



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110809627 A

(43)申请公布日 2020.02.18

(21)申请号 201880043435.0

(22)申请日 2018.04.19

(30)优先权数据

62/488,523 2017.04.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/028331 2018.04.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/195297 EN 2018.10.25

(71)申请人 西雅图儿童医院(DBA西雅图儿童研
究所)

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 戴维德·J·罗林斯 凯伦·索默
斯瓦蒂·辛格

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 王芬 张淑珍

(51)Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 35/76(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61P 37/04(2006.01)

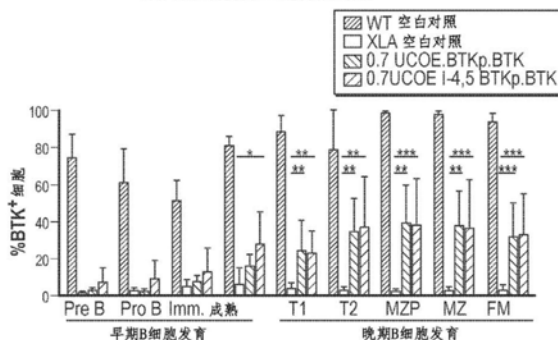
(54)发明名称

用于XLA基因疗法的优化的慢病毒载体

(57)摘要

本文描述了用于治疗、抑制或缓解受试者中的X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)的组合物和方法,所述受试者已被鉴别或选择为将从治疗、抑制或缓解XLA的疗法中受益的受试者。示例性的实施方式包括用于对BTK表达进行恢复或增加的基因疗法的构建体和方法。

两种载体均挽救了B细胞发育和功能



1. 一种用于持续的Bruton酪氨酸激酶 (BTK) 表达的多核苷酸, 所述多核苷酸包含:
编码遍在染色质开放元件 (UCOE) 的第一序列;
编码启动子的第二序列; 以及
编码BTK的第三序列。
2. 如权利要求1所述的多核苷酸, 其中, 所述UCOE为2kb、1.5kb、1kb、0.75kb、0.5kb或0.25kb, 或者由任意两个上述值限定的范围之间的任意数量的千碱基。
3. 如权利要求1或2所述的多核苷酸, 其中, 所述第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。
4. 如权利要求1-4中任一项所述的多核苷酸, 其中, 所述启动子为BTK启动子。
5. 如权利要求4所述的多核苷酸, 其中, 所述BTK启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸, 其中, 所述第三序列为密码子优化的, 以在人中表达。
7. 如权利要求6所述的多核苷酸, 其中, 所述第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的多核苷酸, 其中, 所述启动子为B细胞特异性启动子。
9. 如权利要求8所述的多核苷酸, 其中, 所述B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。
10. 如权利要求8或9所述的多核苷酸, 其中, 所述B细胞特异性启动子为内源性启动子。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸, 所述多核苷酸进一步包含一个或多个增强子元件。
12. 如权利要求11所述的多核苷酸, 其中, 所述一个或多个增强子元件包含至少一个DNase超敏位点 (DHS)。
13. 如权利要求12所述的多核苷酸, 其中, 所述DNase超敏位点为DNase超敏位点1 (DHS1)、DNase超敏位点2 (DHS2)、DNase超敏位点3 (DHS3)、DNase超敏位点4 (DHS4) 和/或DNase超敏位点5 (DHS5)。
14. 如权利要求12或13所述的多核苷酸, 其中, 所述DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。
15. 如权利要求11-14中任一项所述的多核苷酸, 其中, 所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。
16. 如权利要求15所述的多核苷酸, 其中, 所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。
17. 如权利要求15或16所述的多核苷酸, 其中, 所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。
18. 如权利要求17所述的多核苷酸, 其中, 所述内含子区域包含SEQ ID NO:9 (内含子4)、SEQ ID NO:10 (内含子5) 和/或SEQ ID NO:11 (内含子13) 中所示的序列。
19. 如权利要求15或16所述的多肽, 其中, 所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:4: 内含子4-5) 中所示的序列。
20. 如权利要求15或16所述的多肽, 其中, 所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:

14或SEQ ID NO:15中所示的序列。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的多核苷酸,其中,所述UCOE处于反向方向或正向方向。

22. 如权利要求21所述的多核苷酸,其中,所述UCOE处于正向方向。

23. 如权利要求11-22中任一项所述的多核苷酸,其中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的多核苷酸,其中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。

25. 如权利要求24所述的多核苷酸,其中,所述BTK启动子上游的基因为BTK增强子。

26. 如权利要求25所述的多核苷酸,其中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。

27. 一种用于在细胞中持续表达BTK的载体,所述载体包含:

编码遍在染色质开放元件 (UCOE) 的第一序列;

编码启动子的第二序列;以及

编码BTK的第三序列。

28. 如权利要求27所述的载体,其中,所述第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。

29. 如权利要求27或28所述的载体,其中,所述启动子为BTK启动子。

30. 如权利要求27-29中任一项所述的载体,其中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。

31. 如权利要求27-30中任一项所述的载体,其中,所述第三序列为密码子优化的,以在人中表达。

32. 如权利要求31所述的载体,其中,所述第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。

33. 如权利要求27-32中任一项所述的载体,所述载体进一步包含B细胞特异性启动子。

34. 如权利要求33所述的载体,其中,所述B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。

35. 如权利要求33或34所述的载体,其中,所述B细胞特异性启动子为内源性启动子。

36. 如权利要求27-35中任一项所述的载体,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。

37. 如权利要求36所述的载体,其中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。

38. 如权利要求36所述的载体,其中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。

39. 如权利要求38所述的载体,其中,所述DNase超敏位点为DNase超敏位点1 (DHS1)、DNase超敏位点2 (DHS2)、DNase超敏位点3 (DHS3)、DNase超敏位点4 (DHS4) 和/或DNase超敏位点5 (DHS5)。

40. 如权利要求38或39所述的载体,其中,所述DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示

的序列。

41. 如权利要求37所述的载体,其中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。

42. 如权利要求41所述的载体,其中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。

43. 如权利要求42所述的载体,其中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9 (内含子4)、SEQ ID NO:10 (内含子5) 和/或SEQ ID NO:11 (内含子13) 中所示的序列。

44. 如权利要求36所述的载体,其中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4中所示的序列。

45. 如权利要求36所述的载体,其中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。

46. 如权利要求27-45中任一项所述的载体,其中,所述UCOE处于反向方向或正向方向。

47. 如权利要求46所述的载体,其中,所述UCOE处于正向方向。

48. 如权利要求27-47中任一项所述的载体,其中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。

49. 如权利要求27-48中任一项所述的载体,其中,所述细胞为B细胞。

50. 如权利要求27-48中任一项所述的载体,其中,所述细胞为髓系细胞。

51. 如权利要求27-48中任一项所述的载体,其中,所述细胞为造血干细胞。

52. 如权利要求51所述的载体,其中,所述细胞为CD34⁺造血干细胞。

53. 如权利要求36-52中任一项所述的载体,其中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。

54. 如权利要求27-53中任一项所述的载体,其中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。

55. 如权利要求54所述的多核苷酸,其中,所述BTK启动子上游的基因为BTK增强子。

56. 如权利要求55所述的多核苷酸,其中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。

57. 一种用于表达BTK的细胞,所述细胞包含:

多核苷酸,所述多核苷酸包含:

编码遍在染色质开放元件 (UCOE) 的第一序列;

编码启动子的第二序列;以及

编码BTK的第三序列。

58. 如权利要求57所述的细胞,其中,所述多核苷酸处于载体中。

59. 如权利要求57或58所述的细胞,其中,所述载体为慢病毒载体。

60. 如权利要求57-59中任一项所述的细胞,其中,所述细胞为B细胞。

61. 如权利要求57-59中任一项所述的细胞,其中,所述细胞为髓系细胞。

62. 如权利要求57-59中任一项所述的细胞,其中,所述细胞为造血干细胞。

63. 如权利要求57-59中任一项所述的细胞,其中,所述细胞为CD34⁺造血干细胞。

64. 一种促进有需要的受试者中的B细胞存活、增殖和/或分化的方法,所述方法包括:

向所述受试者给予如权利要求57-63中任一项所述的细胞,或向所述有需要的受试者

给予包含如权利要求1-26中任一项所述的多核苷酸或如权利要求27-56中任一项所述的载体的细胞；以及，任选地在给予所述细胞前将所述受试者鉴别为将从接受促进B细胞存活、增殖和/或分化的疗法中受益的受试者，和/或任选地对所述受试者或获得自所述受试者的生物样品中的B细胞存活、增殖和/或分化进行测量。

65. 如权利要求64所述的方法，其中，所述细胞来自所述受试者，其中通过向所述细胞中引入如权利要求1-26中任一项所述的多核苷酸或如权利要求27-56中任一项所述的载体来对所述细胞进行基因修饰。

66. 如权利要求64或65所述的方法，其中，所述给予通过过继细胞转移进行。

67. 如权利要求64-66中任一项所述的方法，其中，所述细胞为B细胞。

68. 如权利要求64-66中任一项所述的方法，其中，所述细胞为髓系细胞。

69. 如权利要求64-66中任一项所述的方法，其中，所述细胞为造血干细胞。

70. 如权利要求64-66中任一项所述的方法，其中，所述细胞为CD34+造血干细胞。

71. 如权利要求64-70中任一项所述的方法，其中，所述受试者为雄性。

72. 如权利要求64-71中任一项所述的方法，其中，所述受试者患有X连锁无丙种球蛋白血症 (XLA)。

73. 如权利要求64-72中任一项所述的方法，其中，对所述受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。

74. 如权利要求64-73中任一项所述的方法，其中，对所述受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。

75. 一种治疗、抑制或缓解有需要的受试者中的X连锁无丙种球蛋白血症 (XLA) 或与XLA相关的疾病症状的方法，所述方法包括：

向所述受试者给予如权利要求57-63中任一项所述的细胞，或向所述有需要的受试者给予包含如权利要求1-26中任一项所述的多核苷酸或如权利要求27-56中任一项所述的载体的细胞；以及，任选地将所述受试者鉴别为将从接受用于XLA或与XLA相关的疾病症状的疗法中受益的受试者，和/或任选地对所述受试者中的XLA进展的改善或与XLA相关的疾病症状的改善进行测量。

76. 如权利要求75所述的方法，其中，所述细胞来自受试者，其中，通过向所述细胞中引入如权利要求1-26中任一项所述的多核苷酸或如权利要求27-56中任一项所述的载体来对所述细胞进行基因修饰。

77. 如权利要求75或76所述的方法，其中，所述给予通过过继细胞转移进行。

78. 如权利要求75-77中任一项所述的方法，其中，所述细胞为B细胞。

79. 如权利要求75-77中任一项所述的方法，其中，所述细胞为髓系细胞。

80. 如权利要求75-77中任一项所述的方法，其中，所述细胞为造血干细胞。

81. 如权利要求75-77中任一项所述的方法，其中，所述细胞为CD34+造血干细胞。

82. 如权利要求75-81中任一项所述的方法，其中，所述受试者为雄性。

83. 如权利要求75-82中任一项所述的方法，其中，对所述受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。

84. 如权利要求75-83中任一项所述的方法，其中，对所述受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。

用于XLA基因疗法的优化的慢病毒载体

以引用的方式将任意优先权申请并入

本申请要求2017年4月21日提交的美国临时专利申请No.62/488,523的优先权的权益。将上述申请的全部公开内容通过引用以其整体明确地并入。

对联邦基金的引用

本发明是在由NIH国立过敏与传染病研究所授予的基金号AI084457的支持下完成的。

对序列表的引用

将本申请与电子格式的序列表一起提交。将序列表作为标题为Sequence Listing SCRI.148W0.txt的文件提供,创建于2018年4月17日,大小为140kb。以引用的方式将电子格式的序列表中的信息以其整体并入本文。

技术领域

本发明的方面涉及用于治疗、抑制或缓解受试者中的X连锁无丙种球蛋白血症 (X linked agammaglobulinemia,XLA) 的组合物和方法,所述受试者已被鉴别或选择为将从治疗、抑制或缓解XLA的疗法中受益的受试者。示例性的方面包括用于恢复或增加Bruton酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase,BTK) 表达的基因疗法的构建体和方法。

背景技术

X连锁无丙种球蛋白血症 (XLA) 是由Bruton酪氨酸激酶 (BTK) 基因突变引起的罕见X连锁遗传性病症。这些突变导致患病个体无法生成成熟B细胞,并且这些B细胞无法响应B细胞抗原受体的接合以及其它细胞信号。受影响的男性/雄性无法产生针对病原体激发的保护性抗体应答,并最终死于病毒或细菌感染。目前的疗法在过去的50多年中没有改变,其由免疫球蛋白替代 (immunoglobulin replacement) 和靶向抗微生物剂构成。尽管有这种疗法,但XLA受试者继续遭受慢性感染,并处于增加的一系列病态或危及生命的并发症风险中。在罕见的情况下,已经用无调理 (conditioning) 或使用降低强度调理的干细胞移植对XLA受试者进行治疗,其具有不同结果。显然需要更多的用于抑制、治疗或缓解XLA的疗法。

发明内容

基于候选启动子、绝缘子和增强子元件以及人密码子优化的BTK cDNA构建体的迭代设计和测试,已制造了经鉴别的新的基于慢病毒 (LV) 的载体构建体并在本文的替代方式中进行了描述,所述构建体介导了衍生自 (鼠或人) 造血干细胞的B细胞和髓系细胞中的持续BTK表达。在向BTK缺陷宿主中离体转导及移植后,这些替代方式已显示出令人惊讶地持续表达BTK并挽救了B细胞发育。如本文的示例性替代方式中的一种所示,本文所示的构建体利用截短的遍在染色质开放元件 (ubiquitous chromatin opening element,UCOE) (衍生自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座内的内含子区域的保守增强子元件),来驱动人密码子优化的BTK cDNA的表达。

在小鼠基因疗法实验中使用该构建体的LV载体在初次移植接受者和二次移植接受者

中介导了B细胞和髓系细胞中持续的BTK表达,并挽救了B细胞的发育和功能,并且未有病毒毒性的证据。因此,该构建体代表用于基因疗法治疗、抑制或缓解人XLA的独特LV载体。

在第一方面,提供了用于持续的Bruton酪氨酸激酶(BTK)表达的多核苷酸,所述多核苷酸包含:编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,UCOE为2kb、1.5kb、1kb、0.75kb、0.5kb或0.25kb,或者由任意两个上述值限定的范围之间的任意数量的千碱基。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,BTK启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,第三序列为密码子优化的,以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述启动子为B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述多肽进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域是与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在第二方面,提供了用于在细胞中持续表达BTK的载体,所述载体包含:编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列、以及编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,第三序列为密码子优化的,以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体进一步包含B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包含B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,所述B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少

一个内含子区域。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述载体是B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在第三方面,提供了用于表达BTK的细胞,其中,所述细胞包含多核苷酸,所述多核苷酸包含编码UCOE的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸处于载体中。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在第四方面,提供了促进或增加有需要的受试者中的B细胞存活、增殖和/或分化的方法,其中,所述方法包括:向所述受试者给予本文任一替代方式所述的细胞,或者向所述有需要的受试者给予包含本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体的细胞;以及,任选地在给予所述细胞前将所述受试者鉴别或选择为将从接受将促进B细胞存活、增殖和/或分化的疗法中受益的受试者,和/或任选地在接受所述细胞给予后对所述受试者中或获得自所述受试者的生物学样品中的B细胞存活、增殖和/或分化进行测量。在一些替代方式中,所述细胞来自受试者,并且其中,通过向细胞中引入本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体来对细胞进行基因修饰。在一些替代方式中,给予通过过继细胞转移进行。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述受试者为男性/雄性。在一些替代方式中,所述受试者患有XLA。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。在一些替代方式中,

0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在第五方面,提供了治疗、抑制或缓解有需要的受试者中的X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)或与XLA相关的疾病症状的方法,其中,所述方法包括:向所述受试者给予本文任一替代方式所述的细胞,或者向所述有需要的受试者给予包含本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体的细胞;以及,任选地将所述受试者鉴别或选择为将从接受用于XLA或与XLA相关的疾病症状的疗法中受益的受试者,和/或任选地对所述受试者中XLA进展的改善或与XLA相关的疾病症状的改善进行测量。在一些替代方式中,所述细胞来自所述受试者,其中,通过向细胞中引入本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体来对细胞进行基因修饰。在一些替代方式中,给予通过过继细胞转移进行。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述受试者为男性/雄性。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

附图说明

图1示出了优化的用于XLA的基因递送平台。

图2示出了对用于XLA基因疗法的慢病毒载体进行优化的方法。

图3示出了用于治疗计划的临床前模型的方法。

图4示出了淋巴细胞亚群(subsets)中的BTK表达:来自移植有表达人BTK的慢病毒载体0.7UCOE或0.7UCOE I-4,5的XLA小鼠的骨髓(BM)、脾(SP)和腹膜液(PF)的B细胞、单核细胞和中性粒细胞中的BTK表达,通过流式细胞术进行测量并表示为对照BTK⁺群的百分比。

图5示出了对B细胞发育和功能的挽救。来自初次接受者的B亚群中的BTK表达分析。脾B细胞亚群(右子图)按照从最不成熟亚群到更成熟亚群的顺序表示:从早期B细胞发育(pre B细胞、pro B细胞、未成熟B细胞和成熟B细胞)到晚期B细胞发育(过渡型1(T1)、过渡型2(T2)、边缘区前体(MZP)、边缘区(MZ)和滤泡成熟(FM))。

图6示出了载体0.7UCOE.BTKp.BTK和0.7UCOE I-4,5BTKp.BTK均挽救了B细胞发育和功能。(A)脾B细胞的绝对计数(右子图)。(B)响应IgM刺激的B细胞增殖。用可溶性IgM对初始B细胞进行刺激。示出了归一化之WT空白对照的72小时增殖中的BTK+B细胞的百分比。

图7示出了对T依赖性抗原免疫的应答和自身抗体产生。(A)通过ELISA对来自处于Alum中的NP-CGG免疫的处理小鼠的血清中NP特异性IgG水平的累积数据进行检测,并相对于IgG标准品进行测量。ELISA用于检测初次免疫之前(-)和之后(10)以及再激发或二次免疫后(20)的高亲和力NP-IgG水平。(B)在实验结点时通过ELISA对来自处理小鼠的血清中的抗dsDNA IgG和抗dsDNA IgG2c的水平进行测量,以吸光度读数(OD450)表示。将来自自身免疫WAS^{-/-}嵌合小鼠的血清用作阳性对照(黑色三角形)。

图8示出了每细胞病毒整合数。(A)初次移植小鼠中总BM以及脾CD43⁻(B细胞)与CD43⁺(非B)细胞中每细胞平均病毒整合数,通过qPCR进行测量。(B)初次移植小鼠中BTK+B细胞百

分比除以CD43-脾B细胞群中的平均病毒整合数。数据表示来自6个独立实验的平均值±SEM, n=9 (WT空白对照)、10 (XLA空白对照)、16 (0.7UCOE.BTKp)、14 (0.7UCOE.INT4,5BTKp)。

图9示出了初次接受者小鼠中四种LV构建体的表达谱以及对B细胞发育和功能的挽救。(9A) 具有RRL骨架的慢病毒构建体示意图,所述构建体用于在鼠细胞中表达人BTK,并具有BTK启动子(BTKp)、1.5kb遍在染色质开放元件(UCOE)或Eμ增强子、以及密码子优化的人BTK cDNA(co)。(9B) 通过流式细胞术对来自基因疗法处理的小鼠的骨髓、脾、腹膜的B细胞和髓系细胞中的BTK标记进行测定,并以BTK+群的百分比示出。(数据代表来自10个独立实验的平均值±SEM, n=14 (WT空白对照)、12 (K0空白对照)、5 (BTKp)、24 (1.5kb.UCOE.BTKp)、18 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、21 (Eμ.BTKp)。(9C-9E) 针对指示B细胞亚群的表面标记物对骨髓、脾和腹膜中的B细胞(B220+)进行染色,并分析活淋巴细胞的计数或百分比:(9C) 早期B细胞发育:Pro-B (CD43+, IgM-)、Pre-B (CD43-, IgM-, IgD-)、未成熟 (CD43-, IgM+, IgD-) 以及成熟 (CD43-, IgM+, IgD+) ; (9D) 晚期B细胞发育:过渡型T1 (CD24hi、CD21-)、过渡型T2 (CD24hi、CD21int)、边缘区/前体MZ/MZP (CD24hi、CD21hi) 和滤泡性FM (CD24int、CD21int) ; (9E) 腹膜B细胞:B2 (B220hi)、B1b (B220lo、CD5-) 和B1a (B220lo、CD5+)。数据代表10次独立实验的平均值±SEM, n (BM、SP、PE) = 11、13、14 (WT空白对照); 10、11、10 (K0空白对照); 5、5、5 (BTKp); 20、21、22 (UCOE.BTKp); 14、14、17 (UCOE.BTKp.co); 18、19、20 (Eμ.BTKp)。(9F) 将来自处理小鼠的总脾细胞用仅培养基、抗鼠IgM、LPS或PMA/离子霉素进行刺激,并通过掺入3H-胸苷测量增殖,表示为由3个重复孔平均而来的每分钟计数(cpm)。数据表示来自5个独立实验的平均值±SEM, n=10 (WT空白对照)、7 (K0空白对照)、5 (BTKp)、13 (1.5kbUCOE.BTKp)、9 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、10 (Eμ.BTKp)。(9G-9H) 通过ELISA对来自处理小鼠的血清中的总血清IgG (9G) 和IgM (9H) 进行测量。数据代表来自4个独立实验的平均值±SEM, n=9 (WT空白对照)、10 (K0空白对照)、2 (BTKp)、19 (1.5kb.UCOE.BTKp)、14 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、16 (Eμ.BTKp)。(9I) 来自用处于Alum中的NP-CGG免疫的处理小鼠的血清中的NP特异性IgG水平,通过ELISA进行测量并相对于IgG标准品进行表示。ELISA用于检测免疫前(-)和免疫后(+),以及随后的再激发(++)后的低亲和力(Supp)和高亲和力(i) NP-IgG水平。数据表示来自5个独立实验的平均值±SEM, n=9 (WT空白对照)、10 (K0空白对照)、2 (BTKp)、19 (1.5.UCOE.BTKp)、14 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、16 (Eμ.BTKp)。在指定的实验组和K0空白对照组的总B细胞或B细胞亚群之间,***P<.001;**P=.001-.01;*P=.01-.05。

图10示出了经Eμ.BTKp基因疗法处理的小鼠发展出广谱特异性IgG自身反应性抗体(broad specificity IgG autoreactive antibodies)。在任何免疫之前,通过ELISA对来自处理小鼠的血清中的抗dsDNA IgG (a) 水平进行测量,并以吸光度读数(OD450)进行描述。数据代表来自10个独立实验的平均值±SEM, n=18 (WT空白对照)、16 (K0空白对照)、6 (BTKp)、30 (1.5kb.UCOE.BTKp)、18 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、29 (Eμ.BTKp)、2 (WASp对照)。(b) 通过ELISA从Eμ.BTKp小鼠中对抗-dsDNA IgG亚类IgG2c和IgG3进行测量(n=23)。(c) 通过ELISA对来自9只Eμ.BTKp处理小鼠的血清中的抗dsDNA IgG的亚类进行测量。在指定的实验组之间,***P<.001;**P=.001-.01;*P=.01-.05。

图11示出了1.5kbUCOE.BTKp和1.5kbUCOE.BTKp.co在初次接受者和二次接受者中以较低的拷贝数引起持续的BTK表达。通过流式细胞术对来自二次移植小鼠的脾粒细胞(CD11b+, GR1hi)就其BTK+细胞%进行评价。(a) 二次移植接受者中BTK+粒细胞%的图表分析。数据

表示来自3个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n=3$ (WT空白对照)、2 (KO空白对照)、3 (BTKp)、8 (1.5.UCOE.BTKp)、7 (E μ .BTKp)。(b) BTK+粒细胞百分比除以来自初次移植小鼠的脾细胞中的平均病毒整合数。(c-d) 通过qPCR测量的来自初次移植小鼠和二次移植小鼠的骨髓(c)和脾细胞(d)中的每细胞平均病毒整合。数据代表来自8次初次移植实验和3次二次移植实验的平均值 $\pm$ SEM, n (初次与二次)=5、3 (BTKp); 18、8 (UCOE.BTKp); 10、1 (UCOE.BTKp.co); 18、7 (E μ .BTKp)。在指定的实验组之间, *** $P<.001$; ** $P=.001-.01$; * $P=.01-.05$ 。

图12示出了在用0.7kb UCOE.BTKp.co LV处理的基因疗法小鼠中,B细胞的发育以及受影响的造血谱系中BTK表达的恢复。在移植后16-25周时对BTK+细胞的比例和B细胞亚群的数值重建(numerical reconstitution)进行评估。(a) 具有RRL骨架的慢病毒构建体示意图,所述构建体表达密码子优化的人BTK并具有0.7kb遍在染色质开放元件(UCOE)。(b-c) 来自基因疗法处理组的骨髓(b)和脾(c)淋巴细胞亚群(中性粒细胞、单核细胞、B细胞和T细胞)中BTK+细胞的百分比,通过流式细胞术进行测定。数据代表来自7个独特实验的平均值 $\pm$ SD, $n=13$ (WT空白对照)、12 (KO空白对照)、36 (0.7kb.UCOE.BTKp.co)。(d) 脾中性粒细胞(CD11b+GR1+)、单核细胞(CD11b+)、B细胞(B220+)和T细胞(CD4+CD8+)中BTK表达的代表性流式图,(e) 腹膜B细胞(CD19+)以及B细胞亚群B1a (CD5-CD43+)、B1b (CD5+CD43+)和B2 (CD5-CD43-)中的BTK表达。来自7个独特实验的具有SD的代表性数据, $n=2$ (WT空白对照)、2 (KO空白对照)、8 (0.7kb.UCOE.BTKp.co)。(f) 通过亚群中Btk表达对B细胞发育的挽救,通过流式细胞术进行测量。早期B细胞发育:Pro-B (CD43+、IgM-)、Pre-B (CD43-、IgM-、IgD-)、未成熟(CD43-、IgM+IgD-)和成熟(CD43-、IgM+、IgD+) ;晚期B细胞发育:过渡型T1 (CD24hi、CD21-)、过渡型T2 (CD24hi、CD21int)、边缘区/前体MZ/MZP (CD24hi、CD21hi)和滤泡FM (CD24int、CD21int)。来自7个独立实验的累积数据, $n=13$ (WT空白对照)、12 (KO空白对照)、36 (0.7kb.UCOE.BTKp.co)。(g-h) 来自BM(g)和脾(h)中的B细胞亚群的总细胞计数。(i) 以占腹膜液中总淋巴细胞群的百分比示出的B细胞亚群。数据代表2个独立实验的平均值 $\pm$ SD, $n=4$ (WT空白对照)、4 (KO空白对照)、11 (0.7kbUCOE.BTK.co)。*代表KO空白对照与0.7kb.UCOE.BTK.co之间的显著差异。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:*** $P<.001$; ** $P=.001-.01$; * $P=.01-.05$ 。

图13示出了初次接受者中0.7.UCOE.Bkp.co LV基因疗法后B细胞功能的重建。骨髓移植后16-25周后的B细胞功能分析。棒表示平均值 $\pm$ SD。(a) 与抗小鼠IgM抗体、LPS或P/I孵育后72小时,经历 ≥ 1 次细胞分裂的B细胞(CD43-脾细胞)的百分比(通过CFSE稀释进行测量并通过流式细胞术读出)。来自一项独立实验的代表性数据; $n=4$ (WT空白对照)、3 (KO空白对照)和5 (0.7.UCOE.BTKp.BTK.co)。(b) IgM刺激后72小时,流式细胞术分析显示CFSE标记的B细胞(CD43-脾细胞),在活的和B220+群上进行门控(gated)(在流式图中工作)。(c) 来自用处于Alum中的NP-CGG免疫的处理小鼠的血清中的高亲和力NP特异性IgG水平,通过ELISA进行测量。在免疫前(-)和免疫后(+)以及再激发后(++)测量所述值。数据代表7次独立实验,初次免疫(+)中 $n=11$ (WT空白对照)、10 (KO空白对照)、13 (0.7kb.UCOE.BTKp.co),再激发(++)中, $n=3$ (WT空白对照)、3 (KO空白对照)、3 (0.7kb.UCOE.BTKp.co)。免疫的初次接受者血清中的(d)总IgG和IgM以及(e)抗dsDNA抗体水平,在移植后16-25周通过ELISA进行测定。数据来自7个独立实验; $n=10$ (WT空白对照)、8 (KO空白对照)和26 (0.7.UCOE.BTKp.BTK.co)。将来自2个自身免疫WAS嵌合体、具有高血清抗DNA抗体的血清作为阳性对照运行(e)。使用

单向ANOVA: Sidak检验确定P值: *** $P < .001$; ** $P = .001 - .01$; * $P = .01 - .05$ 。

图14示出了经基因疗法处理的骨髓细胞的连续传代至二次TBK-/-接受者中后, VCN和BTK表达得以维持。通过流式细胞术, 对来自初次接受者的BM移植后16周的二次接受者的BM (a) 和脾 (b) 的受影响谱系内表达BTK+细胞百分比进行测量。数据代表两个单独实验; $n = 4$ (WT空白对照)、4 (KO空白对照)、19 (0.7UCOE.BTKp.BTKco)。(c) 病毒拷贝数 (VCN), 通过提取自初次接受者的总BM以及脾B (CD43-) 和非B (CD43+) 细胞中的gDNA的qPCR进行测定。(d) 来自二次接受者小鼠的总BM和脾细胞的VCN; 每个点代表单只动物。数据来自初次接受者 ($n = 21$, 0.7.UCOE.BTKp.BTK.co) 和二次接受者 ($n = 11$, 0.7.UCOE.BTKp.BTK.co) 的7个独特实验。(e) 关于甲基化, 对来自初次接受者和二次接受者的脾gDNA进行评估。对于初次接受者, $n = 2$ (BTKp.BTK)、5 (1.5kb UCOE.BTKp.BTK)、6 (E μ .BTKp.BTK.)、6 (0.7kb.UCOE.BTKp.co)。对于二次接受者, $n = 4$ (1.5kb.UCOE.BTKp.BTK) 和6 (0.7UCOE.BTKp.co)。在所有子图中, 示出了平均值 $\pm$ SD值; 比较0.7.UCOE.BTKp.BTK.co与KO空白对照平均值的P值。使用单向ANOVA: Sidak检验确定P值: *** $P < .001$; ** $P = .001 - .01$; * $P = .01 - .05$ 。

