



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0085357
(43) 공개일자 2017년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0004885
(22) 출원일자 2016년01월14일
심사청구일자 2016년12월26일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김선원
경상남도 진주시 진주대로 1317, 105동 2202호(이
현하이클래스웰가아파트)
김정현
경상남도 진주시 진주대로 522, 508호(가좌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
두호특허법인

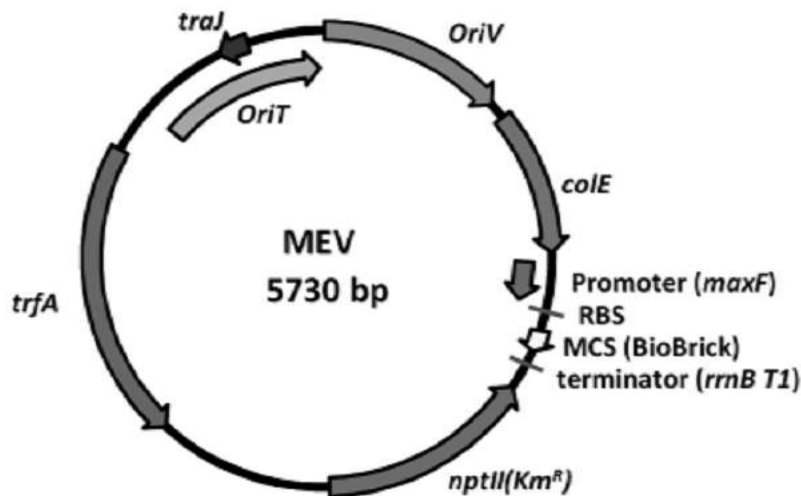
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터

(57) 요약

본 발명은 복제 기점, 프로모터, 상기 프로모터 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 항생제 내성 유전자 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위는 EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI 순서로 배열된 적어도 4개의 제한 효소 부위를 가짐으로써, 사이즈가 작아 숙주 세포로의 도입, 특히, 컨주게이션을 이용한 도입 효율이 높으며, 다수개의 제한 효소 부위를 가져 다양한 유전자의 삽입이 용이한 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2800/30 (2013.01)

(72) 발명자

차명석

경상남도 창원시 마산회원구 구암북12길 70, A동
513호(구암동, 한우아파트)

조선영

경상남도 창원군 영산면 한글목길 15-2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064882

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1가스리파이너지사업

연구과제명 메탄-메탄올 전환 플랫폼 군주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.09.17 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

복제 기점, 프로모터, 상기 프로모터 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 항생제 내성 유전자 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위는 EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI 순서로 배열된 적어도 4개의 제한 효소 부위를 가지는 발현 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 다중 클로닝 부위는 EcoRI, KpnI, XbaI, SpeI, KpnI 및 PstI 순서의 제한 효소 부위를 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 다중 클로닝 부위는 서열번호 37의 염기 서열을 갖는 발현 벡터.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 발현 벡터는 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 PCM66 벡터를 주형으로 하는 발현 벡터.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 복제 기점은 서열번호 5의 염기 서열을 갖는 발현 벡터.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 4의 염기 서열을 갖는 발현 벡터.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 터미네이터는 서열번호 10의 염기 서열을 갖는 발현 벡터.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 발현 벡터는 서열번호 1의 염기 서열을 갖는 발현 벡터.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 발현 벡터에서 복제 기점 및 플라스미드 복제 개시 단백질 유전자가 제거된 턴인 또는 턴아웃 벡터.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 프로모터 상류에 적어도 5개 이상의 제한 효소 부위를 갖는 벡터.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 터미네이터 하류에 loxP 부위를 갖는 벡터.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 loxP 부위 하류에 적어도 5개 이상의 제한 효소 부위를 갖는 벡터.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 녀인 또는 녀아웃 벡터는 서열번호 6의 염기 서열을 갖는 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 메탄올을 기반한 생명과학 분야의 연구들이 많은 관심을 끌고 있다. 그 중 메탄올을 탄소원으로 이용하는 메틸로박테리움(Methylobacterium) 속 미생물들을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 메틸로박테리움 속 미생물들을 이용한 고부가 이차대사산물 생산 연구의 장점은 자연계에 풍부하게 존재하며 천연가스로부터 쉽게 얻을 수 있는 메탄올을 탄소원으로 이용한다는 점에서 경제적 측면에서 매우 유리하다.

[0004] 메탄올을 기반한 메틸로박테리움 미생물 연구의 가장 대표 모델 균주로 Methylobacterium extorquens AM1이 이용된다. 이 균주의 특징은 메탄올 이외에 다양한 C2, C3 그리고 C4 물질을 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있다는 것이다. 또한 M. extorquens AM1과 더불어 관련된 여러 가지 균주의 지놈 염기서열이 분석이 완료되었고 현재도 진행되고 있다. 이러한 지놈 염기서열의 분석은 M. extorquens AM1을 비롯한 Methylobacterium의 대사경로를 재조합하고 새로운 대사경로의 도입을 위한 기초자료로 활용되고 있다.

[0005] 지금까지 M. extorquens AM1을 이용한 대사공학 연구의 목적으로 다양한 유전자 조작 기술과 벡터들이 개발되었고, 재조합 단백질 발현에 이용되었다. 하지만 대부분의 발현 벡터를 비롯한 지놈 특이적 유전자 제거와 삽입을 위한 벡터들은 불필요한 염기서열을 많이 포함하고 있어서 사이즈가 크고, 유전자 클로닝을 위한 다양한 제한효소 사이트의 부재로 인하여 여러 가지 유전자를 동시에 벡터에 클로닝하기 힘든 단점을 가지고 있다.

[0006] 한국공개특허 제2015-0019387호에는 재조합 발현벡터, 이를 포함하는 숙주세포 및 그 용도가 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2015-0019387호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 사이즈가 작아 숙주 세포로의 도입 효율이 우수한 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 다수개의 제한 효소 부위를 가져 다양한 유전자의 삽입이 용이한 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따른 발현 벡터는 복제 기점, 프로모터, 상기 프로모터 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 항생제 내성 유전자 서열을 포함하고,

[0013] 상기 다중 클로닝 부위는 EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI 순서로 배열된 적어도 4개의 제한 효소 부위를 갖는다.

[0014] 본 발명의 발현 벡터는 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다. 발현벡터는 발현조절 서열 및 필요에 따라 막표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현 조절 서열(expression control sequence)이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 또한 발현벡터는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함 할 수 있으며, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기점을 포함 할 수 있다.

[0015] 상기 숙주 세포는 원핵 세포, 진핵 세포, 또는 분리된 동물세포일 수 있다.

[0016] 상기 숙주 세포는 예를 들면, 박테리아, 곰팡이, 또는 이들의 조합일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 또는 이들의 조합일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 에세리키아 (Escherichia) 속일 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실러스 속, 코리네박테리움 속, 유산균 또는 이들의 조합일 수 있다. 곰팡이는 효모, 클루베로마이세스, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0017] 보다 구체적으로, 상기 숙주 세포는 메틸로박테리움 속 미생물일 수 있다. 구체적인 예를 들자면, 메틸로박테리움 엑스토르켄스(M. extorquens), 메틸로박테리움 애드해시븀(M. adhaesivum), 메틸로박테리움 아미노보란스(M. aminovorans), 메틸로박테리움 아쿠아티쿰(M. aquaticum), 메틸로박테리움 클로로메타니쿰(M. chloromethanicum), 메틸로박테리움 디클로로메타니쿰(M. dichloromethanicum), 메틸로박테리움 푸지사와엔세(M. fujisawaense), 메틸로박테리움 히스파니쿰(M. hispanicum), 메틸로박테리움 이스빌리엔세(M. isbiliense), 메틸로박테리움 루시타눔(M. lusitanum), 메틸로박테리움 메소필리쿰(M. mesophilicum), 메틸로박테리움 노두란스(M. nodulans), 메틸로박테리움 오르가노필룸(M. organophilum), 메틸로박테리움 포다리움(M. podarium), 메틸로박테리움 포폴리(M. populi), 메틸로박테리움 라디오톨레란스(M. radiotolerans), 메틸로박테리움 로데시아눔(M. rhodesianum), 메틸로박테리움 로디눔(M. rhodinum), 메틸로박테리움 수오미엔세(M. suomiense), 메틸로박테리움 티오시아나툼(M. thiocyanatum), 메틸로박테리움 버라이어빌레(M. variabile), 메틸로박테리움 자트마니(M. zatmanii) 등을 들 수 있다.

[0018] 바람직하게는 메틸로박테리움 엑스토르켄스일 수 있고, 보다 구체적으로, Methylobacterium extorquens AM1, DM4, PA1, CM4, BJ001 등일 수 있으며, 바람직하게는 Methylobacterium extorquens AM1일 수 있다.

[0019] 이하, 메틸로박테리움 속 미생물에 사용되는 벡터인 경우를 구체적으로 설명하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 발현벡터에는 당업계에 알려진 다양한 단백질을 암호화하는 염기 서열이 도입될 수 있으며, 이 목적 단백질을 암호화하는 염기 서열은 프로모터와 작동 가능하게 연결된다. 작동 가능하게 연결(operably linked)된다는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다.

[0021] 복제 기점(replication origin)으로는 해당 숙주 세포 내에서 작동할 수 있는 복제 기점이 제한 없이 사용될 수 있다. 메틸로박테리움 속 미생물의 경우는 예를 들면 OriV 복제 기점일 수 있다.

[0022] 바람직하게는 복제 기점 서열로는 복제 기점 및 그 양 말단에 제한 효소 부위를 갖는 서열을 사용할 수 있다. 구체적인 예시로는 OriV 복제 기점 및 그 양 말단에 제한 효소 부위를 갖는 서열번호 5의 염기 서열을 사용할 수 있다.

- [0023] 본 발명에서 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제에 대한 인지 및 적절한 전사에 요구되는 다른 인자를 제공함으로써 코딩서열의 발현을 제어하는, 일반적으로 코딩서열의 상류(5')에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. "프로모터"는 TATA-박스과 전사 개시위치를 특징하는 역할을 하는 다른 서열로 이루어진 짧은 DNA 서열인 최소 프로모터를 포함하며, 여기에 발현 제어를 위한 조절성분이 첨가된다. "프로모터"는 또한 코딩서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절할 수 있는 최소 프로모터와 조절성분을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 프로모터는 전체가 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 자연에서 발견된 상이한 프로모터들로부터 유래된 상이한 성분들로 이루어질 수 있으며, 또는 합성 DNA 절편으로 이루어질 수 있다. 프로모터는 또한 생리적 또는 성장 조건에 대한 반응으로 전사 개시의 유효성을 제어하는 단백질 인자의 결합에 관여하는 DNA 서열을 함유할 수 있다.
- [0024] 프로모터로는 해당 숙주 세포 내에서 작동할 수 있는 프로모터가 제한 없이 사용될 수 있다. 메틸로박테리움 속 미생물의 경우는 예를 들면 maxF(PmaxF), lac, sMMO(Soluble methane monooxygenase) σ 54, pMMO(particulate methane monooxygenase) σ 70, rpoD 등일 수 있으며, 바람직하게는 maxF 프로모터이다.
- [0025] 바람직하게는 프로모터 서열로는 프로모터 및 그 양 말단에 제한 효소 부위를 갖는 서열을 사용할 수 있다. 구체적인 예시로는 maxF 프로모터 및 그 양 말단에 제한 효소 부위를 갖는 서열번호 4의 염기 서열을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "다중 클로닝 부위"는 제한효소(restriction enzyme)가 인식할 수 있는 부위를 여러 개 가지고 있는 부분으로, 클로닝 시에 유전자 조작을 용이하게 하기 위해 벡터 내에 목적하는 유전자를 삽입할 수 있도록 다양한 제한효소 부위를 포함하도록 구성된 염기서열 부위를 의미한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 다중 클로닝 부위는 상기 프로모터의 하류에 위치하는 것으로서, EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI 순서로 배열된 적어도 4개의 제한 효소 부위(바이오브릭)를 가진다.
- [0028] 통상 다중 클로닝 부위의 제한 효소 부위를 이용하여 유전자를 클로닝 할 경우, 2개의 제한 효소를 처리하여 2개의 제한 효소 부위 사이를 제거하고, 제거된 부위에 도입할 유전자가 삽입된다. 그러한 경우에 해당 부위의 서열이 변경되어 제한 효소 부위는 상실된다. 따라서, 이후 다시 유전자를 삽입하고자 할 때 해당 제한 효소 부위는 사용할 수 없게 된다.
- [0029] 그러나, 본 발명과 같이 EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI 순서로 배열된 적어도 4개의 제한 효소 부위를 갖는 경우에는, 도 5에 예시된 개념도와 같이 제한 효소 부위를 이용한 유전자 삽입 이후에도 벡터 상에 다시 동일 제한 효소 부위가 존재하게 되므로, 지속적인 유전자 삽입, 변경, 제거 등이 용이하다.
- [0030] EcoRI, XbaI, SpeI 및 PstI의 4개의 제한 효소 부위가 상기 순서를 유지하기만 한다면 각 제한 효소 부위 사이에 제한 효소 부위가 더 추가될 수 있다. 본 실시예의 경우는 EcoRI과 XbaI 사이트와 SpeI과 PstI 사이트 사이에 각각 KpnI 사이트를 삽입하였으나(도 2), 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 다중 클로닝 부위는 서열번호 37의 염기 서열을 가질 수 있다.
- [0032] 터미네이터로는 해당 숙주 세포 내에서 작동할 수 있는 터미네이터가 제한 없이 사용될 수 있다. 메틸로박테리움 속 미생물의 경우는 예를 들면 rrnB-T1, rrnB-TE일 수 있으며, 바람직하게는 rrnB-T1(서열번호 10)일 수 있다.
- [0033] 항생제 내성 유전자는 선별 마커(selective marker)로서의 역할을 할 수 있다. 이러한 항생제 저항성 유전자로 될 수 있는 유전자는 현재 다수가 공지되어 있다(예를 들어, 카나마이신, 네오마이신, 앰피실린, 테트라사이클린 등). 따라서, 당업자는 상기 공지된 항생제 저항성 유전자들로부터 원하는 유전자를 취사선택하여 사용하는 것이 가능하며 이러한 유전자의 구체적인 종류는 본 발명의 본질을 구성하는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 PCM66 벡터(Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. Marx CJ, Lidstrom ME. Microbiology. 2001 Aug;147(Pt 8):2065-75.)를 주형으로 하여 제조된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1의 염기 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 턴인 또는 턴아웃 벡터를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 턴인 또는 턴아웃 벡터는 숙주 세포에 대하여 지놈 부위 특이적 유전자 인테그레이션 또는 턴아웃을 위해 사용될 수 있다.

