgt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	7200
tatcgtagtt atctacagca cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	7260
cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag tttactcata	7320
tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	7380
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	7440
ccccgtagaa aagatcaaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	7500
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggtttgt ttgccggatc aagagctacc	7560
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct	7620
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	7680
tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	7740
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg	7800
cacacagccc agcttggagc gaacgacctt caccgaactg agatacctac agcgtgagct	7860
atgagaaaag gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	7920
ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	7980
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	8040
gcggagccta tggaataacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg	8100
gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atccccgat tctgtggata accgtattac	8160
cgctt	8166