图15示出了0.7UCOE.BTKp.co引起XLA CD34细胞中持续的BTK表达和较低的拷贝数。用0.7UCOE.BTKp.co以不同的感染复数 (MOI) 对XLACD34细胞和对照CD34细胞进行转导, 并在体外培养15天。(a) 健康和XLA CD34细胞的慢病毒转导方案的示意图。在补充有100ng人TPO、SCF和Flt3的SCGM培养基中刺激细胞48小时。将细胞用0.7UCOE.BTKp.co转导, 并培养生长15天。在第15天, 对细胞进行关于BTK表达和VCN的分析。(b) 以不同MOI转导后15天的XLA患者CD34细胞中BTK染色的代表性流式图。(c) 在24hr转导后转导细胞的活力, 通过流式细胞术进行测定。(d) 病毒拷贝数 (VCN), 通过从培养15天后收集的总细胞中提取的gDNA的qPCR进行测定。数据代表来自在重复孔中进行的3个独特实验的平均值 $\pm$ SD。每个点代表健康或XLA的个体供体。

图16示出了BTK启动子模拟小鼠中BTK的内源性表达模式。(a-b) 从野生型小鼠中收集骨髓、脾、腹膜洗液 (peritoneal wash)、外周血和胸腺, 并就B细胞标记物、髓系细胞标记物、T细胞标记物和NK细胞标记物、胞内BTK, 对细胞进行染色, 并在流式细胞仪上进行读取。如图例中所概述的, 用符号的形状指明来自各种组织的样品。显示了每个亚群的BTK+细胞百分比 (a), 以及BTK+细胞的中位荧光强度 (b)。(c) 具有RRL骨架、E μ 增强子和人BTK cDNA的慢病毒构建体的示意图, 所述构建体处于B29启动子 (上子图) 或内源性BTK启动子BTKp (下子图) 的控制下。(d-e) 从E μ .B29或E μ .BTKp基因疗法处理的KO小鼠中收集骨髓细胞、脾细胞和腹膜细胞, 并对所述细胞就B细胞 (CD11b-、B220+)、髓系细胞 (CD11b+) 和T细胞 (CD11b-、CD3+) 的标记物, 胞内BTK进行染色, 并通过流式细胞术进行分析。(d) BTK+细胞百分比。(e) 在指定的细胞群中BTK染色的中位荧光强度。数据代表两次独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n = 4$ (E μ B29) 和 $n = 5$ (E μ BTKp)。在E μ .B29和E μ .BTKp之间, *** $P < .001$; ** $P = .001 - .01$; * $P = .01 - .05$ 。

图17示出了 (a) 在BTK启动子控制下具有E μ 增强子和人BTK cDNA (野生型或经密码子优化的) 以及连接T2A的GFP的慢病毒构建体的示意图。(b) 用BTK-GFP或coBTK-GFP构建体对鸡BTK-/-DT40细胞进行转导; 直方图示出了GFP和BTK表达。(c) 将经BTK-GFP和coBTK-GFP转导的细胞用Indo-1 Ester AM荧光染料染色并用抗IgM刺激; 通过流式细胞术对钙动员进行监测。

图18示出了 (a) 在来自基因疗法处理的KO小鼠的外周血B细胞和髓系细胞中BTK表达的代表性图(通过流式细胞术)。(b) 通过流式细胞术对来自基因疗法处理的小鼠的骨髓、脾、腹膜的B细胞和髓系细胞中的BTK标记进行测定,并示出了BTK+细胞的中位荧光强度。(数据代表来自10个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n=14$ (WT空白对照)、12 (KO空白对照)、5 (BTKp)、24 (1.5kb.UCOE.BTKp)、18 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、21 (E μ .BTKp)。(c) 来自经基因疗法处理的小鼠的骨髓的代表性流式细胞术图,以早期B细胞发育的标记物进行染色。(d) 图表描绘了按照成熟度减小的Hardy分数(Hardy fractions)的B细胞百分比:Fr I (IgMlo,IgDhi)、Fr II (IgMhi,IgDhi)、Fr III (IgMhi,IgDlo),每个环代表一只小鼠,并且在图表内部示出了每个部分中平均B细胞百分比。数据表示来自11个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n=18$ (WT空白对照)、14 (KO空白对照)、7 (BTKp)、43 (1.5kb.UCOE.BTKp)、18 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、23 (E μ .BTKp)。(e-f) 通过ELISA对用处于Alum中的NP-CGG免疫前(-)和免疫后(+)的处理小鼠血清中的NP特异性IgG水平进行测定,并将其相对于IgG标准品进行表示。示出了所有组(e)和个体小鼠(f)的低亲和力NP特异性抗体。数据代表来自5个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n=9$ (WT空白对照)、10 (KO空白对照)、2 (BTKp)、19 (1.5.UCOE.BTKp)、14 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、16 (E μ .BTKp)。(g) 来自用TNP-Ficol免疫的处理小鼠的血清中TNP特异性IgM的水平,通过ELISA测量并相对于IgM标准品进行表示。数据代表来自3个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, $n=4$ (WT)、6 (WT空白对照)、4 (KO)、3 (KO空白对照)、14 (UCOE.BTKp)。在指定的实验组和KO空白对照组之间,*** $P<.001$;** $P=.001-.01$;* $P=.01-.05$ 。

图19示出了 (a) 与对照相比,具有高抗dsDNA IgG滴度和低抗dsDNA IgG滴度的E μ .BTKp初次移植小鼠的存活曲线。(b) 在E μ .BTKp初次移植小鼠中BTK+细胞的BTK MFI和抗dsDNA IgG滴度(分别通过流式细胞术和ELISA测量)的相关性。

图20示出了通过自身抗原阵列对来自WT空白对照(4)、1.5kb.UCOE.BTKp(4)和E μ .BTKp(8)小鼠的血清中对88种鼠抗原有反应性的IgM和IgG的水平进行分析。每行的数据经过z转换,并且将Z分数用从最低反应性(红色)到最高反应性(蓝色)的比色表显示。

图21示出了B细胞的发育以及涉及酶BTK的途径。

图22示出了最优BTK LV基因疗法载体的开发。

图23示出了含有BTK内源性启动子的LV载体。如所示,2kb CBX3-HNRPA2B1元件-UCOE 1.5-消除了A2启动子,但保留了处于反向方向的CBX3。

图24示出了含有BTK内源性启动子的LV载体的开发。如所示,E μ 与B细胞中较高水平的Btk MFI有关。

图25示出了来自含有Btk内源性启动子的LV载体的FACS分析的结果。

图26示出了获得自处理小鼠的脾细胞的髓系细胞中的BTK表达。

图27示出了B细胞中BTK表达的结果,其中表达BTK的LV包含B细胞特异性启动子E μ .B29。

图28示出了由包含启动子区域BTKpro.BTK的慢病毒载体而来的B细胞和单核细胞中的BTK表达。

图29示出了由包含启动子区域BTKpro.BTK和遍在染色质开放元件(UCOE)的慢病毒载体而来的B细胞和单核细胞中的BTK表达。

图30示出了由包含启动子区域E μ .BTKpro.BTK(BTK启动子)和huBTK的慢病毒载体而来

的B细胞和单核细胞中的BTK表达。

图31示出了在骨髓、脾和腹膜的B细胞和髓系细胞中数种BTK启动子的BTK表达谱。

图32示出了在骨髓、脾和腹膜的B细胞和髓系细胞中数种BTK启动子的BTK表达谱。使用的载体是:WT空白对照、DKO空白对照、BTKp、UCOE BTKp、UCOE.BTKp.co和EμBTKp。

图33示出了成熟B细胞亚群的B细胞发育恢复。黑色着色的区域示出了更成熟的外周B细胞群。

图34示出了B细胞群(骨髓、脾和腹膜)的B细胞发育数值重建。如所示,数据总结了来自每载体多达40只接受者小鼠以及类似数量对照的发现。

图35示出了表达四种不同类型的慢病毒载体(空白对照wt、DKO空白对照、具有UCOE.BTKp的慢病毒载体、和具有Eμ.BTKp的慢病毒载体)的细胞中的B细胞增殖。活体染料稀释与Btk染色显示,在实验中UCOE引起与野生型小鼠相当类似的结果。

图36示出了具有下列载体的细胞中的B细胞增殖:WT、WT空白对照、DKO、DKO空白对照、UCOE.BTKp和Eμ.BTKp。

图37示出了关于具有下列载体的细胞的IgM和IgG产生的结果:WT、WT空白对照、DKO、DKO空白对照、BTKp、UCOE.BTKp和Eμ.BTKp。底部子图示出了关于具有下列载体的细胞的T非依赖性免疫应答:WT、WT空白对照、DKO、DKO空白对照、UCOE.BTKp、WT-0和KO-0。值得注意的是,EμIgG水平实际上略高于WT空白对照接受者。

图38示出了关于具有下列载体的细胞的T依赖性免疫应答:WT、WT空白对照、DKO、DKO空白对照、BTKp、UCOE.BTKp、UCOE.BTKp.co、WT-0、Eμ.BTKp和KO-0。

图39示出了T依赖性免疫:亲和力成熟。个体UCOE动物和对照的亲和力成熟产生相当类似的结果。

图40示出了自身抗体产生的证据。

图41用细胞的热图(heat map)示出了自身抗体产生的证据,所述细胞具有载体WT空白对照、UCOE.BTKp和Eμ.BTKp。进行此项以测试IgM和IgG的产生。

图42示出了抗体水平以及小鼠存活百分比与BTK表达的相关性。

图43示出了二次接受者小鼠中具有BTK表达的中性粒细胞中的长期干细胞标记。

图44示出了在具有下列载体的初次接受者和二次接受者中关于VCN的长期干细胞标记的证据:空白对照、BTKp、UCOE.BTKp、UCOE.BTKp.co、以及Eμ.BTKp。

图45示出了LV疗法对长期存活的影响。

图46示出了BTK启动子LV中替代增强子元件的测试总结。

图47示出了0.7UCOE.BTKp和0.7UCOE.IE.BTKp挽救BTK表达以及脾B细胞计数。

图48示出了0.7UCOE.BTKp和0.7UCOE.IE.BTKp挽救B细胞功能。

图49示出了相比0.7UCOE,0.7UCOE.IE展现改善的安全性。

图50示出了具有DNase超敏位点的新BTK构建体。

图51示出了DNase超敏位点的鉴别。

图52示出了进行细胞中BTK表达评价的构建体的示意图。

图53示出了DHS构建体与0.7UCOE及0.7UCOE.IE的体内比较。

图54示出了移植后15周,关于B细胞、T细胞、单核细胞和中性粒细胞的外周血淋巴细胞分布。还在具有下列载体的细胞中的淋巴细胞亚群中证实了BTK重建:未辐照的KO、KO空白

对照、0.7UCOE、0.7UCOE.IE、0.7UCOEDHS4、0.7UCOE.DHS12、0.7UCOE.DHS124、0.7UCOE1-5、WT空白对照和未辐照的WT。

图55示出了具有下列载体的细胞中的BTK实验总结：K0空白对照、0.7UCOE、0.7UCOE.IE、0.7UCOEDHS4、0.7UCOE.DHS12、0.7UCOE.DHS124、0.7UCOE1-5和WT空白对照。

图56示出了在具有携带UCOE元件的载体或携带DHS4元件的载体的细胞中的BTK表达。

图57示出了具有下列载体的细胞的BTK表达实验：0.7UCOE.BTKp.coBTK、K0空白对照、0.7UCOE、DHS4、DHS1-5和WT空白对照。

图58示出了移植具有下列载体的细胞后12周的外周血淋巴细胞分布：K0空白对照、WT空白对照、0.7UCOE、DHS4和DHS1-5。

图59示出了具有下列载体的B细胞、单核细胞和中性粒细胞的6周和12周外周血淋巴细胞分布：未辐照的K0、K0空白对照、0.7UCOE、DHS4、DHS1-5、WT空白对照和未辐照的WT。

图60示出了具有下列载体的B细胞、单核细胞和中性粒细胞的6周和12周BTK表达：未辐照的K0、K0空白对照、0.7UCOE、DHS4、DHS1-5、WT空白对照和未辐照的WT。

图61示出了细胞移植后的12周放血 (bleed) 后，BTK在细胞亚群中表达。

图62示出了用于原coBTK (密码子优化的BTK) 与新coBTK的体外比较的实验设置。

图63示出了体外比较—TBK谱系阴性细胞，体积匹配病毒 (第7天BTK染色)。

图64示出了接受不同浓度用于BTK表达的慢病毒载体的细胞中BTK表达的百分比。使用的载体如下：K0空白对照、0.7UCOE、DHS4、0.7UCOE.newcoBTK、0.7UCOE.newcoBTK和WT脾。

图65示出了原coBTK与新coBTK的体内比较。

图66示出了用于优化UCOE元件以增加或增强BTK表达的额外技术。

图67示出了用于优化UCOE元件以增加或增强1.5kb UCOE的BTK表达的额外技术。

图68示出了0.7UCOE.BTKp vs.0.7UCOEFwd.BTKp：用匹配体积病毒进行的体外测试。

图69示出了关于完成临床BTK LV构建体的概述。

图70示出了用于完成临床BTK LV构建体以及针对密码子优化BTK的计划的最终体内测试的概述。

图71示出了经批准的XLA患者干细胞单采 (apheresis) 的表格。

图72示出了处于NSG的人嵌合体。

图73示出了骨髓和脾的B细胞的人淋巴细胞重建。

图74示出了植入的XLA干细胞 (脾) 的表型，例如IgD和IgM的表达。

图75示出了植入的XLA干细胞 (脾) 的表型，例如CD24和CD38的表达。

图76示出了B细胞发育阻滞 (BM)，其表明在XLA组和健康组之间存在同等数量的ProB细胞%。

图77示出了B细胞发育阻滞 (BM)，其表明与健康对照相比，患有XLA的患者具有显著较高的pre-B细胞%。

图78示出了B细胞发育阻滞 (BM)，其表明患有XLA的患者具有阻滞于Pre B细胞阶段的细胞。这些Pre B细胞能够迁移到脾中。CD179a/CD179b替代轻链通过二硫键键合至与信号转导子CD79a/CD79b异二聚体关联的膜结合Ig mu重链以形成B细胞受体样结构，即所谓的preB细胞受体 (preBCR)。

图79示出了B细胞发育阻滞 (BM)。XLA B细胞的发育阻滞于Pre B细胞阶段。Pre B细胞

能够迁移到脾。

图80示出了B细胞通过Ca²⁺流通起作用。但是,与对照细胞相比,XLA B细胞无法流通(flux) IgM。

图81示出了B细胞发育中的途径阻滞,其中XLA导致B细胞发育阻滞于Pre B细胞阶段。

图82示出了来自实验的结果和结论的概述。

图83示出了概述干细胞的人慢病毒转导的图解。

图84示出了概述人HSC临床前建模的图解。

图85示出了干细胞的人慢病毒转导的结果。如所示,相比DHS4,0.7 UCOE.BTKp.BTK具有70%的活力。

图86示出了用XLA P2在D15的BTK表达。如所示,在非选择性环境中,0.7 UCOE.BTKp.BTK与DHS4相比而言引起较高的BTK表达。

图87示出了来自实验和跟进实验的结论的概述。

图88示出了关于人HSC的临床前建模。对于这些实验,用空白对照载体或载体UCOE.BTKp.co对CD34+细胞进行转导。

图89示出了人HSC的临床前建模。用载体UCOE.BTKpro.co-opBTK (UCOE.BTKp.co) GFP对细胞进行转导。

图90示出了用于转导NSG接受者小鼠的实验方法的图解。

图91示出了来自转化的接受者小鼠的结果:GFP表达%、在骨髓和脾的细胞中的病毒拷贝表达、以及在B细胞和髓系细胞中的表达。

图92示出了通过比较小鼠和人BTK基因序列以及用于BTK表达测试的所有载体对保守非编码序列进行鉴别的分析。所鉴别和定位的区域位于BTK启动子内,在BTK启动子上游以及与邻近基因(BTK增强子或BTKe)相近,在内含子4、内含子5和内含子13以及内含子1的部分中。

图93示出了来自将1.5kb UCOE截短至0.7kb以及鉴别可改善慢病毒构建体的滴度和BTK表达的潜在DNA增强子元件的结果。(a) 将1.5kb遍在染色质开放元件(UCOE)截短至0.7kb。UCOE元件跨越管家基因CBX3和HNRPA2B1的转录方向相反的启动子区域(divergently transcribed promoter regions)中的大的富含CpG的区域,并且传统上已被多个团体截短至1.5-2.2kb的区域用于蛋白表达构建体。此处使用的1.5kb UCOE于CBX3的外显子1开始,跨过CBX3替代外显子1。将该区域截短至0.7kb,去除了Alt.Ex.1下游的区域。(b) 从ENCODE数据库对来自BTK基因内含子区域的DNaseI超敏位点(DHS)进行鉴别,并使用UCSC人基因组浏览器Feb.2009 (GRCh37/hg19) 组件进行可视化。鉴别出五个DHS,并将其依次标记为DHS1、DHS2、DHS3、DHS4和DHS5(蓝色框)。ENCODE基因组分段(ENCODE Genome Segmentation)在DHS4周围鉴别出预测的增强子元件(黄色框)。将外显子以黑框示出。序列长度记录在每个DHS下方。将这些DHS序列的各种组合克隆到0.7UCOE.BTKp.coBTK构建体中,并进行体外测试(数据未示出)。(c) 进行了鼠(TBK)谱系阴性细胞的体外转导实验,用以比较两个版本的密码子优化BTK的BTK表达水平:coBTK(图1-2)和Staal等发表的密码子优化BTK(Leukemia 2010),在此表示为co2BTK。代表性流式图示出了转导后7天时的BTK表达。(d) 基于DHS构建体的体外测试以及coBTK与co2BTK的比較的结果,鉴别了四种构建体用于体内测试。此处示出了慢病毒构建体的图解,所述慢病毒构建体表达密码子优化的人BTK

(coBTK或co2BTK)版本之一,并具有RRL骨架、0.7kb的遍在染色质开放元件(0.7UCOE),同时具有或不具有0.7UCOE元件下游的DHS4的添加。

图94示出了在用0.7UCOE载体处理的基因疗法小鼠中,受影响的造血谱系中BTK表达和B细胞发育恢复。在移植后19-23周时对BTK+细胞的比例以及B细胞和髓系细胞亚群的数值重建进行评估。(图94A)示出了终点分析时脾B细胞中的胞内BTK染色的代表性流式图。(b-d)来自基因疗法处理组的骨髓(图94B)、脾(图94C)和腹膜(图94D)淋巴细胞亚群中BTK+细胞的百分比,通过流式细胞术进行测定。将细胞亚群限定为中性粒细胞(CD11b+GR1+)、单核细胞(CD11b+)和B细胞(B220+)。(图94E-图94F)堆积的条示出了骨髓(图94E)、脾(图94F)和腹膜(图94G)中的B细胞亚群的平均计数。早期B细胞发育(骨髓):Pro+Pre-B(IgM-,IgD-)、未成熟(IgM+IgD-)和成熟(IgM+,IgD+)。晚期B细胞发育(脾):过渡型T1(CD24hi,CD21-)、过渡型T2(CD24hi,CD21int)、边缘区/前体MZ/MZP(CD24hi,CD21hi)和滤泡性FM(CD24int,CD21int)。腹膜B细胞亚群:B1(IgM+CD43+)和B2(CD43-)。(图94H)B细胞亚群中BTK表达的挽救,通过流式细胞术进行测量。(图94I)B细胞发育中的BTK+MFI,归一化至每个单独的实验中的WT空白对照。数据表示来自4个独特实验的平均值 $\pm$ SD,n=13(WT空白对照)、13(KO空白对照)、11(0.7UCOE.BTKp.co)、11(0.7UCOE.BTKp.co2)、16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)以及6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:***P<.001;**P=.001-.01;*P=.01-.05。

图95示出了体内和体外B细胞功能的恢复。(图95A)在移植后12周时,将小鼠用处于Alum中的NP-CGG进行免疫。通过ELISA对来自免疫小鼠的血清中的NP特异性IgG水平进行测量,并相对于IgG标准品进行表示。在初次免疫前(-)和初次免疫后10天(1°)从血清中测量高亲和力和NP-IgG。初次激发后一个月,用处于PBS中的NP-CGG对小鼠进行再激发,并在10天后(2°)收集血清。(图95B-图95C)通过ELISA和终点分析(移植后21-23周)对来自处理小鼠的血清中的总血清IgG(图95B)和IgM(图95C)进行测量。(图95D-图95F)在终点分析时,通过CD43-磁分离将B细胞从脾细胞中分离,用Cell Trace Violet标记,并在体外用IgM、LPS或培养基对照进行刺激。(图95D)在与抗小鼠IgM抗体、LPS或仅培养基孵育后72小时,经历了 ≥ 1 次细胞分裂的BTK+B细胞的百分比(通过流式细胞术读出)。(图95E)每次分裂(D0-D4)后细胞的BTK+MFI,归一化至WT空白对照。(图95F)示出了IgM刺激后72小时的B细胞中BTK染色和Cell Trace稀释的代表性流式图,在活细胞和B220+BTK+细胞上进行门控。数据代表来自4个独特实验的平均值 $\pm$ SD,n=13(WT空白对照)、13(KO空白对照)、11(0.7UCOE.BTKp.co)、11(0.7UCOE.BTKp.co2)、16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)和6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:***P<.001;**P=.001-.01;*P=.01-.05。

图96示出了载体安全性考虑。(图96A-图96B)通过ELISA对来自处理小鼠的血清中的抗-dsDNA IgG(图96A)和抗-dsDNA IgG2c(图96B)水平进行测量,并以吸光度读数(OD450)进行描述。作为阳性对照包括来自已知的自身免疫倾向WAS嵌合小鼠模型和经Eu.BTKp处理的小鼠的血清。(图96C)在终点分析时从总骨髓和脾中分离基因组DNA,并通过qPCR对每细胞病毒整合数(VCN)进行量化。数据表示来自4个独特实验的平均值 $\pm$ SD,n=13(WT空白对照)、13(KO空白对照)、11(0.7UCOE.BTKp.co)、11(0.7UCOE.BTKp.co2)、16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)和6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。

使用单向ANOVA: Sidak检验确定P值: *** $P < .001$; ** $P = .001 - .01$; * $P = .01 - .05$ 。

图97示出了转染方案的示意图。

图98示出了处理组之间人造血细胞的同等骨髓植入。将来自XLA患者的人干细胞(无论是否进行基因疗法处理)与来自健康供体的人干细胞同等地植入到骨髓中。98A. 示出了人免疫细胞的各种标记物的代表性流式图, 所述标记物包括人和小鼠CD45(造血细胞的标记物)、CD33(髓系细胞)和CD19(B细胞)、CD4和CD8(T细胞)。人造血细胞是来自总的活BM细胞的hCD45⁺和mCD45⁻细胞; 由hCD45⁺门控对CD33和CD19标记物进行了分析; 由CD33-CD19-门控对CD4和CD8进行了分析。98B和98C. 人CD45%和植入到BM中的hCD45细胞总数; 对于每个队列(XLA3、XLA3+LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2、XLA3+LV0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2和健康供体), $n=4$ 。

图99示出了临床前建模XLA3: 移植后12周的脾分析。

图100示出了临床前建模XLA3: 移植后12周的脾分析, 以及用使用0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2的基因疗法处理的XLA3 HSC小鼠接受者的结果。

图101示出了脾中B细胞发育亚群的代表性流式图。对每个基因疗法队列(列于右侧)示出了用于鉴别人B细胞发育亚群的典型门控策略。每个子图中使用的标记物显示在底部(Hist=直方图); 前驱门控(predecessor gates)在每列顶部显示(如果使用)。

图102示出了与XLA对照相比, LV转导的XLA3 HSC(使用0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2)的接受者的脾未成熟B细胞(包括CD19⁺CD24⁺CD38⁺B细胞和CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺细胞)的比例增加。图表总结了来自图4示出的流式细胞术的结果, 着眼于未成熟B细胞的特定亚群体。A, 脾中未成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)的%; B, IgM⁺的未成熟B细胞的%; C-D, 脾中未成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)和CD24⁺hCD38⁺IgM⁺细胞的总数; E, CD10直方图的叠加图, 示出了与健康供体相比CD10中的平均荧光强度MFI的偏移。对于每个队列, $n=4$; 通过单向ANOVA, *** $P=0.0004$; ** $P=0.0044$; * $P=0.4$ 。

图103示出了与XLA对照相比, LV转导的XLA HSC(0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2)的接受者的成熟B细胞(CD19⁺CD24^低CD38^低IgM⁺和IgD⁺)的比例增加。103A-C, 分别为脾中成熟B细胞(hCD24^低hCD38^低)的%、以及IgM⁺和IgM⁺IgD⁺的成熟B细胞的百分比; 103D-F, 分别为脾成熟B细胞以及IgM⁺和IgM⁺IgD⁺的成熟B细胞的总数; 103G, CD10的直方图叠加图, 示出了CD10的MFI与健康供体相似。对于每个队列, $N=4$; 通过单向ANOVA, *** $P=0.0004$; ** $P=0.0044$; * $P=0.4$ 。

图104示出了骨髓中B细胞发育亚群的代表性流式图。

图105示出了与XLA对照相比, LV转导的XLA HSC(使用0.7UCOE BTKp BTKco2或DHS4 BTKpBTK.co2)的接受者表现出CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺未成熟B细胞的比例增加。

图106示出了LV转导的XLA HSC(使用LV 0.7UCOE BTKp BTKco2或LV 0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTK.co2)的接受者在体内表现出0.2-2病毒拷贝数(VCN)/细胞的基因标记。

图107示出了接受LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTK.pBTKco2的基因疗法的XLA3 HSC接受者在体内产生分泌IgM的B细胞。

图108示出了用LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2转导的XLA3 HSC接受者响应于B细胞受体(BCR)接合而展现出恢复的B细胞流通钙的能力。

图109示出了B细胞分化方案。

图110示出了体外B细胞类别转换的代表性流式图。

图111示出了LV转导的XLA HSC的接受者(使用0.7UC0E BTKp BTKco2或DHS4 BTKpBTK.co2)产生B细胞,所述B细胞能够应答引起抗体分泌的T细胞依赖性信号和细胞因子。

定义

除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

如本文中所用,“一个/种(a/an)”可表示一个(种)或多于一个(种)。

在提及可测量的值时,本文所使用的“约”意在包括与指定值相差 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 、以及更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化。

本文所述的“多核苷酸”是指“核酸”或“核酸分子”,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链式反应(PCR)产生的片段,以及通过连接、切断、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用产生的片段。核酸分子可由天然存在的核苷酸(例如DNA和RNA)或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映体形式)的单体或者两者的组合组成。经修饰的核苷酸可具有糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分的改变。糖修饰包括例如用卤素、烷基集团、胺类和叠氮基团替代一个或多个羟基集团,或者糖可被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可用空间上和电子上相似的结构(例如氮杂糖和碳环糖类似物)替代。碱基部分中的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶、或其它熟知的杂环取代基。核酸单体可通过磷酸二酯键或此类键合的类似物连接。磷酸二酯键合的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺磷酸硫醇酯(phosphoroaniloithioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)、氨基磷酸酯等。术语“核酸分子”还包括所谓的“肽核酸”,其包含与聚酰胺骨架连接的天然存在的或经修饰的核酸碱基。核酸可以是单链或双链的。在一些实施方案中,提供了编码融合蛋白的核酸序列。在一些替代方式中,核酸是RNA或DNA。

当根据说明书进行阅读时,“编码(Coding for/encoding)”具有其平常和普通的含义,并可包括但不限于例如多核苷酸中特定核苷酸序列(例如基因、cDNA或mRNA)用作合成其它大分子(例如确定的氨基酸序列)的模板的性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则该基因编码蛋白。

当根据说明书阅读时,“Bruton酪氨酸激酶”(BTK)具有其平常和普通的含义,并且可包括但不限于例如在人中由BTK基因编码的酶。BTK是在B细胞发育中起关键作用的激酶。例如,BTK通过高亲和力IgE受体在肥大细胞激活以及B细胞成熟中起着关键的作用。BTK基因的突变与原发性免疫缺陷疾病X连锁无丙种球蛋白血症(Bruton无丙种球蛋白血症)相关联;有时缩写为XLA。XLA患者在其骨髓中具有正常的Pre-B细胞群,但这些细胞无法成熟并进入循环。

本文所述的“X连锁无丙种球蛋白血症”(XLA)是影响身体抵抗感染的能力的遗传性疾病。作为无丙种球蛋白血症(其为X连锁)的形式,在男性/雄性中更为常见。在患有XLA的人中,白细胞形成过程不产生成熟B细胞,表现为他们的血流中称为 γ 球蛋白的蛋白(包括抗体)的完全缺乏或几乎完全缺乏。X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)的特征是在生命的头两年中受影响的男性/雄性经常发生细菌感染。复发性中耳炎是诊断前最常见的感染。结膜炎、

窦肺感染(sinopulmonary infections)、腹泻和皮肤感染也很常见。大约60%的患XLA个体在他们发展出严重的威胁生命的感染(例如肺炎、脓胸、脑膜炎、脓毒症、蜂窝织炎或化脓性关节炎)时,被识别为具有免疫缺陷。