- [0039] 숙주 세포는 전술한 숙주 세포일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 상기 발현 벡터를 주형으로 하는 것일 수 있다. 그러한 경우 전술한 장점을 그대로 가질 수 있다.
- [0041] 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터가 숙주 세포로 도입된 경우 벡터가 복제되지 않고 자연적으로 소멸되도록 하기 위해, 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 전술한 발현 벡터에서 복제를 담당하는 복제 기점 및 복제수 결정에 관여하는 플라스미드 복제 개시 단백질 유전자가 제거된 것이다.
- [0042] 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 프로모터 상류에 복수개의 제한 효소 부위를 가질 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 적어도 5개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 본 실시예에서는 SphI, EcoRV, HpaI, NcoI, NheI 및 NotI를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 이와 같이 복수개의 제한 효소 부위를 가짐으로써, 종래의 다양한 제한효소 사이트의 부재로 인하여 여러 가지 유전자를 동시에 벡터에 클로닝하기 힘든 단점을 해결할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 녀아웃을 위해 터미네이터 하류에 loxP 부위를 가질 수 있다.
- [0046] loxP 부위로는 loxP71(서열번호 26) 및 loxP66 부위(서열번호 66)를 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 loxP 부위 하류에 복수개의 제한 효소 부위를 더 가질 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 적어도 5개 이상의 제한 효소 부위를 가질 수 있다. 본 실시예에서는 SbfI, DraI, ScaI, SalI 및 SacII를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터에 있어서, 프로모터 상류의 제한 효소 부위, 프로모터, 다중 클로닝 부위, 터미네이터, loxP 부위 및 그 하류의 제한 효소 부위를 포함하는 서열은 예를 들면 서열번호 7의 염기 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 녀인 또는 녀아웃 벡터는 구체적으로 서열번호 6의 염기 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 또한, 본 발명은 녀아웃 벡터를 제공한다.
- [0053] 본 발명의 녀아웃 벡터는 전술한 녀인 또는 녀아웃 벡터를 이용한 지놈 특이적 유전자 삽입 또는 제거 후에 항생제 저항성 유전자 제거를 위해 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 녀아웃 벡터는 전술한 발현 벡터를 주형으로 하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 녀아웃 벡터는 전술한 녀인 또는 녀아웃 벡터와 상이한 항생제 저항성 유전자를 갖는다.
- [0056] 항생제 저항성 유전자로는 전술한 녀인 또는 녀아웃 벡터에 도입된 것과 상이한 것일하면 전술한 항생제 저항성 유전자가 제한없이 사용될 수 있다.
- [0057] 테트라사이클린 저항성 유전자를 갖는 경우의 구체적인 예를 들면, 터미네이터 및 그 하류의 테트라사이클린 저항성 유전자를 포함하는 서열은 예를 들면 서열번호 9의 염기 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0058] 전술한 녀인 또는 녀아웃 벡터와 상이한 항생제 저항성 유전자를 갖는 녀아웃 벡터는 예를 들면 서열번호 35의 염기 서열을 가질 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명의 녀아웃 벡터는 전술한 녀인 또는 녀아웃 벡터의 loxP(71/66) 부위를 인식하여 반응하는 Cre recombinase를 코딩하는 cre 유전자(서열번호 36)를 가질 수 있다. 그러한 녀아웃 벡터는 서열번호 8의 염기 서열을 가질 수 있다.
- [0060] Cre 유전자를 갖는 본 발명의 녀아웃 벡터는 다량의 cre recombinase가 발현되어 항생제 저항성 유전자 제거 효율이 우수하고, 특히, maxF 프로모터를 사용할 경우 특히 우수하다.
- [0062] 본 발명에서 상기 발현벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터가 도입될 수 있는 메틸로박테리움 속 균주의 배양에 사용된 탄소원으로는 C1, C2, C3, C4 계열의 물질 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 C1 계열의 메탄올이다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 황산암모늄이다.

- [0063] 메틸로박테리움 속 균주의 배양은 통상의 메틸로박테리움 속의 배양 조건으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 약 15-45℃에서 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체 만을 회수하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [0064] 상기 배양의 일 예에 있어서, 메틸로박테리움속 미생물의 경우 탄소원으로서 메탄올을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 메탄올이 배지 중의 유일한 탄소원일 수 있다. 바람직하게는, 0.5 부피 %의 메탄올을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배지는 메탄올이 첨가된 MMS 배지일 수 있다. MMS 배지는 리터당 1.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g KNO_3 , 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 ml solution Fe-EDTA (3.8% (w/v)), 0.5 ml $\text{NaMo} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.1% (w/v)), 1.0 ml trace element solution (500 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mg H_3BO_3 , 250 mg EDTA) 이다. 배양은 교반되는 상태로 수행될 수 있다. 교반되는 경우, 250 rpm으로 교반될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 벡터를 메틸로박테리움 속 균주로 도입하는 방법은 통상의 메틸로박테리움 속 균주로 도입하는 방법으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 컨쥬게이션(conjugation) 방법이다.
- [0066] 상기 메틸로박테리움 속 균주로 컨쥬게이션을 위해 사용된 대장균 균주는 대장균 ST17, ST18 균주를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균 ST18 균주이다.
- [0067] 상기 과정에서 대장균 ST18 균주의 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 배양할 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, LB (Luria-Bertani) 액체 배지 및 단백질 발현 물질이 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있으며 ALA (aminolevulinic acid)를 배지에 포함할 수 있고, 교반되는 경우, 250 rpm으로 교반될 수 있다.
- [0068] 상기 벡터제작 과정에 사용된 균주는 통상의 대장균 에세리키아 콜리일 수 있으며, 예를 들면, DH5 α , DH10 β , MG1655 등일 수 있으며, 바람직하게는 대장균 DH5 α 이다.
- [0069] 상기 벡터 제작에 사용된 대장균용 복제기점은 대장균에서 작동하는 복제기점일 수 있으며, 예를 들면, pBR322, p15A 유래일 수 있으며, 바람직하게는 pBR322 유래의 ColE 복제기점(서열번호 15)이다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 벡터 제작과정에서 사용된 대장균 균주의 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 배양할 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, LB (Luria-Bertani) 액체 배지 및 단백질 발현 물질이 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 벡터 제작을 위한 대장균 배양의 탄소원으로는 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 글리세롤이다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 트립톤이다.
- [0072] 본 발명에서 벡터 제작을 위한 대장균 배양은 통상의 대장균 속의 배양 조건으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 약 15-45℃에서 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [0073] 상기 배양의 일 예에 있어서, 대장균의 경우 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 글리세롤은 배지 중의 유일한 탄소원일 수 있다. 바람직하게는, 2.0 부피 %의 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배지는 글리세롤이 첨가된 LB 배지일 수 있다. LB 배지는 리터당 5 g yeast extract, 10 g 트립톤, 10 g NaCl 이다. 배양은 교반되는 상태로 수행될 수 있다. 교반되는 경우, 250 rpm으로 교반될 수 있다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 과정에서 사용된 Methylobacterium 균주의 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 배양할 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MMS (methanol mineral salts)(By far the most common growth medium used in methanotrophy is "Nitrate Mineral Salts" (NMS) medium first described by Whittenbury, et al. (1970).) 액체 배지 및 단백질 발현 물질이 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0076] 본 발명의 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터는 사이즈가 작아 숙주 세포로의 도입, 특히, 컨쥬게이션을 이용한 도입 효율이 높다.
- [0077] 본 발명의 발현 벡터 및 녀인 또는 녀아웃 벡터는 다수개의 제한 효소 부위를 가져 다양한 유전자의 삽입이 용이하다.

도면의 간단한 설명

- [0079] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 발현 벡터의 개열 지도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 발현 벡터에서의 다중 클로닝 부위의 순서도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 녀인 또는 녀아웃 벡터의 개열 지도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 녀아웃 벡터의 개열 지도이다.
- 도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 다중 클로닝 부위의 제한 효소 부위를 이용한 유전자 클로닝 공정을 개략적으로 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0080] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0082] **실시예**
- [0083] **1. 메틸로박테리움 속 균주 도입을 위한 발현벡터(MEV) 제작**
- [0084] 본 실시예에서는 메틸로박테리움 속 균주로 도입할 발현벡터(MEV)를 제작하는 것이다. 본 벡터의 제작은 PCM66 벡터를 주형(backbone)으로 하여 제작되었다(도 1, 2). 본 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

서열번호	프라이머	염기서열
11	Backbone-F	GGGCATGCATAGATCTAGGCCTGAATCGCCCCATC
12	Backbone-R	GCGCATGCTACGGTTATCCACAGAATCAG
13	OriE-F	CGAGTACTGTGCTGCAATGATACCGCGAG
14	OriE-R	CCAGTACTGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC

- [0088] 벡터 제작에 사용된 프로모터는 메틸로박테리움 속 미생물에서 강한 발현을 보이며 메탄올에 의해 발현이 유도되는 maxF 프로모터(서열번호 4)를 사용하였으며, 터미네이터로는 일반적인 메틸로박테리움 벡터에 널리 사용되고 있는 rrnB-T1 터미네이터(서열번호 10)를 사용하였다.
- [0089] 유전자 클로닝을 위한 MCS의 염기서열은 바이오브릭(도 2)을 이용하였다. MCS의 제한효소 사이트 구성은 EcoRI, XbaI, SpeI, PstI 순으로 구성된 바이오브릭을 사용하였으며, 단순 유전자 추가와 제거를 용이하게 하기 위하여 EcoRI과 XbaI 사이트와 SpeI과 PstI 사이트 사이에 각각 KpnI 사이트를 삽입하였다(도 2).
- [0090] 벡터의 틀이 되는 염기서열을 PCM66 벡터(서열번호 2)를 주형으로 프라이머 Backbone-F (서열번호 11)와 프라이머 Backbone-R (서열번호 12)을 이용하여 증폭하고, 서열번호 15의 대장균용 복제기점을 프라이머 OriE-F (서열번호 13)와 OriE-R (서열번호 14)을 이용하여 증폭한 후 각각을 제한효소 ScaI과 SphI으로 절단하고 라이게이션하여 서열번호 16의 MEV-A 벡터를 제작하였다.
- [0091] 프로모터(서열번호 4)와 MCS(서열번호 37), 그리고 터미네이터(서열번호 10)를 포함하는 서열번호 3의 염기서열을 인공합성(바이오니아, 대한민국)하여 미리 제작된 MEV-A 벡터의 제한효소 SphI과 BglII 사이트를 통해 결합하여 MEV 벡터(도 1)를 제작하였다.
- [0092] 제작된 벡터는 기존 PCM66 벡터에 비해 불필요한 염기 서열이 약 1.9kb 제거된 약 5.7kb로써 Methylobacterium으로의 벡터 도입 효율을 향상시킬 수 있다.

[0093] 또한 대장균과 메틸로박테리움용 복제기점과 유전자 발현을 위한 프로모터의 교체가 용이하게 제작되었으며 바 이오브릭을 이용한 다양한 유전자의 삽입이 용이해졌다.

[0095] 2. 메틸로박테리움 속 균주의 지놈 특이적 유전자 도입과 제거를 위한 벡터(MIDV) 제작.

[0096] 본 실시예에서는 메틸로박테리움 속 균주의 지놈 특이적 유전자 삽입 및 제거를 위한 벡터(MIDV)를 제작하는 것이다 (도 3). 본 벡터의 제작은 상기 MEV 벡터를 주형으로 하여 제작되었다. 본 벡터 제작을 위해 사용된 프 라이머는 표 2에 나타내었다.

표 2

서열번호	프라이머	염기서열
20	DtrfA-F	GGCATATGTCACCCTCCTTGCGGGATTGC
21	DtrfA-R	CGCATATGGGCCTTGTGGGGTCAGTTCCG
22	MCS2-F (rs)	GCGCATGCTGATATCAGTTAACTCCATGGAGCTAGCTGCGGCCGCGTTGACGACAACGGT GCGATGGG
23	MCS2-R (loxP71)	CCGATCCATAAAGTTCGTATAGCCTACCCTATACGAACGGTAACGCATCTCCCCTGGAGG GCTTG
24	loxP(66)-F	GGAGATCTAGGCCTGAATCGCCCCATCATCATCC
25	loxP(66)/RS-R	GGCCTGCAGGATTTAAATAGTACTTGTGCGACTCCGCGGTACCGTTTCGTATAGCCTACCCT ATACGAAGTTATGAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATC

[0100] 먼저 MEV 벡터(서열번호 1, 도 1)에서 OriV 복제기점(서열번호 5)과 trfA 유전자(서열번호 17)를 제거하는 작 업을 진행하였다. MIDV 벡터의 경우 메틸로박테리움 속 균주로 도입되었을 경우 벡터가 복제되지 않고 자연적으로 소멸되어야 하기 때문에 복제를 담당하는 OriV와 벡터의 복제수 결정에 관여하는 trfA 유전자(plasmid replication initiator protein)를 제거하였다.

[0101] MEV 벡터의 SalI과 ScaI 사이트를 이용하여 OriV 염기서열(서열번호 5)을 제거하고 Klenow polymerase를 처리 하여 양쪽 말단을 blunt end로 만든 후 라이게이션하여 MEVΔOriV(서열번호 18)를 제작하였다.

[0102] 그 후 벡터의 복제수를 결정하는 trfA 유전자를 제거하는 작업을 진행하였다. MEVΔOriV 벡터를 주형으로 프 라이머 DtrfA-F (서열번호 20)와 프라이머 DtrfA-R (서열번호 21)을 이용하여 PCR하였다. PCR로 증폭된 DNA를 제 한효소 NdeI을 처리하고 라이게이션하여 MEVΔOriV, trfA 벡터(서열번호 19)를 제작하였다.

[0103] 상기 제작된 MEVΔOriV, trfA 벡터에 지놈 유전자 상동성 염기서열을 삽입할 제한효소 사이트와 항생제 저항성 유전자 제거를 위한 loxP 사이트를 삽입하는 작업을 진행하였다.

[0104] 먼저 MEVΔOriV, trfA 벡터의 maxF 프로모터 앞쪽에 지놈 유전자 상동성 염기서열을 삽입할 제한효소 사이트인 SphI, EcoRV, HpaI, NcoI, NheI, NotI과 항생제 저항성 유전자 제거를 위한 loxP71 사이트(서열번호 26)를 삽 입하였다.

[0105] 먼저 MEVΔOriV, trfA 벡터에서 기존의 프로모터를 포함한 MCS 부위(서열번호 3)를 SphI과 BglII를 이용하여 제 거하고, 지놈 유전자 상동성 염기서열을 삽입할 제한효소 사이트와 loxP71 사이트가 포함된 새로운 염기서열을 MEV 벡터를 주형으로 프라이머 MCS2-F (rs) (서열번호 22)와 프라이머 MCS2-R (loxP71) (서열번호 23)를 이용 하여 PCR하였다. PCR로 증폭된 DNA를 SphI과 BglII를 처리하고 상기 MEVΔOriV, trfA 벡터(SphI/BglII)와 라이 게이션하여 MIDV-A 벡터(서열번호 27)를 구축하였다.

[0106] 구축된 상기 MIDV-A 벡터에 지놈 유전자 상동성 염기서열을 삽입할 제한효소 사이트인 SbfI, DraI, ScaI, SalI, SacII와 항생제 저항성 유전자 제거를 위한 loxP66 사이트(서열번호 28)를 삽입하였다. MIDV-A 벡터의 BglII와 SbfI을 처리하여 카나마이신 저항성 유전자를 제거하고, 지놈 유전자 상동성 염기서열을 삽입할 제한효소 사 이트와 loxP66 사이트가 포함된 새로운 카나마이신 저항성 유전자를 MEV 벡터를 주형으로 프라이머 loxP(66)-F (서열번호 24)와 프라이머 loxP(66)/RS-R (서열번호 25)를 이용하여 PCR하였다. PCR로 증폭된 DNA를 BglII와 SbfI을 처리하고 상기 MIDV-A 벡터(BglII/SbfI)와 라이게이션하여 MIDV 벡터(서열번호 6)를 최종 구축하였다 (도 3).

[0107] 제작된 MIDV 벡터는 약 4.0kb로 다른 유전자 삽입 및 제거를 위한 벡터에 비해 사이즈가 작아 컨주게이션을 이 용한 도입 효율이 높고, 지놈 상동성 유전자 염기서열 삽입을 위한 다양한 제한효소 사이트를 포함하고 있어 제 한효소 부재로 인한 문제점을 줄일 수 있다.

[0109] 3. 항생제 저항성 유전자 제거를 위한 벡터(MtEV-cre) 제조.

[0110] 본 실시예에서는 메틸로박테리움 속 균주의 지놈 특이적 유전자 삽입 및 제거 후 항생제 저항성 유전자를 제거를 위한 벡터(MtEV-cre)를 제작하는 것이다. 본 벡터의 제작은 상기 MEV 벡터를 주형으로 하여 제작되었다. 본 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머는 표 3에 나타내었다 (도 4).

표 3

[0112]

서열번호	프라이머	염기서열
31	Tet-F	CGCCTGCAGGCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAG
32	Tet-R	GCAGATCTGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACC
33	cre-F	GCGAATTCATGTCCAATTTACTGACCGTACACC
34	cre-R	CCACTAGTTTAATCGCCATCTTCCAGCAGG

[0114] 먼저 MEV 벡터의 카나마이신 저항성 유전자(서열번호 29)를 테트라사이클린(tetracycline) 저항성 유전자(서열번호 9)로 교체하였다. Methylobacterium 지놈에 유전자 삽입과 제거를 선별하기 위한 마커로 카나마이신 저항성 유전자를 사용하기 때문에 본 벡터 제작에는 동일한 항생제 저항성 유전자를 사용할 수 없으므로 테트라사이클린 저항성 유전자를 삽입하였다.