“启动子”是启动特定基因转录的DNA区域。启动子可位于基因的转录起始位点附近,在同一条链上并在DNA的上游(有义链的5'区域)。启动子可为条件型启动子、诱导型启动子或组成型启动子。启动子可对细菌、哺乳动物或昆虫细胞的蛋白表达具有特异性。在一些替代方式中,当提供了编码融合蛋白的核酸时,所述核酸还包含启动子序列。在一些替代方式中,启动子对哺乳动物的蛋白表达具有特异性。在一些替代方式中,启动子是条件型启动子、诱导型启动子或组成型启动子。

本文所述的“遍在染色质开放元件(UCOE)”是衍生自遍在表达的管家基因的含启动子CpG岛的调控元件。已提出来自此类启动子的调控元件具有染色质重塑功能,允许染色质维持在引起它们附近的基因高且持续表达的允许构型中。尽管UCOE原来相对较大(达16kb),新的、较小的合成UCOE可引起转基因的高表达。遍在染色质元件及其功能在图1中进行了描述。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

当根据说明书阅读时,“密码子优化”具有其平常和普通的含义,并且可包括但不限于例如将密码子改变为已知增加最大蛋白表达效率的密码子的设计过程。在一些替代方式中,优选用于在人中表达的密码子优化,其中,可通过使用本领域技术人员已知的算法来进行密码子优化,以产生为了在人中的高mRNA和蛋白产量所优化的合成遗传转录本。包含用于人中的密码子优化算法的程序可容易获得。此类程序可包括例如OptimumGene™或GeneGPS®算法。另外,经人密码子优化的序列可从例如Integrated DNA Technologies商购获得。

还可进行优化以减少多核苷酸中二级结构的出现。在所述方法的一些替代方式中,还可进行载体中序列的优化,以降低总GC/AT比。严格的密码子优化可能导致不希望的二级结构、或者导致引起二级结构的不期望的高GC含量。因此,二级结构影响转录效率。密码子使用优化之后,可使用诸如GeneOptimizer的程序进行二级结构避免和GC含量优化。这些额外的程序可在初始密码子优化后用于进一步的优化和排查,以限制在第一轮优化后可能出现的二级结构。用于优化的替代程序是容易获得的。在所述方法的一些替代方式中,载体包含进行了关于二级结构避免的优化的序列和/或进行了减少总GC/AT比的优化的序列和/或进行了为了在人中表达的优化的序列。在本文的一些替代方式中,编码BTK的基因是密码子优化的基因。在一些替代方式中,密码子优化的BTK包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。

本文所述的“增强子元件”是可被蛋白(激活剂)结合以增加特定基因转录发生的可能性的短DNA区域。激活剂也可称为转录因子。增强子可以是顺式作用的、或反式作用的(远离基因作用),并且可以位于距基因多达1Mbp(1,000,000bp)的位置,并且可以位于起始位点的上游或下游,并且可以处于正向方向或反向方向。增强子的大小可以是50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、1100bp、1200bp、1300bp、1400bp或1500bp的大小,或由任意两个上述值限定的范围之间的任意数量的碱基对。

本文所述的“Dnase I超敏位点”是对DNase I酶切割敏感的染色质区域。在基因组的这

些特定区域中,染色质失去了其浓缩结构,暴露DNA并使其可被接近。这提高了DNA被酶(例如DNase I)降解的可得性。这些可接近的染色质区域在功能上与转录活性有关,因为这种重塑状态对于蛋白(例如转录因子)的结合是必需的。本文的替代方式中描述了“Dnase I超敏位点4”(DHS4)。DHS4是一种增强子元件,位于距 ϵ -珠蛋白启动子-18kb处,并可包含红细胞系(erythroid)特异性蛋白和遍在蛋白的结合位点,并作为调控元件起着重要作用。在本文的一些替代方式中,用于表达BTK的载体包含至少一个DNase超敏位点。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。

本文所述的“内含子”是基因内在RNA终产物成熟过程中通过RNA剪接被移除的任何核苷酸序列。在本文的载体的一些替代方式中,载体包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。

“载体”、“表达载体”或“构建体”是用于将异源核酸引入细胞的核酸,其具有调控元件以在细胞中提供异源核酸的表达。载体包括但不限于质粒、微环、酵母和病毒基因组。在一些替代方式中,所述载体为病毒载体。在一些替代方式中,所述病毒载体为慢病毒载体。

本文所述的“B细胞”是淋巴细胞亚型白细胞的一种。它们也被称为B淋巴细胞。B细胞可通过分泌抗体在适应性免疫系统的体液免疫组成中发挥作用。另外,B细胞呈递抗原(它们也被分类为专业抗原呈递细胞(APC))并分泌细胞因子。在本文提供的细胞的一些替代方式中,所述细胞为B细胞。

当根据说明书阅读时,“髓系细胞”具有其平常和普通的含义,并且可包括但不限于例如骨髓或脊髓中的粒细胞或单核细胞前体细胞,或在骨髓或脊髓中发现的粒细胞或单核细胞前体细胞的类似物。髓系细胞谱系包括外周血中的循环单核细胞,以及它们在成熟、分化和/或激活后所变成的细胞群。这些群包括非终末分化的髓系细胞、髓系来源的抑制细胞、和分化的巨噬细胞。分化的巨噬细胞包括非极化和极化的巨噬细胞、静息(resting)和激活的巨噬细胞。不受限制地,髓系谱系还可包括粒细胞前体、多形核来源的抑制细胞、分化的多形核白细胞、中性粒细胞、粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、髓系来源的抑制细胞、树突状细胞和红细胞。例如,小胶质细胞可分化自髓系祖细胞。在本文提供的细胞的一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。

本文所述的“造血干细胞”或“HSC”是指可产生髓系细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突细胞和淋巴谱系(例如T细胞、B细胞、NK细胞))的前体细胞。HSC具有其中存在三类干细胞的异质群体,其通过它们在血液中的淋巴样后代与髓系后代的比(L/M)来区别。在本文提供的细胞的一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。当根据说明书阅读时,“受试者”或“患者”具有其平常和普通的含义,并可包括但不限于例如可在其上使用或给予本文所述的替代方式(例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的)的任何有机体。受试者或患者包括例如动物。在一些替代方式中,所述受试者为小鼠、大鼠、兔子、非人灵长类动物和人。在一些替代方式中,所述受试者为牛、羊、猪、马、狗、猫、灵长类动物或人。在一些替代方式中,所述受试者为人类男性。

本文所述的“过继细胞疗法(Adoptive cellular therapy)”或“过继细胞转移(adoptive cell transfer)”是指以将免疫功能和特性转移至新宿主中为目的,将细胞(最

通常为免疫来源的细胞)转移回同一患者或新的接受者宿主中。在一些替代方式中,过继细胞疗法或过继细胞转移包括向有需要的受试者给予用于表达BTK的细胞。

具体实施方式

BTK在B细胞和髓系细胞中均表达,其中BTK也有助于两种谱系中的正常功能应答。无法表达BTK会导致XLA。相反,活化的BTK或野生型BTK的过表达会导致细胞转化和/或发育阻滞(“Early arrest in B cell development in transgenic mice that express the E41K Bruton’s tyrosine kinase mutant under the control of the CD19 promoter region”J Immunol.1999Jun 1;162(11):6526-33;“Correction of B-cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.”Leukemia.2010Sep;24(9):1617-30;以引用的方式将其整体并入本文),并且野生型BTK的表达失调可促进自身抗体的产生并增加自身免疫的风险(“Enhanced Expression of Bruton’s Tyrosine Kinase in B Cells Drives Systemic Autoimmunity by Disrupting T Cell Homeostasis.”J Immunol.2016Jul 1;197(1):58-67;以引用的方式将其整体并入本文)。因此,在XLA中的安全并成功的临床基因疗法需要在每个细胞谱系中恢复BTK表达(即正常表达该蛋白),并严格调控表达(即不在通常不表达该蛋白的发育亚群中、以及表达可能促进细胞功能改变的地方引起过表达)。为了解决该挑战,如本文替代方式中所述,在使用衍生自患有XLA的人受试者的HSC的新型人细胞模型和鼠XLA动物模型中对候选病毒载体进行了综合评估。基于候选启动子、绝缘子和增强子元件以及人密码子优化的BTK cDNA构建体的迭代设计和测试,鉴别了新型的基于慢病毒的载体构建体并将其在本文的替代方式中示出,所述载体构建体在离体转导以及移植进BTK缺陷宿主中后,在衍生自(鼠或人)造血干细胞的B细胞和髓系细胞中介导了持续的BTK表达。本文替代方式的独特构建体利用截短的UCOE元件(一种衍生自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座内的内含子区域的保守增强子元件)来驱动人密码子优化的BTK cDNA的表达。示例性替代方式之一的最优LV载体被称为0.7UCOE.DHS4.BTKpro.coBTK。作为替代方式中所述的研究的一部分,确定了造成这种构建体选择的一系列令人惊讶且无法预测的结果,如下所示:1)如若干替代方式所示,仅包含BTK最小启动子的LV不足以恢复B细胞发育或功能;2)如若干替代方式所示,利用Eμ增强子元件的LV(带有B谱系限制性启动子或BTK最小启动子)导致高滴度自身抗体的发展(包括致病性类别转换的IgG同种型),表明该增强子引起了显著的安全隐患;3)观测到二次接受者动物中多个候选LV平台的LV载体表达沉默,这使得利用UCOE元件来抵抗这种沉默;4)观测到使用大UCOE元素时的低滴度,并因此引起了新型截短的0.7kb元件的设计和测试,这将引起滴度和功能的改善并保持对沉默的抵抗;5)将生物信息学工具用来对衍生自BTK基因座的多种潜在候选增强子元件进行鉴别和测试,并且经过大量分析后,将其用于鉴别最佳元件DHS4,所述DHS4引起体内BTK表达增加而不降低病毒滴度;6)测试了替代的人密码子优化的BTK cDNA,并导致鉴别出最能恢复BTK表达的构建体;7)从多名患有XLA的成年受试者中收集HSC,并且证实了当将这些干细胞移植到免疫缺陷NSG小鼠中时,这些干细胞重现了在XLA受试者中所见的B细胞发育缺陷;以及8)在本文的若干替代方式中,证实了使用本文所述的替代的优化LV构建体,可有效地转导XLA HSC。

X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)是由BTK基因(Broton酪氨酸激酶)的突变引起的遗传性

X连锁免疫缺陷病症。这种疾病影响大约100,000分之一的男性。临床表现可包括：缺乏成熟的B细胞和血清免疫球蛋白，对肺、窦和皮肤的包囊细菌感染的易感性，由细菌脓毒症导致的突然死亡风险，肠道病毒的慢性和全身感染，慢性炎症性肠病，以及恶性肿瘤（如结肠癌和其它类型的癌症）的风险增加。

XLA目前的治疗选择可包括每3-4周一次的终身混合（pooled）人免疫球蛋白（IVIg或SCIg）。然而，这些治疗昂贵并且目前的治疗也可能导致感染和突然死亡的风险。

基因疗法的候选者可包括患有单基因造血病症的候选者。

Bruton酪氨酸激酶（BTK）是一种胞浆非受体蛋白酪氨酸激酶，其主要在B细胞受体信号传导途径中起作用。BTK促进B细胞存活、增殖和分化。BTK在BCR（B细胞受体）接合后可维持持续的钙信号并促进NF κ B的激活。此外，BTK在细胞因子、生长因子和TLR信号传导通路中也发挥作用。图21示出了BTK的作用，其中BTK引起了B细胞的发育。如所示，XLA导致了Pre-B细胞阶段的阻滞。BTK在B谱系和髓系谱系中表达，在T细胞中不表达。内源性BTK的表达谱如图16所示。

没有其他研究者描述将BTK启动子或本文替代方式的任何其它修饰与LV载体中的BTK结合使用。尽管先前的启动子功能研究中已对BTK启动子和BTK第一内含子进行了部分评价，但尚没有团体描述或测试了衍生自人BTK基因座的候选增强子，包括DHS4元件或其它（“Analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene promoter reveals critical PU.1 and SP1 sites.” Blood. 1996 Feb 1; 87 (3): 1036-44; “Cell specific expression of human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene (Btk) is regulated by Sp1 and Spi-1/PU.1-family members.” Oncogene. 1996 Nov 7; 13 (9): 1955-64; “Large-scale comparative sequence analysis of the human and murine Bruton's tyrosine kinase loci reveals conserved regulatory domains.” Genome Res. 1997 Apr; 7 (4): 315-29.; “Synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1.” Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jun 7; 259 (2): 364-9; “Btk expression is controlled by Oct and BOB.1/OBF.1.” Nucleic Acids Res. 2006 Mar 31; 34 (6): 1807-15; “Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter via NF- κ B.” Blood. 2008 May 1; 111 (9): 4617-26.; 以引用的方式将所有参考文献以其整体在此明确地并入）。

已经鉴别了独立衍生的密码子优化的BTK cDNA（“Correction of B-cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.” Leukemia. 2010 Sep; 24 (9): 1617-30’，以引用的方式将其整体并入）。其他研究者已经研究了在LV载体中单独使用UCOE元件或将其与谱系特异或遍在的启动子结合使用，但没有人将此技术应用于BTK（“Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells.” Blood. 2007 Sep 1; 110 (5): 1448-57.; “A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors.” Mol Ther. 2010 Sep; 18 (9): 1640-9; “Physiological regulation of transgene expression by a lentiviral vector containing the A2UCOE linked to a myeloid

promoter.”Gene Ther.2012Oct;19(10):1018-29;“Correction of murine Rag2 severe combined immunodeficiency by lentiviral gene therapy using a codon-optimized RAG2therapeutic transgene.”Mol Ther.2012Oct;20(10):1968-80;“Promoter and lineage independent anti-silencing activity of the A2 ubiquitous chromatin opening element for optimized human pluripotent stem cell-based gene therapy.”Biomaterials.2014Feb;35(5):1531-42.;“A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny.”Stem Cells.2013Mar;31(3):488-99;“Lentiviral MGMT (P140K)-mediated in vivo selection employing a ubiquitous chromatin opening element (A2UCOE) linked to a cellular promoter.”Biomaterials.2014Aug;35(25):7204-13;“Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells.”Gene Ther.2017Mar 27;以引用的方式在此将所有参考文献以其整体明确地并入)。

如本文的替代方式中所述,优化的慢病毒载体将用于患有X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)的受试者的基因疗法中,将其设计为产生用于该疾病的长期治愈性疗法。图22中示出了最优BTK慢病毒基因疗法载体开发中的示例性替代方式。该替代方式将产生安全的病毒递送平台和具有最优蛋白表达水平的期望谱系表达。

在一些替代方式中,优化的BTK慢病毒载体包含遍在染色质开放元件(UCOE)。UCOE可以提供稳定的转基因表达而不受整合位点的影响,并且还可赋予对临近启动子沉默的抵抗(见图1)。

还证明了优化的用于BTK表达的LV载体使细胞中BTK的表达增加。图23示出了在若干替代方式使用的一些示例性载体。如图24所示,包含E μ BTKp启动子的慢病毒载体在髓系细胞中也具有BTK增加。

对用DKO空白对照、BTKp、UCOE、BTKp和E μ .BTKp转导的细胞进行关于BTK表达的测试。如FACS分析中所示,与单独的BTKp启动子、以及将其与UCOE元件一起相比,将E μ 掺入LV载体中用于BTK表达也显示出在B细胞和髓系细胞中均最大程度地增强BTK表达。(图25)。如图26所示,转导细胞中BTK表达的结果与天然表达BTK的野生型细胞相当,该图示出了B细胞和单核细胞二者中敲除细胞和野生型细胞之间的比较。

预期该LV载体将产生治愈性疗法,特别是XLA基因疗法。

在本文所述的替代方式中,所述基因递送平台被专门用于XLA疗法。这将允许在B细胞和髓系细胞中恢复内源性BTK表达,并挽救XLA患者的免疫应答。进一步对载体的安全性进行了评价。先前研究的用于XLA的慢病毒载体包括具有启动子和转录元件(例如BTK最小启动子、Ig重链 μ 内含子增强子、以及1.5kb遍在染色质开放元件)的载体。然而,如本文的替代方式所示,需要进一步的修饰以改善B细胞和髓系细胞中的BTK表达。

用于XLA的基因递送平台的优化

为了改善用于基因疗法的慢病毒载体,如本文的替代方式所示采取了若干步骤:1) 通过将UCOE元件的大小降低至0.7kb来改善病毒滴度;2) 对内源性人BTK中将改善在B细胞和髓系细胞中的表达的转录元件进行鉴别,并用包含在BTK启动子上游的保守非编码序列

(CNS) 对表达进行测试(图1)。在本文所述的替代方式中,在临床前模型中测试的慢病毒载体包括0.7UCOE.BTKp.BTK和0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTK。(参见图2)。如图3所示,从XLA小鼠采集血液,从中收获Lin阴性细胞。然后用LC-huBTK-LV转导所述细胞。然后,将细胞给予XLA小鼠,在细胞转移后20-25周时进行分析。通过流式细胞术对BTK表达进行分析。还进行了二次细胞转移,以用于干细胞长期再植(repopulation)(见图3)。图3中示出了用于XLA基因疗法的临床前鼠模型的示意图。

两种表达人BTK的载体(.7UCOE和0.7UCOE-I4,5)均将BTK表达恢复至受影响的造血细胞,挽救了B细胞的发育和功能,并恢复了免疫应答(图4-图7)。然而,证实了0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTK与0.7UCOE.BTKp.BTK一样有效表达BTK,但使用较少的病毒整合(图8)。

因此得出了若干结论。

包含与内源性BTK关联的保守BTK调控元件(衍生自BTK内含子4和内含子5)的LV载体改善了每病毒整合的BTK表达。0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTK LV也是XLA基因疗法的有效候选者。

对于扩展的临床前研究,进行了以下:a)鼠建模,用以充分评价毒性、安全性和功效(包括使用二次移植和整合位点分析);b)体外永生化和反式激活分析;c)完善内含子4和内含子5内的遗传元件,以改善B细胞和髓系细胞中的BTK表达;以及d)在体外和NSG接受者小鼠中评价健康对照和XLA受试者CD34+干细胞中的0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTK。

使用UCOE绝缘的BTK启动子改善小鼠XLA模型中慢病毒基因疗法的安全性和功效

使用UCOE绝缘的BTK启动子进行实验来优化慢病毒基因疗法小鼠中的安全性和功效。关于实验,使用了若干种载体构建体:WT空白对照、KO空白对照、BTKp、1.5UCOE.BTKp和E μ .BTKp。

图9中示出了四种LV构建体的表达谱以及对初次接受者小鼠的B细胞发育和功能的挽救。使用的载体是BTKpro.BTK、1.5UCOE.BTKpro.BTK、1.5UCOE.BTKpro.coBTK(人密码子优化的BTK)和E μ .BTKpro.BTK。如图9所示,证实了载体E μ .BTKp.hBTK在所有细胞中均增加BTK表达。如图10所示,还证实了载体E μ .BTKp.hBTK在所有细胞中均增加IgG表达。如图11所示,对于载体E μ .BTKp.hBTK,在粒细胞、骨髓B细胞和脾B细胞中还发现了增加的BTK表达。证实了1.5kbUCOE.BTKp和1.5kbUCOE.BTKp.co载体以较低的拷贝数在初次接收者和二次接受者中引起持续的BTK表达(图11)。

在用0.7kb UCOE.BTKpro.coBTK LV处理的基因疗法小鼠中,在受影响的造血谱系和B细胞发育中显示了BTK表达的恢复(图12)。

在初次接受者中,在0.7UCOE.BTK.co LV基因疗法后还在细胞中观察到了B细胞的增殖、IgM和IgG分泌的增加(图12)。

在初次接受者中,在0.7UCOE.Bkp.co LV基因疗法后还观察到B细胞功能的重建(图13)。

基因疗法处理的骨髓细胞的连续传代进入二次TBK-/-接受者后,VCN和BTK表达得到维持(图14)。如所示,用0.7UCOE.BTKp.co转导的细胞引起中性粒细胞、单核细胞、骨髓和脾的B细胞的BTK表达。还测量了DNA的甲基化(一种抑制基因转录的修饰)。

证实了载体0.7UCOE.BTKp.co在XLA CD34细胞中引起持续的BTK表达和较低的拷贝数(图15)。将XLA CD34细胞和对照CD34细胞用0.7UCOE.BTKp.co以不同感染复数(MOI)进行转导,并在体外培养15天。如所示,转导的XLA细胞具有与健康对照细胞相似的活力。

也将慢病毒载体中的BTK启动子用于评价野生型小鼠中的BTK表达。如所示, BTK启动子模拟了小鼠中BTK的内源表达模式(图16)。

然后对E μ 启动子在慢病毒载体中的表达增强进行了测试。测试了两个具有E μ 启动子的载体, 如图17子图a所示(E μ 增强子和野生型或人密码子优化的人BTK cDNA, 带有T2A连接的GFP)。将鸡BTK-/-DT40细胞用BTK-GFP或coBTK-GFP构建体进行转导; 直方图示出了GFP和BTK的表达(图17子图b)。将经BTK-GFP和coBTK-GFP转导的细胞用Indo-1 Ester AM荧光染料进行染色, 并用抗IgM进行刺激; 通过流式细胞术对钙动员进行监测。如所示, BTK启动子控制下的具有E μ 增强子和人BTK cDNA的慢病毒构建体在鸡细胞中引起BTK-GFP的受控表达。

还完成了来自基因疗法处理的KO小鼠的外周血B细胞和髓系细胞的流式细胞术后BTK表达的代表性图(图18)。测试的载体是: WT空白对照、KO空白对照、BTKp、1.5kb.UCOE.BTKp、1.5kb.UCOE.BTKp.co和E μ .BTKp。图18子图c中示出了来自基因疗法处理小鼠的骨髓的代表性流式细胞术图, 其用早期B细胞发育的标记物进行了染色。图18子图d示出了描绘按照成熟度减小的Hardy分数的B细胞百分比的图表: Fr I (IgMlo, IgDhi)、Fr II (IgMhi, IgDhi)、Fr III (IgMhi, IgDlo), 每个环代表一只小鼠, 并且在图表中示出了每个部分中B细胞的平均百分比。数据表示来自11个独立实验的平均值 $\pm$ SEM, n=18 (WT空白对照)、14 (KO空白对照)、7 (BTKp)、43 (1.5kb.UCOE.BTKp)、18 (1.5kb.UCOE.BTKp.co)、23 (E μ .BTKp)。如所示, 具有E μ 增强子的载体引起B细胞和髓系细胞中较高的BTK表达, 以及IgG分泌的增加。

如图19所示, 与用空白对照载体转导的细胞处理的对照XLA小鼠相比, E μ .BTKp初次移植小鼠还具有提高的存活。

关于对88种鼠抗原有反应性的IgM和IgG的水平, 通过自身抗原阵列对用WT空白对照、1.5kb.UCOE.BTKp和E μ .BTKp载体转导的细胞处理的小鼠的血清进行了分析。每行的数据都经过z转换, 并且将Z分数用从最低反应性(红色)到最高反应性(蓝色)的比色表展示。如图20所示, 反应性最高的血清来自用具有E μ 启动子的慢病毒载体(E μ .BTKp)转导的细胞。

设计用于增加B细胞和单核细胞中BTK表达的载体

还就B细胞特异性启动子对BTK生产的影响对该启动子进行了检查。在示例性替代方式中, 制造了慢病毒载体(lentivector), 该载体包含E μ 增强子元件和与编码人BTK的基因(huBTK)融合的B细胞特异性启动子B29(图27)。如所示, 该载体引起B细胞中BTK表达的增加; 但是, 单核细胞中的BTK表达与敲除细胞相当(图27)。

在另一替代方式中, 还检查了BTK启动子区域, 以评价该BTK启动子在用于BTK表达的慢病毒载体中的影响。如图28所示, 制造了慢病毒载体, 其包含与编码人BTK的基因(huBTK)融合的BTK启动子(BTKpro)。如所示, 该BTK启动子引起B细胞中BTK表达增加。然而, BTK表达并未与野生型细胞中的表达相当。在单核细胞中, 包含该BTK启动子区域的慢病毒载体无法引起BTK表达增加, 并且BTK的表达与敲除细胞相当。

制造了慢病毒载体, 该载体包含遍在染色质开放元件和与编码人BTK的基因融合的BTK启动子(BTKpro)(图29)。如所示, 增强子元件与启动子一起引起B细胞以及单核细胞中BTK表达的增加。但是, 该表达并未与野生型细胞中的表达相当。

制造了慢病毒载体, 该载体包含E μ 增强子和与编码人BTK的基因融合的BTK启动子(BTKpro)(图30)。如所示, 增强子元件与启动子一起引起B细胞和单核细胞中BTK表达的增

加。结果表明,转导细胞中BTK的表达超过野生型细胞中BTK的量。数据表明,E μ 增强子引起所测试载体中最多的BTK表达。

以下提供了本文使用的示例性构建体:

- 1.0.7UCOE.BTKp.coBTK.
- 2.0.7UCOEfwd.BTKp.coBTK
- 3.0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK
- 4.0.7UCOEfwd.DHS4.BTKp.coBTK
- 5.0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK
- 6.0.7UCOEfwd.IE.BTKp.coBTK
- 7.0.7UCOE.BTKp.co2BTK
- 8.0.7UCOEfwd.BTKp.co2BTK
- 9.0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2BTK
- 10.0.7UCOEfwd.DHS4.BTKp.co2BTK
- 11.0.7UCOE.IE.BTKp.co2BTK
- 12.0.7UCOEfwd.IE.BTKp.co2BTK

通常,这些构建体代表3个不同元件(0.7UCOE、增强子或BTK编码序列,均具有相同的BTK启动子)的各种迭代:

0.7UCOE:		增强子			启动子	BTK 人密码子优化:	
0.7UCOE	0.7UCOEfwd	none	DHS4	IE	BTKp	coBTK	co2BTK

人密码子优化的BTK

进行编码BTK的基因的人密码子优化。可通过使用本领域技术人员已知的算法来进行人密码子优化,以产生为在人中的高mRNA和蛋白产量而优化的合成遗传转录本。如图17所示,对两个构建体就其引起细胞中BTK表达增加的能力进行了测试。所述慢病毒构建体包含E μ 元件和BTK启动子区域。用于表达的基因是BTK和人密码子优化的BTK,两者均融合至GFP基因转录本上。如图17所示,人密码子优化的BTK引起GFP的增加(MFI 2288)、以及GFP的增加。

BTK慢病毒载体的表达谱

检查了若干种载体的表达谱:WT空白对照、DKO空白对照、BTKp (BTK启动子)、UCOE.BTKp (遍在染色质开放元件加BTK启动子)、UCOE.BTKp.co (遍在染色质开放元件,BTK启动子加人密码子优化的BTK) 和E μ .BTKp (E μ 元件加BTK启动子)。如图31和图32所示,具有E μ 元件和BTK启动子的用于BTK表达的慢病毒载体在骨髓、脾和腹膜中引起的来自B细胞和髓系细胞的BTK表达最高。

B细胞发育和成熟B细胞亚群的恢复

还在用下列载体转导的细胞中对成熟B细胞亚群的恢复进行了检测:WT空白对照、DKO空白对照、BTKp (BTK启动子)、UCOE.BTKp (遍在染色质开放元件加BTK启动子)、UCOE.BTKp.co (遍在染色质开放元件、BTK启动子加密码子优化的BTK) 和E μ .BTKp (E μ 元件加BTK启动子)。在XLA中,发育停止于pre B细胞。因此,对细胞的进一步发育进行了检查,其中B细胞的发育依赖于BTK的水平。如所示,包含E μ 元件加BTK启动子的用于BTK表达的慢病毒

载体产生了属于成熟外周B细胞群的细胞,表明由转导的细胞产生的BTK水平将在小鼠中引起成熟B细胞亚群的恢复(图33)。

还在给予了表达BTK的细胞的BTK缺陷小鼠中对B细胞群的数值重建进行了检查。用以下载体对细胞进行转导:WT空白对照、DKO空白对照、BTKp (BTK启动子)、UCOE.BTKp (遍在染色质开放元件加BTK启动子)、UCOE.BTKp.co (遍在染色质开放元件、BTK启动子加入密码子优化的BTK) 和E μ .BTKp (E μ 元件加BTK启动子)。图34中示出了总结了来自40只接受者小鼠的发现的数据,所述接受者小鼠接受了用于BTK表达的转导细胞。接受了经BTK表达载体(包括UCOE.BTKp.co、E μ .BTKp或UCOE.BTKp)转导的细胞的小鼠能够在骨髓、脾和腹膜中发育成熟的B细胞。因此,本发明的方面涉及慢病毒载体,所述慢病毒载体包含遍在染色质开放元件、BTK启动子和人密码子优化的BTK,其可用于在患有XLA的受试者中促进成熟B细胞发育的方法中。

在用分别转导有以下慢病毒载体的细胞处理的小鼠中也显示出B细胞增殖,所述慢病毒载体包含遍在染色质开放元件和BTK启动子(UCOE.BTKp),另一慢病毒载体包含于BTK启动子区域融合的E μ 元件(E μ .BTKp)(图35)。对照包括WT空白对照以及DKO空白对照细胞。使用抗IgM抗体对细胞进行荧光激活细胞分选。如所示,具有来自两种慢病毒载体UCOE.BTKp和E μ .BTKp的表达BTK的细胞具有IgM的表达,IgM是由B细胞产生的基本抗体。

还用PMA和离子霉素对细胞进行处理。PMA用于激活PKC,而离子霉素用于触发钙释放(其为NFAT信号传导所需的)(图35)。

如图36所示,当用抗IgM和PMA/离子霉素处理时,与野生型相比,用两种慢病毒载体UCOE.BTKp和E μ .BTKp转导的细胞具有增加的细胞分裂。此外,与仅具有BTK启动子的载体以及具有BTK启动子和UCOE元件的载体相比,这些细胞还显示出总IgM和IgG分泌的增加(图37)。