[0115] 먼저 MEV 벡터를 제한효소 SbfI과 BglII를 처리하여 기존의 카나마이신 저항성 유전자를 제거하였다. 새롭게 도입될 테트라사이클린 저항성 유전자는 pACYC184 벡터(서열번호 30)를 주형으로 프라이머 Tet-F (서열번호 31)와 프라이머 Tet-R (서열번호 32)을 이용하여 테트라사이클린 저항성 유전자를 증폭하고 제한효소 SbfI과 BglII를 처리하여 카나마이신 저항성 유전자가 제거된 MEV 벡터와 라이게이션 하였다. 이렇게 제작된 벡터를 MtEV (methylobacterium tetracycline expression vector) (서열번호 35)로 명명하였다.

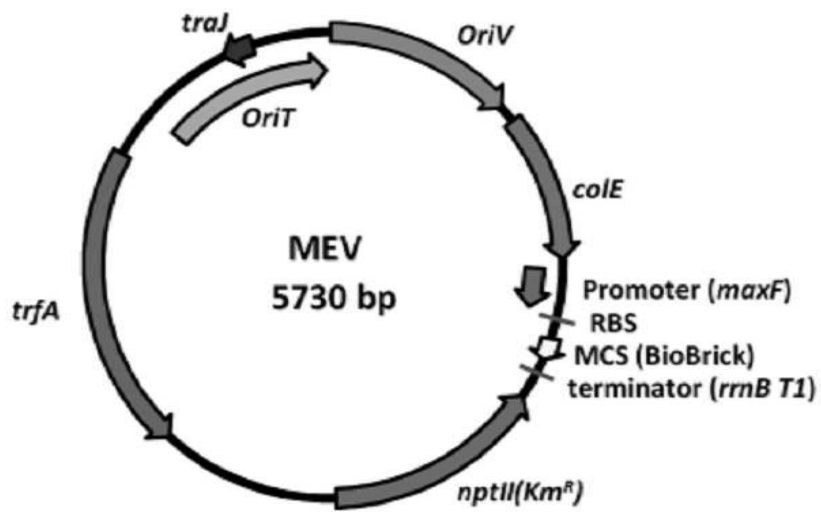
[0116] 제작된 MtEV 벡터에 상기 실시예 2에서 언급한 loxP(71/66) 사이트를 인식하여 반응하는 Cre recombinase를 코딩하는 cre 유전자(서열번호 36)를 클로닝하였다. MtEV 벡터를 제한효소 사이트인 EcoRI과 SpeI을 처리하고, pQE-cre 플라스미드를 주형으로 프라이머 cre-F (서열번호 33)와 cre-R (서열번호 34)을 이용하여 cre 유전자를 증폭하고 제한효소 EcoRI과 SpeI을 처리하여 MtEV (EcoRI/SpeI)과 라이게이션 하였다. 이렇게 제작된 플라스미드를 MtEV-cre로 명명하였다 (도 4).

[0117] MtEV-cre 플라스미드는 MEV 벡터와 마찬가지로 불필요한 염기서열이 제거되었기 때문에 벡터의 사이즈(약 6.7kb)가 작아서 Methylobacterium으로 도입 효율을 향상시킬 수 있다. 또한 강력한 maxF 프로모터로 인하여 다량의 Cre recombinase가 발현되어 항생제 저항성 유전자 제거 효율을 높일 수 있다.

[0118] 상기 벡터 제작과정에서 사용된 유전자 조작 기술은 Sambrook and Russell (2001)에 명시된 통상적인 방법을 따랐다.

도면

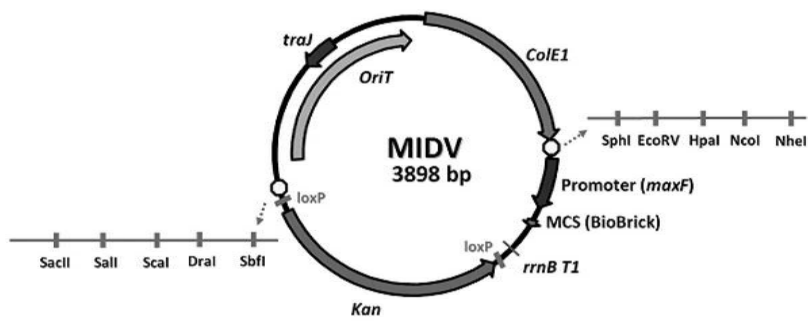
도면1



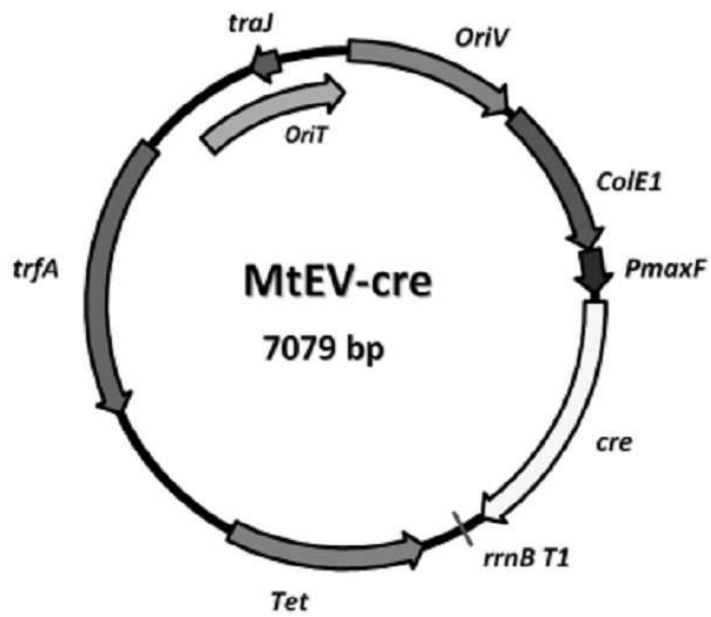
도면2



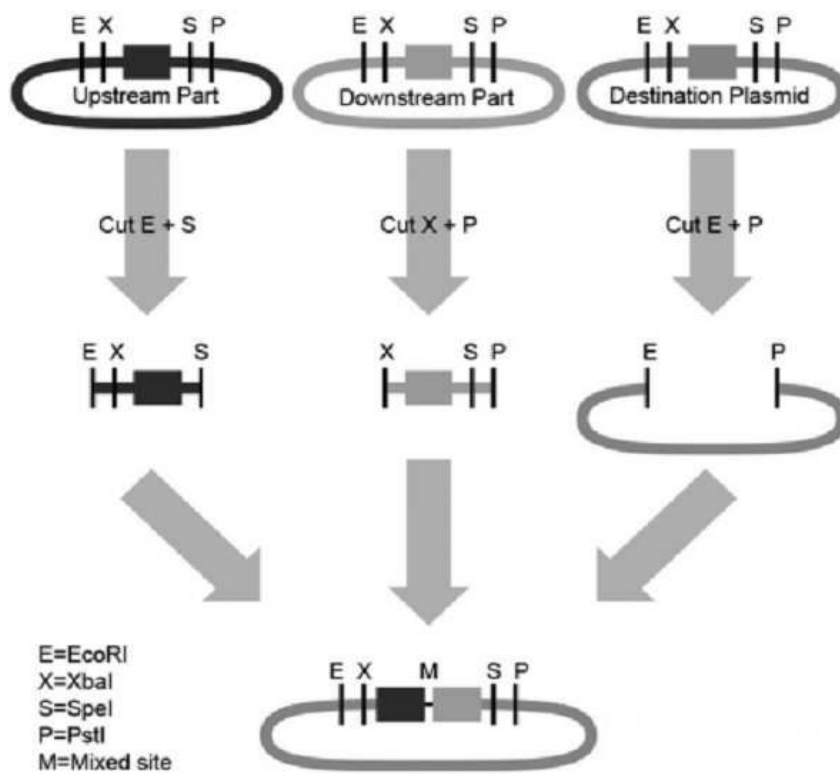
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY OFFICE OF ACADEMY AND INDUSTRY COLLABORATION
- <120> EXPRESSION VECTOR AND KNOCK IN OR KNOCK OUT VECTOR
- <130> 16P01043
- <160> 37

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 5730

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylobacterium expression vector

<400> 1

gaccctttcc gacgtcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggtggcg gccgtctatg	60
gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc	120
gttgtggata cctcgcgga aacttggccc tcaactgacag atgagggggcg gacgttgaca	180
cttgaggggc cgactcacc ggcgcggtg tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc	240
cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt	300
tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg	360
gcgcgactac tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca	420
gatgaggggc gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt	480
gcaagggttt ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac	540
caatatattt aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc	600
cgaagggggg tgccccctt tctcgaacc tcccggccc ctaacgcggg cctcccatcc	660
ccccaggggc tgcgccttc ggccgcgaac ggccctaccc caaaaatggc agccaagctg	720
accacttctg cgctcgccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg	780
tgagcgtggg tctcgcggtt tcattgcagc accagtactg accccgtaga aaagatcaaa	840
ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca	900
ccgctaccag cggtaggttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta	960
actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc	1020
caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca	1080
gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta	1140
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgagg	1200
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaa cgccacgctt	1260
cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaa aggagagcgc	1320
acgaggggag ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac	1380
ctctgacttg agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac	1440

gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc	1500
tttctgcgt tatccccga ttctgtggat aaccgtagca tgcgttgacg acaacggtgc	1560
gatgggtccc ggccccggtc aagacgatgc caatacgttg cgacactacg ccttggcact	1620
tttagaattg ccttatcgtc ctgataagaa atgtccgacc agctaaagac atcgcgcca	1680
atcaaagcct agaaaatata ggcgaaggga cgctaattggg cccttcacac agaggagaga	1740
cagcgaattc tggtaacctc tagactatcg actagtgggt acctctgcag aagcttcagg	1800
agctcttaag ccagccccgc tgcctccggc atccgcttac agataaaacg aaaggctcag	1860
tcgaaagact gggccttttcg ttttatacaa gccctccagg ggagatgcgt ggatccttag	1920
atctaggcct gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga	1980
gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct	2040
gcgttgtcgg gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagttcg atttattcaa	2100
caaagccgcc gtcccgtaaa gtcagcgtaa tgccttgcca gtgttacaac caattaacca	2160
attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atacaggat	2220
tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc	2280
agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa	2340
tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcacatgag	2400
tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa	2460
caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaacg ttattcattc	2520
gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaaacag	2580
gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt tcacctgaat	2640
caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttccggg gatcgcagtg gtgagtaacc	2700
atgcatcatc aggagtacgg ataaaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca	2760
gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgcatgtt	2820
tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgic gcacctgatt	2880
gcccgcatt atcgcgagcc catttatacc catataaate agcatccatg ttggaattta	2940
atcgcgccct cgagcaagac gtttcccggt gaatatggct cataacaccc cttgtattac	3000
tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt	3060
aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttccccccc cccctgcag gtccgacacg	3120
gggatggatg gcgttcccga tcatggtcct gcttgcttcg ggtggcatcg gaatgccggc	3180
gctgcaagca atgttgtcca ggcaggtgga tgaggaacgt caggggcagc tgcaaggctc	3240
actggcggcg ctaccagcc tgacctgat cgtcggaccc ctctcttca cggcgatcta	3300

tcgggtctct ataacaacgt ggaacgggtg ggcatggatt gcaggcgctg ccctctactt	3360
gctctgcctg ccggcgctgc gtgcgggct ttggagcggc gcagggaac gagccgatcg	3420
ctgatcgtgg aaacgatagg cctatgccat gcgggtcaag gcgacttccg gcaagctata	3480
cgcgccctag aattgtcaat tttaatcctc tgtttatcgg cagtctgtag agcgcgccgt	3540
gcgtcccgag cgatactgag cgaagcaagt gcgtcgagca gtgcccgtt gtctctgaaa	3600
tgccagtaaa gcgttggtg ctgaaccccc agccggaact gacccacaa ggccctagcg	3660
tttgcaatgc accaggtcat cattgacca ggctgttcc accaggccgc tgcctcgcaa	3720
ctcttcgag gcttcgccg cctgtcgcg ccacttctc acgcggttg aatccgatec	3780
gcacatgagg cggaagggtt ccagcttgag cgggtacggc tcccgggtgc agctgaaata	3840
gtcgaacatc cgtcgggccc tcggcgacag ctgcggtac ttctccata tgaatttcgt	3900
gtagtggtcg ccagcaaaca gcacgacgat ttctcgtcg atcaggacct ggcaacggga	3960
cgttttcttg ccacggtcca ggacgcggaa gcggtgcagc agcgacaccg attccaggtg	4020
cccaacgcgg tcggacgtga agcccatcgc cgtcgctgt aggcgcgaca ggcattcctc	4080
ggccttcgtg taataccggc cattgatcga ccagcccagg tcttgcaaa gctcgtagaa	4140
cgtgaagggt atcggtcgc cgataggggt gcgcttcgcg tactccaaca cctgtgccca	4200
caccagttcg tcatcgtcgg cccgcagctc gacgccggtg taggtgatct tcacgtcctt	4260
gttgacgtgg aaaaatgacct tgttttgag cgcctcgcgc gggattttct tgttcgcgt	4320
ggtgaacagg gcagagcggg ccgtgtcgtt tggcatcgt cgcatcgtgt ccggccacgg	4380
cgcaatatcg aacaaggaag gctgcatttc cttgatctgc tgcctcgtgt gtctcagcaa	4440
cgcgccctgc ttggcctcgc tgacctgttt tgccaggtcc tcgccggcgg tttttcgctt	4500
cttggtcgtc atagtctctc gcgtgtcgt ggtcatcgac ttgccaaac ctgccgctc	4560
ctgttcgaga cgacgcgaac gctccacggc ggccgatggc gcgggcaggg cagggggagc	4620
cagttgcacg ctgtcgcgt cgatcttggc cgtagcttgc tggaccatcg agccgacgga	4680
ctggaagggt tcgcggggcg cacgcatgac ggtgcggtt gcgatggtt cggcatcctc	4740
ggcggaaaac cccgcgtcga tcagttcttg cctgtatgcc ttccggtcaa acgtccgatt	4800
cattcacctt ccttcgggga ttgccccgac tcacgccggg gcaatgtgcc cttattcctg	4860
atttgaccgg cctgggtgct tgggtgccag ataatecacc ttatcgga tgaagtcggt	4920
cccgtagacc gtctggcgt ctttctcgt cttggtattc cgaatcttgc cctgcacgaa	4980
taccagctcc gcgaagtcgc tcttcttgat ggagcgcgtg gggacgtgct tggcaatcac	5040
gcgcaccccc cggccgtttt agcggctaaa aaagtcatgg ctctgccctc gggcggacca	5100
cgcccatcat gaccttgcca agctcgtcct gcttctcttc gatcttcgcc agcagggcga	5160

ggatcgtggc atcaccgaac cgcgccgtgc gcgggtcgtc ggtgagccag agtttcagca 5220

ggccgcccag gcggcccagg tcgccattga tgcgggccag ctgcgggacg tgctcatagt 5280

ccacgacgcc cgtgattttg tagccctggc cgacggccag caggtaggcc tacaggctca 5340

tgccggccgc cgcgcctttt tctcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg cagtacacct 5400

tgataggtgg gctgcccttc ctggttggct tggtttcac agccatccgc ttgccctcat 5460

ctgttacgcc ggcggtagcc ggccagcctc gcagagcagg attcccgttg agcaccgcca 5520

ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaac acccgctcgc ggggtgggcct acttcaccta 5580

tcctgcccgg ctgacgccgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc ctttgcaaaa 5640

atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaaa aatcgctata atgaccccga 5700

agcagggtta tgcagcgga aagatccgtc 5730

<210> 2

<211> 7607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCM66 vector

<400> 2

gaccctttcc gacgtcacc gggctggttg cctcgcgcgc tgggtggcg gccgtctatg 60

gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc 120

gttgtggata cctcgcggaa aacttggccc tactgacag atgaggggcg gacgttgaca 180

cttgaggggc cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc 240

cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcttgattt tacgcgagtt 300

tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgaggg 360

gcgcgactac tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca 420

gatgaggggc gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt 480

gcaagggttt ccgccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gettttaaac 540

caatatattat aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcct gtgcgcgtga ccgcgcacgc 600

cgaagggggg tgccccctt tctcgaacc tcccgccccg ctaacgcggg cctcccatcc 660

ccccaggggc tgcgcccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agccaagctg 720

accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg 780

tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc actggggcca gatgtaagc cctcccgtat 840

cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc 900

tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat	960
acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga agatcctttt	1020
tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc	1080
cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt	1140
gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac	1200
tccttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt	1260
glagccgtag ttaggccacc acttcaagaa cctctgtagca ccgcctacat acctcgctct	1320
gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga	1380
ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac	1440
acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg	1500
agaaagcgcc acgtttcccg aaggagaaaa ggccggacagg tatccggtaa gcggcagggt	1560
cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc	1620
tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg	1680
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc	1740
ttttgctcac atgttcttct ctgcgttatc ccttgattct gtggataacc gtattaccgc	1800
ctttgagtga gctgataccg ctgccgcag ccgaacgacc gagcgacgag agtcagttag	1860
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca	1920
ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccg ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat	1980
taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg	2040
tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaacagct atgacatga	2100
ttacgccaag ctgcatgcc tgcaggtcga ctctagagga tccccgggta ccgagctcga	2160
attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccttggcgtt acccaactta	2220
atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg	2280
atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc	2340
tccttacgca tcgtgctggg atttcacacc gcataatggg cactctcagt acaatctgct	2400
ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac	2460
gggcttgtct gctccccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca	2520
tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctctgtatac	2580
gcctatTTTT ataggTTaat gtcatgataa taatggtttc ttagcacctt ttctcggtcc	2640
ttcaacgttc ctgacaacga gcctcttttt cgccaatcca tcgacaatca ccgcgagtec	2700

ctgctcgaac gctgcgtccg gaccggcttc gtcgaaggcg tctatcgagg cccgcaacag	2760
cggcgagagc ggagcctgtt caacgggtgcc gccgcgctcg ccggcatcgc tgtcgccggc	2820
ctgctcctca agcacggccc caacagtga gtagctgatt gtcacagcg cattgacggc	2880
gtccccggcc gaaaaacccg cctcgagag gaagcgaagc tgcgcgtcgg ccgtttccat	2940
ctgcggtgcg cccggtcgag tgccggcatg gatgcgcgag ccatcgcggt aggcgagcag	3000
cgcctgcctg aagctgcggg cattccccgat cagaaatgag cgccagtcgt cgtcggtctt	3060
cggcaccgaa tgcgtatgat tctcgccag catggcttcg gccagtcgt cgagcagcgc	3120
ccgtttgttc ctgaagtgcc agtaaagcgc cggctgctga accccaacc gttcgccag	3180
tttgcgtgct gtcagaccgt ctacccgac ctggttcaac aggtccaggc cggcacggat	3240
cactgtattc ggctgcaact ttgtcatgat tgacacttta tcactgataa acataatatg	3300
tccaccaact tatcagtgat aaagaatccg cgcgttcaat cggaccagcg gaggtggtc	3360
cggaggccag acgtgaaacc caacataccc ctgatcgtaa ttctgagcac tgtcgcgctc	3420
gacgtgtcgc gcatcgccct gattatgccg gtgctgccgg gcctcctgag cgatctggtt	3480
cactgaacg acgtcacgc ccaatatggc attctgtgg cgctgtatgc gttggtgcaa	3540
tttgcctgag cactgtgct gggcgcgctg tcggatcgtt tcgggcggcg gccaatcttg	3600
ctgctcgcg tggccggcgc cactgtcgac tacgccatca tggcgacagc gcctttcctt	3660
tgggttctct atatcgggcg gatcgtggcc ggcatcacgc gggcgactgg ggccgtagcc	3720
ggcgcttata ttgccatga cctgcagggg ggggggggag ctgaggtctg cctcgtgaag	3780
aaggtgttgc tgactcacc caggcctgaa tcgccccatc atccagccag aaagtgaggg	3840
agccacggtt gatgagagct ttgtttagg tggaccagtt ggtgattttg aacttttgct	3900
ttgccacgga acggtctgag ttgtcgggaa gatgcgtgat ctgaccttc aactcagcaa	3960
aagttcgatt tattcaaca agccgccgtc ccgtcaagtc agcgtaatgc tctgccagt	4020
ttacaacaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg agcatcaaat gaaactgcaa	4080
tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaa agccgtttct gtaatgaagg	4140
agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggatcgggt ctgcgattcc	4200
gactcgtcca acatcaatc aacctattaa ttccctcgc tcaaaaataa ggttatcaag	4260
tgagaaatca ccatgagatg cgactgaatc cggtgagaat ggcaaaagct tatgcatttc	4320
ttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac	4380
caaaccgtta ttattcgtg attgcgcctg agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa	4440

aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacactgcc a gcgcatcaac	4500
aataattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tcccggggat	4560
cgcagtgggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga tggtcggaag	4620
aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac	4680
gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacgc ggcttcccat acaatcgata	4740
gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc	4800
atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt tcccgttgaa tatggctcat	4860
aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcacg atgatatatt	4920
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca acgtggcttt ccccccccc	4980
cctgcaggtc cgacacgggg atggatggcg ttcccgatca tggctcctgct tgcttcgggt	5040
ggcatcgga tgcggcgct gcaagcaatg ttgtccaggc aggtggatga ggaacgtcag	5100
gggcagctgc aaggctcact ggccggcgtc accagcctga cctcgatcgt cggaccctc	5160
ctcttcacgg cgatctatgc ggcttctata acaacgtgga acgggtgggc atggattgca	5220
ggcgtgccc tctacttgct ctgcctgccg gcgctgcgtc gcgggctttg gagcggcgca	5280
gggcaacgag ccgatcgctg atcgtggaaa cgataggcct atgccatgcg ggtcaaggcg	5340
acttccggca agctatacgc gccctagaat tgtcaatfff aatcctctgt ttatcggcag	5400
ttcgtagagc gcgccgtgcg tcccagcgca tactgagcga agcaagtgcg tcgagcagtg	5460
cccgtttgtt cctgaaatgc cagtaaagcg ctggctgctg aacccccagc cggaaactgac	5520
cccacaaggc cctagcgttt gcaatgcacc aggtcatcat tgaccagcgc gtgttcacc	5580
aggccgctgc ctgcgaactc ttgcgaggtc tcgccgacct gctcgcgcca ctcttcacg	5640
cgggtggaat ccgatccgca catgaggcgg aaggtttcca gcttgagcgg gtacggctcc	5700
cggtgcgagc tgaatatgct gaacatccgt cgggccgtcg gcgacagctt gcggtacttc	5760
tcccatatga atttcgtgta gtggtcgcca gcaaacagca cgacgatttc ctgctcgatc	5820
aggacctggc aacgggacgt tttcttgcca cgttccagga cgcggaagcg gtgcagcagc	5880
gacaccgatt ccagggtccc aacgcggctg gacgtgaagc ccatcgccgt cgcctgtagg	5940
cgcgacaggc attcctcggc ctctgtgtaa taccggccat tgatcgacca gccaggtcc	6000
tggcaaaagt cgtagaacct gaaggtgatc ggctcgcga taggggtgcg ctctcgctac	6060
tccaacacct gctgccacac cagttcgtca tcgtcgcccc gcagctcgac gccggtgtag	6120
gigatcttca cgtccttgtt gacgtggaaa atgaccttgt tttgcagcgc ctgcgcggg	6180
atcttcttgt tgcgcgttgt gaacagggca gagcgggccc gtctgtttgg catcgtcgc	6240
atcgtgtccg gccacggcgc aatatcgaa aaggaaagct gcatttcctt gatctgctgc	6300

ttcgtgtgtt tcagcaacgc ggccgtgcttgc gctcgcgtga cctgttttgc caggtcctcg 6360
 ccggcgggtt ttcgcttctt ggctcgtcata gttcctcgcg tgtcgatggt catcgacttc 6420
 gccaaacctg ccgcctcctg ttcgagacga cgcgaacgct ccacggcgcg cgatggcgcg 6480
 ggcagggcag ggggagccag ttgcacgctg tcgcgctcga tcttggccgt agcttgcctg 6540

 accatcgagc cgacggactg gaaggtttcg cggggcgcac gcatgacggt gcggcttgcg 6600
 atggtttcgg catcctcggc ggaaaacccc gcgtcgatca gttcttgcct gtatgccttc 6660
 cgggtcaaacg tccgattcat tcacctcct tgcgggattg ccccgactca cgccggggca 6720
 atgtgccctt attcctgatt tgaccgcct ggtgccttgg tgtccagata atccacctta 6780
 tcggcaatga agtcggcccc gtagaccgtc tggccgtcct tctcgtactt ggtattccga 6840
 atcttgccct gcacgaatac cagctccgcg aagtcgtctt tcttgatgga gcgcattgggg 6900
 acgtgcttgg caatcacgcg cccccccgg ccgttttagc ggctaaaaaa gtcattggctc 6960

 tgcctcggg cggaaccgc ccatcatgac ctgccaagc tcgtcctgct tctcttcgat 7020
 cttcgccagc agggcgagga tcgtggcatc accgaaccgc gccgtgcgcg ggtcgtcgg 7080
 gagccagagt ttcagcaggc cgcccaggcg gccaggtcg ccattgatgc gggccagctc 7140
 gcggacgtgc tcatagtcca cgacgccccg gatctttag cctggccga cgccagcag 7200
 gtaggcctac aggtcctatgc cggccgccg cgccttttcc tcaatcgctc ttcgttcgtc 7260
 tggaaggcag tacacctga taggtgggct gcccttcctg gttggcttgg ttcatcagc 7320
 catccgcttg cctcatctg ttacgccggc gtagccggc cagcctcgca gacaggatt 7380

 ccggttgagc accgccagg gcaataagg gacagtgaag aaggaacacc cgctcgcggg 7440
 tgggcctact tcacctatcc tgcccggctg acgccgttgg atacaccaag gaaagtctac 7500
 acgaacctt tggcaaaatc ctgtatatcg tgcgaaaaag gatggatata ccgaaaaat 7560
 cgctataatg accccgaagc aggttatgc agcgaaaaag atccgtc 7607

 <210> 3
 <211> 377
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> multiple cloning site of Methylobacterium expression vector
 <400> 3
 cgttgacgac aacgggtgca tgggtcccgg ccccggtcaa gacgatgcca atacgttgcg 60

 acactacgcc ttggcacttt tagaattgcc ttatcgtcct gataagaaat gtccgaccag 120
 ctaaagacat cgcgtccaat caaagcctag aaaatatagg cgaagggacg ctaatgggcc 180

cttcacacag aggagagaca gcgaaattctg gtaccttcta gactatcgac tagttggtac 240
ctctgcagaa gcttcggag ctcttaagcc agccccctg ctcccggcat ccgcttacag 300
ataaacgaa aggcctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt ttatacaagc cctccagggg 360
agatgcgtgg atcctta 377

<210> 4
<211> 180
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> maxF promoter

<400> 4
cgttgacgac aacgggtgcga tgggtcccgg ccccggtcaa gacgatgcca atacgttgcg 60
acactacgcc ttggcacttt tagaattgcc ttatcgtcct gataagaaat gtccgaccag 120
ctaaagacat cgcgccaat caaagcctag aaaatatagg cgaagggacg ctaatgggcc 180
180

<210> 5
<211> 818
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OriV replication origin

<400> 5
tcgacccttt ccgacgtca cgggctggt tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta 60
tggccctgca aacgcgccag aaacccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gggccgccg 120
gcgttggtga tacctcgcgg aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga 180
cacttgaggg gccgactcac ccggcgcggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg 240
gccggcgacg tggagctggc cagcctcgca aatcggcgaa aacgcctgat ttacgcgag 300
tttcccacag atgatgtgga caagcctggg gataagtgcc ctgcggtatt gacacttgag 360
ggcgcgact actgacagat gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtctga 420

cagatgaggg gcgcacctat tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat 480
ttgaagggt ttccgccgt ttttcggcca ccgtaacct gtcctttaac ctgcttttaa 540
accaatattt ataaaccttg tttttaacca gggtgcgcc ctgtgcgct gaccgcgcac 600
gccgaagggg ggtgcccc cttctcgaac cctcccgcc cgctaacgcg ggcctcccat 660
ccccccagg gctgcgcccc tcggccgcga acggcctcac ccaaaaatg gcagccaagc 720

tgaccacttc tgcgctcggc ctttcgggt ggctgggtta ttgctgataa atctggagcc 780
ggtagcgtg ggtctcggc tatcattgca gcaccagt 818

<210> 6

<211> 3898

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylobacterium insertion deletion vector

<400> 6

gaactgaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccitttttt ctgcgcgtaa 60
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccgatcaag 120
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgagata ccaatactg 180
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca cgcctacat 240
acctcgtct gtaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 300

ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 360
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 420
gtgagctatg agaaagcgcc acgttcccg aaggagaaaa ggcgacagg tatccggtaa 480
gcggcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttc agggggaac gcctggtatc 540
tttatagtc tgcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 600
cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgggc ctttttacgg ttcttgccct 660
tttgctggcc tttgctcac atgttctttc ctgcgttacc cctgattct gtggataacc 720

gtagcatgct gatatcagtt aactccatgg agctagctgc ggccgcggtt gacgacaacg 780
gtcgatggg tccggcccc ggtcaagacg atccaatac gttgcgacac tacgccttgg 840
cacttttaga attgccctat cgtcctgata agaaatgtcc gaccagctaa agacatcgcg 900
tccaatcaaa gcctagaaaa tataggcgaa gggacgctaa tgggcccttc acacagagga 960
gagacagcga attctggtac cttctagact atcgactagt tggctacctt gcagaagctt 1020
ccggagctct taagccagcc ccgtgctcc cggcatccgc ttacagataa aacgaaagcg 1080
tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat acaagccctc caggggagat gcgttaccgt 1140

tcgtatagg taggctatac gaagtatgg atccttagat ctaggcctga atcgcccat 1200
catccagcca gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttag gtggaccagt 1260
tggtgatatt gaacttttgc ttgccacgg aacggtctgc gttgtcgga agatgcgtga 1320
tctgatcctt caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgctt cccgtcaagt 1380

cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc	1440
gagcatcaaa tgaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa	1500
aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc	1560
ctggtatcgg tcigcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccctc	1620
gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa	1680
tggcaaaagc ttatgcattt ctttcagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc	1740
atcaaaatca ctgcacatcaa ccaaacggtt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg	1800
aaatacgca tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgag	1860
gaacactgcc agcgcatcaa caatatcttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg	1920
gaatgctgtt ttcccgggga tcgcagtgtt gagtaacat gcatcatcag gactacggat	1980
aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc	2040
atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc	2100
gggcttccca tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca	2160
tttatacca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt	2220
ttcccgttga atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt	2280
tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttagacac	2340
aacgtggctt tcataacttc gtatagggtt ggctatacga acggtaccgc ggagtcgaca	2400
agtactatctt aaatcctgca ggtccgacac ggggatggat ggcgttcccg atcatgttcc	2460
tgcttgcttc ggggtggcatc ggaatgccgg cgtcgcaagc aatgttgtcc aggcaggtgg	2520
atgaggaacg tcagggcgag ctgcaaggct cactggcggc gctcaccagc ctgacctcga	2580
tcgtcggacc cctcctcttc acggcgatct atgcggcttc tataacaacg tggaacgggt	2640
gggcatggat tgcaggcgct gccctctact tgcctctcct gccggcgctg cgtcgcgggc	2700
tttgagcgg cgcagggcaa cgagccgacg gctgatcgtg gaaacgatag gcctatgcca	2760
tgccgggtcaa ggcgacttcc ggcaagctat acgcgcccta gaattgtcaa ttttaactct	2820
ctgtttatcg gcagttcgta gagcgcgccg tgcgtccga gcgatactga gcgaagcaag	2880
tgcgtcgagc agtgcccgtt tgttctgaa atgccagtaa agcgttggt gctgaacccc	2940
cagccggaac tgacccaca aggccatat gtacccctcc ttgcgggatt gccccgactc	3000
acgccggggc aatgtgcctt tattcctgat ttgaccgcc tgggtccttg gtgtccagat	3060
aatccacctt atcggaatg aagtcggtcc cgtagaccgt ctggccgtcc ttctcgtact	3120
tggtatccg aatcttgccc tgcacgaata ccagctccgc gaagtcgctc ttcttgatgg	3180

agcgcatggg gacgtgcttg gcaatcacgc gcaccccccg gccgttttag cggctaaaaa 3240

agtcattggct ctgccctcgg gcggaccacg cccatcatga ccttgccaag ctctctctgc 3300

ttctcttcga tcttcgccag cagggcgagg atcgtggcat caccgaaccg cgccgtgcgc 3360

gggtcgtcgg tgagccagag ttccagcagg cggcccaggc ggcccaggtc gccattgatg 3420

cgggccagct cgcggacgtg ctcatagtcc acgacgcccg tgattttgta gccctggccg 3480

acggccagca ggtaggccta caggetcatg ccggccgccc cgccttttc ctcaatcgt 3540

cttcgttcgt ctggaaggca gtacaccttg ataggtgggc tgccttcct ggttggcttg 3600

gtttcatcag ccatacgtt gccctcatct gttacgccg cggtagccg ccagcctcgc 3660

agagcaggat tcccgttag caccgccagg tgcgaataag ggacagtga gaaggaacac 3720

ccgtcgcgg gtgggcctac ttcacctatc ctgccggct gacgccgtt gatacacaa 3780

ggaaagtcta cacgaacctt ttggcaaat cctgtatata gtgcgaaaaa ggatggatat 3840

accgaaaaa tcgtataat gacccgaag cagggttatg cagcgaaaaa gatccgtc 3898

<210> 7

<211> 1659

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence including restriction site upstream of promoter,
promoter, multiple cloning site, terminator, loxP site, and
restriction site downstream of loxP site