T细胞依赖性免疫应答

向小鼠给予转导的细胞,并进一步测试T细胞依赖性免疫应答。用以下慢病毒载体对细胞进行转导:WT空白对照、DKO、DKO空白对照、BTKp、UCOE.BTKp和UCOE.BTKp.co (人密码子优化的BTK)、E μ .BTKp.co (人密码子优化的BTK) 和E μ .BTKp。然后对T细胞免疫应答进行评价。如所示,用E μ .BTKp慢病毒载体转导的细胞引起IgG和IgM表达增加(图38-图41)。

抗体水平也与BTK表达相关,小鼠存活也与之有关。如图42所示,与被给予DKO空白对照细胞的小鼠相比,被给予用E μ .BTKp慢病毒载体转导的细胞的小鼠产生了增加的小鼠存活。

还在中性粒细胞和二次接受者小鼠中对BTK表达进行了评价。如图43所示,所给予的转导有E μ .BTKp慢病毒载体的细胞引起二次接受者小鼠中BTK表达增加。然而,在被给予病毒载体BTKp的小鼠中,二次接受者中的病毒拷贝数增加(图44)。关于慢病毒疗法的长期存活评价提供了证据表明载体UCOE.BTKp.co、UCOE.BTKp和E μ .BTKp使小鼠存活提高。

总的来说,BTK启动子研究证明了慢病毒载体中的BTK启动子在B细胞和髓系细胞中表现出显著的BTK表达。UCOE.BTKpro和E μ .BTKpro挽救B细胞发育、B细胞绝对数量、B细胞增殖和免疫应答。用UCOE.BTKpro和E μ .BTKpro也挽救了髓系表达。出乎意料的是,含E μ 的载体导致高滴度自身抗体的产生,因此使其对于临床使用可能不安全。与非UCOE载体相比,UCOE-Btkp-Btk载体以低得多的病毒拷贝数表现出功能性挽救。UCOE-Btkp-Btk载体在鼠和人HSC中均表现出持续的标记。因此,UCOE.BTKp-coBTK慢病毒载体代表了用于额外修饰的改良且

独特的临床载体平台。

替代增强子元件

对BTK启动子中的替代增强子元件就其改善细胞中BTK表达的能力进行了评价。图46中示出了所使用的慢病毒构建体。如所示,1.5kb UCOE改进了B细胞中的BTK启动子。但是,为了降低大的载体尺寸以及低病毒滴度,寻求额外的改善(图46)。

将1.5kb UCOE截短至0.7UCOE以创建慢病毒载体0.7UCOE.BTKp(图2)。如图2所示,还添加了潜在的人BTK增强子元件来创建0.7UCOE.IE.BTKp。内含子区域包含来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4和内含子5。

将0.7UCOE.BTKp和0.7UCOE.IE.BTKp转导到细胞中,并且将图3中概述的方法用于向小鼠中给予细胞。如图47中所示,用0.7UCOE.BTKp和0.7UCOE.IE.BTKp转导的细胞挽救了BTK表达和脾B细胞计数。还证实该细胞挽救了B细胞功能(图48)。

用0.7UCOE.IE转导的细胞也显示出比0.7UCOE改善的安全性(见图49)。如所示,与自身免疫对照(和先前的非Btk启动子载体)相比,0.7UCOE和0.7UCOE.IE均产生较低的自身抗体滴度,而0.7UCOE.IE以少的每细胞病毒整合表现出相似的功效。

测试包含DNase超敏位点的BTK构建体

用DNase超敏位点设计用于表达BTK的慢病毒构建体(图50)。载体如下:0.7UCOE.BTKp.coBTK(0.7UCOE增强子、BTK启动子和人密码子优化的BTK)和0.7UCOE.IE4,5,.BTKp.coBTK(0.7UCOE元件、与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4和内含子5、BTK启动子和人密码子优化的BTK)。

如图51中所示,对DNase超敏位点进行了鉴别。

基于对内含子和DNase超敏位点的鉴别,构建了具有候选内含子和DNase超敏位点的构建体(图52)。构建体如下:0.7UCOE.BTKp.coBTK、0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS1,2.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS1,2,4.BTKp.coBTK、和0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTK。

进行了DHS构建体与0.7UCOE载体和0.7UCOE.IE载体的体内比较。在实验设置中,每 1×10^6 个细胞40 μ l病毒(针对匹配病毒计数值(VCN))进行了优化)用于过夜转导。随后,将 1×10^6 个细胞/疾病(condition)R0注射到TBKBP小鼠中(移植前辐照900rad)。如所示,用0.7UCOE.BTKp.coBTK转导的细胞以较高的VCN引起较高的BTK表达(图53)。

移植后15周后,对B细胞发育进行评价并检查外周血淋巴细胞分布。如图54中所示,用该载体转导的细胞比具有0.7UCOE慢病毒载体的KO空白对照细胞产生增加的B细胞,这表明B细胞增加。然而,以用包含0.7UCOE元件的慢病毒载体转导的细胞,观察到淋巴细胞亚群中较高水平的BTK重建。

进行实验以将具有UCOE和内含子元件的慢病毒构建体与新的DHS构建体进行比较。将体积以40 μ L病毒/百万细胞相匹配。如图55中所示,与包含DHS元件的载体相比,用包含0.7UCOE元件的慢病毒载体转导的细胞中输入VCN增加。在这些实验中,UCOE和DHS4之间的BTK表达也没有显著差异。然而,在脾中DHS4的BTK/VCN显著高于UCOE(图56)。

在另一替代方式中,使用下列载体对体内BTK表达进行检查:0.7UCOE.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK和0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTK。关于实验,从TBK供体小鼠中收获Lin细胞。对于转导:以10 μ l病毒/百万细胞达到匹配的体积(目标:通过体外测试预测,匹

配的输入VCN为 ~ 3),然后在SCGM转导培养基(mSCF,mTPO)+凝聚胺中以 4×10^6 细胞/ml进行16小时的转导。然后将细胞移植,其中每小鼠给予 1.5×10^6 个细胞(接受者:TBK,900rad辐照)(图57)。如图57中所示,用0.6UCOE构建体转导的细胞具有较高的VCN;然而,BTK表达水平与包含DHS4元件的慢病毒构建体类似。此外,12周时外周血淋巴细胞分布的分析显示,用慢病毒载体0.7UCOE、0.7UCOE.DHS4和0.7UCOE.DHS1-4转导的细胞具有B细胞的增加,表明慢病毒载体使得BTK表达,从而引起小鼠中成熟B细胞的发育(图58)。6周外周血淋巴细胞分布在图59中示出。如所示,由0.7UCOE、0.7UCOE.DHS4和0.7UCOE.DHS1-4表达BTK的细胞具有B细胞产量的增加(图59)。此外,在被给予包含0.7UCOE、0.7UCOE.DHS4和0.7UCOE.DHS1-4慢病毒载体的细胞的小鼠中的第6周和第12周评价时,在B细胞、单核细胞和中性粒细胞中证实了BTK表达(图60)。在12周放血实验时,证实了在所有亚群中BTK均得以表达(图61)。

测试替代的人密码子优化BTK构建体

进行实验以检查人密码子优化的BTK构建体对BTK的细胞表达的影响。人密码子优化的BTK描述于Ng等中(“Correction of B cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.”Leukemia.2010Sep;24(9):1617-30;以引用的方式将其整体并入)。

以下实验的目的是比较两种不同版本的人密码子优化BTK的BTK表达/染色。设置包括:从TBK小鼠分离的Lin细胞;转导培养基:完全SCGM+mSCF+mTPO+凝聚胺,向 1×10^6 细胞(4×10^6 细胞/ml)添加5 μ l、10 μ l或20 μ l病毒,7天体外培养,然后第7天时BTK染色和VCN。慢病毒构建体为:0.7UCOE.BTKp.coBTK(滴度: $1.17E^{+09}$)、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK(滴度: $1.09E^{+09}$)、0.7UCOE.BTKp.newcoBTK(滴度: $1.81E^{+08}$)、和0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK(滴度: $1.13E^{+08}$)(图62)。

如图63中所示,在用0.7COE.newcoBTK和DHS4.newcoBTK以5 μ L、10 μ L和20 μ L的病毒添加转导的细胞中BTK表达增加。对于用.7COE.newcoBTK和DHS4.newcoBTK以5 μ L、10 μ L和20 μ L的病毒添加转导的细胞,还证实了MFI增加(图64)。在用添加的10 μ L.7COE.newcoBTK和DHS4.newcoBTK慢病毒载体二者转导的细胞中显示出最优病毒拷贝数/细胞(图64)。

还考虑了原始的人密码子优化BTK和新的人密码子优化BTK的体内比较。实验组包括:0.7UCOE.BTKp.coBTK(滴度: $1.17E^{+09}$)(5只小鼠)、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK(滴度: $1.09E^{+09}$)(5只小鼠)、0.7UCOE.BTKp.newcoBTK(滴度: $1.81E^{+08}$)(5只小鼠)、0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK(滴度: $1.13E^{+08}$)(5只小鼠)、K0空白对照(3只小鼠)、WT空白对照(5只小鼠)和未辐照对照(1只小鼠)。转导设置包括:具有10 μ l/百万细胞的体积匹配(与当前的体内实验一致)(图71)。

测试慢病毒载体中UCOE元件的替代方向

进行实验以检查UCOE元件方向对BTK细胞表达的影响(图66)。如图67中所示,制造构建体,以评价UCOE的方向是否会影响BTK表达。

对于实验,测试了4种慢病毒载体:K0空白对照、0.7UCOE.BTKp($7.52E^{+07}$)、0.7UCOEfwd.BTKp col4($6.79E^{+08}$)、0.7UCOEfwd.BTKp col6($1.79E^{+09}$)和WT空白对照。如图68中所示,慢病毒载体0.7UCOE.BTKp($7.52E^{+07}$)、0.7UCOEfwd.BTKp col4($6.79E^{+08}$)、0.7UCOEfwd.BTKp col6($1.79E^{+09}$)之间的BTK水平相似,但是VCN随病毒体积的增加而增加。

如实验中所示,BTK启动子是强健(robust)启动子。关于UCOE元件,0.7kb UCOE有效地

防止了BTK表达的沉默并使得载体滴度增加。此外,将UCOE以正向方向安置显著增加滴度,但并不改变BTK表达。这表明反向的UCOE方向表现等价于高滴度的构建体。关于增强子元件,证实了与0.7UCOE.Btkp相比,0.7UCOE.IE.Btkp以较低的病毒整合展现对BTK表达功能的挽救,并且与较大的IE构建体相比,较小的增强子元件(DHS位点)的添加没有增加滴度。

处于正向方向的UCOE使IE效价增加 $>11\log$,表明在所有构建体中正向方向的UCOE将提高滴度。

例如,已证实了与0.7UCOE.IE.Btkpro相比,0.7UCOE.DHS4.Btkp在B细胞和髓系细胞中表现出增加的BTK表达,表明0.7UCOE.DHS4.Btkp载体是特别强健的载体。

关于人密码子优化的BTK,与先前的co-Btk构建体相比,新的构建体使得BTK表达显著增加。

测试IgG、IgM和NP特异性Ig/M人HSC研究—对照和XLA受试者:

使用慢病毒载体对体内XLA细胞功能和B细胞发育的挽救进行了检查。进行实验来评价在NSG小鼠中再现XLA患者的B细胞表型是否可行。还考虑了,该方法是否可通过用临床LV载体转导XLA干细胞来挽救体内B细胞发育。如图71中所示,图71是选择其来接受治疗的XLA患者的表。

外周中的XLAB细胞表型包括明显减少的B细胞百分比、较高百分比的过渡/未成熟B细胞(CD38+CD24+CD10^高),以及缺乏成熟B细胞(CD38-CD24-CD10^低)。

在图72中,在患者XLA P2、P3和P4中显示了处于NSG的人嵌合体。如所示,在骨髓中有相等的hCD45细胞植入,但是在外周中有显著较低的分化hCD45细胞百分比。

对于人淋巴细胞重建,在骨髓中B细胞的百分比是相等,但是,在所有XLA患者P2、P3和P4中,在脾中B细胞的百分比显著较低,而髓系细胞和T细胞相对增加(图73)。

图74中示出了患者XLA P2、P3和P4的植入的XLA干细胞(脾)的表型。如所示,患者表现出低水平的成熟B细胞;但是,患者具有类似水平的未成熟B细胞(图75)。

图76中示出了患者XLA P2、P3和P4的植入的XLA干细胞(脾)的表型。如所示,在XLA组和健康组之间患者表现出相等的Pro B细胞%。

检查了所有XLA患者的B细胞发育阻滞。如图77中所示,BTK使得Pro B细胞发育成成熟B细胞。对细胞进行关于hCD19+、CD22+和CD179a+的分析。如所示,与健康对照相比,XLA患者具有显著较高的pre-B细胞百分比。因此,这些XLAB细胞被阻滞在Pre B细胞阶段,然后处于该阶段的细胞能够迁移到脾(图78和图85)。

还在XLA细胞中检查了由Ca²⁺引起的B细胞功能(图80)。如所示,与对照相比,XLA B细胞不能流通IgM。

根据XLA B细胞的评价,证实了XLA细胞具有阻滞在Pre B细胞阶段的B细胞发育(图81)。

如所示,XLA患者在脾中具有较低的B细胞数量和百分比。此外,在骨髓中B细胞发育抑制在pre-B细胞阶段。下一步是在NSG小鼠中重现XLA患者的B细胞表型,以检查表达BTK的慢病毒载体系统的作用。

根据图83和图90中所示的方法,用下列载体进行干细胞的人慢病毒转导:0.7UCOE.BTKp.coBTK和0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK。

与具有DNase超敏位点4区域的载体相比,用0.7UCOE.BTKp.BTK进行的干细胞的人慢病

毒转导产生70%的活力(图85)。

在用0.7UCOE.BTK.pBTK慢病毒载体转导的源自患者XLA P2的细胞中也观察到BTK表达。如在非选择性环境中所示,与包含DNase超敏位点4区域的慢病毒载体相比,0.7UCOE.BTK.pBK引起较高的BTK表达(图86)。

鉴于以上实验,结论是用0.7UCOE.BTKp.BTK和0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTK以MOI 10转导的XLA干细胞引起临床上相关的病毒拷贝1-2。因此,预期XLA干细胞的慢病毒转导在体内将产生B细胞发育的挽救。

人HSC的临床前建模

使用慢病毒载体对人HSC的临床前建模进行检查,所述慢病毒载体表达融合至GFP蛋白的人密码子优化的BTK,其可用T2A接头自剪切(见图88)。如所示,测试构建体包含UCOE元件、BTK启动子、人密码子优化的BTK基因以及T2A-GFP标记物蛋白。CD34⁺HSC的体外转导表明用该慢病毒载体转导的细胞中的GFP增加(图88)。然后将细胞给予NSG接受者小鼠,如图90中所示。6个月后的体内分析显示B细胞以及髓系细胞均增加(图89和图97)。

考虑用如图92所示的构建体进行的进一步测试。利用ENCODE全基因组数据库信息,关于特定细胞谱系中的调控标记物进行了生物信息学方法。该探索的流程是使用保守的非编码序列信息来鉴别候选增强子。

为了改善组织特异性BTK的表达,通过比较人和小鼠的非编码序列并鉴别高度保守的区域来对保守的非编码序列进行鉴别。将保守的非编码序列克隆到BTKp的前面,并观察它们与BTK启动子(BTKp)组合是否改善表达。第一遍读数使用了GFP报告子来追踪表达—改善的表达将使GFP信号或“MFI”增加。内含子4和内含子5被确定为改善了MFI,还有内含子4、内含子5和内含子13的重叠群(contig)。GFP由SEQ ID NO:8中所示的序列编码。图92的组1所示的序列在SEQ ID NO 23-SEQ ID NO 30中。编码GFP的测试序列在SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:36-SEQ ID NO:40中示出。

接下来,用GFP在体外再次测试含有内含子4、内含子5和内含子13的重叠群与仅内含子4和内含子5的重叠群。内含子4,5一起具有更好的MFI。

在小鼠基因疗法模型中对内含子4和内含子5重叠群进行了体内测试,将其称为内含子增强子4,5或IE4-5。这些研究使用增强子/启动子元件来驱动密码子优化的人BTK编码序列的表达,并证实IE4-5的包含改善了每病毒拷贝数的BTK表达。

编码用于表达BTK的序列的多肽在SEQ ID NO 33-SEQ ID NO 35和SEQ ID NO 41-SEQ ID NO 45中示出。

使用来自编码数据库的信息完善候选增强子

为了更仔细地定义介导IE4-5中增强子活性的DNA元件,将ENCODE数据库用来寻找位于这些内含子中的DNase超敏位点,并且在每个内含子中找到了一个DNase超敏位点,其在B细胞和髓系细胞中均存在,但并不总是存在于非相关组织中。这些被称为DHS 4和DHS 5,并且比之前所包含的内含子区域的大小少725bp和1077bp。还在内含子1中鉴别出B细胞和髓系细胞中的DNase超敏位点(DHS1、DHS2和DHS3),由于一些证据表明内含子1可在体外改善MFI,所述DNase超敏位点也用于进行测试。通过ENCODE分段分析,DHS 3和DHS 4被鉴别为在B细胞中具有转录增强子的特性;DHS5被鉴别为CTCF结合位点/候选绝缘子。

还测试了DHS位点1到DHS位点5的各种组合。

如图92中所示,“1kb”和“3kb”是控制增强子大小的非保守内含子1序列。

将1.5kb UCOE截短至0.7kb以及鉴别潜在DNA增强子元件可在慢病毒构建体中改善滴度和BTK表达

图93A中示出了将1.5kb遍在染色质开放元件(UCOE)截短至0.7kb的结果。UCOE元件跨越管家基因CBX3和HNRPA2B1的转录方向相反的启动子区域中的大的富含CpG的区域,并且传统上已被多个团体截短至1.5-2.2kb区域用于蛋白表达构建体。此处使用的1.5kb UCOE于CBX3的外显子1开始,跨过CBX3替代外显子1。将该区域截短至0.7kb,去除了Alt.Ex.1下游的区域。(93B)从ENCODE数据库中鉴别来自BTK基因内含子区域的DNaseI超敏位点(DHS),并使用UCSC人基因组浏览器Feb.2009(GRCh37/hg19)组件对其进行可视化。鉴别出五个DHS,并将其依次标记为DHS1、DHS2、DHS3、DHS4和DHS5(蓝色框)。ENCODE基因组分段在DHS4周围鉴别出预测的增强子元件(黄色框)。将外显子以黑框示出。序列长度记录在每个DHS下方。将这些DHS序列的各种组合克隆到0.7UCOE.BTKp.coBTK构建体中,并进行如下体外测试(数据未示出)。用含有如下所示的各种表达盒的LV对鼠Btk^{-/-}Tec^{-/-}骨髓细胞进行转导。然后通过流式细胞术对转基因表达的平均荧光强度进行比较。(93C)进行了鼠(TBK)谱系阴性细胞的体外转导实验,用以比较两个版本的密码子优化BTK中的BTK表达水平:coBTK(图1-2)和Staal等发表的密码子优化BTK(Leukemia 2010),在此表示为co2BTK。代表性流式图示出了转导后7天时的BTK表达。(93D)基于DHS构建体的体外测试以及coBTK与co2BTK的比較的结果,我们鉴别了四种构建体用于体内测试。此处示出了慢病毒构建体的图解,所述慢病毒构建体表达密码子优化的人BTK(coBTK或co2BTK)版本之一,并具有RRRL骨架、0.7kb的遍在染色质开放元件(0.7UCOE),同时具有或不具有0.7UCOE元件下游的DHS4的添加。

图94中示出了:在用0.7UCOE载体处理的基因疗法小鼠中,受影响的造血谱系中BTK表达和B细胞发育恢复的结果。在移植后19-23周时对BTK+细胞的比例以及B细胞和髓系细胞亚群的数值重建进行评估。(图94A)示出了终点分析时脾B细胞中的胞内BTK染色的代表性流式图。(图94B-图94D)来自基因疗法处理组的骨髓(图94B)、脾(图94C)和腹膜(图94D)淋巴细胞亚群中BTK+细胞的百分比,通过流式细胞术进行测定。将细胞亚群限定为中性粒细胞(CD11b+GR1+)、单核细胞(CD11b+)和B细胞(B220+)。(图94E-图94F)堆积的条示出了骨髓(图94E)、脾(图94F)和腹膜(图94G)中的B细胞亚群的平均计数。早期B细胞发育(骨髓):Pro+Pre-B(IgM-,IgD-)、未成熟(IgM+IgD-)和成熟(IgM+,IgD+)。晚期B细胞发育(脾):过渡型T1(CD24hi,CD21-)、过渡型T2(CD24hi,CD21int)、边缘区/前体MZ/MZP(CD24hi,CD21hi)和滤泡性FM(CD24int,CD21int)。腹膜B细胞亚群:B1(IgM+CD43+)和B2(CD43-)。(图94H)B细胞亚群中BTK表达的挽救,通过流式细胞术进行测量。(图94I)B细胞发育中的BTK+MFI,归一化至每个单独的实验中的WT空白对照。数据表示来自4个独特实验的平均值±SD,n=13(WT空白对照)、13(KO空白对照)、11(0.7UCOE.BTKp.co)、11(0.7UCOE.BTKp.co2)、16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)以及6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:***P<.001;**P=.001-.01;*P=.01-.05。

图95示出了体内和体外B细胞功能的恢复。(图95A)在移植后12周时,将小鼠用处于Alum中的NP-CGG进行免疫。通过ELISA对来自免疫小鼠的血清中的NP特异性IgG水平进行测量,并相对于IgG标准品进行表示。在初次免疫前(-)和初次免疫后10天(1°)从血清中测量

高亲和NP-IgG。初次激发后一个月,用处于PBS中的NP-CGG对小鼠进行再激发,并在10天后(2°)收集血清。(图95B-图95C)通过ELISA和终点分析(移植后21-23周)对来自处理小鼠的血清中的总血清IgG(图95B)和IgM(图95C)进行测量。(图95D-图95F)在终点分析时,通过CD43-磁分离将B细胞从脾细胞中分离,用Cell Trace Violet标记,并在体外用IgM、LPS或培养基对照进行刺激。(图95D)在与抗小鼠IgM抗体、LPS或仅培养基孵育后72小时经历了 ≥ 1 次细胞分裂的BTK+B细胞的百分比(通过流式细胞术读出)。(图95E)每次分裂(D0-D4)后细胞的BTK+MFI,归一化至WT空白对照。(图95F)示出了IgM刺激后72小时的B细胞中BTK染色和Cell Trace稀释的代表性流式图,在活细胞和B220+BTK+细胞上进行门控。数据代表来自4个独特实验的平均值 $\pm$ SD, $n=13$ (WT空白对照)、13 (KO空白对照)、11 (0.7UCOE.BTKp.co)、11 (0.7UCOE.BTKp.co2)、16 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2) 和6 (0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:*** $P<.001$;** $P=.001-.01$;* $P=.01-.05$ 。

图96示出了一些载体安全性考虑。通过ELISA对来自处理小鼠的血清中的抗-dsDNA IgG(图96A)和抗-dsDNA IgG2c(图96B)水平进行测量,并以吸光度读数(OD450)进行描绘。作为阳性对照包括来自已知的自身免疫倾向WAS嵌合小鼠模型和经Eu.BTKp处理的小鼠的血清。(图96C)在终点分析时从总骨髓和脾中分离基因组DNA,并通过qPCR对每细胞病毒整合数(VCN)进行量化。数据表示来自4个独特实验的平均值 $\pm$ SD, $n=13$ (WT空白对照)、13 (KO空白对照)、11 (0.7UCOE.BTKp.co)、11 (0.7UCOE.BTKp.co2)、16 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、11 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2) 以及6 (0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)。使用单向ANOVA:Sidak检验确定P值:*** $P<.001$;** $P=.001-.01$;* $P=.01-.05$ 。

来自XLA患者的人HSC中的临床前建模LV载体

以下实验的目的是确定当被移植到免疫缺陷NSG小鼠中时,基因疗法载体是否可以挽救来自XLA HSC的B细胞的发育。CD34细胞来源:XLA患者3(错义突变)和健康供体#15。转导方案包括在SCGM(100ng/ml的TPO、FLT3和SCF)中预刺激48小时后的一次LV攻击。所使用的MOI:5。所使用的慢病毒为0.7UCOE.BTKp.BTK.co2(滴度: 7×10^8)和DHS4.co2(滴度: 1×10^9)

实验小鼠:4只小鼠=健康供体#15(HD)

3只小鼠=处理的XLA P3空白对照(XLAP3)

5只小鼠=0.7UCOE.BTKp.BTK.co2(0.7UCOE)

4只小鼠=0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTK.co2(DHS4)

分析于:转移后12周(图97)。

图98示出了治疗组之间的人造血细胞的同等骨髓植入的结果。将来自XLA患者的人干细胞(无论进行基因疗法处理与否)与来自健康供体的人干细胞同等地植入到骨髓中。示出了人免疫细胞的各种标记物的代表性流式图,包括人和小鼠CD45(造血细胞的标记物)、CD33(髓系细胞)和CD19(B细胞)、CD4和CD8(T细胞)。人造血细胞是来自总的活BM细胞的hCD45+和mCD45-细胞;由hCD45+门控对CD33和CD19标记物进行分析;由CD33-CD19-门控对CD4和CD8进行分析。图98B和图98C。人CD45%和植入到BM中的hCD45细胞总数;对于每个队列(XLA3、XLA3+LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2、XLA3+LV0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2和健康供体), $n=4$ 。

图99示出了使用0.7UCOE.BTKp BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2给予基因疗法的

XLA3 HSC小鼠接受者的结果,显示脾人造血细胞数量显著增加。图99A.示出了人免疫细胞的标记物的代表性流式图,包括人和小鼠CD45(造血细胞的标记物)、CD33(髓系细胞)和CD19(B细胞)、CD4和CD8(T细胞)。人造血细胞是hCD45⁺且mCD45⁻;由hCD45⁺门控对CD33和CD19标记物进行分析;由CD33-CD19-门控对CD4和CD8进行分析。图99B和图99C:hCD45⁺的脾细胞的%和总数。对于每个队列,n=4; **P=0.004,采用单向ANOVA。图100中示出了LV转导的XLA HSC(使用0.7UCOE BTKp BTKco2或DHS4 BTKpBTK.co2)的接受者的结果,展现了相对于未处理的XLA患者细胞,脾B细胞(CD19⁺细胞)的比例增加。此处总结了图2中所示的流式细胞术的结果,着眼于人免疫细胞的特定类别:A-C,脾中人CD45⁺细胞的%,其为B细胞(CD19⁺)、髓系细胞(CD33⁺)和T细胞(CD4⁺或CD8⁺);D-F,脾中人CD45⁺细胞的总数,其为B细胞(CD19⁺)、髓系细胞(CD33⁺)和T细胞(CD4⁺或CD8⁺);对于每个队列,n=4。通过单向ANOVA, **P=0.0044。

图101中示出了脾中B细胞发育亚群的代表性流式图。关于每个基因疗法队列(列于右侧),示出了用于鉴别人B细胞发育亚群的典型门控策略。每个子图中使用的标记物显示在底部(Hist=直方图);前驱门控显示在每列顶部(如果使用)。从人CD19⁺细胞对人CD24和hCD38细胞进行门控。未成熟B细胞(hCD24⁺hCD38⁺)是IgM⁺IgD⁻CD10⁺高;成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)是IgM⁺IgD⁺CD10⁺低。

图102中示出了LV转导的XLA3 HSC(使用0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2)的接受者的结果。如所示,与XLA对照相比,接受者具有比例增加的脾未成熟B细胞(包括CD19⁺CD24⁺CD38⁺B细胞和CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺细胞)。总结了图4中所示的来自流式细胞术的结果的图表,着眼于未成熟B细胞的特定亚群。A,脾中未成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)的%;B,IgM⁺的未成熟B细胞的%;C-D,脾中未成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)和CD24⁺hCD38⁺IgM⁺细胞的总数;E,CD10直方图的叠加图,显示与健康供体相比CD10中的平均荧光强度MFI的偏移。对于每个队列,n=4;通过单向ANOVA, ***P=0.0004; **P=0.0044; *P=0.4。

如图103所示,与XLA对照相比,LV转导的XLA HSC(0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2)的接受者具有增加的成熟B细胞(CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺和IgD⁺)比例。图104A-图104C,分别为脾中成熟B细胞(hCD24⁺hCD38⁺)的%、以及IgM⁺和IgM⁺IgD⁺的成熟B细胞的百分比;图103D-图103F,分别为脾成熟B细胞以及IgM⁺和IgM⁺IgD⁺的成熟B细胞的总数;图103G,CD10的直方图叠加图,显示CD10的MFI与健康供体相似。对于每个队列,N=4;通过单向ANOVA, ***P=0.0004; **P=0.0044; *P=0.4。

图104中示出了骨髓中B细胞发育亚群的代表性流式图。对每个基因疗法队列(列于右侧),示出了用于鉴别骨髓中人B细胞发育亚群的流式图和门控策略。每个子图中使用的标记物显示在底部(Hist=直方图);前驱门控显示在每列顶部(如果使用)。从人CD19⁺细胞对人CD24和hCD38细胞进行门控。骨髓中的未成熟B细胞(hCD24⁺hCD38⁺)是IgM⁺IgD⁻CD10⁺高。

如图105所示,与XLA对照相比,LV转导的XLA HSC(使用0.7UCOE BTKp BTKco2或DHS4 BTKpBTK.co2)的接受者表现出增加的CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺未成熟B细胞比例。图表总结了基于图7所示的门控策略的流式分析。每个点代表单个小鼠。A-D,分别是IgM⁺的未成熟B细胞和未成熟B细胞(CD24⁺CD38⁺)的百分比和数量;E,CD10直方图叠加图,显示与健康供体相比,CD10中的MFI偏移。蓝色代表用LV 0.7.UCOE.BTKp.BTKco2处理的单个小鼠,橙色代表用