<400> 7

ctgatatcag ttaactccat ggagctagct gcggccgagg ttgacgaaa cgggtcgatg 60

ggtcceggcc ccggtcaaga cgatccaat acgttgcgac actacgctt ggcactttta 120

gaattgcctt atcgtcctga taagaaatgt ccgaccagct aaagacatcg cgtccaatca 180

aagcctagaa aatataggcg aaggagcgt aatgggcct tcacacagag gagagacagc 240

gaattctggt accttctaga ctatcgacta gttggtacct ctgcagaagc ttccggagct 300

cttaagccag ccccgctgct cccggcatcc gcttacagat aaaacgaaag gtcagtcga 360

aagactgggc ctttcgtttt atacaagccc tccaggggag atgcgttacc gttcgtatag 420

ggtaggctat acgaagtat ggatccttag atctaggcct gaatcgcccc atcatccagc 480

cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt 540

ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct gcgttgcgg gaagatgct gatctgatec 600

ttcaactcag caaagtctg attattcaa caaagccgcc gtcccgtaa gtcagcgtaa 660

tgctctgcc	gtgttacaac	caattaacca	attctgatta	gaaaaactca	tcgagcatca	720
aatgaaactg	caattttattc	atatcaggat	tatcaatacc	atatttttga	aaaagccgtt	780
tctgtaatga	aggagaaaa	tcaccgaggc	agttccatag	gatggcaaga	tcttggtatc	840
ggtctgcgat	tccgactcgt	ccaacatcaa	tacaacctat	taatttcccc	tcgtcaaaaa	900
taaggttattc	aagtggagaa	tcaccatgag	tgacgactga	atccggtgag	aatggcaaaa	960
gcttatgcat	ttctttccag	acttggttcaa	caggccagcc	attacgctcg	tcatcaaaat	1020
cactcgcattc	aaccaaaccg	ttattcattc	gtgattgcgc	ctgagcgaga	cgaaatacgc	1080
gatcgctgtt	aaaaggacaa	ttacaacag	gaatcgaatg	caaccggcgc	aggaacactg	1140
ccagcgcattc	aacaatat	ttcacctgaat	caggatattc	ttctaatacc	tgggaatgctg	1200
ttttccggg	gatcgcagt	gtgagtaacc	atgcatcattc	aggagtacgg	ataaaatgct	1260
tgatggtcgg	aagaggcata	aattccgtca	gccagtttag	tctgaccattc	tcatctgtaa	1320
catcattggc	aacgctacct	ttgccatgtt	tcagaaacaa	ctctggcgca	tcgggcttcc	1380
catacaatcg	atagattgtc	gcacctgatt	gcccgcacatt	atcgcgagcc	catttatacc	1440
catataaate	agcatccattg	ttggaattta	atcgcggcct	cgagcaagac	gtttcccggtt	1500
gaatatggct	cataacaccc	cttgtattac	tgtttatgta	agcagacagt	tttattgttc	1560
atgatgatat	atttttatct	tgtgcaatgt	aacatcagag	attttgagac	acaacgtggc	1620
tttcataact	tcgtataggg	taggctatac	gaacgggtac			1659
<210>	8					
<211>	7079					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	MtEV-cre vector					
<400>	8					
gaccctttcc	gacgtccacc	gggctgggtg	ccctcgccgc	tgggctggcg	gccgtctatg	60
gccctgcaaa	cgcgccagaa	acgccgtcga	agccgtgtgc	gagacaccgc	ggccgccggc	120
gttgtggata	ctcgcggaa	aacttggccc	tactgacag	atgagggg	gacgttgaca	180
cttgaggggc	cgactcacc	ggcgccggt	tgacagatga	ggggcaggct	cgatttcggc	240
cggcgacgtg	gagctggcca	gcctcgcaaa	tcggcgaaaa	cgcctgattt	tacgcgagtt	300
tcccacagat	gatgtggaca	agcctgggga	taagtgcct	gcggtattga	cacttgaggg	360
gcgcgactac	tgacagatga	ggggcgcgat	ccttgacact	tgaggggcag	agtgtgaca	420
gatgaggggc	gcacctattg	acatttgagg	ggctgtccac	aggcagaaaa	tccagcattt	480

gcaagggttt ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac	540
caatatattat aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc	600
cgaagggggg tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc	660
ccccaggggc tgccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agccaagctg	720
accatttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg	780
tgagcgtggg tctcgcggtg tcattgcagc accagtactg accccgtaga aaagatcaaa	840
ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca	900
ccgtaccag cggtaggttg ttgcccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta	960
actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc	1020
caccatttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca	1080
gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta	1140
ccggataagg cgagcggctc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag	1200
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt	1260
cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc	1320
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac	1380
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac	1440
gccagcaacg cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc	1500
tttctgctg tatcccciga ttctgtggat aaccgtagca tgcgttgacg acaacggtgc	1560
gatgggtccc ggccccggtc aagacgatgc caatacgttg cgacactacg ccttggcact	1620
tttagaattg cctatcgtc ctgataagaa atgtccgacc agctaaagac atcgctcca	1680
atcaaagcct agaaaatata ggcaaggga cgctaattgg cccttcacac agaggagaga	1740
cagcgaattc atgtccaatt tactgaccgt acacaaaaat ttgcctgcat taccggtcga	1800
tgcaacgagt gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcagggatc gccaggcgtt	1860
ttctgagcat acctggaaaa tgcttctgtc cgtttgccgg tcgtgggcgg catggtgcaa	1920
gttgaataac cggaatgggt ttcccgcaag acctgaagat gttcgcgatt atctttata	1980
tcttcaggcg cgcggtctgg cagtaaaaac tatccagcaa catttgggcc agctaaacat	2040
gcttcacgt cggtccgggc tgccacgacc aagtgcagc aatgctgttt cactggttat	2100
gcggcggatc cgaagaagaa acgttgatgc cgttgaacgt gcaaaacagg ctctagcgtt	2160
cgaacgact gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga	2220
tatacgaat ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctgttacgta tagccgaaat	2280

tgccaggatc agggttaaag atatctcacg tactgacggt gggagaatgt taatccatat	2340
tggcagaacg aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt	2400
aactaaactg gtcgagcgat ggatttccgt ctctgggtga gctgatgac cgaataacta	2460
cctgttttgc cgggtcagaa aaaatgggtg tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc	2520
aactcgcgcc ctggaaggga tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga	2580
tgactctggt cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccgtgtcg gagccgcgcg	2640
agatatggcc cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctgggt gctggaccaa	2700
tgtaaatatt gtcatgaact atatccgtac cctggatagt gaaacagggg caatggtgcg	2760
cctgctggaa gatggcgatt aaactagtig gtacctctgc agaagcttcc ggagctctta	2820
agccagcccc gctgctcccg gcatccgctt acagataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga	2880
ctgggccttt cgtttttatc aagccctcca ggggagatgc gtggatcctt agatctcatc	2940
gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt	3000
atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg tcaccctgga tgctgtaggc	3060
ataggttgg tttatgccgt actgcccggc ctcttgcggg atatcgtcca ttccgacagc	3120
atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt tctatgcgca	3180
cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtctgtct cgcttcgcta	3240
cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg gatcctctac	3300
gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgctgg cgcctatata	3360
gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag cgcttgtttc	3420
ggcgtgggta tgggtggcagg ccccgctggc gggggactgt tgggcgccat ctcttgcata	3480
gcaccattcc ttgcggcggc ggtgtctaac ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta	3540
atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc	3600
agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac tgtcttcttt	3660
atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg cgaggaccgc	3720
tttcgctgga gcgcgacgat gatcgccctg tcgcttgcgg tattcggaat ctgacacgc	3780
ctcgtcaag ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt tcggcgagaa gcaggccatt	3840
atcgccggca tggcgccgca cgcgtgggc tacgtcttgc tggcgttcgc gacgcgaggc	3900
tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg gcatcgggat gcccgcgttg	3960
caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca aggatcgctc	4020

gcggctctta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga tcgtcacggc gatttatgcc	4080
gcctcgccga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgcct atacctgtc	4140
tgctccccg cgttgcgtcg cgggtcatgg agccgggcca cctcgacctg aatggaagcc	4200
ggcggcacct cgtaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa ttccttcgga	4260
gaactgtgaa tgcgcaaacc aaccttggc agaacatata catcgctcc gccatctcca	4320
gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg cgcctgatcg	4380
tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggccgggttg ccttactggt tagcagaatg	4440
aatcacgat accctgcagg tccgacacgg ggatggatgg cgttcccgat catggtcctg	4500
cttgcctcgg gtggcatcgg aatgccggcg ctgcaagcaa tgtgtccag gcaggaggat	4560
gaggaacgtc aggggcagct gcaaggctca ctggcgccgc tcaccagcct gacctcgatc	4620
gtcggacccc tctctttcac ggcatctat gcggcttcta taacaacgtg gaacgggttg	4680
gcatggattg caggcgctgc cctctacttg cctgcctgc cggcgctgcg tcgcgggctt	4740
tggagcggcg cagggcaacg agccgatcgc tgatcgtgga aacgatagcc ctatgccatg	4800
cgggtcaagg cgacttccgg caagctatac gcgccctaga attgtcaatt ttaatcctct	4860
gtttatcggc agttcgtaga gcgcgccgtg cgtcccagc gatactgagc gaagcaagtg	4920
cgtcgagcag tgcccgttg ttcctgaaat gccagtaaag cgctggctgc tgaacccca	4980
gccggaactg accccacaag gccctagcgt ttgcaatgca ccaggtcac attgaccag	5040
gcgtgttcca ccaggccgt gcctcgcaac tcttcgagg cttcgcgcac ctgctcgcgc	5100
cattcttca cgcgggtgga atccgatccg cacatgaggc ggaaggtttc cagcttgagc	5160
gggtacggct cccgggtgca gctgaaatag tcgaacatcc gtcgggccgt cggcgacagc	5220
ttgcggtact tctcccatat gaatttcgtg tagtggctgc cagcaaacag cagcacgatt	5280
tctcgtcga tcaggacctg gcaacgggac gttttcttgc cacggtccag gacgcggaag	5340
cgggtgcagca gcgacaccga ttccagggtc ccaacgcggc cggacgtgaa gccatcgcc	5400
gtcgcctgta ggcgcgacag gcattcctcg gccttcgtgt aataccggcc attgatcgac	5460
cagcccaggt cctggcaaaag ctctagaac gtgaaggtga tcggctcgcc gataggggtg	5520
cgcttcgctg actccaacac ctgctgccac accagttcgt catcgtcggc ccgcagctcg	5580
acgccggtgt aggtgatctt cagtccttg ttacgtgga aatgacctt gttttgcagc	5640
gcctcgcgcg ggattttctt gttgcgcgtg gtgaacaggg cagagcgggc cgtgtcgttt	5700
ggcatcgctc gcatcgtgtc cggccacggc gcaatatcga acaaggaaag ctgcatttcc	5760
ttgatctgct gcttcgtgtg tttagcaac gcggcctgct tggcctcgtg gacctgtttt	5820
gccaggctct cgccggcggc ttttcgcttc ttggctgtca tagttcctcg cgtgtcgatg	5880

gtcatcgact tcgccaacc tgccgcctcc tgttcgagac gacgcgaacg ctccacggcg	5940
gccgatggcg cgggcagggc agggggagcc agttgcacgc tgtcgcgctc gatcttggcc	6000
gtagcttgct ggaccatcga gccgacggac tggaaggttt cgcggggcgc acgcatgacg	6060
gtcgggcttg cgatggtttc ggcatcctcg gcggaacc cgcgctcgat cagttcttgc	6120
ctgtatgcct tccggtcaaa cgtccgattc attcaccctc cttgcgggat tgccccgact	6180
cacgccgggg caatgtgccc ttattcctga ttgaccgc cttgtgcctt ggtgtccaga	6240
taatccacct tatcggcaat gaagtcggtc ccgtagaccg tctggccgct cttctcgtac	6300
ttggtattcc gaatcttgcc ctgcacgaat accagctcgc cgaagtcgct cttcttgatg	6360
gagcgcatgg ggacgtgctt ggcaatcacg cgcaccccc ggccgtttta gcggctaaaa	6420
aagtcatggc tctgccctcg ggcggaccac gccatcatg acctgcca gctcgtcctg	6480
cttctcttcg atcttcgcca gcagggcgag gatcgtggca tcaccgaacc gcgccgtgcg	6540
cgggtcgtcg gtgagccaga gtttcagcag gccgccagg cggcccaggt cgccattgat	6600
gcggggccagc tcgcgacgt gtcatagtc cagcagccc gtgattttgt agccctggcc	6660
gacggccagc aggtaggcct acaggctcat gccggccgcc gccgcctttt cctcaatcgc	6720
tcttcgttcg tctggaaggc agtacacctt gatagggtgg cttcccttcc tggttggctt	6780
ggtttcatca gccatccgct tgcctcatc tgttacgccc gcggtagccg gccagcctcg	6840
cagagcagga ttcccgttga gcaccgccag gtgcgaataa gggacagtga agaaggaaca	6900
cccgtcgcg ggtgggccta cttacctat cctgcccggc tgacgccgtt ggataacca	6960
aggaaagtct acacgaacct ttggcaaaa tctgtatat cgtgcgaaa aggatggata	7020
taccgaaaa atcgctataa tgaccccgaa gcagggttat gcagcgaaa agatccgtc	7079
<210> 9	
<211> 1527	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sequence including terminator, tetracyclin resistance gene	
downstream of terminator	
<400> 9	
gatctcatcg ataagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag	60
gcaccgtgta tgaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcaccgt caccctggat	120
gctgtaggca taggcttggc tatgccggtc ctgccgggccc tcttgcggga tatcgtccat	180
tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt	240

ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg gccgccgccc agtcctgctc	300
gcttcgctac ttggagccac tategactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg	360
atcctctacg ccggacgcat cgtggccggc atcaccggcg ccacaggtgc ggttgctggc	420
gcctatatcg ccgacatcac cgatggggaa gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc	480
gcttgtttcg gcgtgggtat ggtggcaggc cccgtggccg ggggactgtt gggcgccatc	540
tccttgcatg caccattcct tgcggcggcg gtgctcaacg gcctcaacct actactgggc	600
tgcttcttaa tgcaggagtc gcataaggga gagcgtcgac cgatgccctt gagagccttc	660
aaccagtcga gtcctctccg gtgggcgcgg ggcatgacta tcgtcgccgc acttatgact	720
gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag gtgccggcag cgctctgggt cattttcggc	780
gaggaccgct ttgcctggag cgcgacgatg atcggcctgt cgcttcgggt attcggaatc	840
ttgcacgcc tcgctcaage cttcgtcact ggtcccga ccaaacttt cggcgagaag	900
caggccatta tcgccggcat ggcggccgac gcgctgggct acgtcttgct ggcgttcgcg	960
acgcgaggct ggatggcctt cccattatg attcttctcg cttccggcgg catcgggatg	1020
cccgcgttgc agccatgct gtccaggcag gtatgatgacg accatcaggg acagcttcaa	1080
ggatcgctcg cggtcttac cagcctaact tcgatcactg gaccgctgat cgtcacggcg	1140
atttatgccg cctcggcgag cacatggaac gggttggcat ggattgtagg cgccgccta	1200
tacctgtct gctccccgc gttgcgtcgc ggtgcatgga gccggggccac ctcgacctga	1260
atggaagccg gcggcacctc gctaacgatg tcaccactcc aagaattgga gccaatcaat	1320
tcttgcgagg aactgtgaat gcgcaaacca acccttgga gaacatatcc atcgcgtccg	1380
ccatctccag cagccgcacg cggcgcatct cgggcagcgt tgggtcctgg ccacgggtgc	1440
gcgatgacgt gtcctgtcgt ttgaggaccc ggctagcgtg gcgggggttc cttactggtt	1500
agcagaatga atcacgata ccctgca	1527
<210> 10	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rrnB-T1 terminator	
<400> 10	
ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt ttat	44
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Backbone-F

<400> 11

gggcatgcat agatctaggc ctgaatcgcc ccatc 35

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Backbone-R

<400> 12

gcgcatgcta cggttatcca cagaatcag 29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OriE-F

<400> 13

cgagtactgt gctgcaatga taccgcgag 29

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OriE-R

<400> 14

ccagtactga ccccgtagaa aagatcaaag gatc 34

<210> 15

<211> 556

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ColE promoter

<400> 15

gccggatcaa gagctacaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcat 60

accaaatact gtccttctag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 120

accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgccg gtggcgataa	180
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg	240
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag	300
atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag	360
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa	420
cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt	480
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg	540
gttcttgccc ttttgc	556
<210> 16	
<211> 5353	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MEV-A vector	
<400> 16	
gatctaggcc tgaatcgccc catcatccag ccagaaagtg agggagccac ggttgatgag	60
agctttgttg taggtggacc agttggatgat ttgaaacttt tgctttgccg cggaacggtc	120
tcggttgctg ggaagatgcg tgatctgac cttcaactca gcaaaagttc gatttatcca	180
acaaagccgc cgtcccgtca agtcagcgtc atgctctgcc agtggttaca ccaattaacc	240
aattctgatt agaaaaactc atcgagcatc aaatgaaact gcaattttatt catatcagga	300
ttatcaatac catatttttg aaaaagccgt tttctgtaatg aaggagaaaa ctaccgagg	360
cagttccata ggatggcaag atcctggtat cggctctgca ttccgactcg tccaacatca	420
atacaaccta ttaattttcc ctcgtcaaaa ataaggttat caagtgagaa atcaccatga	480
gtgacgactg aatccgggtg gaatggcaaa agcttatgca tttctttcca gacttggtca	540
acaggccagc cattacgctc gtcacaaaa tcactcgcac caaccaaacc gttattcatt	600
cgtgattgcg cctgagcgag acgaaatacg cgatcgctgt taaaaggaca attacaaaca	660
ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa	720
tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct gttttcccg ggatcgagc ggtgagtaac	780
catgcatcat caggagtagc gataaaatgc ttgatggtcg gaagaggcat aaattccgctc	840
agccagttta gtctgacct ctcactgtga acatcattgg caacgctacc ttgacctgt	900
ttcagaaca actctggcgc atcgggcttc ccatacaatc gatagattgt cgcacctgat	960
tgcccagat tatcgcgagc cattttatac ccatataaat cagcatccat gttggaattt	1020

aatcgcggcc tcgagcaaga cgtttcccg tgaatatggc tcataacacc ccttgiatta	1080
ctgtttatgt aagcagacag ttttattgtt catgatgata tatittttatc ttgtgcaatg	1140
taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg ctttcccccc cccccctgca ggtccgacac	1200
ggggatggat ggcgttcccg atcatgggtcc tgcttgcttc gggtagcatc ggaatgccgg	1260
cgctgcaagc aatgtttgcc aggcaggtgg atgaggaacg tcaggggcag ctgcaaggct	1320
caatggcggc gtcaccagc ctgacctga tcgtcggacc cctcctcttc acggcgatct	1380
atgcgcttc tataacaacg tggaaagggt gggcatggat tgcaggcgct gccctctact	1440
tgctctgctt gccggcgctg cgtcgcgggc ttggagcgg cgcagggcaa cgagccgac	1500
gctgatcgtg gaaacgatag gcctatgcca tgcgggtcaa ggcgacttcc ggcaagctat	1560
acgcgccta gaattgtcaa ttttaacct ctgtttatcg gcagttcgta gagcgcgccg	1620
tgctccga gcgatactga gcgaagcaag tgcgtcagc agtgcccgt tgttctgaa	1680
atgccagtaa agcgttggt gctgaacccc cagccggaac tgacccaca aggcctagc	1740
gtttgcaatg caccaggtca tcattgacc aggcgtgttc caccaggccg ctgcctcgca	1800
actcttcga ggttcgccc acctgctgc gccacttctt cagcgggtg gaatecgac	1860
cgcacatgag gcggaaggt tccagctga gcgggtacgg ctcccgtgc gagctgaaat	1920
agtcgaacat ccgtcgggc gtcggcgaca gcttgcgta cttctccat atgaatttcg	1980
tgtagtggtc gccagcaaac agcacgacga tttcctcgtc gatcaggacc tggcaacggg	2040
acgttttctt gccacgttc aggcgcgga agcgtgcag cagcgacacc gattccaggt	2100
gcccacgcg gtcggacgtg aagcccatcg ccgtgcctg taggcgcgac aggcattcct	2160
cggccttcgt gtaataccgg ccatgatcg accagcccag gtcttgcaa agctcgtaga	2220
acgtgaaggt gatcggctcg ccgatagggg tgcgttcgc gtactccaac acctgtgcc	2280
acaccagttc gtcacgtcg gcccgagct cgacgccgt gtaggtgac ttcacgtcct	2340
tgttgacgtg gaaaatgacc ttgttttga gcgcctcgc cgggatttct ttgttcgcg	2400
tggtgaacag ggcagagcgg gccgtgtcgt ttggcatcgc tcgcatcgtg tccggccacg	2460
gcgcaatc gaacaaggaa agctgcattt ccttgatctg ctgcttcgtg tgtttcagca	2520
acgcggcctg cttggcctcg ctgacctgt ttgccaggtc ctcgccggcg gtttttcgt	2580
tcttggtcgt catagtctt cgcgtgtcga tggatcga cttcgccaaa cctgccgct	2640
cctgttcgag acgacgcgaa cgctccacgg cggccgatgg cgcgggcagg gcagggggag	2700
ccagttgcac gctgtcgcgc tcgatcttgg ccgtagcttg ctggaccatc gagccgacgg	2760

actggaaggt ttcgcggggc gcacgcatga cggcgcggct tgcgatggtt tcggcatcct	2820
cggcgaaaaa ccccgctcgc atcagttctt gcctgtatgc cttccggtca aacgtccgat	2880
tcattcaccc tecttgcggg attgccccga ctacgcgcgg ggcaatgtgc cttattcct	2940
gatttgaccg gcctggtgcc ttggtgtcca gataatccac cttatcggca atgaagtcgg	3000
tccctagacg cgtctggcgc tcttctctgt acttgggtatt ccgaatcttg ccctgcacga	3060
ataccagctc cgcgaagtcg ctcttcttga tggagcgcgt ggggacgtgc ttggcaatca	3120
cgcgcacccc ccggccgttt tagcggctaa aaaagtcatt gctctgccct cgggcggacc	3180
acgcccatca tgaccttgcc aagctcgtcc tgccttctct cgatcttcgc cagcagggcg	3240
aggatcgtgg catcacgaa ccgcgccgtg cgcgggtcgt cggtagacca gagtttcagc	3300
aggccgcccc ggccggccag gtcgccattg atgcgggcca gctcgcggac gtgctcatag	3360
tccacgacgc ccgtgatttt gtaccctgg ccgacggcca gcaggtaggc ctacaggctc	3420
atgccggcgc ccgcgcctt ttcctcaatc gctcttcgtt cgtctggaag gcagtacacc	3480
ttgatagggt ggctgccctt cctggttggc ttggtttcat cagccatccg ctigccctca	3540
tctgttacgc cggcggtagc cggccagcct cgcagagcag gattcccgtt gagcaccgcc	3600
agggtgcgaat aaggacagc gaagaaggaa caccgcctcg cgggtgggcc tacttcacct	3660
atcctgcccc gctgacgcgc ttggatacac caaggaaagt ctacacgaac cttttggcaa	3720
aatcctgtat atcgtgcgaa aaaggatgga tataaccgaa aaatcgctat aatgaccccc	3780
aagcagggtt atgcagcgga aaagatccgt cgaccctttc cgacgctcac cgggctggtt	3840
gccctcgccg ctgggctggc ggccgtctat ggccctgcaa acgcgccaga aacgccgtcg	3900
aagccgtgtg cgagacaccg cggccgccgg cgttgttgat acctcgcgga aaacttggcc	3960
ctcactgaca gatgaggggc ggacgttgac acttgagggg ccgactcacc cggcgcggcg	4020
ttgacagatg aggggcaggc tcgatttcgg ccggcgacgt ggagctggcc agcctcgcaa	4080
atcggcgaaa acgcctgatt ttacgcgagt tccccacaga tgatgtggac aagcctgggg	4140
ataagtcccc tgcggtattg acacttgagg ggccgcgacta ctgacagatg aggggcgcga	4200
tccttgacac ttgaggggca gagtgtgac agatgagggg cgcacctatt gacatttgag	4260
gggctgtcca caggcagaaa atccagcatt tgcaagggtt tccgcccgtt ttctggccac	4320
cgctaacctg tcttttaacc tgccttttaa ccaatattta taaaccttgt ttttaaccag	4380
ggctgcgccc tgtgcgcgtg accgcgcacg ccgaaggggg gtgccccccc ttctcgaacc	4440
ctcccgcccc gctaacgcgg gcctcccatc cccccagggg ctgcgccctt cggccgcgaa	4500

cggcctcacc ccaaaaatgg cagccaagct gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4560
 gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag 4620
 caccagtact gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 4680
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga 4740
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa 4800
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 4860
 tacatacctc gcctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 4920

tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 4980
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 5040
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 5100
 ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg 5160
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 5220
 ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 5280
 ggccctttgc tggccctttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatccctg attctgtgga 5340

taaccgtagc atg 5353

<210> 17
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> trfA gene
 <400> 17

ctagcgtttg caatgcacca ggtcatcatt gacccaggcg tgttccacca ggccgctgcc 60
 tcgcaactct tcgcaggett cgccgacctg ctgcgccac ttcttcacgc ggggtggaatc 120
 cgatccgcac atgaggcgga aggtttccag cttgagcggg tacggctccc ggtgcgagct 180
 gaaatagtcg aacatccgtc gggccgtcgg cgacagcttg cggctacttct cccatatgaa 240
 tttcgtgtag tggctgccag caaacagcac gacgatttcc tcgtcgatca ggacctggca 300

acgggacgtt ttcttgccac ggtccaggac gcggaagcgg tgcagcagcg acaccgattc 360
 caggtgcccc acgcggtcgg acgtgaagcc catcgccgtc gcctgtaggc gcgacaggca 420
 ttcttcggcc ttcgtgtaat accggccatt gatcgaccag cccaggtcct ggcaaagctc 480
 gtagaacgtg aaggtgatcg gctcgccgat aggggtgcgc ttcgctact ccaacacctg 540
 ctgccacacc agttcgatc ctgcggcccg cagctcgacg ccggtgtagg tgatcttcac 600
 gtccttggtg acgtggaaaa tgacctgtt ttgcagcgcc tcgcgcggga ttttctgtt 660

gcgcgtggtg aacagggcag agcgggccgt gtcgtttggc atcgctcgca tcgtgtccgg	720
ccacggcgca ataatgaaca aggaaagctg catctccttg atctgctgct tcgtgtgttt	780
cagcaacgcg gcctgcttgg cctcgctgac ctgttttgcc aggtcctcgc cggcggtttt	840
tcgtttcttg gtcgtcatag ttcttcgcgt gtcgatggtc atcgacttcg ccaaactgc	900
cgctcctgt tcgagacgac gcgaacgtc cacggcgcc gatggcgcg gcaggcgagg	960
gggagccagt tgcacgtgt cgcgctcgat cttggccgta gcttgctgga ccatcgagcc	1020
gacggactgg aaggtttcgc ggggcgcacg catgacggtg cggcttgca tggtttcggc	1080
atctcggcg gaaaaccccg cgtcgatcag ttcttgctg tatgccttc ggtcaaacgt	1140
ccgattcat	1149
<210> 18	
<211> 4912	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Methylobacterium expression vector without OriV	
<400> 18	
actgaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaac	60
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag	120
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttacgacgag cgcagatacc aaatactgtc	180
cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac	240
ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc	300
gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgagc ggtcgggctg aacgggggggt	360
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt	420
gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc	480
ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt	540
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttttg atgctcgtea	600
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt	660
tgctggcctt ttgtcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt	720
agcatgcgtt gacgacaacg gtgcgatggg tcccggcccc ggtcaagacg atccaatac	780
gttgcgacac tacgccttgg cacttttaga attgccttat cgtcctgata agaaatgtcc	840
gaccagctaa agacatcgcg tccaatcaaa gcctagaaaa tataggcgaa gggacgctaa	900
tgggcccttc acacagagga gagacagcga attctggtac cttctagact atcgactagt	960

tggtacctct gcagaagctt ccggagctct taagccagcc ccgtgtctcc cggcatccgc	1020
ttacagataa aacgaaagcg tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat acaagccctc	1080
caggggagat gcgtggatcc ttagatctag gcctgaatcg ccccatcatc cagccagaaa	1140
gtgaggagc caggttgat gagagctttg ttgtaggtgg accagttagt gattttgaac	1200
ttttgctttg ccacggaacg gtctgcgttg tcgggaagat gcgtgatctg atccttcaac	1260
tcagcaaaag ttcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccg tcaagtcagc gtaatgctct	1320
gccagtgtta caaccaatta accaattctg attagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa	1380
actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta	1440
atgaaggaga aaactcaccg aggcagtctc ataggatggc aagatcctgg tatcggtctg	1500
cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca aaaataaggt	1560
tatcaagtga gaaatcacca tgagtacga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagcttat	1620
gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctctcatca aaatcactcg	1680
catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc gagacgaaat acgcgatcgc	1740
tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg	1800
catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc	1860
cggggatcgc agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg	1920
tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat	1980
tggcaacgct acctttgccg tggttcagaa acaactctgg cgcatcgggc ttcccataca	2040
atcgatagat tgtcgacct gattccccga cattatcgcg agccattta taccatata	2100
aatcagcatc catgttgaa tttaatcgcg gcctcgagca agacgtttcc cgttgaatat	2160
ggctcataac accccttgta ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg	2220
atataatttt atcttgtca atgtaacatc agagattttg agacacaacg tggctttccc	2280
ccccccct gcaggctcga caggggatg gatggcgctt ccgatcatgg tctgtctgc	2340
ttcgggtggc atcggaatgc cggcgtgca agcaatgtt tccaggcagg tggatgagga	2400
acgtcagggg cagctgcaag gctcactggc ggcgtcacc agcctgacct cgatcgtcgg	2460
accctcttc ttacggcga tctatcggc ttctataaca acgtggaacg ggtgggcatg	2520
gattgcaggc gctgccctct acttgcctg cctgccggcg ctgcgtcgcg ggctttggag	2580
cggcgaggg caacgagccg atcgtgatc gtggaaacga taggcctatg ccatgcgggt	2640
caaggcgact tccggcaagc tatacgccc ctagaattgt caattttaat cctctgttta	2700