LV0.7UCOE.DHS4.UCOE.BTKp.BTKco2处理的单个小鼠。对于每个队列, $n=4$ 。通过单向ANOVA确定统计学上的显著性; *** $P=0.0004$; ** $P=0.0044$; * $P=0.4$ 。

图106示出了LV转导的XLA HSC (使用LV 0.7UCOE BTKp BTKco2或LV 0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTK.co2) 的接受者在体内表现出0.2-2病毒拷贝数 (VCN) /细胞的基因标记。根据通过定量PCR所测定的, 对BM (A) 和脾 (B) 以及移植前的原始CD34细胞 (C) 中的每细胞病毒整合数进行计算。0.7UCOE.Co2.BTKp.BTK和DHS4.BTKp.BTKCo2之间没有显著差异。每个点代表单个小鼠 (A和B各自中 $N=4$; C中 $N=1$)

如图107所示, 接受用LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTK.pBTKco2进行的基因疗法的XLA3 HSC接受者在体内产生分泌IgM的B细胞。通过ELISA从移植后12周获得的血清中对IgM总水平进行量化。使用人IgM标准品确定IgM的值 ($\mu\text{g/mL}$)。每个点代表单个小鼠的结果; 对于每个队列, $N=4$ 。

如图108所示, 用LV 0.7UCOE.BTKp.BTKco2或0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2转导的XLA3 HSC接受者响应于B细胞受体 (BCR) 的接合显示出B细胞流通钙的恢复能力。对来自每个队列中小鼠的混合的 5×10^6 个总脾细胞就其响应于BCR信号传导而使钙流通 (BTK激活下游的重要事件) 的能力进行分析。图108A提供了示出用于人CD19+细胞的评价钙通量的门控策略的代表性流式图。图108B提供了BCR与人IgM抗体接合后, 通过流式细胞术对胞内钙水平进行的动力学分析。

图110中示出了体外B细胞类别转换的代表性流式图。将来自接受体小鼠的脾细胞以B细胞分化方案 (上一张图片) 进行培养, 然后对标记物进行染色, 以允许识鉴血浆B细胞。还收集了培养基上清液以通过ELISA测定人IgM和IgG水平。

如图111所示, LV转导的XLA HSC接受者 (使用0.7UCOE BTKp BTKco2或DHS4 BTKpBTK.co2) 产生B细胞, 所述B细胞能够应答引起抗体分泌的T细胞依赖性信号和细胞因子。将 0.5×10^6 个总脾细胞 (从每个队列的小鼠中汇集) 在IMDM+10%FBS+2-巯基乙醇培养基中进行培养。在I阶段中, 将细胞与MegaCD40L (100ng/ml) +CpG ODN 2006 (1 $\mu\text{g/mL}$) +IL-2 (50ng/ml) +IL-10 (50ng/ml) +IL-15 (10ng/ml) 培养7天。I阶段后, 将细胞用PBS 2 $\times$ 洗涤, 并在II阶段培养基 (IMDM+10%FBS+BME, 补充有IL-2 (50ng/ml) +IL-6 (50ng/ml) +IL-10 (50ng/ml) +IL-15 (10ng/ml)) 中培养3天, 然后切换至III阶段培养基 (IMDM+10%FBS+BME, 补充有IL-6 (50ng/ml) +IL-15 (10ng/ml) +IFN- α 2B (100U/ml)) 4天, 在这个时间点收集培养基上清液, 并使用人IgM和IgG标准品通过ELISA对人IgG (A) 和IgM (B) 的水平进行测定。

额外的替代方式

如本文所述, 提供了用于持续的Bruton酪氨酸激酶 (BTK) 表达的多核苷酸。所述多核苷酸可包含编码遍在染色质开放元件 (UCOE) 的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中, UCOE为2kb、1.5kb、1kb、0.75kb、0.5kb或0.25kb, 或在由任意两个上述值限定的范围之间的任意数量的千碱基。在一些替代方式中, 第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中, 所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中, BTK启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中, 第三序列为密码子优化的, 以在人中表达。在一些替代方式中, 第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中, 所述启动子为B细胞特异性启动子。在一些替代方式中, B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,

B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,多肽进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,该一个或多个增强子元件包含至少一个DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,多肽包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:1中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

还提供了用于在细胞中使BTK持续表达的载体。所述载体可包含:编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列、以及编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,第三序列为密码子优化的,以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体进一步包含B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包含B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中示出的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元

件包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,多肽或载体包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在一些替代方式中,提供了用于表达BTK的细胞,所述细胞包含:多核苷酸,所述多核苷酸包含编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸位于载体中。所述载体可包含编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,第三序列为密码子优化的,以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体进一步包含B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,所述B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:4:内含子4-5)、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:

18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在一些替代方式中,提供了促进有需要的受试者中的B细胞存活、增殖和/或分化的方法,所述方法包括:向所述受试者给予本文任一替代方式所述的细胞,或者向有需要的受试者给予包含本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体的细胞;以及,任选地在给予所述细胞之前将受试者鉴别为将从接受将促进B细胞存活、增殖和/或分化的疗法中受益的受试者,和/或任选地对所述受试者中或获得自所述受试者的生物学样品中的B细胞存活、增殖和/或分化进行测量。所述载体可包含编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列和编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,第三序列为密码子优化的,以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体还包含B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,所述B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:4:内含子4-5)、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,

所述细胞来自受试者,并且其中,通过将上述任一替代方式所述的多核苷酸或载体引入细胞来对细胞进行基因修饰。在一些替代方式中,给予通过过继细胞转移进行。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34⁺造血干细胞。在一些替代方式中,所述受试者为男性/雄性。在一些替代方式中,所述受试者患有X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。在一些替代方式中,多肽或载体包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些替代方式中,多肽或载体包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

在一些替代方式中,提供了治疗、抑制或缓解有需要的受试者中的X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)或与XLA相关的疾病症状的方法,所述方法包括:向受试者给予本文任一替代方式所述的细胞,或者向有需要的受试者给予包含本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体的细胞;以及,任选地将受试者鉴别为将从接受XLA或与XLA相关的疾病症状疗法中受益的受试者,和/或任选地对受试者中XLA进展的改善或与XLA相关的疾病症状的改善进行测量。所述载体可包含编码遍在染色质开放元件(UCOE)的第一序列、编码启动子的第二序列、以及编码BTK的第三序列。在一些替代方式中,第一序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2中所示的核酸序列。在一些替代方式中,所述启动子为BTK启动子。在一些替代方式中,所述启动子包含SEQ ID NO:5中所示的核酸序列。在一些替代方式中,对第三序列进行密码子优化以在人中表达。在一些替代方式中,第三序列包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体进一步包含B细胞特异性启动子。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子包括B细胞特异性启动子B29。在一些替代方式中,B29启动子序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些替代方式中,B细胞特异性启动子为内源性启动子。在一些替代方式中,所述载体进一步包含一个或多个增强子元件。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含至少一个内含子区域。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含DNase超敏位点(DHS)。在一些替代方式中,DNase超敏位点为DNase超敏位点1(DHS1)、DNase超敏位点2(DHS2)、DNase超敏位点3(DHS3)、DNase超敏位点4(DHS4)和/或DNase超敏位点5(DHS5)。在一些替代方式中,DNase超敏位点包含SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域来自与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座。在一些替代方式中,所述至少一个内含子区域为与人BTK近端启动子关联的人BTK基因座的内含子4、内含子5和/或内含子13。在一些替代方式中,所述内含子区域包含SEQ ID NO:9(内含子4)、SEQ ID NO:10(内含子5)和/或SEQ ID NO:11(内含子13)中所示的序列。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:4:内含子4-5)、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列。在一些替代方式中,UCOE处于反向方向或正向方向。在一些替代方式中,UCOE处于正向方向。在一些替代方式中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造

血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述一个或多个增强子元件包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20中所示的序列。在一些替代方式中,所述多核苷酸进一步包含BTK启动子上游的基因。在一些替代方式中,BTK启动子上游的基因为BTK增强子。在一些替代方式中,所述BTK增强子包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22中所示的序列。在一些替代方式中,所述载体为B谱系特异性慢病毒载体的基于慢病毒的载体。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞来自受试者,并且其中,通过向细胞中引入本文任一替代方式所述的多核苷酸或本文任一替代方式所述的载体来对细胞进行基因修饰。在一些替代方式中,给予通过过继细胞转移进行。在一些替代方式中,所述细胞为B细胞。在一些替代方式中,所述细胞为髓系细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD34+造血干细胞。在一些替代方式中,所述受试者为男性/雄性。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受免疫球蛋白替代疗法。在一些替代方式中,对受试者进行选择以接受靶向抗微生物剂。在一些替代方式中,多肽或载体包含SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些替代方式中,0.7UCOE包含SEQ ID NO:2中所示的序列。在一些替代方式中,所述增强子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

序列

下面列出了在本文替代方式中使用的序列:

0.7UCOE:		增强子:			启动子	BTK 密码子优化:	
0.7UCOE	0.7UCOEfwd	one	HS4	IE4-5	BTKp	coBTK	co2BTK

>0.7UCOE (SEQ ID NO:1)

(SEQ ID#1)

```
Cgcgtgtggcatctgaagcaccaccagcgagcgagagctagagagaaggaaagccaccgacttcaccgcctccgagctgctccg
ggctcgggggtctgcagcgtctccggccctccgcgcctacagctcaagccacatccgaagggggagggagccgggagctgcgcgc
ggggccgctggggggaggggtggcaccgcccacgcccggcgccacgaagggcggggcagcgggcgcgccccggcgggg
gggaggggcccgcgcgcccgcctgggaattggggccctagggggagggcgaggcgccgacgaccgcggcacttacgt
tcgcggcgtggcgcccgggtgggtcccaagggggaggggaagggggagggcgggcgaggacagtgaccggagtctcctcagcgggt
ggcttttctgcttggcagcctcagcggctggcgccaaaaccggactccgcccacttcctcgcccctgcggtgcgaggggtgtggaatc
ctccagacgctgggggagggggagttgggagcttaaaaactagtagccctttgggaccactttcagcagcgaactctcctgtacacca
ggggtcagttccacagacgcggggccaggggtgggtcattgcggcgtgaacaataatttgactagaagttgattcgggtgttt
```

>0.7UCOEfwd (SEQ ID NO:2)

(SEQ ID NO:2)

Cgcaaacacccgaatcaacttctagtcaaattattgttcacgccgcaatgacccacccctggcccgctctgtggaactgacccctgg
tgtacaggagagttcgtgctgaaagtgggtccaaaggggtactagttttaagctcccaactccccctccccagcgtctggaggatt
ccacacccctgcaccgcagggcgaggaagtggcgaggatccggttttggcgccagccgctgaggctgccaagcagaaaagcca
ccgctgaggagactccggtcactgtcctcgccccgcctcccccttccctcccccttggggaccaccggcgccacgccgcgaacggt
aagtgcgcgggtcgtcggcgcctcgccctccccctagggcccaattccagcggcgcgcgcgcgccctcccccgccg
ggcgcgcgcccgctgccccgcccttctgtggcgcccgcggtggcggtgccacccctccccccagcgccccgcgcgcagctc
ccggctccctccccctcgatgtggcttgagctgtaggcgcgaggcgaggagacgctgcagacccgcgacccggagcagctcg
gaggcggtgaagtgggtggcttctctctctagctctcgctcgctgggtggtgcttcagatgccacac

>DHS4

(SEQ ID NO:3)

aattctatcatagtgtgtcttctatgataactgcattgagaaagatgctctgcttgttgagtgagcattcacttcttctggttctgactatc
tgtctaatagtggatcatgtgggtgaaaagatagaaaaggggagtagtattaggaagttcagtatgaggaagacttattagacttatgcat
aaacctaattctgttgaatctggaagagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagcaagaactacaaatttggcttctcagtttg
gcttgcttacatcctgagaactctgtaggccacatgtcgtgaatatagcagcctctgcaacagtgaagccagaaaaggaagtggaaa
gtctcaggggagggggcttctgtcatggatttatgagcacagcaagactacaagcaaaaagaaaaatgtaaaaggatcttgttcgt

>IE4-5

(SEQ ID NO:4)

acatctttgagcttcagtttctcatctgtaaataggggaataatacatacttctaaggctactgcaaagatcaataagtaatacatttga
agcacttgggacagagcctgctacatagtaagtgtcattaagtgttagttatcattgttgttttaggccaagggtgtgtgaaaattaa
atgagataatatataaaagggtatttagctcaatatctggcacatagcaataattgaatagatgatccttcattcttctgctcctcttcc
agtttgaaagacttggctaataattttgaccaaccaaaactgcatfcaaggagtgtaagaaggctggtatagccagccagtgagtatc
agaatctaaatgtttattaagacaaagggtgtcatgcaataaccaaccataccattatcagctgcccattcctctgtttcttaggcag
ccttctctgatgtcaactcaaccagtaatctctcagtcacttgacatgtggctatatatacacacaaaatgtgtgcatgcatcctgtgctg
caagcatttacagtcaagtttatctgaacacactgtatgggtgatgtgaaatgctgaaactgttcaagtttaggtcctcacaagcaagga
atatgaaatatttcttgggaaatatttatccacaacaaagagatgtacagtgttctgtatacagtgtttagcatttccatgtgttttacat
gtatttacttctttagtcccttacaacaacccagaggtagatgtggcatgaattaccattattctccttgagaagaagaaactgagcat
caaagaagcttgttggccttctgccagaaatcaccagttgttaaatggtaaaagagggtgaaaccaggttctctgactctgacttca
agcactctcatatcatctatattaattttggagctaggtattttatacttaggattctaaatattgcataaccattgaatgccacaccacct
tgtattcagtgcaaaaaatgggacttttctaataatagagaaatggaggtgcctaaaattacaaaattgcactagagagatagtgatag
aactgggaaactcttagtctaataattttatcttttattcatatgatggaataactaagctcaatggcagaatcttcagtcagcaatgggttcag
gttatgtgaactatctgaaggattcctgaactcttcatacttaggaatgtagcggtttaaagctcttagaattttcatactcttaggtcctct
gacttgtgctcaattcatgcataaactattttataaggctcctgctgcccctgctggagataacattttgtttatccaacaaagggtatttt
atcttattataaattctgacttgtatagaagagaaatgaagtataatctatataaattaagtcttgattagtagataggggtatttacttgg
ataatatggagtaaaattttaattcatggctaattacctccactccactacagtggtcctccctcaccaatattagccaaaataaatcaa
atttggaaactacaaactacttcaaaaagggttaagggtatataaagcaatatcatcaagtcaaatagttttttaacatgtacaaggc
atcatgctaggtgttacgaagatgcatgaaatataagatgtgttccaacctcacagagttatagacatcacataataaattctgaag
tcaaataataaattttaaaattatctgctgttcagcattgttctactagtcagccaaacaatgtcatctgttgaaaggcattggtagtaaa
aactgtgtctgaaatacccctcttcaaaagggttcgtaatttgatatagtcaggacacgaacaagatcctttacattttcttttctgtgtt
agtcttctgtgtctcataatccatgacagaaagccccctccctgagactttccacttctttctggcttctactgttgcagaggctgcta
tattcacgacatgtggcctacagagttctcaggatgtaagcaagccaaactgaagaccaattttagtcttctgctctcctaaacagatgc
atatgtggcacttcagctctccagattacaacagaatttaggtttatgcataagtctaataagtcttctcactgaacttctaataactact
ccccctttctatctttcaaccacatgaccactattagacagatagtcagaaccagaagggaagtgaatgctcactcaacaagcagagc
atctttctcaatgcagttatcatagacaagacacactatgatagaattgggtgctgctatgtattcttttga

>BTKp

(SEQ ID NO:5)

Tgcatttctaggagaatccctgggggaatcattgcagttggagcataatgtagggggcccctgagaaaacctccaggcttcaagtg

acatacctagctgctttaccggtttacaggactcaagagaaagggtggacattgagagttaatccctgaggccaaatcttaaatggagaa
agtcaacatccacagaaaaatggggaagggcacaaagtatttctgtgggcttatattccgacattttatctgtaggggaaaaatgctttctta
gaaaatgactcagcacggggaagtctgtctctacctctgtctgttttgcctttggggtccttcactatcaagttcaactgtgtgtccctg
agactcctctgccccggaggacaggagactcgaaaaacgctcttctggccagtctcttggctctgtgtctgccagccccagcatctc
tcctctttctgtaagcccctctccctgtgctgactgtcttcatagtacttttaggtatgtgtccctttacctctgggaggatagcttgatgacc
tgtctgtcaggccagccccatctagagtctcagtgggcccagtcagtggtgagaaagggtctttcaagatagactcaagatagtagtgt
cagagggtcccaagcaaatgaaggcggggacagttgaggggggtggaataggacggcagcaggggaaccagatagcatgctgtct
gagaagaaaaaagacattggttaggtcaggaagcaaaaaagggaactgagtggtgtgaaagggtgggggttctcagactgtc
cttctctctggactgtaagaattagctc

>coBTK

(SEQ ID NO:6)

atggccgctgtgatcctggagagcatttctgaagagggtccagcagaaaaagaaaacctctcccctgaactttaagaaaagactgtt
cctgctgacagtgcacaagctgtcttactatgagtacgactttgagcggggccgaggatcaaaaaaggggagcatcgatgtgga
gaagattacatcgctggagaccgtggtccctgaaaagaatccaccccctgagaggcagatccaagacggggcgaggagtctct
gagatggagcagattagtagtattgagcgttccctatcctttcaggtggtgtacgacgagggaccactgtatgtgttctcaccaca
gaggagctgagaaagagggtgattcaccagctgaagaacgtgattagatacaatagcgtatggtgcagaagtatcacctgtttttg
gatcgacgggcagtagctgtgttccagacagctaagaacgctatgggatgccagattctgaaaaatcggaacggatctctgaaa
ccaggggagttcacaccgcaagacaaaaagcccctgcctccaacaccggaggaggtatcagatcctgaaaaagcctctgccaccgg
agcctgctgcagccccagtcagcacttccgaactgaaaaagggtggtggtctgtatgactacatgccatgaatgtaacgatctgca
gctgagaaaggcgacgagtatttcttctggaagagtctaactctgccttgggtggaggccagagataagaacggacaggaggggt
acatcccatctaattatgtgaccgaggctgaggactctattgagatgtacgagtggatagcaagcacatgacacgggtcccaggctga
gcagctgctgaagcaggaggggcaagaggagggtttatcgtcgcgattctagtaaggccggcaatacactgtgtcagtggtcgc
taagagcaccggagacccccaggcggtgatcagacactatgtggtgtgttccacacctcagttctcagtactatctggctgagaagcac
ctgtttagtacaatcccagagctgattaactaccaccagcacaattctgccggcctgatcagcaggctgaagtatcccgtctccagca
gaacaaaaatgctccttctaccgctggactgggttacggcagttgggagattgatccaaaggacctgacattcctgaaggagctggg
aactgggcagtttggcgtggtgaagtatggaaaatggagagggcagtagatgtggccatcaagatgatcaaggagggtcaatga
gagaggacgagttcatcaggaggctaagggtcatgatgaacctgtcccacgagaaactggtgcagctgtatggagtgtgcaccaag
cagcggccattttatcattacagagtacatggctaattgggtgtctgtaactatctgcgcgagatgagacagattccagacaca
gcagctgctggaaatgtgcaaggatgtgtgtgaggctatggagtacctggagtctaagcagtttctgcaccgggacctggctgctgc
aattgcctggtgaacgatcaggcggtggtgaagggtgagtgaacttcggactgtcaaggatgtgtgtggtgacgagtacaccagctccg
tgggctctaagttcctgtgagatggtctccaccgagggtgctgatgtatagcaagttctcctctaagagcgatatctgggctttggcgt
gctgatgtgggaaatctacagcctgggcaagatgccttacgagcggttcacaaattccgagacagctgagcacatcgccagggcct
gcgctgtaccggccacatctggcctctgagaagggtgtacacatcatgtacagctgttggcacgagaaggccgacgagagacca
cattcaagatcctgctgtccaacattctagatgtgatggacgaggagagctga

>co2BTK

(SEQ ID NO:7)

atggccgctgacatcctggaagcatcttctgaagcggagccagcagaagaagaaaaccagccccctgaacttcaagaagcggct
gttctgctgaccgtgcacaagctgtcctactacgagtacgacttcgagcggggcagacggggcagcaagaagggcagcatcgac
gtcgagaagatcacctgcgtggagaccgtggtgcccgagaagaacccccctcccgagcggcagatccccagcggggcagga
aagcagcagatggaacagatcagcatcatcgagcgggttccttaccattccaagtgggtgtacgacgagggccccctgtacgtgtt
agccccaccgaggaactgcggaagcgggtgattcaccagctgaagaacgtgatccggtacaacagcgacctggtgcagaagtacc
accctgcttttggatcgacggccagtacgtgtgtcagccagaccgccaagaacgctatgggctgccagattctggaaaaccgga
acggcagcctgaagccccggcagcagccacagaaagaccaagaagccccctgccccccaccggaagaggaccagatctgaag
aagcctctgcctcccgagccccggcgtgcacctgtgagcaccagcagctgaagaaagtggcctgtacgactacatgccat
gaacgccaacgacctgcagctgcggaagggcgacgagtacttcatcctggaagaaagcaacctgccctggcggggccaggga
caagaacggccaggaaggctacatccccagcaactacgtgaccgaggccgaggactccatcgagatgtacgagtgtacgcaag
cacatgaccagaagccaggccgaacagctgtgaagcaggaaggcaagaggcggttcatcgctccgggacagcagcaaggc
cggcaagtacaccgtgagcgtgttcgccaagagcaccggcgacccccaggcggtgatccggcactacgtggtgtgcagaccccc
cagagccagtactacctggccgagaagcacctgttcagcaccatccccagctgatcaactatcaccagcacaacagcgtggact
gatttctcggctgaagtaccccgtgtcccagcagaacaaaacgccccagcacagccggcctgggctacggcagctgggagatc
gacccaaggacctgaccttctgaaagagctgggcaccggccagttcggcgtggtgaagtacggcaagtggaggggcccagtacg
acgtggccatcaagatgatcaaggaaggcagcatgagcaggacgagttcatcgaggaagccaaagtgatgatgaacctgagcca
cgagaagctggtgcagctgtacggcgtgtgcaccaagcagcggccatcttcatcatcaccgagtacatggccaacggctgcctgt
gaactacctgcccagatgcggcacaggtccagacacagcagctgctcgaatgtgcaaggacgtgtgcgaggctatggaatacc
tggaatccaagcagttcctgcaccgggacctggccgagaaactgcctggtgaacgaccaggggggtggtgaaggtgtccgacttc
ggcctgagcagatactgtggtgacgaggtacaccagcagcgtgggcagcaagttccccgtgcgggtggagccccctgaggtgc
tgatgtacagcaagttcagcagcaagagcgacatctggccctcggcgtgctgatgtgggagatctacagcctgggcaagatgccct
acgagcgggtcaccaacagcgagaccgagcagcatcgccaggcgctgcggctgtacaggccccacctggccagcgagaag
gtgtacaccatcatgtacagctgtggcacgagaaggccgacgagaggccacctcaagatcctgctgtccaacatcctggacgtg
atggacgaggaagctga

与图92相关的序列元件(如果未在上面显示)——这些是作为将上述序列鉴别为我们的临床基因疗法载体的最佳候选者的过程的一部分进行了测试的构建体:

>GFP

(SEQ ID NO:8)

atgggtgagcaaggcgaggagctgttcaccgggggtggtgcccatcctggtcagctggacggcgacgtaaacggccacaagtca
gcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcc
ctggcccaccctctgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaa
gtccgccatgcccgaaggctactccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaag
ttcgagggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaaggcgcatgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctgg
agtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaac
atcgaggacggcagcgtgcagctgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaac
cactacctgagcaccagtcgccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgc
cgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaa

>内含子4

(SEQ ID NO:9)

ctcaaaaagaatacatagcagcaccaattctatcatagtgtgtcttctatgataactgcattgagaaagatgctctgctgttgagtga
catttcacttcttctggttctgactatctgtctaatagttggtcatgtgggtgaaaagatagaaaaggggagtagtattaggaagttcagta
tgaggaagacttattagacttatgcataaacctaaattctgttgaatctggaagagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagc
aagaactacaaatttggtcttcagtttggttgccttcatcctgagaactctgtaggccacatgtcgtgaatatagcagcctctgcaacagt
gaaagccagaaaaggaagtggaaagtctcaggggagggggcttctgtcatggatttatgagcacagcaagactaacaagcaaaaa
gaaaaatgtaaaaggatcttgttcgtgtccctgactatatcaaatctacgaaacctttgaaagaggggtatttcagacacagttttactacc
aatgcctttcaacaagatgacattgtttggctgcactagtgaacaatgctgaacagcagataattttaattaatttatattgacttcagaat
ttattatgtgatgtctataaactctgtgaggggtggaaccacatcttatatttcacatcttcgtaacacctagcatgatgccttgatcatg
gttaaaaaaatactatttgacttgatgatattgcttattatataccttaccttttgaagtaggtttgtagttccaaatttgattttttggcta
attggtgaggggagggccactaggtagtggaggtggaggttaattagccatgaattaaaattttactccatattatccaagtgaataacca
tatgtactaatcaagacttaatttatatagattatcacttcatttctctctatacaaaagtcagaatttaataataagataaaatacctttgttg
ataaacaataatgttatctccagcaaggcgagcgagacctataaaataagtttatgcatgaattgaagcacaagtcaggaggacct
aagagtatgaaaaattctaagagcttttaaacgctacattcctagatatgaagagttcaggaatccttcagatagttcacataacctgaac
accattgctgactgaagattctgcc

>内含子5

(SEQ ID NO:10)

Ccatcatatgaataaaaagataaaatattagactaagagtttccagttctatcactatctcttagtgcaattttgtaattttaggcacctcca
tttctctatttattaagaaaagtcccatttttgcactgaatacaaggggtggtggcattcaatgggtatgcaatatttagaatcctaagtata
aaatacctagctccaaaaaattaaatagatgatgatgagagtgcttgaagtcagagtcagagaacctgggttcaagccctctttaccatt
tacaactgggtgatttctggcaagaaggccaacaagcttcttgatgctcagtttcttctcaaaggagaataatggtaattcatgccca
catctacctctgggggtgtgtgaaggatcaaatgaagtaataatacatgtaaaagcacatggaaaactgtaaatcactgtatacgaaagc
actgtacatctcttgggttgataaatatttcccaaggaaatatttcatattccttgccttgtgaggacctaaactgaacagtttcagcatttc
acatcaaccatacagtggttcagataaactgactgtaaatgcttcagcagcaggtgcatgcacacatatgtgtgtatatatagccac
atgtcaagtgactgagagattaactgggtgagtgacatcaggaaaggctgcctagagaaacaggaaggatggcagactgataatgggt
atgggtgggttattgcatgacagcccttgtcttaataaacatttagattctgatactcactggctggctataccagccttgtaactcccttg
aatgcaagtttgggtggtcaaaattatattagccaagcttcaaaactgaaagggaacaggaggaacgaagatgaaggatcatctattca
attattgctatgtgccagatattgagctaaatacctttatataatctcatttaatttcacaacaaccttggcctaaaaacaacaacatgat
aactaacacttaatgagcacttactatgtagcaggctctgtcccaagtcttcaaatgtattacttattgatcttgcagtagccttaagaag
tatgtattattcccctatttacagatgaggaaactgaagctcaaagatgt

>内含子13

(SEQ ID NO:11)

ggtaggggtggactggccagttgcaaaaactaccttgccttgccttagggagtgctccttgaggtacactgttctgcagcagctgc
ctcaaggacgctcaagacagatccaagcaaaagtattcactgattttctctcttagtggtctacgactgggactgcaaaacatagatt
cataaagggttgcgttgccttgggtcttttgccttttttaattgtgggaaaatttcagtactatccctgagttcattaactaccatcac
taacataatcataaagggttggggaggttgcttagtctatcttgccttatggccaccttgaacctaaaattcccagattcctctaacc
aatgaatcccgttctgagattgacttaagcaaagacagattagcttctaaaaatttccctttactagtttctatttctaccccagtagg
gattttgtctattgtaagaattatacattcatgaccccaaagaatcacaccaagacttta

>1kb

>CONTIG

(SEQ ID NO:14)

tcaaaaagaatacatagcagcaccaattctatcatagtgtgtcttgtctatgataactgcattgagaaagatgctctgctgttgagtgagc
atttcacttccttctggttctgactatctgtctaatagttggtcatgtgggtgaaaagatagaaaaggggagtagtattaggaagttcagtat
gaggaagacttattagacttatgcataaacctaaattctgttgaatctggaagagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagca
agaactacaaatttggtcttcagtttggttgccttacatcctgagaactctgtaggccacatgtcgtgaatatagcagcctctgcaacagt
aaagccagaaaagggaagtggaaagtctcaggggagggggcttctgtcatggatttatgagcacagcaagactaacaagcaaaaag
aaaaatgtaaaaggatcttctgtgtcctgactatatcaaatttacgaaacctttgaagaggggtatttcagacacagttttactacca
atgcctttcaacaagatgacattgtttggctgcactagtgaacaatgctgaacagcagataattttaataatttatatttgacttcagaattt
attatgtgatgtctataaactctgtgaggggtggaaccacatcttatatttcatgcatcttcgtaaacctagcatgatgcctgtacatgg
ttaaaaaataactatttgacttgatgattgcttattatatacctacccttttgaagtagggttgtagttccaaatttgatttatttggctaata
tggtgaggggagggccactaggtagtggaggtggaggtaattagccatgaattaaaattttactccatattatccaagtgaataaccata
tgtactaatcaagacttaatttatagattatcacitcatttcttctatacaaaagtcagaatttaataataagataaaatacccttggat
aaacaaaaatgttatctccagcaagggcagacggagacctataaaataagtttatgcatgaattgaagcacaagtcaggaggaccta
agagtatgaaaaattctaagagcttttaaacgctacattcctagatatgaagagttcaggaatcctcagatagttcacataacctgaaca
ccattgctgactgaagattctgccattgagcttagtattccatcatatgaataaaagataaaatattagactaagagttccagttctatca
ctatctcttagtgcaattttgtaatttttaggcacctccatttcttattattaagaaaagtcctttttgactgaatacaaggggtggtg
gcattcaatgggtatgcaatatttagaatcctaagtataaaatacctagctccaaaaattaaatagatgatgatgagagtgcttgaagtc
agagtcagagaacctgggttcaagccctctttaccatttacaactgggtgatttctggcaagaaggccaacaagcttcttgatgctca
gttcttcttctcaaaggagaataatggaattcatgccacatctacctctggggtgttgtaaggatcaaatgaagtaataacatgtaaa
agcacatggaaaactgtaaatcactgtatacgaaagcactgtacatcttctgtgttgataaatatttccaaggaaatatttcatactctt
gcttgtgaggacctaactgaaacagtttcagcatttcacatcaaccatacagtggttcagataaacttgactgtaaatgcttgacgac
aggatgcatgcacacataatttggtgtatataagccacatgtcaagtactgagagattaactgggtgagttgacatcaggaaaggctg
cctagagaaacaggaaggatggcagactgataatggtatgggtggttattgcatgacagcccttcttctaataaacatttagattctgat
actcactggctggctataccagccttgacactccctgaatgcaagttgggtggtaaaattatattagccaagctttcaaactgaaag
ggaacaggaggaacgaagatgaaggatcatctattcaattattgctatgtgccagatattgagctaaataccctttatattatctcattta
atttcacaacaacctggcctaaaaacaacaacatgataactaacacttaatgagcacttactatgtagcaggctctgtccaagtgt
tcaaatgtattacttatttgatcttgcagtagccttaagaagtatgtattattcccctatttacagatagggaaactgaagctcaaagatgtta
tccttatttctctggggtagggtgactggccagttgcaaaaactaccttgcctggccttgccctaggagtgctcttgaggtagcactgttc
tgacgagctgcctcaaggacgctcaagacagatccaagcaaaagtattcactgattttcttctctagtggctacgactgggactgca
aaaacatagattcataaagggttctgtgtgtcttgggtcttttgccttttttaattgtgggaaaatttcagtactatccctgagttcatt
aactaccatcactaataatcataaagggttggggaggttgcttagtctatcttctgccttatggccacctgaacctaaattccca
gattcctctaaccaatgaatcccgttctgagattgacttaagcaaaagacagattagtacttctaaaaatttcccttttactagtttcttattc
taccacagtagggattttgtctattgtaagaattatacattcatgaccccaagaatcacaccaagacttta

>revCONTIG

(SEQ ID NO:15)

taacaataaagtcttggtgtgattctttggggcatgaatgtataattcttacaatagacaaaaatccctactggggtagaaataggaaaac
tagtaaaagggaatttttagaagtactaatctgtctttgcttaagtaatctcagaaacgggattcattggttagaggaatctgggaatttt
aggttcaaggtggccataaggcaagaagatagactaagcaacctccccaaatcccttatgattatgtagtgatggttagttaatgaact
cagggatagtagtgaatatttccacaattaaaaataaaagacaaaaagaccaagacaacgacaaagcccttatgaatctatgtttt
gcagtcctcagtcgtagccactagaggaagaaaatcagtgaataacttttgccttgatctgtcttgagcgtccttgaggcagctgctgca
gaacagtgtacctcaaggacactccctaaggcaaggccagcaaggtagttttgcaactggccagtcacacctacccagagaaat
aaggataacatctttgagcttcagtttctcatctgtaaatagggaataatacatacttctaaggctactgcaaagatcaataagtaata
catttgaagcacttgggacagagcctgctacatagtaagtgtcattaagtgttagttatcattgttgttttttaggccaaggtgtgtga
aaattaaatgagataatatataaaaggatttttagctcaatatctggcacatagcaataattgaatagatgatccttcatcttcttctctgtt
cccttcagtttgaagacttggctaataatatttgaccaacaaacttgcattcaaggagtgtaaggttggtatagccagccagtg
agtatcagaatctaaatgtttattaagacaaaaggctgtcatgcaataacccaaccataccattatcagctgccatccttctgtttctta
ggcagccttctgtatgtcaactcaaccagttaatctctcagtcacttgacatgtggctatatatacacaaaatatgtgtgcatgcatcct
gtgtgcaagcatttacagtcaagttatctgaacacactgtatggttagtgtaaatgctgaaactgttcaagtttaggtcctcacaagc
aaggaaatgaaatatttcttgggaaatatttccacaacaaagagatgtacagtgttctgtatagcagtttacagttttccatgtgt
ttcatgtattattacttattgtatccttacaacaacccagaggtagatgtggcatgaattaccattattctcctttgagaagaagaaact
gagcatcaaagaagcttgttggccttcttgcagaaatcaccagtttgaatggtaaaagagggttgaaccaggttctctgactct
gacttcaagcactctacatcatctatttaatttttggagctaggtattttatacttaggattctaaatattgcataaccattgaatgccaca
ccacctgtattcagtgcaaaaaatgggacttttctaataaataagagaaatggaggtgcctaaaattacaaaattgcactagagagata
gtgatagaactgggaaactcttagtctaataattttatctttattcatatgatggaatactaagctcaatggcagaatcttcagtcagcaatgg
tgttcagggttatgtgaactatctgaaggattcctgaactcttcatatctaggaatgtagcgtttaaagctcttagaattttcatactttaggt
cctctgacttgtgcttcaattcatgcataaacttatttataaggtctccgtctgcccttgctggagataacattttgtttatccaacaaagg
gtattttatcttattataaattctgactttgtatagaagagaaatgaagtataatataaattaagctttagtagtacatagggttattc
acttggataatatggagtaaaattttaattcatggctaattacctccactccactacctagtggcctcccctaccaatattagccaaaata
aatcaaatgttggaactacaaacctacttcaaaaagggtgaaggtatataataagcaatatcatcaagtcaaatagttttttaacctgtac
aaggcatcatgctaggtgttacgaagatgcatgaaatatataagatgtgttccaacctcacagagtttatagacatcacataataaatt
ctgaagtcaaatataaattaatttaaaattatctgctgttcagcattgttactagtgagcgaacaatgtcatcttgttgaaggcattggt
agtaaaaactgtgtctgaaataccctcttcaaaagggttctgaatttgatagtagcaggacacgaacaagatcctttacattttctttt
gcttgttagtcttctgtgtctataaatccatgacagaaagccccctcccctgagactttccacttcttttctggcttctactgttgcagag
gctgctatattcacgacatgtggcctacagagttctcaggatgtaagcaagccaaactgaagaccaaattgtagttcttctctcctaaa
cagatgcatatgtggcacttcagctcttcagattacaacagaatttaggtttatgcataagtctaataagcttctcctacatgaacttcta
atactactccccctttctatctttcaaccacatgaccactattagacagatagtcagaaccagaagggaagtgaatgtcactcaacaa
gcagagcatcttctcaatgcagttatcatagacaagacacactatgatagaattggtgctgctatgtattcttttga

>ABCD

(SEQ ID NO:16)

ctgggggtatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgcttgggacccctaaaaaccagagagacagcatggctgggtgcc
atztatcagctagtgaggagggctgacggaggggtgggagtgatcatcagcacaagggcctggcagtccttctggtgattagagagggc
cgaaagggtccttccgacaagggtgaggggtgggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgacctccgaacaggttag
caaatgttagaaagggtacctctggcaaaacttagtgaaaagtaattgcaggagcagtcagataaaaacaagcccttctgtcaa
atagtgttgaaagactcaatagggtacatgggtcaatgaagccttagaaaaagaataactaagaggcagattctctgagaacatggt
aaaagctcacgctccacgttatgaagttgaccttctgagctagggaaaggcctggctaggccaggggttaggctacctgccttgagc
tgtaccaggccaaatgtgccagggtcagagctggcttattaaaggactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggttaacaatgggttaa
aagactgggcccaggagaaagcagcctctgcctcagcccagacagtgcggccaacccttgaggtgtggcaaagggttctcctcttac
cattgccctccatgtgcatggcttcttctgtcttcattttctccttctcctcggatccacgcgtgaattctttaaactccttat
gggtgcgaactaatgtaactttccatccagttatgggggattggtgcaattttaattatcactatgatttctatttccatttgagcaaatttcc
atagagtttcttctcagtgacttagaccatcatcagggaagtgaacttaggtataaagggaagatacagcttgcgaaaaccaaagttgggc
gttctccaaagattatcagataccccctctacaccacaatgatctgattgctgagatctgattgctaactactgaaaataaggaagaa
ctagaattttcagtgacacagtgctcagcaagaagctagaaaaggccttgacataatttgactccaaagctacttgggtatgcatgaag
ccatctggggaggggaaggaggaggagaactcctctgaggaccctgaaacaattgggccacgtgtgactttcagttctatggaga
ttcatgtgcagtggtgagggcaatctgagagcatttgaaaccagaagctttaaacgcgtaggaaaagacagggaatggccagaatc
ttcctagccaattgagtagtgcttcaaggagaaatcaagagaaaacactacttcttgatatttggctaagttagtcattgaagtacagtt
gactggttattttattttaaatcatatctcatagactcttccaatcataggctggctgtgtagtttctgaatttctctggtattcttctttt
ttttttattttattttttttttttttttgagactccaggctggagtgagtgacgatcttggctcactgcaacctccgctcccagttcaa
gcatctctcctcagcctcctgagttgctgggactacaggcgcctgtcaccacgcccggctaatttttgtattttaatagagacggg
atttcacatggtggccaggctggctcttaactcctgacctcaagtgatccgccagcctcagcctccaaagtgtgggattacgggcat
gagccactgcgcctggacttatttcttaatagttttatcttatgagcgaagataagagcccaagatggttagttactgattctgcaa
gtgctatttctattaatccttggcatactgcagtttgatgatggctgcactcttgtaataagcttcgtcttctgaattctgttctcatagg
gagctgggagggctgcaaaagggtggccctgtaaaaatcttgcatttataatttaataattacagacccagtgaggacaatgtttgaaaaat
tatattcacctctaggaattgggaactgaaagtccaatatctgcctcagtgagttctggcacctgcattatcccttctgggtatatcaa
gatcaacagctgcacagatacttttgcctttcacagattctacacatatcatataaagggtgaatagtgtaaagctacctctacaccttacaa
gcacacagg

>DCBA

(SEQ ID NO:17)

cctgtgtgcttggaaggtgtagaggtagctttacactattcacctttatatgatatgtgtagaatctgtgaaaagcaaaagtatctgtgcag
ctgttgatcttgatataaccagaaggataatgcagggtgccagaactccactgaggcagatattggactttcagttcccaatttcctagac
gggtgaatataattttcaaacattgtcccactggggctctgtaattattaaattataaatgcaaagattttacagggccacctttgcagcctc
ccagctccctatggagcaacagaattcagaaagacgaagcttattaacaagagtgcagccatcatacaaaactgcagtatgccaagga
attaatagaatagcacttgcagaatcagtaaaactaaacctcttgggctcttatcttcgctcataagataaaatactattaagaataaag
tccaggcgagctgggtcatgccgtaatccagcactttgggaggctgaggctggcgatcacttgaggtcaggagttagagaccag
cctggccaacatggtgaaatcccgtctctattaaaaatacaaaaaattagccgggcgtgggtgacaggcgctgtagctccagcaactca
ggaggctgaggcaggagaatcgctgaactcgggaggcgagggttcagtgagccaagatcgtgacactgcactccagcctggag
tctcaaaaaaaaaataaaaaataaaaaataaaaaaagaagaataaccagagcaaaattcagaaaactacacagccagccta
tgattgggaagagtctatgagatatgattaaaaataaaataaccagtcaactgtacttcaaatgactacttagccaaaatatccaagaagt
agtgtttctcttgatttctccttgaaagcactactcaattggctaggaagattctggccattccctgtcttctacgcgttaagcttctgg
gttccaatgctctcagattgccctcagccactgcacatgaatcctatagaactgaaagtcacacgtggcccaattgttcagggtct
cagaggagtctccctcctcctccctcccccagatggcttcatgcataaccaagtagctttggagtc aaatatgtcaaggcctctttcta
gcttctgtctgagcactgtgtcactgaaaattctagttcttcttatttcagtagttagcaatcagatctcagcaatcagatcattgtgggtgt
agaagggggtatctgataactctttggagaacgccaaactttggtttcgaaagctgtatctccctttataccctaagtcacttctgat
gggtctagtcactgaaaggaaactctataggaaatttgcataaatggaaatagcaaatcatagtataatttaaaatgcaccaatcccc
cataactggatggaaagtacattagttcgaccataaggagtttacaagaattcacgcgtggatccgaggaaaggaaaggagaaat
aatgaagacaagagaaaaagcaagccatgcacatggagggcaatgtaaggagagaaacctttgccacaacctcaagggtggccg
cactgtctgggctgaggcagaggctgcttctcctggccagctctttaccattgttaccacgagggtggcacagctccacacagtct
ttaataagccagctctgaccctggcgacatttggcctggtagctcaaggcaggtagcctacaccctggcctagccaggcctttccct
agctcacaagggtcaacttcataacgtggagcgtgagctttaccatgttctcagagaatctgcctcttagtatttctttaaaggcttca
ttgacctatgtatccctattgagcttcaagcactatttgacagaagggtgtgtttatctgactgctccctgcaatattactttccactaagt
ttgccagaggtaccccttttaacatttgcacctgttcggatggcacctcatgtcacattttcttctgttccgccaccctcagccctt
gtcggaaaggaccctttcggcctctataaccagaaggactgccagggcctgtgtgatgacactccaccctccgtcagcctc
ctccactagctgataaatggcaccagccatgtgtctctctggttttaggggtccaagcaagggtacattgtgtgtgtgccccgcccc
tgccataccccag

>AB

(SEQ ID NO:18)

ctgggggtatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgcttgggacccctaaaaaccagagagacagcatggctggtgcc
atztatcagctagtgaggagggctgacggagggtgggagtgatcatcagcacaaggccctggcagtccttctggtgattagagaggc
cgaaagggtccttccgacaagggtgaggggtgggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgacctccgaacaggtag
caaatgttagaaaagggtacctctggcaaaacttagtgaaaagtaatttgaggagcagtcagataaaaacaagcccttctgtcaa
atagtgcctgaagactcaatagggtacatgggtcaatgaagccttagaaaaagaaatactaagaggcagattctctgagaacatggt
aaaagctcacgctccacgttatgaagtgacctttgtgagctagggaaaggcctggctaggccagggtgtaggctacctgccttgagc
tgtaccaggccaaatgtcgccagggtcagagctggcttattaaaggactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggttaacaatgggtaa
aagactgggcccaggagaaagcagcctctgcctcagcccagacagtgcggccaaccttgagggttggtgcaaagggttctcctttac
cattgccctccatgtgcatggcttgctttcttctgtcttcattatttctccttctcctcggatccacgcgtgaattctttaaactccttat
gggtcgaaactaatgtaactttccatccagttatgggggattggtgcaattttaattatcactatgatttgctatttccatttgagcaatttctt
atagagtttcttctcagtgacttagaccatatacaggaagtgacttaggtataaagggaagatacagcttctgaaaaccaaagtttgggc
gttctccaaagagttatcagatacccccttctacaccacaatgatctgattgctgagatctgattgctaactactgaaaataaggaagaa
ctagaattttcagtgacacagtgctcagcaagaagctagaaaaggccttgacataattgactccaaagctacttggttatgcatgaag
ccatctgggggaggggaaggaggaggagaactcctctgaggaccctgaaacaattgggcccacgtgtgactttcagtttctatggaga
ttcatgtgcagtggtgagggcaatctgagagcattggaaccagaagctttaa

>A

(SEQ ID NO:19)

ctgggggtatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgcttgggacccctaaaaaccagagagacagcatggctggtgcc
atztatcagctagtgaggagggctgacggagggtgggagtgatcatcagcacaaggccctggcagtccttctggtgattagagaggc
cgaaagggtccttccgacaagggtgaggggtgggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgacctccgaacaggtag
caaatgttagaaaagggtacctctggcaaaacttagtgaaaagtaatttgaggagcagtcagataaaaacaagcccttctgtcaa
atagtgcctgaagactcaatagggtacatgggtcaatgaagccttagaaaaagaaatactaagaggcagattctctgagaacatggt
aaaagctcacgctccacgttatgaagtgacctttgtgagctagggaaaggcctggctaggccagggtgtaggctacctgccttgagc
tgtaccaggccaaatgtcgccagggtcagagctggcttattaaaggactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggttaacaatgggtaa
aagactgggcccaggagaaagcagcctctgcctcagcccagacagtgcggccaaccttgagggttggtgcaaagggttctcctttac
cattgccctccatgtgcatggcttgctttcttctgtcttcattatttctccttctcctc

>B

(SEQ ID NO:20)

gaattctttaaactccttatggtgcgaactaatgtaactttccatccagttatgggggattggtgcaattttaattatcactatgatttgcta
tttccatttgagcaatttctatagagtttcttctcagtgacttagaccatatacaggaagtgacttaggtataaagggaagatacagctt
cgaaaaccaaagtttggcgcttctcaaagagttatcagatacccccttctacaccacaatgatctgattgctgagatctgattgcta
tactgaaaataaggaagaactagaatttctcagtgacacagtgctcagcaagaagctagaaaaggccttgacataattgactccaaag
ctacttggttatgcatgaagccatctggggagggaaggaggaggagaactcctctgaggaccctgaaacaattgggcccacgtgt
gactttcagtttctatggagattcatgtgcagtggtgagggcaatctgagagcattggaaccagaagctttaa

>BTKe

(SEQ ID NO:21)

tccatcacctactagatatatcagtgagtgaaaacttcgctaaactaacgctatacctatatcatgaagtgtgtggactagagacaagtgc
catatccttacggcaattaactgggaaacgtcaaatagtaactaccactcaccttttccgaaaatcggcttagtttcccaccatagcc
actctgcttctgtcataacgccgttctctgggaaaacgaattggtattgttataaaatactgaagatcagcaagtaagtcttacaggtt
tatcttaatttcgcagcagaaatattaacgctcaagccaggcgtggaggagagagacccggactcgtatgttattctacaacacaaat
gtcacattaacaccaaattatgcggaatccatcttaccctgggctacagagaatccttgccttctgtactgtgtcactttatggggtg
gtgcttggcacacttcttacagaaagtccggcgggttttagggacgttaacctagtaaagaaacagttcagaacgtgcaatgttattgac
cacaatggcacaacgccctaccttaccagctaaagtctgaggcactccaggaggactcctcattactgtctacctctgactacaggg
gggcccagccccatgtgcttcaagcagagcttctcctccgtcgagcccaagagggaagagacctattaactccacccccggct
aactctacctcttgaacccatcacttcaattctggccccgtagcccggtccctttaggggtgatcccggaagattgggtgtctgata
tatcgagtccacacaggagcctggacccatcccgcatagcacggcgacgaaggggggaaagattaagctggatgttactcgg
ccccaccagcaagtcttaccatgcttgcgtgagcgctatcggcgcggaagaaagaaaccgcgaggcaaacggaagtatatagg
agggtcccgatgcacttctcatgggagtcggtaggagcaatcatagagtgaaggctcagcgagcgccctcgggcggctgaga
ggactcagttcggagccgcggcgaggccttaaggaaaggactccgcctaaagggtggtccactcaccgcacttctccgcccc
gcagcttcaacgttctgtcactttatctcttttgggtgactctgtctacgtatggcggttcagtgaaggagcagtggtttccagatcctt
ggcctccccgtccccgagggaagccaggactagggtcgaatgaaggggtcctccactccacgttccattcctgtccacctaagg
tactgggaacacctttcgagcaaaactgctaattcaatgaagacctggaggagccaattgttccagttcatctatcacatggccagtt
gggtccattcaacaaatgggtattggatgccattatgtggcaggcactgttccgggggagagggtacagtaataataggctataaatgt
gcaattatgaactaagtactttgaagaaaaggaacaatgattggcattaaagcagcacccctctgttgaggagtaagtcagcagctcta
gggtctgaaaagtgaacaatgaattgttggctcctgt

>BTKe Δ Myc

(SEQ ID NO:22)

tgttactcggccccaccagcaagtcctaccatgcttgcgtgagcgctatcggcgcggaagaaagaaaccgcgaggcaaacgga
agtatataggaggttccgatcgacttctcatgggagtcggtaggagcaatcatagagtgaaggctcagcgagcgccctcggg
cggctgagaggactcagttcggagccgcggcgaggccttaaggaaaggactccgcctaaagggtggtccactcaccgcacttct
ccccccccgcagcttcaacgttctgtcactttatctcttttgggtgactctgtctacgtatggcggttcagtgaaggagcagtggtttcc
agatcctctggcctccccgtccccgagggaagccaggactagggtcgaatgaaggggtcctccactccacgttccattcctgttcca
cctcaaggctcactgggaacacctttcgagcaaaactgctaattcaatgaagacctggaggagccaattgttccagttcatctatcacat
ggccagttggtccattcaacaaatgggtattggatgccattatgtggcaggcactgttccgggggagagggtacagtaataataggct
tataaatgtgcaattatgaactaagtactttgaagaaaaggaacaatgattggcattaaagcagcacccctctgttgaggagtaagtca
gcagctctagggtctgaaaagtgaacaatgaattgttggctcctgt

将以下的基因表达盒的序列克隆到pRRLSIN.cppt.PGK-GFP.WPRE[移除PGK-GFP]
Addgene#12252的pRRL骨架中；

包含启动子的具有GFP序列的核酸如下 (BTKp.GFP) : (SEQ ID NO:23)

gcatttcctaggagaatccctgggggaatcattgcagttggagcataatgtagggggccctgagaaaac
ctccaggcttcaagtacatacctagtctgtttaccggttacaggactcaagagaaagggtggacattgagagttaatccctgaggcc
aaatcttaaatggagaaagtcaacatccacagaaaatggggaagggcacaaagtatttctgtgggcttatattccgacattttatctgtag
gggaaaaatgctttcttagaaaatgactcagcacggggaagtctgtctctacctctgtctgtttgtccttgggggtcccttactatcaa
gttcaactgtgtgtccctgagactcctctgccccggaggacaggagactcgaacacgctcttctgcccagctctttgctctgtgtct
gccagccccagcatctctcttcttctgtaagccccctctccctgtgtgactgtcttcatagtagtttaggtatgttgcctttacctctg
ggaggatagcttgatgacctgtctgtctcaggccagccccatctagagtctcagtgccccagtcattgagaaagggtcttcaaagat
agactcaagatagtagtgcagaggtcccaagcaaatgaaggcggggacagttgagggggtggaataggacggcagcaggga
accagatagcatgtctgtgagaagaaaaaagacattggtttaggtcaggaagcaaaaaagggaactgagtggctgtgaaagggt
ggggtttgctcagactgtccttctctctgactgtaagaattagctcagggccaccatggtgagcaaggcgaggagctgttcaccg
gggtgggtgccatcctggtcagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgcc
cctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggccaccctcgtgaccaccctgacctacg
gcgtgcagtgttcagccgtaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtccgcatgccgaaggctacgtccaggag
cgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggcgacaccctggtgaaccgcatcg
agctgaagggtcagcttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatc
atggccgacaagcagaagaacggcatcaagggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgac
cactaccagcagaacccccatcggcgacggccccgtgtgtgtgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagca
aagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgtgtgagttcgtgaccgcccgggatcactctggcatggacgagctgtac
aagtaa

INT4.BTKp.GFP (SEQ ID NO:24)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCCTCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTG
TGTCTTGTCTATGATAACTGCATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTTGAGTGA
GCATTTCACTTCCTTCTGGTTCTGACTATCTGTCTAATAGTGGTCATGTGG
GTTGAAAAGATAGAAAAGGGGAGTAGTATTAGGAAGTTCAGTATGAGGA
AGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCTGTTGTAATCTGGAAGA
GCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTT
GGTCTTCAGTTTGGCTTGCTTACATCCTGAGAACTCTGTAGGCCACATGTC
GTGAATATAGCAGCCTCTGCAACAGTGAAAGCCAGAAAAGGAAGTGGA
AGTCTCAGGGGAGGGGGCTTTCTGTTCATGGATTTATGAGCACAGCAAGAC
TAACAAGCAAAAAGAAAAATGTAAAAGGATCTTGTTCTGTCCCTGACTA
TATCAAAATTTACGAAACCTTTGAAAGAGGGGTATTTTCAGACACAGTTTTT
ACTACCAATGCCTTTCAACAAGATGACATTGTTTGGCTGCACTAGTGAAC
AATGCTGAACAGCAGATAATTTTAAATTAATTTATATTTGACTTCAGAATT
TATTATGTGATGTCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACCATCTTATATA
TTTCATGCATCTTCGTAACACCTAGCATGATGCCTTGTACATGGTTAAAAA
AATACTATTTGACTTGATGATATTGCTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAA
GTAGGTTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATTTTGGCTAATATTGGTGAGGGG
AGGCCACTAGGTAGTGGAGGTGGAGGTAATTAGCCATGAATTAATAATTTT
ACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTACTAATCAAGACTTAATT
TATATAGATTATCACTTCATTTCTCTTCTATACAAAGTCAGAATTTAATAA
TAAGATAAAAATACCCTTTGTTGGATAAACAAAAATGTTATCTCCAGCAAG
GGCAGACGGAGACCTTATAAAATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAG
TCAGGAGGACCTAAGAGTATGAAAAATTCTAAGAGCTTTTAAACGCTACA
TTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTCAGATAGTTCACATAACCTG
AACACCATTGCTGACTGAAGATTCTGCCGGGCCCCTGAGAAAACCTCCAG
GCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAG
AAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAA
AGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTT
ATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGAC

TCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTGGGG
TCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGG
AGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGT
GTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGT
GCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAG
GATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGT
GGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGT
AGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTG
GAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAA
AAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTG
TGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAAT
TAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGG
GTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCT
CGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
ACAATAACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA
CGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

INT5.BTkp.GFP (SEQ ID NO:25)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCCATCATATGAATAAAAGATAAAATATTAGACTAAGAGTTT
CCCAGTTCTATCACTATCTCTCTAGTGCAATTTTGTAAATTTTAGGCACCTCC
ATTTCTCTATTTATTAAGAAAAGTCCCATTTTTTGCAGTGAATACAAGGGT
GGTGTGGCATTCAATGGTTATGCAATATTTAGAAATCCTAAGTATAAAATA
CCTAGCTCCAAAAAATTAAATAGATGATGTATGAGAGTGCTTGAAGTCAG
AGTCAGAGAACCTGGTTTCAAGCCCTCTTTTACCATTTACAACTGGGTGA
TTTCTGGCAAGAAGGCCAACAAGCTTCTTTGATGCTCAGTTTCTTCTCTC
AAAGGAGAATAATGGTAATTCATGCCACATCTACCTCTGGGGTTGTTGTA
AGGATCAAATGAAGTAATAACATGTAAAAGCACATGGAAAAGTGTAA
ATCACTGTATACGAAAGCACTGTACATCTCTTTGTTGTGGATAAATATTTT
CCAAGGAAATATTTTATATTCCTTGTGAGGACCTAACTTGAACAG
TTTCAGCATTTTACATCAACCATAACAGTGTGTTTCAAGATAAACTTGACTGTA
AATGCTTGCAGCACAGGATGCATGCACACATATTTGTGTGTATATATAGC
CACATGTCAAGTGAAGTGAAGATTAAGTGGTTGAGTTGACATCAGGAAAG
GCTGCCTAGAGAAACAGGAAGGATGGCAGACTGATAATGGTATGGTTGG
GTTATTGCATGACAGCCCTTTGTCTTAATAAACATTTAGATTCTGATACTC
ACTGGCTGGCTATACCAGCCTTGTACACTCCCTTGAATGCAAGTTTGGTTG

GTCAAAATTATATTAGCCAAGTCTTTCAAACCTGAAAGGGAACAGGAGGAA
CGAAGATGAAGGATCATCTATTCAATTATTGCTATGTGCCAGATATTGAG
CTAAATACCTTTTATATATTATCTCATTTAATTTTCACAACAACCTTGGCCT
AAAAACAACAACAATGATAACTAACACTTAATGAGCACTTACTATGTAGC
AGGCTCTGTCCCAAGTGCTTCAAATGTATTACTTATTTGATCTTTGCAGTA
GCCTTAAGAAGTATGTATTATTCCCCTATTTACAGATGAGGAAACTGAAG
CTCAAAGATGTTAGGGCCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATA
CCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGA
GAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAG
AAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTT
TATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAAATGACTCAGCACGGGGAAAG
TCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAA
GTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTC
GAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCA
GCATCTCTCCTCTTTCCCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATA
GTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCT
GTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTG
AGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCA
AGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAAATAGGGACGGCAGC
AGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAG
GTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGGGTGGGGTTT
GCTCAGACTGTCCTTCTCTGGAAGTGAAGAATTAGTCTCGAGGCCACC
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCCTGGT
CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
GGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCAC
CACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCT
ACGGCGTGAGTGCTTACAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT
CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG
GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCA
CAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
CTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACA
ACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA
GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTC
TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

INT13.BTKp.GFP (SEQ ID NO:26)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCGGTAGGGTGGACTGGCCAGTTGCAAAAACCTTTGCTG
GCCTTGCCCTTAGGGAGTGTCTTGAGGTACACTGTTCTGCAGCAGCTGCCT
CAAGGACGCTCAAGACAGATCCAAGCAAAAGTTATTCACTGATTTTCTTC
CTCTAGTGGCTACGACTGGGACTGCAAAAACATAGATTCAATAAGGGCTT
TGTCGTTGTCTTGGGTCTTTTTGTCTTTTATTTTAATTGTGGGAAAATTT
CAGTACTATCCCTGAGTTCATTAACCTACCATCACTAACATAATCATAAAG