tcggcagttc gtagagcgcg ccgtgcgtcc cgagcgatac tgagcgaagc aagtgcgtcg	2760
agcagtgtccc gcttgttctt gaaatgccag taaagcgctg gctgctgaac cccagccgg	2820
aactgacccc acaaggccct agcgtttgca atgcaccagg tcatcattga cccaggcgtg	2880
ttccaccagg ccgtgcctc gcaactcttc gcaggcttcg ccgacctgct cgcgccactt	2940
cttcacgcgg gtggaatccg atccgcacat gaggcggaag gtttccagct tgagcgggta	3000
cggctcccgg tgcgagctga aatagtcgaa catccgtcgg gccgtcggcg acagcttgcg	3060
gtactttctc catatgaatt tcgtgtagt gtcgccagca aacagcacga cgatttctc	3120
gtcgatcagg acctggcaac gggacgtttt ctgccacgg tccaggacgc ggaagcgggtg	3180
cagcagcgac accgattcca ggtgcccaac gcggtcggac gtgaagccca tcgccgtcgc	3240
ctgtaggcgc gacaggcatt cctcggcctt cgtgtaatac cggccattga tcgaccagcc	3300
caggctctgg caaagctcgt agaactgaa ggtgatcggc tcgccgatag ggggtgcgtt	3360
cgcgtactcc aacacctgct gccacaccag ttctgtcatc tcggcccga gctcgacgcc	3420
ggtgtagggt atcttcacgt cttgttgac gtggaaaatg acctgtttt gcagcgctc	3480
gcgcgggatt ttcttgtgc gcgtggtgaa caggcgagag cgggccgtgt cgtttggcat	3540
cgctcgatc gtgtccggcc accggcgaat atcgaacaag gaaagctgca ttcccttgat	3600
ctgctgttc gtgtgttca gcaacgcggc ctgcttgcc tcgtcgacct gttttgccag	3660
gtcctcgccg gcggttttt cttcttgggt cgtcatagtt cctcgcgtgt cgatggtcat	3720
cgacttcgcc aaacctgcc cctcctgttc gagacgacgc gaacgtcca cggcgccga	3780
tggcgccggc agggcagggg gagccagttg cacgctgtcg cgctcgatct tggccgtagc	3840
ttgttgacc atcgagccga cggactggaa ggtttcgcgg ggcgcacga tgacggtgcg	3900
gcttgcatg gtttcggcat cctcggcgga aaaccccgcg tcgatcagtt cttgcctgta	3960
tgcttccgg tcaaacgtcc gattcattca cctccttgc gggattgccc cgactcacgc	4020
cggggcaatg tgcccttatt cctgatttga ccgcctggt gccttggtgt ccagataatc	4080
caccttatcg gcaatgaagt cggtcctgta gacctctgg ccgtccttct cgtacttgg	4140
attccgaatc ttgccctgca cgaataccag ctccgcgaag tcgtcttct tgatggagcg	4200
catggggacg tgcttgcaa tcacgcgcac cccccgccg ttttagcggc taaaaaagtc	4260
atggctctgc cctcggcgcg accacgcca tcatgacctt gccaagctcg tcctgttct	4320
cttcgatctt cgccagcagg gcgaggatcg tggcatcacc gaaccgcgc gtgcgcgggt	4380
cgtcggtgag ccagagtctc agcaggccgc ccaggcgcc caggtcgcca ttgatcggg	4440

ccagctcgcg gacgtgctca tagtccacga cgcccgatgat tttgtagccc tggccgacgg 4500
ccagcaggta ggcctacagg ctcatgccgg ccgccgccgc cttttcctca atcgctcttc 4560
gttcgtctgg aaggcagtac accttgatag gtgggctgcc cttcctggtt ggcttggttt 4620
catcagccat ccgcttgccc tcatctgtta cgccggcggg agccggccag cctcgagag 4680
caggattccc gttgagcacc gccagggtgcg aataaggac agtgaagaag gaacaccgcg 4740
tcgcggttg gctacttca cctatcctgc ccggtgacg ccgttgata caccaaggaa 4800
agtctacag aaccctttgg caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg 4860

aaaaaatcgc tataatgacc ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagatc cg 4912

<210> 19

<211> 3769

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylobacterium expression vector without OriV, trfA

<400> 19

actgaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc 60
tgctgcttgc aaacaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag 120
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 180
cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 240

ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 300
gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggg 360
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 420
gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc 480
ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggatctt 540
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgta 600
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 660

tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 720
agcatgcgtt gacgacaacg gtgcgatggg tcccgcccc ggtcaagacg atgccaatac 780
gttgcgacac tacgccttgg cacttttaga attgccttat cgtcctgata agaaatgtcc 840
gaccagctaa agacatcgcg tccaatcaaa gcctagaaaa tataggcgaa gggacgctaa 900
tgggcccttc acacagagga gagacagcga attctgttac cttctagact atcgactagt 960
tggtacctct gcagaagctt ccggagctct taagccagcc ccgctgtcc cgcatccgc 1020

ttacagataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat acaagccctc	1080
caggggagat gcgtggatcc ttagatctag gcctgaatcg ccccatcatc cagccagaaa	1140
gtgagggagc cacggttgat gagagctttg ttgtaggtgg accagttggt gatTTTgaac	1200
TTTTgctttg ccacggaacg gtctgcgttg tcgggaagat gcgtgatctg atccttcaac	1260
tcagaaaag ttcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccg tcaagtcagc gtaatgctct	1320
gccagtgtta caaccaatta accaattctg attagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa	1380
actgcaattt attcatalca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta	1440
atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatcggtctg	1500
cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca aaaataaggt	1560
tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagcttat	1620
gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctgctcatca aaatcactcg	1680
catcaaccaa accgttatctc attcgtgatt gcgcctgagc gagacgaaat acgcgatcgc	1740
tgTtaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg	1800
catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc	1860
cggggatcgc agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg	1920
tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat	1980
tggcaacgct acctttgcca tgTttcagaa acaactctgg cgcatcgggc ttcccataca	2040
atcgatagat tgtgcacct gattgcccga cattatcgcg agccattta taccatata	2100
aatcagcatc catgttgga tttaatcgcg gcctcgagca agacgtttcc cgttgaatat	2160
ggctcataac accccttgta ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg	2220
atataTTTT atcttgtca atgtaacatc agagattttg agacacaacg tggctttccc	2280
ccccccct gcaggtccga cacgggatg gatggcgttc ccgatcatgg tctgtctgc	2340
ttcgggtggc atcggaatgc cggcgtgca agcaatgttg tccaggcagg tggatgagga	2400
acgtcagggg cagctgcaag gtcactggc ggcgtcacc agcctgacct cgatcgtcgg	2460
accctctctc ttcacggcga tctatcggc ttctataaca acgtggaacg ggtgggcatg	2520
gattgcaggc gctgccctct acttgctctg cctgccggcg ctgcgtcgcg ggctttggag	2580
cggcgcagg caacgagccg atcgctgac gtggaaacga taggcctatg ccatgcgggt	2640
caaggcgact tccggcaagc tatacgcgcc ctagaattgt caattttaat cctctgttta	2700
tcggcagttc gtagagcgcg ccgtgcgtcc cgagcgatac tgagcgaagc aagtgcgtcg	2760

agcagtgccc gcttggttcc taaatgccag taaagcgctg gctgctgaac cccagccgg 2820
aactgacccc acaaggccca tatgtcacc tcttgccggg attgccccga ctcacgccgg 2880
ggcaatgtgc cttatttcc tatttgacc gcctgggtgc ttggtgtcca gataatccac 2940
cttatcgga atgaagtcgg tcccgtagac cgtctggccg tcttctcgt acttggtatt 3000
ccgaatcttg cctgcacga ataccagtc cgcgaagtcg cttctcttga tggagcgcac 3060
ggggacgtgc ttggcaatca cgcgcacccc cggccggtt tagcggttaa aaaagtcag 3120
gctctgccct cgggcggacc acgcccata tgacctgcc aagctcgtcc tgcttctctt 3180

cgatcttcgc cagcagggcg aggatcgtgg catcaccgaa ccgcgccgtg cgcgggtcgt 3240
cggtagacca gattttcagc aggcgcccc ggccggccag gtcgccattg atgcgggcca 3300
gctcgcggac gtgctcatag tccacgacgc ccgtgatttt gtagccctgg ccgacggcca 3360
gcaggtaggc ctacaggctc atgccggccg ccgccgcctt ttcctcaatc gctcttcgtt 3420
cgtctggaag gcagtacacc ttgatagggt ggctgccctt cctggttggc ttggtttcat 3480
cagccatccg cttgccctca tctgttacgc cggcggtagc cggccagcct cgcagagcag 3540
gattccggtt gagcaccgcc aggtgcgaat aaggacagc gaagaaggaa caccgcctcg 3600

cgggtgggcc tacttcacct atcctgccc gctgacccg ttggatacac caaggaaagt 3660
ctacacgaac ctttggcaa aatcctgtat atcgtgcgaa aaaggatgga tataccgaaa 3720
aatcgctat atgaccccg aagcagggtt atgcagcgga aaagatccg 3769

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DtrfA-F

<400> 20

ggcatatgtc accctccttg cgggattgc 29

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DtrfA-R

<400> 21

cgcatatggg ccttgtgggg tcagttccg 29

<210> 22

<211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCS2-F (rs)
 <400> 22
 gcgcattgtg atattcattt actccattga gctagctgcg gccgcgttga cgacaacggt 60
 gcgatggg 68
 <210> 23
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCS2-R (loxP71)
 <400> 23
 ccgatccat aatttcgtat agcctaccct atacgaacgg taacgcatct cccctggagg 60
 gcttg 65
 <210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> loxP(66)-F
 <400> 24
 ggagattctag gcctgaatcg ccccatcatc atcc 34
 <210> 25
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> loxP(66)/RS-R
 <400> 25
 ggcttcgagg atttaaattg tacttgctga ctccgcggta ccgttcgtat agcctaccct 60
 atacgaagtt atgaaagcca cgttgtgtct caaaatc 97
 <210> 26
 <211> 34
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> loxP71 site

<400> 26

taccgttcgt atagggtagg ctatacgaag ttat 34

<210> 27

<211> 3868

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIDV-A vector

<400> 27

gggtccgacac ggggatggat ggcgttcccg atcatgttcc tgcttgcttc ggggtggcatc 60

ggaatgccgg cgtgcaagc aatgttgtcc aggcaggtgg atgaggaacg tcaggggcag 120

ctgcaaggct cactggcggc gctcaccagc ctgacctga tcgtcggacc cctcctcttc 180

acggcgatct atgcggcttc tataacaacg tggaacgggt gggcatggat tgcaggcgct 240

gccctctact tgctctgct gccggcgctg cgtcgcgggc tttggagcgg cgcagggcaa 300

cgagccgacg gctgatcgtg gaaacgatag gcctatgcca tgcgggtcaa ggcgacttcc 360

ggcaagctat acgcgccta gaattgtcaa ttttaatcct ctgtttatcg gcagttcgta 420

gagcgcgccc tgcttccga gcgatactga gcgaagcaag tgcttcgagc agtgcccgt 480

tgttcctgaa atgccagtaa agcgttggt gctgaacccc cagccggaac tgacccaca 540

aggcccatat gtcacctcc ttgcgggatt gccccgactc acgccggggc aatgtgccct 600

tattcctgat ttgaccgcc tgggtgccttg gtgtccagat aatccacctt atcggcaatg 660

aagtcggtcc cgtagaccgt ctggccgtcc ttctcgtact tggatttcg aatcttgccc 720

tgcacgaata ccagctccgc gaagtcgctc ttcttgatgg agcgcatggg gacgtgcttg 780

gcaatcacgc gcacccccg gccgttttag cggctaataa agtcatggct ctgccctcgg 840

gcggaccacg cccatcatga ctttgccaag ctgctctgc ttctcttcga tcttcgccag 900

cagggcgagg atcgtggcat caccgaaccg cgcgtgcgc gggtcgtcgg tgagccagag 960

tttcagcagg ccgcccaggc ggcccaggtc gccattgatg cgggccagct cgcggacgtg 1020

ctcatagtcc acgacgccc tgattttgta gccctggccg acggccagca ggtaggccta 1080

caggctcatg ccggccgccc ccgccttttc ctcaatcgt cttcgttcgt ctggaaggca 1140

gtacaccttg ataggtgggc tgcccttctt ggttggttg gtttcacag ccatccgtt 1200

gccctcatct gttacgccgg cggtagccgg ccagcctgc agagcaggat tcccgttgag 1260

caccgccagg tgcaataag ggacagtga gaaggaacac ccgtcgcgg gtgggcctac 1320

ttcacctatc ctgcccggct gacgccgttg gatacaccaa ggaaagtcta cacgaaccct	1380
ttggcaaat cctgtatatc gtgcgaaaaa ggatggatat accgaaaaaa tcgtataat	1440
gaccccggaag cagggttatg cagcggaaaa gatccgtcga actgaccccg tagaaaagat	1500
caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa	1560
accaccgcta ccagcgttgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa	1620
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt	1680
agggcaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgc taatcctgtt	1740
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata	1800
gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt	1860
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac	1920
gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaacg ggcagggtcg gaacaggaga	1980
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg	2040
ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa	2100
aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgcctggcctt ttgctcacat	2160
gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt agcatgctga tatcagttaa	2220
ctccatggag ctagctgcgg ccgcggttga cgacaacggt gcgatgggtc ccggccccgg	2280
tcaagacgat gccaatacgt tgcgacacta cgccttggca cttttagaat tgccttatcg	2340
tcctgataag aaatgtccga ccagctaaag acatcgcgtc caatcaaagc ctagaaaata	2400
taggcgaagg gacgctaatt ggcccttcac acagaggaga gacagcgaat tctggtacct	2460
tctagactat cgactagtgt gtacctctgc agaagcttcc ggagctctta agccagcccc	2520
gctgctcccc gcatccgctt acagataaaa cgaaagctc agtcgaaaga ctgggccttt	2580
cgttttatac aagccctcca ggggagatgc gttaccgttc gtatagggtg ggctatacga	2640
agttatggat ccttagatct aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagtgaggga	2700
gccacggttg atgagagctt tgtttaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt	2760
tgccacggaa cggctctgct gtgcgggaag atgcgtgac tgatccttca actcagcaaa	2820
agttcgattt attcaacaaa gccccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct ctgccagtgt	2880
tacaaccaat taaccaatc tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat	2940
ttattcatat caggattatc aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga	3000
gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg	3060

actcgtccaa catcaataca acctattaat ttcccctcgt caaaaataag gttatcaagt	3120
gagaaatcac catgagtac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct	3180
ttccagactt gttcaacagg ccagccatta cgtcgtcat caaaatcact cgcatacaacc	3240
aaaccgttat tcattcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgac gctgttaaaa	3300
ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac cggcgcagga aactgccag cgcatacaaca	3360
atattttcac ctgaatcagg atattcttct aatactgga atgctgtttt cccggggatc	3420
gcagtggatga gtaacctgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcggaaga	3480
ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg	3540
ctacctttgc catgtttcag aaacaactct ggcgcatcgg gcttcccata caatcgatag	3600
attgtcgac ctgattgccc gacattatcg cgagccatt tatacccata taaatcagca	3660
tccatgttgg aatttaacg cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat atggctcata	3720
acacccttg tattactgtt tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt	3780
ttatcttgat caatgtaaca tcagagattt tgagacacaa cgtggctttc ataacttcgt	3840
atagggtagg ctatacgaac ggtaccgc	3868
<210> 28	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> loxP66 site	
<400> 28	
ataacttcgt atagggtagg ctatacgaac ggta	34
<210> 29	
<211> 816	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> kanamycin resistance gene	
<400> 29	
atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc tcgaggccgc gattaaattc caacatggat	60
gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc	120
tatcatttgt atgggaagcc cgatgcgcca gattgttttc tgaaacatgg caaaggtagc	180
gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct	240

cttccgacca tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg 300
atccccggga aaacagcatt ccaggtatta gaagaatata ctgattcagg tgaataatt 360
gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct 420
tttaacagcg atcgcttatt tctctcgtc caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg 480
gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa 540
gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg gattcagtcg tcaactcatgg tgattttcct 600

cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc 660
ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct 720
ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataactctga tatgaataaa 780
ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttctaa 816

<210> 30
<211> 4245
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> pACYC184 vector
<400> 30

gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60

gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctcgtgt 120
ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaatgt tctttacgat gccattggga 180
tatatcaacg gtggtatata cagtgaattt ttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240
aaatctcgat aactcaaaaa atacggccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagt 300
ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcaa aagttggccc agggcttccc 360
ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480

gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
aaggctgcac cggctgcgtc gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgctc 720
actgactcgc tacgctcggc cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780
ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgaagg gccgcggcaa 840
agccgttttt ccataggtc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaata 900

agtgggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggcggtccc	960
tcgtgcgctc tctgttctct gcctttcggg ttaccgggtg cattccgctg ttatggccgc	1020
gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac	1080
tgtatgcacg aacccccctg tcagtcggac cgtgcgccct tatccggtaa ctatcgtctt	1140
gagtccaacc cgaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt	1200
agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg	1260
tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt	1320
cgaaaaaccg ccttgaagg cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc	1380
aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tticagtga	1440
atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc	1500
atgtttgaca gcttatcctc gataagcttt aatgcggtag ttatcacag ttaaattgct	1560
aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcctc ctcggcaccg	1620
tcacctgga tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg	1680
atatcgtcca ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt	1740
tgatgcaatt tctatgcga cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcgcgc	1800
cagtctgct cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac	1860
ccgtctgtg gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacgggc gccacaggtg	1920
cggttgctgg cgcttatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg	1980
ggctcatgag cgcttgtttc ggctgggta ttgtggcagg ccccgctggc gggggactgt	2040
tgggcgcat ctcttgcct gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggccctcaacc	2100
tactactggg ctgcttctca atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct	2160
tgagagcctt caacceagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg	2220
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg	2280
tcattttcgg cgaggaccgc ttctgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg	2340
tattcggaa cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt	2400
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc	2460
tggcgttcgc gacgcgagge tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg	2520
gcatcgggat gcccgcttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg	2580
gacagcttca aggatcgctc gcggtcttta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga	2640
tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag	2700
gcgccgccct ataccttctc tgcctccccg cgttgcgtcg cgggtcatgg agccgggcca	2760

cctcgacctg aatggaagcc ggcggcacct cgtaacgga ttcaccactc caagaattgg 2820
agccaatcaa ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aaccttggc agaacatata 2880
catcgctcc gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg 2940
gccacgggtg cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggcggggttg 3000

ccttactggt tagcagaatg aatcacgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg 3060
caaaacgtct ggcacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttcctg ttctgtaaag 3120
tctggaaacg cggaagtccc ctactgtctg ctgaagtgc ccgcaacaga gagtggaaac 3180
aaccggtgat accacgatac tatgactgag agtcaacgcc atgagcggcc tcatttctta 3240
ttctgagtta caacagtccg caccgctgtc cggtagctcc ttccggtggg cgcggggcat 3300
gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc 3360
ggcagcgccc aacagtcccc cggccacggg gcctgccacc ataccacgc cgaacaagc 3420

gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac 3480
acctacatct gtattaacga agcgctaacc gtttttatca ggctctggga ggcagaataa 3540
atgatcatat cgtcaattat tacctccacg gggagagcct gagcaaaactg gcctcagga 3600
tttgagaagc acacggtcac actgcttccg gtagtcaata aaccggtaaa ccagcaatag 3660
acataagcgg ctatttaacg accctgccct gaaccgacga ccgggtcgaa ttgctttcg 3720
aatttctgcc attcatccg ttattatcac ttattcagge gtagcaccag gcgtttaagg 3780
gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg 3840

taattcatta agcattctgc cgacatggaa gccatcacag acggcatgat gaacctgaat 3900
cgccagcggc atcagcacct tgctgccttg cgtataatat ttgcccatgg tgaaaacggg 3960
ggcgaagaag ttgtccatat tggccagtt taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccaggg 4020
attggtgag acgaaaaaca tattctcaat aaaccttta gggaaatagg ccaggttttc 4080
accgtaacac gccacatctt gcgaatata gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta 4140
ttcactccag agcgatgaaa acgtttcagt ttgtcatgg aaaacggtgt aacaagggtg 4200
aacactatcc catatcacca gtcaccgtc ttctattgcc atacg 4245

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tet-F

<400> 31

cgctgcagg catcgataag ctttaatgcg gtag	34
<210> 32	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Tet-R	
<400> 32	
gcagatctgt atcggtgatt cattctgcta acc	33
<210> 33	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cre-F	
<400> 33	
gcgaattcat gtccaattta ctgaccgtac acc	33
<210> 34	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cre-R	
<400> 34	
ccactagttt aatcgccatc ttccagcagg	30
<210> 35	
<211> 6067	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MtEV vector	
<400> 35	
gaccctttcc gacgtcacc gggctggttg cctcgcgcg tgggtggcg gccgtctatg	60
gccctgcaaa cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc	120
gttgtggata cctcgcggaa aacttggccc tactgacag atgaggggcg gacgttgaca	180
cttgaggggc cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc	240
cggcgacgtg gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt	300

tcccacagat gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg	360
gcgcgactac tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca	420
gatgaggggc gcacctatg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt	480
gcaaggggtt ccgcccgtt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac	540
caatatattat aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc	600
cgaagggggg tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc	660
ccccaggggc tgcgcccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agccaagctg	720
accactttctg cgtcgggcc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg	780
tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc accagtactg accccgtaga aaagatcaaa	840
ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca	900
ccgtaccag cgggtggttg ttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta	960
actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtcctt tagttagacc gtagttaggc	1020
caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctg ctctgctaata cctgttacca	1080
gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta	1140
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag	1200
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt	1260
cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaa aggagagcgc	1320
acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac	1380
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac	1440
gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc	1500
tttctgcgt tatccccga ttctgtggat aaccgtagca tgcgttgacg acaacggtgc	1560
gatgggtccc ggccccggtc aagacgatgc caatacgttg cgacactacg ccttggcact	1620
tttagaattg cctatcgtc ctgataagaa atgtccgacc agctaaagac atcgcgtcca	1680
atcaaagcct agaaaatata ggcaaggga cgctaattgg cccttcacac agaggagaga	1740
cagcgaattc tggtaacctc tagactatcg actagttagt acctctgcag aagcttccgg	1800
agctcttaag ccagccccgc tgctcccggc atccgcttac agataaaacg aaaggctcag	1860
tcgaaagact gggccttttcg tttatacaa gccctccagg ggagatgcgt ggatccttag	1920
atctcatcga taagctttaa tgcggtagtt tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagg	1980
caccgtgtat gaaatctaac aatgcgtca tcgtatcct cggcaccgtc accctggatg	2040
ctgtaggcat aggtttggtt atgccggtac tgccgggcct cttgcgggat atcgtccatt	2100
ccgacagcat cgccagtcac tatggcgtgc tgctagcgt atatgcgttg atgcaatttc	2160

tatgcgcacc cgttctcgga gcactgtccg accgctttgg ccgccgccca gtcctgctcg	2220
cttcgctact tggagccact atcgactacg cgatcatggc gaccacaccc gtcctgtgga	2280
tcctctacgc cggacgcacg gtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg	2340
cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcagtgcgc	2400
cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct	2460
ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgcacaacgg cctcaaccta ctactgggct	2520
gcttcctaata gcaggagtcg cataaggag agcgtcgacc gatgcccttg agagccttca	2580
accagtcag ctcttccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccga cttatgactg	2640
tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg	2700
aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggtt ttcggaatct	2760
tgcacgccct cgtcaagcc ttcgtcactg gtcccgcac caaacgttc ggcgagaagc	2820
aggccattat cgcggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgtcttgctg gcgttcgcga	2880
cgcgaggctg gatggccttc cccattatga ttcttctgc ttccggcggc atcgggatgc	2940
ccgcgttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag	3000
gatcgctgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgtgatc gtcacggcga	3060
tttatgccg ctcggcgagc acatggaacg ggttggcatg gattgtaggc gccgcctat	3120
accttgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag ccgggccacc tcgacctgaa	3180
tggaagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccactcca agaattggag ccaatcaatt	3240
cttgcggaga actgtgaatg cgcaaaccaa ccttggcag aacatatcca tcgcgtccgc	3300
catctccagc agccgcacgc ggccgcatctc gggcagcgtt gggtcctggc cacgggtgcg	3360
catgatcgtg ctctgtcgt tggagaccg gctaggctgg cggggttgcc ttactggtta	3420
gcagaatgaa tcaccgatac cctgcaggtc cgacacgggg atggatggcg ttcccgatca	3480
tggctctgct tgcttcgggt ggcatcggaa tgccggcgt gcaagcaatg ttgtccaggc	3540
aggtggatga ggaacgtcag gggcagctgc aaggctcact ggccgcgctc accagcctga	3600
cctcgatcgt cggaccctc ctcttcacgg cgatctatgc ggcttctata acaacgtgga	3660
acgggtgggc atggattgca ggcgtgccc tctacttct ctgcctgccg gcgctgcgtc	3720
gcgggctttg gagcgccga gggcaacgag ccgatcgtg atcgtggaaa cgataggcct	3780
atgccatgcg ggtaaggcg acttcggca agctatacgc gccctagaat tgtcaatctt	3840
aatcctctgt ttatcggcag ttcttagagc gcgccgtgcg tcccgagcga tactgagcga	3900

agcaagtgcg tcgagcagtg cccgcttggt cctgaaatgc cagtaaagcg ctggctgctg	3960
aacccccagc cggaactgac cccacaaggc cctagcggtt gcaatgcacc aggtcatcat	4020
tgaccaggc gtgttcacc aggccgctgc ctgcgaactc ttgcagagct tcgccgacct	4080
gctcgcgcca ctctttcacg cgggtggaat ccgatccgca catgaggcgg aaggtttcca	4140
gcttgagcgg gtacggctcc cgggtcgagc tgaatatgac gaacatccgt cgggcccgtc	4200
gcgacagctt gcggtacttc tcccatatga atttcgtgta gtggtcgcca gcaaacagca	4260
cgacgatttc ctctcgatc aggacctggc aacgggacgt tttcttgcca cggtcaggga	4320
cgcggaagcg gtgcagcagc gacaccgatt ccagggtccc aacgcggtcg gacgtgaagc	4380
ccatcgccgt cgcctgtagg cgcgacaggc attcctcggc ctctgtgtaa taccggccat	4440
tgatcgacca gccaggctcc tggcaaagct cgtagaacgt gaaggtgac ggctcgccga	4500
taggggtgcg ctctcgctac tccaacacct gtgccacac cagttcgtca tcgtcgcccc	4560
gcagctcgac gccggtgtag gtgatcttca cgtccttggt gacgtggaaa atgacctgt	4620
tttgacgagc ctctcgccgg attttctgtg tgcgctgggt gaacagggca gagcgggccc	4680
tgctgtttgg catcgctcgc atcgtgtccg gccacggcgc aatatcgaac aaggaaagct	4740
gcatttcctt gatctgtcgc ttctgtgtgt tcagcaacgc ggcctgcttg gcctcgctga	4800
cctgttttgc caggctctcg cgggcgggtt ttctgttctt ggtcgtcata gtctctcgcg	4860
tgctgatggt catcgacttc gccaaacctg ccgcctcctg ttcgagacga cgcgaacgt	4920
ccacggcggc cgatggcgcg ggcagggcag ggggagccag ttgcacgctg tcgcgctcga	4980
tcttgccgt agcttgcctg accatcgagc cgacggactg gaaggtttcg cggggcgcac	5040
gcatgacggt gcggtctgag atggtttcgg catcctcggc ggaaaacccc gcgtcgatca	5100
gttcttgctt gtagctcttc cggtaaacg tccgattcat tcacctctt tcggggattg	5160
ccccgactca cgcgggggca atgtgccctt attcctgatt tgaccgcct ggtgccttgg	5220
tgtccagata atccacctta tcggcaatga agtcgggtccc gtagaccgtc tggccgtcct	5280
tctcgtactt ggtattccga atcttgccct gcacgaatac cagctccgag aagtcgtctt	5340
tcttgatgga gcgcatgggg acgtgcttgg caatcacgag cccccccg cggttttagc	5400
ggctaaaaaa gtcatggctc tgccctcggg cggaccacgc ccatcatgac cttgccaagc	5460
tcgtcctgct tctcttcgat ctctcgccagc agggcgagga tcgtggcatc accgaaccgc	5520
gccgtgcgag ggtcgtcggg gagccagagt ttgagcaggc cggccaggcg gccaggtcgc	5580
ccattgatgc gggccagctc gcggacgtgc tcatagtcca cgacgccgt gatctttag	5640

ccctggccga cggccagcag gtaggcctac aggtctatgc cggccgccgc cgccttttcc 5700
tcaatcgctc ttcgttcgtc tggaaggcag tacaccttga taggtgggct gcccttcctg 5760
gttggcttgg tttcatcagc catccgcttg cctcatctg ttacgccggc ggtagccggc 5820
cagcctcgca gagcaggatt cccgttgagc accgccaggt gcgaataagg gacagtgaag 5880
aaggaacacc cgctcgccgg tgggcctact tcacctatcc tgcccgctg acgccgttgg 5940
atacaccaag gaaagtctac acgaacctt tggcaaaatc ctgtatatcg tgcgaaaag 6000
gatggatata ccgaaaaat cgctataatg accccgaagc agggttatgc agcggaaaag 6060

atccgtc 6067

<210> 36
<211> 1032
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> cre gene
<400> 36

atgtccaatt tactgaccgt acacaaaaat ttgcctgcat taccggtcga tgcaacgagt 60
gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcaggatc gccaggcggt ttctgagcat 120
acctgaaaa tgccttctgc cgtttgccgg tcgtgggcgg catggtgcaa gttgaataac 180
cggaaatggt ttcccgaga acctgaagat gtctgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
cgcggtcttg cagtaaaaac tatccagcaa catttgggcc agctaaacat gcttcatcgt 300

cggtcggggc tgccacgacc aagtgcagc aatgctgtt cactggttat gcggcggatc 360
cgaaaagaaa acgttgatgc cggatgaacgt gcaaaacagg ctctagcggt cgaacgcact 420
gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga tatacgtaat 480
ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctgttacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
agggttaaag atatctcacg tactgacggt gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt aactaaactg 660
gtcgagcgat ggatttcctg ctctggtgta gctgatgac cgaataacta cctgttttgc 720

cgggtcagaa aaaatggtgt tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 780
ctggaaggga tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggt 840
cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccggtgctg gagccgcgcg agatatggcc 900
cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctggtg gctggaccaa tgtaaatatt 960
gtcatgaact atatccgtac cctggatagt gaaacagggg caatggtgcg cctgctggaa 1020
gatggcgatt ag 1032

<210> 37
 <211> 46
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> multiple cloning site of Methylobacterium expression vector

<400> 37

gaattctggt accttctaga ctatcgacta gttggtacct ctgcag 46