GGATTTGGGGAGGTTGCTTAGTCTATCTTCTTGCCTTATGGCCACCTTGAA
CCTAAAATTCCCAGATTCTCTAACCAATGAATCCCGTTTCTGAGATTGAC
TTAAGCAAAGACAGATTAGTACTTCTAAAAATTTCCCTTTTACTAGTTTTC
CTATTTCTACCCCAGTAGGGATTTTGTCTATTGTAAGAATTATACATTCA
TGACCCCAAAGAATCACACCAAGACTTTAGGGCCCCTGAGAAAACCTCCA
GGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGA
GAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGA
AAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCT
TATATTCCGACATTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTCTTAGAAAATGA
CTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTCTTGTCTTGGG
GTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCG
GAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTG
TGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGT
GCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAG
GATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGT
GGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGT
AGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTG
GAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAA
AAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTG
TGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAAT
TAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG
GTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCT
CGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
ACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA
CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

1kb.BTKp.GFP (SEQ ID NO:27)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCAAACCTGTAGTCTGTTAGCTCACCTAGAAGAAGGAAATTC
TAGAGTCAAGAGAAGTTAAGTTTTAGACAAGCTGGAAGTTGGAATATACT
GGAGTTTAAAGATCATTGACTCAATGAAAAAAAAAAAAAGATTTGTCTGCAG
TAAACCAGAGTTTTAAAAATGATTAGAAATGGACCAGAAAAGAGATAA
GGATAATGAGAAAGGGGGCTCTCTAAACTATTTGGAAGTGAATTTGGGA
CAATGTTTCTGGAAACTATTTTGGCAGTATGTATCAAAATGCAAAATGCA
CATACTTTTTTGAAGTCTGGAAATGATGCTTGTATAGAGATCCTAATAACAT
GGGAAAATAATTAGGAATAATGTAAATAAGAACATTAGATCTTTTTTTTG

GAAAAAGGTACCTTGAACGGATGGATGGATGGATAGATACATACATACA
TGCATACATACATACATAGATGTTACGAAAAATAGGTAAATTAAGTGAAT
GTGCAATATGATCTCAAATATTATAAGAAACACACACAGAAAAAATGG
AAGGAATATGCCGATATATTAATGCCTCTGGATGAGTTTATGAATGATTTT
TTCTTTTTTATATCCCTGTACTTGACATATTTTCTACAATAAGCATGTTTAA
TTTTACTATATTTTGTTTTATTTTGAGATGGGGGTCTCCCTATGTTTCTCAG
GCTGACCTTGAACCTTGGGCTCAAGCAATCCTCCAATATCAGCCTCCTGA
GTAGCTGGGACTACAGGTGCACCCCACTGCACCCAGCTGCGTGTGTTATT
TTGATATCGATGGAAAAAATAAATAAAATGTTTAAGCCAAGGAAAAACAA
AAACTAGGTTGAAAAAGAAGGCCAAAAGGGCACACAAGTCCAGAGTGAA
AGACAGACACCCCAAGCAGTCACCTCAGAGCAGAGGGAGAATATTGAAA
GTATTACCACTGATCTGATCTGGCACTGACTATAAACTTGCAGATTGGCTC
TCTGGCTCTCCTTCCATCATCAGTTGGCCAGAAGGGCCCCCTGAGAAAACC
TCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCA
AGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGG
AGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTG
GGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAA
ATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCTTT
GGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCC
CCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCT
CTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCC
CTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGG
GAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTC
AGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGAT
AGTAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGG
GTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGA
AAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGG
CTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAG
AATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG
GGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA
GTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCTGAAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGG
AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

CONTIG.BTKp.GFP (SEQ ID NO:28)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCCCTCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTG
TGTCTTGTCTATGATAACTGCATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTTGAGTGA
GCATTTCACTTCCTTCTGGTTCTGACTATCTGTCTAATAGTGGTCATGTGG
GTTGAAAAGATAGAAAAGGGGAGTAGTATTAGGAAGTTCAGTATGAGGA
AGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCTGTTGTAATCTGGAAGA
GCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTT
GGTCTTCAGTTTGGCTTGCTTACATCCTGAGAACTCTGTAGGCCACATGTC
GTGAATATAGCAGCCTCTGCAACAGTGAAAGCCAGAAAAGGAAGTGGA
AGTCTCAGGGGAGGGGGCTTTCTGTCATGGATTTATGAGCACAGCAAGAC
TAACAAGCAAAAAGAAAAATGTAAAAGGATCTTGTTTCGTGTCCCTGACTA
TATCAAATTTACGAAACCTTTGAAAGAGGGGTATTTTCAGACACAGTTTTT
ACTACCAATGCCTTTCAACAAGATGACATTGTTTGGCTGCACTAGTGAAC
AATGCTGAACAGCAGATAATTTTAAATTAATTTATATTTGACTTCAGAATT
TATTATGTGATGTCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACCACATCTTATATA
TTTCATGCATCTTCGTAACACCTAGCATGATGCCTTGACATGGTTAAAAA
AATACTATTTGACTTGATGATATTGCTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAA
GTAGGTTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATTTTGGCTAATATTGGTGAGGGG
AGGCCACTAGGTAGTGGAGGTGGAGGTAATTAGCCATGAATTAATAATTT
ACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTACTAATCAAGACTTAATT
TATATAGATTATCACTTCATTTCTCTTCTATACAAAGTCAGAATTTAATAA
TAAGATAAAATACCCTTTGTTGGATAAACAAAAATGTTATCTCCAGCAAG
GGCAGACGGAGACCTTATAAAATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAG
TCAGGAGGACCTAAGAGTATGAAAAATTCTAAGAGCTTTTAAACGCTACA
TTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTCAGATAGTTCACATAACCTG
AACACCATTGCTGACTGAAGATTCTGCCATTGAGCTTAGTATTCCATCATA
TGAATAAAAGATAAAATATTAGACTAAGAGTTTCCCAGTTCTATCACTAT
CTCTCTAGTGCAATTTTGTAAATTTTAGGCACCTCCATTTCTCTATTTATTAA
GAAAAGTCCCATTTTTTGCCTGAATACAAGGGTGGTGTGGCATTCAATG
GTTATGCAATATTTAGAATCCTAAGTATAAAATACCTAGCTCCAAAAAAT
TAAATAGATGATGTATGAGAGTGCTTGAAGTCAGAGTCAGAGAACCTGGT
TTCAAGCCCTCTTTTACCATTTACAACTGGGTGATTTCTGGCAAGAAGGC
CAACAAGCTTCTTTGATGCTCAGTTTCTTCTTCTCAAAGGAGAATAATGGT
AATTCATGCCACATCTACCTCTGGGGTTGTTGTAAGGATCAAATGAAGTA
ATAATACATGTAAAAGCACATGGAAAACGTAAATCACTGTATACGAAAG
CACTGTACATCTCTTTGTTGTGGATAAATATTTCCCAAGGAAATATTTTAT
ATTCTTGCTTTGTGAGGACCTAACTTGAACAGTTTCAGCATTTTCACATC
AACCATACAGTGTGTTTCAAGATAAACTTGAACAGTTTCAGCATTTTCACATC
GATGCATGCACACATATTTGTGTGTATATATAGCCACATGTCAAGTGACT
GAGAGATTAACCTGGTTGAGTTGACATCAGGAAAGGCTGCCTAGAGAAAC
AGGAAGGATGGCAGACTGATAATGGTATGGTTGGGTATTGCATGACAGC
CCTTTGTCTTAATAAACATTTAGATTCTGATACTCACTGGCTGGCTATACC
AGCCTTGTACACTCCCTTGAATGCAAGTTTGGTTGGTCAAATATATTAG
CCAAGTCTTTCAAACCTGAAAGGGAACAGGAGGAACGAAGATGAAGGATC
ATCTATTCAATTATTGCTATGTGCCAGATATTGAGCTAAATACCTTTTATA
TATTATCTCATTTAATTTTCACAACAACCTTGGCCTAAAAACAACAACAT

GATAACTAACACTTAATGAGCACTTACTATGTAGCAGGCTCTGTCCCAAG
TGCTTCAAATGTATTACTTATTTGATCTTTGCAGTAGCCTTAAGAAGTATG
TATTATTCCCCTATTTACAGATGAGGAACTGAAGCTCAAAGATGTTATCC
TTATTTCTCTGGGGTAGGGTGGACTGGCCAGTTGCAAAAACCTACCTTTGCT
GGCCTTGCCTTAGGGAGTGTCTTGAGGTACACTGTTCTGCAGCAGCTGCC
TCAAGGACGCTCAAGACAGATCCAAGCAAAAGTTATTCACTGATTTTCTT
CCTCTAGTGGCTACGACTGGGACTGCAAAAACATAGATTTCATAAAGGGCT
TTGTCGTTGTCTTGGGTCTTTTTGTCTTTTATTTTAAATTGTGGGAAAATTT
TCAGTACTATCCCTGAGTTCATTAACCTACCATCACTAACATAATCATAAAG
GGATTTGGGGAGGTTGCTTAGTCTATCTTCTTGCTTATGGCCACCTTGAA
CCTAAAATTCCCAGATTCTCTAACCAATGAATCCCGTTTCTGAGATTGAC
TTAAGCAAAGACAGATTAGTACTTCTAAAAATTTCCCTTTTACTAGTTTTTC
CTATTTCTACCCCAGTAGGGATTTTTGTCTATTGTAAGAATTATACATTCA
TGACCCCAAAGAATCACACCAAGACTTTAGGGCCCGTGAGAAAACCTCCA
GGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGA
GAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGA
AAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCT
TATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGA
CTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTCTTGTCTTGGG
GTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCGG
GAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTG
TGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCTCTCCCTGT
GCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAG
GATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGT
GGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGT
AGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTG
GAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAA
AAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTG
TGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAAT
TAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGG
GTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCT
CGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
ACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA
CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

3kb.BTKp.GFP (SEQ ID NO:29)

GCATTTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGGCCCAAACCTGTAGTCTGTTAGCTCACCCCTAGAAGAAGGAAATTC
TAGAGTCAAGAGAAGTTAAGTTTTAGACAAGCTGGAAGTTGGAATATACT
GGAGTTTAAGATCATTGACTCAATGAAAAAAAAAAAAAGATTTGTCTGCAG
TAAAACCAGAGTTTTAAAAATGATTAGAAATGGACCAGAAAAGAGATAA
GGATAATGAGAAAGGGGGCTCTCTAAAACCTATTTGGAACCTGAAATTGGGA
CAATGTTTCTGGAAACCTATTTTGGCAGTATGTATCAAAATGCAAAATGCA
CATACTTTTTTGGACTCTGGAAATGATGCTTGTATAGAGATCCTAATAACAT
GGGAAAATAATTAGGAATAATGTAAATAAGAACATTAGATCTTTTTTTTG
GAAAAAGGTACCTTGAACGGATGGATGGATGGATAGATACATACATACA
TGCATACATACATACATAGATGTTACGAAAAATAGGTAAATTAACCTGAAT
GTGCAATATGATCTCAAATATTATAAGAAACACACACAGAAAAAAATGG
AAGGAATATGCCGATATATTAATGCCTCTGGATGAGTTTATGAATGATTTT
TTCTTTTTTATATCCCTGTACTTGACATATTTTCTACAATAAGCATGTTTTA
TTTTACTATATTTTGTTTTATTTTGGAGATGGGGGTCTCCCTATGTTTCTCAG
GCTGACCTTGAACCTCTTGGGCTCAAGCAATCCTCCAATATCAGCCTCCTGA
GTAGCTGGGACTACAGGTGCACCCCACTGCACCCAGCTGCGTGTGTTATT
TTGATATCGATGGAAAAATAAATAAAATGTTTAAGCCAAGGAAAACAA
AACTAGGTTGAAAAAGAAGGCCAAAAGGGCACACAAGTCCAGAGTGAA
AGACAGACACCCAGCAGTCACCTCAGAGCAGAGGGAGAATATTGAAA
GTATTACCACTGATCTGATCTGGCACTGACTATAAACTTGCAGATTGGCTC
TCTGGCTCTCCTTCCATCATCAGTTGGCCAGAATATATTGTCGCTAATGCA
AGACAAAAAGAGATGATGAATCACAGAGACCTAGAAGTTTCCAAAACCA
CAGAAGAAAAATGTAAATGCTAAAAACATAAGGCCAGGCGCGGTGGCT
CAAGCCTGTAATCCCAGCATTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGTCATGGTGT
GCGGCTGTAGTCCAAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAAGAGAATTGCTTGA
AACTGGGAGGTAGCGATTGCAGTGAGCCAAGATTGCGCTACTGTACCGAA
GCCTGGATGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAAATAAATAAATAAATAA
ATAAATAAATAAAACATGAACTGCTGTGGAAGAACCAGAGAGCCCTAAG
GCCTCCTGTAAATGACTACAGCAGGAGAGTTTCCCTGGTCAGCATGCAGC
TTTCGAAAATTGAGTTTGGCTTGATGCCTTCATCACAAATTTGGTCCCCTG
TAGCCTTGACTATGAAGCTTATCATAAAATAATTGGGTTTCACTGGGGCCC
GAACAAAAGCATCTTGGGAATTTAACAAGATTAAAGGTTGCTTTGTGCT
GTGGGTATGATTTTTTTTTCTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC
TGACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGC
AACCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTA
ACTGGGATTACAGGTGCGCGCCACCACGCCAGGCTAATTTTTGTATTTTA
GTAGAGACAGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGCTGCTCTCAAACCTCCT
GACCTTGCCATCCAGCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC
ATGAGCTACCACACGTGGCCATATGTAAATTTTAAACATGTAAACCAATA
CTGTATATCTTTTATAGATATTTACATCTGTAATGATAATATGAAAACGTA
CCTAGGAATGATAAACACCAAATTCAAGATATTGGTAATCTCTAAGGAGG
GAGAAGACTAAGATTTTGGAGTACATAAAGGGGTCTTGATTATATAGATA
GTATTTCAAGTTCTTAACACGTTCTTCTGGTCCCAAGGCCAAGGAATTCT
CAATTGAAATCTCAGTTAGAACGTGAAGGATGCTTCTTGGGACTGGGAAG
AGATTTTCCGTAGGCCAAATTTAACCTCCCACTAGAGATAGTTGATAATTC

TACCACATTTTCATAGTGAAGCATCAGGAAGACAGGACTGAAAAGGCAAG
AAGGAATGATGCAAATTGCATAGTCCAAAAGATAAGCTGGACCTAGGTTT
GCCAGTTTGTCTAAGTAACTGAGAATTCATTCTGAGATCAAAAAATCAAA
ATAATGTTTACAGCAGCATTGTTTATCACTGAAAGCAAACAACCTAAATG
TCCATCAACAGGAGAATGAATAAATATATTGGAATGTATTCATCATATAG
AATATTTTATGCATATAAAAAATGAATTA AACATATGAAGTAGAACTAGC
CAGATAAATAAATCCTAACATATTATATTGAGGGGAAAAAAGCAAGTTGC
TGGAGAATGTGTACCATATATATATATAAAATTTTCTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTCGCGACCGAGTTTCACTCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGC
AAGATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGTTCAAGGGATTCTCCC
GCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGAGAGTAGCGTTGGCCCAGCTAGTTTT
TGTATTTTATAGTAGAGACAGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGCTGCTC
TCAAACCTCCTGACCTTGTCATCCACCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGG
ATTACAGGCCTGAGTTACCGCACGGGCCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTC
AAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGG
TGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCA
ACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATT
CCGACATTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAG
CACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCTTTGGGGTCCCT
TCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGAC
AGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGC
CAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGAC
TGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGC
TTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCC
AGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTC
AGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGGTGGAATAG
GGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGAC
ATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTGTGAAAG
GGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTGGAAGTGTAGAATTAGTCT
CGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTG
CCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
TTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC
CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA
AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC GAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
CAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

revCONTIG.BTKp.GFP (SEQ ID NO:30)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCCTAAAGTCTTGGTGTGATTCTTTGGGGTCATGAATGTATAAT
TCTTACAATAGACAAAAATCCCTACTGGGGTAGAAATAGGAAAAC TAGTA
AAAGGGAAATTTT TAGAAGTACTAATCTGTCTTTGCTTAAGTCAATCTCAG
AAACGGGATTTCATTGGTTAGAGGAATCTGGGAATTTTAGGTTCAAGGTGG
CCATAAGGCAAGAAGATAGACTAAGCAACCTCCCCAAATCCCTTTATGAT
TATGTTAGTGATGGTAGTTAATGAACTCAGGGATAGTACTGAAAATTTTC
CCACAATTAAAAATAAAAGACAAAAAGACCCAAGACAACGACAAAGCCC
TTTATGAATCTATGTTTTTG CAGTCCCAGTCGTAGCCACTAGAGGAAGAA
AATCAGTGAATAACTTTTGCTTGGATCTGTCTTGAGCGTCCTTGAGGCAGC
TGCTGCAGAACAGTGTACCTCAAGGACACTCCCTAAGGCAAGGCCAGCA
AAGGTAGTTTTTGCAACTGGCCAGTCCACCCTACCCAGAGAAATAAGGA
TAACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATACAT
ACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACT
TGGGACAGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAGTGTTAGTTATCATT
GTTGTTGTTTTTAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAAATGAGATAATATAT
AAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGA
TCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTT CAGTTTGAAAGACTTGGCTAAT
ATAATTTTGACCAACCAAACCTTGCATTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTA
TAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCT
GTCATGCAATAACCCAACCATACCATTATCAGTCTGCCATCCTTCCTGTTT
CTCTAGGCAGCCTTTCCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCAC
TTGACATGTGGCTATATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGCT
GCAAGCATTTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGA
AATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAATATGAAA
TATTTCCCTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTCG
TATACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGTATTATTACTTCAT
TTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTAT
TCTCCTTTGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTTGGCCTTCT
TGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAATGGTAAAAGAGGGCTTGAAACCAGG
TTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCATCTATTTAATTTTTTG
GAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCATTGAATG
CCACACCACCCTTGATTTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATA
GAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGA
TAGAACTGGGAAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGG
AATACTAAGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGTT CAGGTTA
TGTGAAC TATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGT
TTAAAAGCTCTTAGAATTTTTCTACTCTTAGGTCCTCCTGACTTGTGCTTC
AATTCATGCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGCTGGAGA
TAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAAATTCTG
ACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTTG
ATTAGTACATATGGGTTATTC ACTTGGATAATATGGAGTAAAATTTTAATT
CATGGCTAATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCCTCACCAATA
TTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAAC TACAAACCTACTTCAAAAAGGGT
AAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATAGTATTTTTTTAACCAT
GTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATATATAAGAT

GTGGTTCCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCACATAATAAATTCTGAA
GTCAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTTCAGCATTGTTCACTAG
TGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATTGGTAGTAAAAACTGT
GTCTGAAATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGA
CACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTCTTTTTGCTTGTTAGTCTTGCTGTGC
TCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGAGACTTTCCACTTCCTTT
TCTGGCTTTCACTGTTGCAGAGGCTGCTATATTCACGACATGTGGCCTACA
GAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCT
TGCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACAA
CAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCTCATACTGAACTT
CCTAATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAG
ACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCTCACTCAACAAGCAGA
GCATCTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACACACTATGATAGAATT
GGTGCTGCTATGTATTCTTTTTGAGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTT
CAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAG
GTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTC
AACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATAT
TCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAG
CACGGGGAAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCTTTGGGGTCCCT
TCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGAC
AGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGC
CAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGAC
TGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGC
TTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCC
AGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTC
AGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAATAG
GGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAAGAAAAAAGAC
ATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAG
GGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCT
CGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTG
CCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGAC
CACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA
AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
CAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

IE.BTKp.GFP (SEQ ID NO:31)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAAATAGGGGA
ATAATACATACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATT
TGAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTT
AGTTATCATTGTTGTTGTTTTTAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAATGA
GATAATATATAAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATT
GAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTTTCAGTTTGAAAG
ACTTGGCTAATATAATTTTGACCAACCAAACCTTGCATTCAAGGGAGTGTA
CAAGGCTGGTATAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAA
GACAAAGGGCTGTCATGCAATAACCCAACCATAACCATTATCAGTCTGCCA
TCCTTCCTGTTTCTCTAGGCAGCCTTTCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAA
TCTCTCAGTCACTTGACATGTGGCTATATATACACACAAATATGTGTGCAT
GCATCCTGTGCTGCAAGCATTTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTAT
GGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAA
GGAATATGAAATATTTCTTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGT
ACAGTGCTTTCGTATACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGT
ATTATTACTTCATTTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATG
AATTACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCT
TGTTGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAAATGGTAAAAGAGGG
CTTGAAACCAGGTTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATAACATCATCT
ATTTAATTTTTTGGAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCA
TAACCATTGAATGCCACACCACCCTTGTATTACAGTGCAAAAAATGGGACT
TTTCTTAATAAATAGAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACT
AGAGAGATAGTGATAGAAGTGGGAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTT
ATTCATATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAAT
GGTGTTCAAGTTATGTGAACTATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCT
AGGAATGTAGCGTTTAAAAGCTCTTAGAATTTTTTCATACTCTTAGGTCTC
CTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCT
GCCCTTGCTGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCT
TATTATTAAATTCTGACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTAT
ATAAATTAAGTCTTGATTAGTACATATGGGTTATTCAGTTGGATAATATGG
AGTAAAATTTTAATTCATGGCTAATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGC
CTCCCCTCACCAATATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAACACAAACC
TACTTCAAAAAGGGTAAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATA
GTATTTTTTTAACCATGTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCA
TGAAATATATAAGATGTGGTTCCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCAC
ATAATAAATTCTGAAGTCAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTT
AGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATT
GGTAGTAAAAACTGTGTCTGAAATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATT
TGATATAGTCAGGGACACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTCTTTTTGCTT
GTTAGTCTTGCTGTGCTCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGA
GACTTTCCACTTCCTTTTCTGGCTTTCACTGTTGCAGAGGCTGCTATATTCA
CGACATGTGGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGA
CCAAATTTGTAGTTCTTGCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAG
CTCTTCCAGATTACAACAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCT

TCCTCATACTGAACTTCCTAATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCA
CATGACCACTATTAGACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCT
CACTCAACAAGCAGAGCATCTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACA
CACTATGATAGAATTGGTGCTGCTATGTATTCTTTTTGAGGCCCTGAGAA
AACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGA
CTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAA
ATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTC
TGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTA
GAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGT
CCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCT
CTGCCCCGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCT
TTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCT
CTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCT
CTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAG
TCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCA
AGATAGTAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGA
GGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAG
AAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGA
GTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTG
TAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTT
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC
ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC
CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTAC
CCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGG
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCG
ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT
CGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

0.7UCOE.IE.BTKp.GFP (SEQ ID NO:32)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAG
AGAGAAGGAAAGCCACCGACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGG
GGTCTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGCGCCTACAGCTCAAGCCACATCCGA
AGGGGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCGCCGGGGGGAGGGGT
GGCACCGCCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCGCGCG
CCCGGCGGGGGAGGGGCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCC
TAGGGGGAGGGCGGAGGCGCCGACGACCGCGGCACTTACCGTTCGCGGC
GTGGCGCCCGGTGGTCCCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGCGGGGCGAG
GACAGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGGTGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCA

GCGGCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCACTTCCTCGCCCCTGCGGTGC
GAGGGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGCTTA
AAACTAGTACCCCTTTGGGACCCTTTCAGCAGCGAACTCTCCTGTACA
CCAGGGGTCAGTTCCACAGACGCGGGCCAGGGGTGGGTCATTGCGGCGT
GAACAATAATTTGACTAGAAAGTTGATTTCGGGTGTTTGCGGCCACATCTTT
GAGCTTCAGTTTCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATACATACTTCTTAAG
GCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACTTGGGACAGAG
CCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAGTGTTAGTTATCATTGTTGTTGTTTT
TAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAAATGAGATAATATATAAAAGGTATT
TAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTT
CGTTCCTCCTGTTCCCTTTTCAGTTTGAAAGACTTGGCTAATATAATTTTGA
CCAACCAAACCTTGCAATTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTATAGCCAGCCA
GTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAAT
AACCCAACCATAACCATTATCAGTCTGCCATCCTTCCTGTTTCTCTAGGCAG
CCTTTCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCACTTGACATGTG
GCTATATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCATT
ACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAA
CTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAATATGAAATATTTCTTG
GGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTCGTATACAGTG
ATTTACAGTTTTCATGTGCTTTTACATGTATTATTACTTCATTTGATCCTT
ACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTATTCTCCTTTG
AGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTTGGCCTTCTTGCCAGAAA
TCACCCAGTTTGTAATGGTAAAAGAGGGCTTGAAACCAGGTTCTCTGAC
TCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCATCTATTTAATTTTTTGGAGCTAGG
TATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCATTGAATGCCACACCA
CCCTTGATTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATAGAGAAAT
GGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGATAGAACT
GGGAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGGAATACTA
AGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTTCAGGTTATGTGAAC
TATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAG
CTCTTAGAATTTTTCTACTCTTAGGTCCTCCTGACTTGTGCTTCAATTCAT
GCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGCTGGAGATAACATT
TTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAAATTCTGACTTTGT
ATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTTGATTAGTA
CATATGGGTATTCACTTGGATAATATGGAGTAAAATTTTAATTCATGGCT
AATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCCTCACCAATATTAGCCA
AAATAAATCAAATTTGGAACACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTAT
ATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATAGTATTTTTTTAACCATGTACAA
GGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATATATAAGATGTGGTT
CCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCACATAATAAATTCTGAAGTCAAA
TATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTTCAGCATTGTTCACTAGTGCAGC
CAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATTGGTAGTAAAACTGTGTCTGA
AATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGACACGA
ACAAGATCCTTTTACATTTTCTTTTTGCTTGTTAGTCTTGCTGTGCTCATA
AATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGAGACTTCCACTTCCTTTTCTGG
CTTTCAGTGTGTCAGAGGCTGCTATATTCACGACATGTGGCCTACAGAGTT

CTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTTGCTC
TCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACAACAGA
ATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCTCATACTGAACTTCCTA
ATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAGACAG
ATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCAT
CTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACACACTATGATAGAATTGGTG
CTGCTATGTATTCTTTTTGAGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTG
ACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGAC
ATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATC
CACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGAC
ATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGG
GGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACT
ATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGA
GACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGC
CCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCT
TCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGAT
GACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCA
TGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGG
TCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAATAGGGACG
GCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGG
TTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGG
GGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGG
CCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATC
CTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGG
CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCT
GCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTG
ACCTACGGCGTGCAAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCA
CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA
TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA
AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACATACAACAG
CCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
ACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC
GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

0.7UCOE.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:33)

CCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAG
GAAAGCCACCGACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGGTCTGC
AGCGTCTCCGGCCCTCCGCGCCTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGA
GGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCGCTGGGGGGAGGGGTGGCACCGC
CCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCGCGCGCCCGGCGG
GGGGAGGGGCCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGGGGA
GGGCGGAGGGCGCCGACGACCGCGGCACTTACCGTTCGCGGGCGTGGCGCC

CGGTGGTCCCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGCGGGGCGAGGACAGTGA
CCGGAGTCTCCTCAGCGGTGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGC
GCCAAAACCGGACTCCGCCCACTTCCTCGCCCCTGCGGTGCGAGGGTGTG
GAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGCTTAAAACTAGT
ACCCCTTTGGGACCACTTTTACGACGCGAACTCTCCTGTACACCAGGGGTC
AGTTCCACAGACGCGGGGCCAGGGGTGGGTTCATTGCGGCGTGAACAATAAT
TTGACTAGAAGTTGATTCGGGTGTTTTCGGGCCGGGGCTAGCTACGACGCG
TTCCGGAATTCGCCCTTGCAATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTG
CAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAG
TGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGG
ACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACA
TCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCG
ACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAAATGACTCAGCAC
GGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCA
CTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAG
GAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCA
GCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTG
TCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTT
GATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAG
TCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTCAG
AGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGGTGGAATAGGG
ACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACAT
TGTTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTGTGAAAGGG
TGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCG
AGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTTCCTGAAG
AGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGAC
TGTTCTCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGC
GGGGCCGCCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTAC
ATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCTGAGAGGCAG
ATCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCAT
TGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTA
TGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACACAGCTGA
AGAACGTGATTAGATACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGT
TTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCAGACAGCTAAGAACGC
TATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGA
GTTACACCGCAAGACCAAAAAAGCCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGA
TCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCA
GCACTTCCGAAGTGA AAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATG
AATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTATTCTGGA
AGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAG
GGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGAT
GTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTG
CTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGCGCGATTCTAGTA
AGGCCGGCAAATACACTGTGTCAGTGTTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCC
CAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTA
CTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAAT

ACCACCAGCACAAATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTC
TCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAG
TTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCCTGAAGGAGCTGGGAACTG
GGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGGCAGTACGATGT
GGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATC
GAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCT
GTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTATCATTACAGAGTACA
TGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATTC
CAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGG
AGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAAT
TGCTTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTC
AAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTC
CTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTA
AGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTG
GGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCAAAATCCGAGACAGCTGAGCACAT
CGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGT
ACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCAC
ATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCT
GA

IE.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:34)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATG
TAGGGGGCCACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAAATAGGGGA
ATAATACATACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATT
TGAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGT
AGTTATCATTGTTGTTGTTTTAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAATGA
GATAATATATAAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATT
GAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTTTCAAGTTTGAAAG
ACTTGGCTAATATAATTTTGACCAACCAAACCTTGCATTCAAGGGAGTGTA
CAAGGCTGGTATAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAA
GACAAAGGGCTGTCATGCAATAACCCAACCATACCATTATCAGTCTGCCA
TCCTTCCTGTTTCTCTAGGCAGCCTTTCTGATGTCAACTCAACCAGTTAA
TCTCTCAGTCACTTGACATGTGGCTATATATACACACAAATATGTGTGCAT
GCATCCTGTGCTGCAAGCATTTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTAT
GGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCTCACAAAGCAA
GGAATATGAAATATTTCTTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGT
ACAGTGCTTTCGTATACAGTGATTTACAGTTTTCATGTGCTTTTACATGT
ATTATTACTTCATTTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATG
AATTACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCT
TGTTGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAAATGGTAAAAGAGGG
CTTGAAACCAGGTTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCATCT
ATTTAATTTTTTGGAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCA
TAACCATTGAATGCCACACCACCCTTGTATTCAAGTGCAAAAAATGGGACT
TTTCTTAATAAATAGAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACT
AGAGAGATAGTGATAGAAGTGGGAAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTT
ATTCATATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAAT

GGTGTTTCAGGTTATGTGAACTATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCT
AGGAATGTAGCGTTTAAAAGCTCTTAGAATTTTTCATACTCTTAGGTCCTC
CTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTTATTTTATAAAGGTCTCCGTCT
GCCCTTGCTGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCT
TATTATTAAATTCTGACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTAT
ATAAATTAAGTCTTGATTAGTACATATGGGTTATTCACCTGGATAATATGG
AGTAAAATTTTAATTCATGGCTAATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGC
CTCCCCTCACCAATATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAACCTACAAACC
TACTTCAAAAAGGGTAAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATA
GTATTTTTTTAACCATGTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCA
TGAAATATATAAGATGTGGTTCCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCAC
ATAATAAATTCTGAAGTCAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTT
AGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATT
GGTAGTAAAAACTGTGTCTGAAATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATT
TGATATAGTCAGGGACACGAACAAGATCCTTTTACATTTTCTTTTGCTT
GTTAGTCTTGCTGTGCTCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGA
GACTTTCCACTTCCTTTTCTGGCTTTCCTGTTGCAGAGGCTGCTATATTCA
CGACATGTGGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGA
CCAAATTTGTAGTTCTTGCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAG
CTCTTCCAGATTACAACAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCT
TCCTCATACTGAACTTCCTAATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCA
CATGACCCTATTAGACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCT
CACTCAACAAGCAGAGCATCTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACA
CACTATGATAGAATTGGTGCTGCTATGTATTCTTTTTGAGGCCCTGAGAA
AACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGA
CTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAA
ATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTT
TGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTA
GAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGT
CCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCT
CTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCT
TTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCT
CTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCT
CTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAG
TCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCA
AGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGA
GGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAG
AAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGA
GTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTGGAAGT
TAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAG
AGCATTTTCTGTAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAA
CTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATG
AGTACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCATCGA
TGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCAC
CCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGATGGA
GCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGA

CGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGT
GGATTCACCAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAGCGATCTGGTGCAG
AAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCCAG
ACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAACGGAT
CTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCA
ACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGC
TGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAAGTAAAAAGGTGGTGGCTCTGTATG
ACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGA
GTATTTCAATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATA
AGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGA
GGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCC
AGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGT
GCGCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTCAAGTGTTCGCTAAGA
GCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACA
CCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCA
GAGCTGATTAATACTACCACCAGCACAAATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCT
GAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCTACCGCTGGAC
TGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCCTGAAG
GAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAG
GGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGGCTCAATGAGCGA
GGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCACGAGA
AACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTATC
ATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGAT
GAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTG
TGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCT
GGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTG
ACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTG
GGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGC
AAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGA
AATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCAAAATTCCGAGA
CAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCC
TCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGA
CGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGG
ACGAGGAGAGCTGA

0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:35)

CCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAG
GAAAGCCACCGACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGGTCTGC
AGCGTCTCCGGCCCTCCGCGCCTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGA
GGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCGCTGGGGGGAGGGGTGGCACCGC
CCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCGCGCGCCCGGCGG
GGGGAGGGGCCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGGGGA
GGGCGGAGGCGCCGACGACCGCGGCACCTACCGTTTCGCGGCGTGGCGCC
CGGTGGTCCCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGCGGGGCGAGGACAGTGA
CCGGAGTCTCCTCAGCGGTGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGC
GCCAAAACCGGACTCCGCCCACTTCCTCGCCCCTGCGGTGCGAGGGTGTG

GAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGCTTAAAACTAGT
ACCCCTTTGGGACCACTTTCAGCAGCGAACTCTCCTGTACACCAGGGGTC
AGTTCCACAGACGCGGGGCCAGGGGTGGGTCATTGCGGCGTGAACAATAAT
TTGACTAGAAAGTTGATTCGGGTGTTTTCGGGCCGGGGCTAGCACATCTTTG
AGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATACATACTTCTTAAGG
CTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACTTGGGACAGAGC
CTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTTAGTTATCATTGTTGTTGTTTT
AGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAAATGAGATAATATATAAAAGGTATTT
AGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTTC
GTTCTCCTGTTCCCTTTCAGTTTGAAAGACTTGGCTAATATAATTTTGAC
CAACCAAACCTTGCACTTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTATAGCCAGCCAG
TGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAATA
ACCCAACCATAACCATTATCAGTCTGCCATCCTTCCTGTTTCTCTAGGCAGC
CTTTCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCACTTGACATGTGG
CTATATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCATTTA
CAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAAC
TGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAATATGAAATATTTCTTG
GAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTCGTATACAGTGA
TTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGTATTATTACTTCATTTGATCCTTA
CAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTATTCTCCTTTGA
GAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTTGGCCTTCTTGCCAGAAAT
CACCCAGTTTGTAATGGTAAAAGAGGGCTTGAAACCAGGTTCTCTGACT
CTGACTTCAAGCACTCTCATACATCATCTATTTAATTTTTTGGAGCTAGGT
ATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCATTGAATGCCACACCAC
CCTTGATTTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATAGAGAAATG
GAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGATAGAACTG
GGAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGGAATACTAA
GCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTTCAGGTTATGTGAACT
ATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAG
CTCTTAGAATTTTTCATACTCTTAGGTCCTCCTGACTTGTGCTTCAATTCAT
GCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGCTGGAGATAACATT
TTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAAATTCTGACTTTGT
ATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTTGATTAGTA
CATATGGGTTATTCACCTGGATAATATGGAGTAAAATTTTAATTCATGGCT
AATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCCTCACCAATATTAGCCA
AAATAAATCAAATTTGGAACACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTAT
ATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATAGTATTTTTTTAACCATGTACAA
GGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATATATAAGATGTGGTT
CCAACCTCACAGAGTTTATAGACATCACATAATAAATTCTGAAGTCAAA
TATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTTCAGCATTGTTCACTAGTGCAGC
CAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATTGGTAGTAAAAACTGTGTCTGA
AATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGACACGA
ACAAGATCCTTTTACATTTTTCTTTTTGCTTGTTAGTCTTGCTGTGCTCATA
AATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGAGACTTCCACTTCTTTTCTGG
CTTTCAGTGTGAGAGGCTGCTATATTCACGACATGTGGCCTACAGAGTT
CTCAGGATGTAAGCAAGCCAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTTGCTC

TCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACAACAGA
ATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCTCATACTGAACTTCCTA
ATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAGACAG
ATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCAT
CTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACACACTATGATAGAATTGGTG
CTGCTATGTATTCTTTTTGAACGCGTTCCGGAATTCGCCCTTGCATTTCTA
GGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGGCC
CTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGT
TACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCA
AATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACA
AGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATG
CTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCT
TGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGA
GACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCC
AGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTA
AGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCC
CTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCC
ATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGA
TAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGG
ACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATG
CTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAG
GGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTC
TCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTG
ATCCTGGAGAGCATTTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTC
TCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGACAGTGCACAAGCTGT
CTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGGG
GAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAA
AGAATCCACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTC
TGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGT
GGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGA
GAAAGAGGTGGATTCACCAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAGCGA
TCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTG
CTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATC
GGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCC
CCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCAC
CCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTG
GCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAA
GGGCGACGAGTATTTCAATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGG
CCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACC
GAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGAC
ACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGG
TTTATCGTGCGGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTCAAGTGTTC
GCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGT
GTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTA
CAATCCCAGAGCTGATTAATACTACCACCAGCACAATTCTGCCGGCCTGATC
AGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCTAC

CGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACAT
TCCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAA
ATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCA
ATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTC
CCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCC
ATTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTG
CGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCA
AGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCAC
CGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAA
GGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCA
GCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGA
TGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGTGA
TGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCAAAAT
TCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACA
TCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGA
AGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGAT
GTGATGGACGAGGAGAGCTGA

ABCD.BTKp.GFP (SEQ ID NO:36)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCGGATCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATG
TACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCA
TTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTATCAGCAC
AAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGGCCGAAAGGGTCCTTT
CCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATG
AGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGC
AACTTAGTGGAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAG
CCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAAT
GAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATG
GTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAA
AGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGC
CAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCT
GTGCCAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGC
AGCCTCTGCCTCAGCCCAGACAGTGCGGCCAACCTTGAGGTTGTGGCAA
AGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTG
TCTTCATTATTTCTCCTTTCTTTCTCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTA
AACTCCTTATGGTGCGAACTAATGTAACCTTCCATCCAGTTATGGGGGATT
GGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATT
TCCTATAGAGTTTCCTTTCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTA
GGTATAAAGGGAAGATACAGCTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCC
AAAGAGTTATCAGATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGA
GATCTGATTGCTAACTACTGAAAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAGTGA
CACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCC
AAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGG
GAGAACTCCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCAG
TTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGG

AAACCCAGAAGCTTTAAACGCGTAGGAAAGACAGGGAATGGCCAGAATC
TTCCTAGCCAATTGAGTAGTGCTTTCAAGGAGAAATCAAGAGAAAACACT
ACTTCTTGATATTTTGGCTAAGTAGTCATTTGAAGTACAGTTGACTGGTT
ATTTTATTTTAAATCATATCTCATAGACTCTTCCCAATCATAGGCTGGCTG
TGTAAGTTTCTGAATTTTGTCTGCTGCTTCTTCTTCTTTTTTTTTTATTTT
TATTTTTTATTTTTTTTTTTGAGACTCCAGGCTGGAGTGCAGTGTACAGATCT
TGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCGAGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAG
CCTCCTGAGTTGCTGGGACTACAGGCGCCTGTCACCACGCCCCGGCTAATT
TTTTGTATTTTAATAGAGACGGGATTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTC
TAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGG
GATTACGGGCATGAGCCACTGCGCCTGGACTTATTATTCTTAATAGTATTT
TATCTTATGAGCGAAGATAAGAGCCCAAGATGGTTTAGTTTACTGATTCT
GCAAGTGCTATTTCTATTAATTCCTTGGCATACTGCAGTTTGTATGATGGC
TGCACTCTTGTTAATAAGCTTCGTCTTTCTGAATTCTGTTGCTCCATAGGG
AGCTGGGAGGCTGCAAAAGGTGGCCCTGTAAAAATCTTTGCATTTATAAT
TTAATAATTACAGACCCAGTGGGACAATGTTTGAAAAATTATATTCACC
GTCTAGGAAATTGGGAACTGAAAGTCCAATATCTGCCTCAGTGGAGTTCT
GGCACCTGCATTATCCCTTCTGGGTATATCAAGATCAACAGCTGCACAGA
TACTTTTGCTTTTACAGATTCTACACATATCATATAAAGGTGAATAGTGT
AAAGCTACCTCTACACCTTACCAAGCACACAGGGGGCCCCCTGAGAAAACC
TCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCA
AGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGG
AGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTG
GGCTTATATCCGACATTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAA
ATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCTTT
GGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCC
CCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCT
CTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCCTGTAAGCCCCCTCTCC
CTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGG
GAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTC
AGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGAT
AGTAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGG
GTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGA
AAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGG
CTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAG
AATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG
GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA
GTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTCTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC

AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

DBCA.BTKp.GFP (SEQ ID NO:37)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCCCTGTGTGCTTGGTAAGGTGTAGAGGTAGCTTTACACTATTCA
CCTTTATATGATATGTGTAGAATCTGTGAAAAGCAAAAGTATCTGTGCAG
CTGTTGATCTTGATATACCCAGAAGGGATAATGCAGGTGCCAGAACTCCA
CTGAGGCAGATATTGGACTTTCAGTTCCCAATTTCTAGACGGTGAATATA
ATTTTTCAAACATTGTCCCACTGGGGTCTGTAATTATTAAATTATAAATGC
AAAGATTTTTACAGGGCCACCTTTTGCAGCCTCCCAGCTCCCTATGGAGC
AACAGAATTCAGAAAGACGAAGCTTATTAACAAGAGTGCAGCCATCATA
CAAACCTGCAGTATGCCAAGGAATTAATAGAAATAGCACTTGCAGAAATCAG
TAAACTAAACCATCTTGGGCTCTTATCTTCGCTCATAAGATAAAATACTAT
TAAGAATAATAAGTCCAGGCGCAGTGGCTCATGCCCCGTAATCCCAGCACT
TTGGGAGGCTGAGGCTGGCGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTAGAGACCA
GCCTGGCCAACATGGTGAAATCCCGTCTCTATTAAAATACAAAAAATTAG
CCGGGCGTGGTGACAGGCGCCTGTAGTCCCAGCAACTCAGGAGGCTGAG
GCAGGAGAATCGCTTGAACCTCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGA
TCGTGACACTGCACTCCAGCCTGGAGTCTCAAAAAAAAAAATAAAAAATAA
AAATAAAAAAAAAAAGAAGAAGAATACCAGAGCAAAATTCAGAAAAC
TACACAGCCAGCCTATGATTGGGAAGAGTCTATGAGATATGATTTAAAAT
AAAATAACCAGTCAACTGTACTTCAAATGACTACTTAGCCAAAATATCCA
AGAAGTAGTGTTTTCTCTTGATTTCTCCTTGAAAGCACTACTCAATTGGCT
AGGAAGATTCTGGCCATTCCCTGTCTTTCTACGCGTTTAAAGCTTCTGGG
TTTCCAATGCTCTCAGATTGCCCTCAGCCACTGCACATGAATCTCCATAGA
AACTGAAAGTCACACGTGGCCCAATTGTTTCAGGGTCCTCAGAGGAGTTC
TCCCTCCTCCTTCCCCTCCCAGATGGCTTCATGCATAACCAAGTAGCTTT
GGAGTCAAATATGTCAAGGCCTCTTTTCTAGCTTCTTGCTGAGCACTGTGT
CACTGAAAATTCTAGTTCTTCCTTATTTTCAGTAGTTAGCAATCAGATCTC
AGCAATCAGATCATTGTGGGTGTAGAAGGGGTATCTGATAACTCTTTGG
AGAACGCCCAAACCTTTGGTTTTCGAAAGCTGTATCTTCCCTTTATACCTAA
GTCACCTCCTGATATGGGTCTAGTCCACTGAAAGGAAACTCTATAGGAAA
TTTGCTCAAATGGAAATAGCAAATCATAGTGATAATTTAAAATTGCACCA
ATCCCCCATAACTGGATGGAAAGTTACATTAGTTTCGCACCATAAGGAGTT
TACAAAGAATTCACGCGTGGATCCGAGGAAAGGAAAGGAGAAATAATGA
AGACAAGAGAAAAGCAAGCCATGCACATGGAGGGCAATGGTAAGAGGA
GAAACCTTTGCCACAACCTCAAGGGTTGGCCGCACTGTCTGGGCTGAGGC
AGAGGCTGCTTTCTCCTGGCCCAGTCTTTTACCCATTGTTACCACGAGGTT
GGCACAGCTTCCACACAGTCCTTTAATAAGCCAGCTCTGACCCTGGCGAC
ATTTGGCCTGGTACAGCTCAAGGCAGGTAGCCTACACCCTGGCCTAGCCA
GGCCTTTCCCTAGCTCACAAAGGTCAACTTCATAACGTGGAGCGTGAGCT
TTTACCATGTTCTCAGAGAATCTGCCTCTTAGTATTTCTTTTTCTAAAGGCT
TCATTGACCCATGTATCCCTATTGAGTCTTCAAGCACTATTTGACAGAAGG

GCTTGTTTTTATCTGACTGCTCCCTGCAATATTACTTTTCCACTAAGTTTGC
CAGAGGTACCCCTTTCTAACATTTGCTACCTGTTCCGGATGGTCACCTCATG
TCACATTTTTCTCTTCTCCTGTTCCGCCACCCTCAGCCCTTGTCGGAAAGGA
CCCTTTCGGCCTCTCTAATCACCAGAAGGGACTGCCAGGGCCTTGTCGTG
ATGACACTCCCACCCTCCGTCAGCCTCCTCCACTAGCTGATAAATGGCAC
CAGCCATGCTGTCTCTCTGGTTTTAGGGGTCCCAAGCAAGGTACATTGCT
GCTGCTGCCAGCCCCTGCCATACCCAGGGATCCGGGCCCCCTGAGAAAA
CCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACT
CAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAAT
GGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTG
TGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGA
AAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCC
TTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCT
GCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTT
GCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCTC
TCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTC
TGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGT
CTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAA
GATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAG
GGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGA
AGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTGAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAG
TGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGT
AAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC
ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGC
CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTAC
CCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGG
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCG
ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT
CGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

AB.BTkp.GFP (SEQ ID NO:38)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCCGATCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATG
TACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCA
TTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTCATCAGCAC
AAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTT
CCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATG
AGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGC

AAACTTAGTGGAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAAACAAG
CCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAAT
GAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATG
GTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAA
AGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGC
CAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAGGACTGTGTGGAAGCT
GTGCCAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGC
AGCCTCTGCCTCAGCCCAGACAGTGCGGCCAACCCCTTGAGGTTGTGGCAA
AGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTG
TCTTCATTATTTCTCCTTTTCTTTCCTCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTA
AACTCCTTATGGTGCGAACTAATGTAACCTTCCATCCAGTTATGGGGGATT
GGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATT
TCCTATAGAGTTTCTTTTCACTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTA
GGTATAAAGGGAAGATACAGCTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCC
AAAGAGTTATCAGATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGA
GATCTGATTGCTAACTACTGAAAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCACTGA
CACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCC
AAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGG
GAGAACTCCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCAG
TTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGG
AAACCCAGAAGCTTTAAACGCGTAGGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGC
TTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAA
AGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAG
TCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCTTAT
ATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTC
AGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTGGGGTC
CCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAG
GACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGAGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTC
TGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCT
GACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGAT
AGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGC
CCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGT
GTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGA
TAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAA
GACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGA
AAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTGAGCTGTAAGAATTAG
TCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTG
GTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCA
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG
AAGTTCATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCCACCTCGT
GACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACA
TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGA
GGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA
ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGG

CATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAG
ACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC
GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

A.BTKp.GFP (SEQ ID NO:39)

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCGGATCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATG
TACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCA
TTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTCATCAGCAC
AAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTT
CCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATG
AGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGC
AACTTAGTGGAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAAACAAG
CCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAAT
GAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATG
GTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAA
AGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGC
CAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCT
GTGCCAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGC
AGCCTCTGCCTCAGCCCAGACAGTGCGGCCAACCTTGAGGTTGTGGCAA
AGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTG
TCTTCATTATTTCTCCTTTCTCTTCCTCGGATCCACGCGTAGGGGCCCCCTGA
GAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACA
GGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCT
TAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTAT
TTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTC
TTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTTT
TGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACT
CCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTC
TCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCC
CCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTA
CCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTA
GAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGAC
TCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGT
TGAGGGGGTGGAATAGGGACGGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCT
GAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAC
TGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTGGA
CTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
GTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG
GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGG
CAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCT
GGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGTCTCAGCCGC
TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA

AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCAT
CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
AAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCG
GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCC
GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGG
AGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
TAA

B.BTKp.GFP (SEQ ID NO:40)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAAC
TAATGTAACCTTTCCATCCAGTTATGGGGGATTGGTGCAATTTTAAATTATC
ACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTATAGAGTTTCCTTTCA
GTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATAAAGGGAAGATAC
AGCTTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCAAAGAGTTATCAGATACC
CCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACT
GAAAATAAGGAAGAACTAGAAATTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCAAGAA
GCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGC
ATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGGGAGAAGTCTCTGAGGAC
CCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTTCAAGTTTCTATGGAGATTCATGT
GCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAGAAGCTTTAAA
CGCGTAGGGGGCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGT
CTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTA
ATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATG
GGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTATCTGT
AGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGGAAGTCTTGTC
TCTACCTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAAC
TGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAAC
GCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTC
TCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTT
AGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCT
CAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGG
TTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAAT
GAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAA
CCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGG
AAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAG
ACTGTCTTCTCTCTGGAAGTGAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTG
AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT
GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAG
GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAACGG
CAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG
TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTC
AAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA
GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC

ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG
GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAG
ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
GCAGAACACCCCCATCGGGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAA

0.7UCOE.AB.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:41)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGA
GAAGGAAAGCCACCGACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTCGCGGGT
CTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGCGCCTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGG
GGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGGCCGCCGGGGGGAGGGGTGGC
ACCGCCACGCGCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCGCGCGCC
GGCGGGGGGAGGGGCCGCGCGCCGCGCCCCGTGGGAATTGGGGCCCTAG
GGGGAGGGCGGAGGCGCCGACGACCGCGGCACTTACCGTTCGCGGCGTG
GCGCCCGGTGGTCCCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGCGGGGCGAGGAC
AGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGGTGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCG
GCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCACTTCCTCGCCCCCTGCGGTGCGAG
GGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGCTTAAAA
ACTAGTACCCCTTTGGGACCACTTTCAGCAGCGAACTCTCCTGTACACCA
GGGGTCAGTTCCACAGACGCGGGGCCAGGGGTGGGTCAATTGCGGCGTGAA
CAATAATTTGACTAGAAGTTGATTCGGGTGTTTGCGGCCCTGGGGTATGG
CAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAAC
CAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGA
CGGAGGGTGGGAGTGTCATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTG
ATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGG
AACAGGAAGAGAAAAATGTGACATGAGGTGACCATCCGAACAGGTAGCA
AATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTAGTGGAAGTAATATTGC
AGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGA
CTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAA
GAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAA
GTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAAAGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCT
ACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCT
TATTAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGCCAACCTCGTGGTAACAATGGGTA
AAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAGCCCAGACAGTGCG
GCCAACCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCA
TGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCTCCTTTCTCCTCG
GATCCACGCGTGAATTCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAACTAATGTAAC
TTCCATCCAGTTATGGGGGATTGGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATT
TGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTATAGAGTTTCTTTTCAGTGGACTA
GACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATAAAGGGAAGATACAGCTTTCGA
AAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCCAAAGAGTTATCAGATACCCCTTCTAC
ACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTGAAAATAA

GGAAGAACTAGAATTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAA
AGAGGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCC
ATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGGGAGAACTCCTCTGAGGACCCTGAAAC
AATTGGGCCACGTGTGACTTTCAGTTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGC
TGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAACCCAGAAGCTTTAAGGCCCTGAG
AAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAG
GACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTT
AAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATT
TCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCT
TAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTTTT
GTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTC
CTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCT
CTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCC
CTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTAC
CTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAG
AGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACT
CAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTT
GAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTG
AGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACT
GAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGA
CTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTG
GAGAGCATTTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCT
GAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACT
ATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCAT
CGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATC
CACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGAT
GGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTA
CGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAG
AGGTGGATTACACAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAGCGATCTGGT
GCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTT
CCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAAC
GGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGC
CTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAG
CCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTGGCTCT
GTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCG
ACGAGTATTTTATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGA
GATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGG
CTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGG
TCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTA
TCGTGCGCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTGAGTGTTCGCT
AAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTT
CACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAAT
CCCAGAGCTGATTAATACTACCACAGCACAAATTCTGCCGGCCTGATCAGCA
GGCTGAAGTATCCCGTCTCCAGCAGAAACAAAATGCTCCTTCTACCGCT
GGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCCT
GAAGGAGCTGGGAAGTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGG

AGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGA
GCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCAC
GAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTT
TATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCG
AGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGA
TGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGG
ACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTG
AGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTC
CGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTA
TAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGCTGATGTG
GGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTACAAATTCCG
AGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTG
GCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGC
CGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGA
TGGACGAGGAGAGCTGA

AB.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:42)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTG
CTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCA
GCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTATCAGCACAAGGCC
CTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTTCCGACA
AGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATGAGGTGA
CCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTA
GTGGAAAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCT
GTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCT
TTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAG
CTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAAAGGCCTG
GCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCAAATGT
CGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGCCAA
CCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCT
GCCTCAGCCCAGACAGTGCGGCCAACCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTC
TCCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCAT
TATTTCTCCTTTCTTTCTCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTAAACTCCT
TATGGTGCGAACTAATGTAACCTTCCATCCAGTTATGGGGGATTGGTGCA
ATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTCTATA
GAGTTTCCTTTCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATA
AAGGGAAGATACAGCTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCCAAAGAG
TTATCAGATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGA
TTGCTAACTACTGAAAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAGTGACACAGTG
CTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTA
CTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGGGAGAACT
CCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCAGTTTCTATG
GAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAG
AAGCTTTAAGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAG
TCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTT

AATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAAT
GGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTATCTG
TAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGT
CTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCCTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAA
CTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAA
CGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCT
CTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTT
TAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGC
TCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAG
GTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAA
TGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGA
ACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTTCAG
GAAGCAAAAAAAGGGAAGTGTGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCA
GACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCA
CCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAG
AAAAAGAAAACCTCTCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGAC
AGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAG
GATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGAC
CGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGG
GGCGAGGAGTCCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCC
CTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACC
CACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACACAGCTGAAGAACGTGATT
AGATAACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGA
CGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCC
AGATTCTGGAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGC
AAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGA
AAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAA
CTGAAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGA
TCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTTCATTCTGGAAGAGTCTAATC
TGCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCC
ATCTAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGT
ATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGA
GGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGC GCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAA
TACACTGTGTCAGTGTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGAT
CAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGA
GAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACCTACCACCAGCACA
ATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAAC
AAAAATGCTCCTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGA
TCCAAAGGACCTGACATTCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCG
TGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGAT
GATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAG
GTCATGATGAACCTGTCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTG
CACCAGCAGCGGCCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGT
GTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAG
CTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTC
TAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACG

ATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTG
GATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTC
TCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCT
GGGCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCT
TACGAGCGGTTACAAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCT
GCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGT
ACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCT
GCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

BTKe.AB.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:43)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCTCCATCACCTACTAGATATATCAGTGCAGTGAAAACCTTCGCTA
AACTAACGCTATACCTATATCATGAAGTGTGTGGACTAGAGACAAGTGCA
TATCCTTACGGCAATTAACCTGGGAAACGTCAAATAGTAACTACCACTCAC
CTTTTCCGGAAAATCGGCTTAGTTTGGCCACCATAGCCACTCTGCTTCCT
GTCATAACGCCGCTTTCCTGGGAAAACGAATTGGTATTTGTTATAAAATA
CTGAAGATCAGCAAGTAAGTCTTACAGGTTTTATCTTAATTTTCGCAGCAG
AAATATTAACGCTCAAGCCAGGCGTGGAGGGAGAGAGACCCGGACTCGT
ATGTTATTCTACAACACAAATGTCACATTAACACCAAATTATGCGGAATC
CATCTTACCCTGGGCGTACAGAGAATCCTTGCCCTTCTTGTACTGTGTCAC
TTTATGGGGTTGGTGCTTGCCACACTTCTTACAGAAAGTCCGGCGGGTTTT
AGGGACGTTAACCTAGTAAAGAAACAGTTCAGAACGTGCAATGTTATTTG
ACCACAATGGCACAACGCCCTACCTTACCCAGCTAAAGCTGAGGCACTCC
AGGAGGACTCCTCATTACTTGCTACCTCTGACTACAGGGTGGGCCAGCCC
CATGTGCTTCAAGCAGAGCTTCTCCCTCCGTCGAGCCCCAAAGAGGGAA
GAGACCTCATTAACCTCACCCCCGGCTAACTCTACCTCTTTGAACCCATCA
CTTCAATTCTGGCCCCGTAGCCCGGTCCCTTTAGGGTTGATCCCGGCAAG
ATTGGGTTGCTCTGATATATCGAGTCCACACAGGAGCCTGGACCCATCCC
GGCATAGCACGGGCGACGAAGGGGGGGGAAAGATTAAGCTGGATGTTACT
CGGCCCCCACCAGCAAGTCCTACCATGCTTGCGTGAGCGCTATCGGCGCG
GAAAGAAAGAAACCGCGAGGCAAACGGAAGTATATAGGAGGTTCCCGAT
CGCACTTCCTCATGGGAGTCGGTAGGAGCAATCATAGAGTGTAAGGCTCA
GCGCAGCGCCCTCGGGCGGCTGAGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGGCG
GGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGTGGTCCACTCACCCGACTT
CCTCCCGCCCCGCAGCTTTCAACGTTTCGTCACCTTTATCTCTTTTGGTGGA
CTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCCAGATCC
TCTGGCCTCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTTCGAATGAAGG
GGTCCTCCACCTCCACGTTCCATTCTGTTCCACCTCAAGGTCACTGGGAA
CACCTTTCGCAGCAAACCTGCTAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAAT
TGTTCCAGTTCATCTATCATATGGCCAGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTA
TTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGTTCCGGGGGAGAGGTACAGTAA
TCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACTAAGTACTTTGAAGAAAA
GGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCCCTTCTGTTGAGGGAGTAAGTC
AGCAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGGCTCCTGTCT
GGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACC
CCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGA

GGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTTCATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTC
CCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTTCCGACAAGGGCTGAG
GGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATGAGGTGACCATCCGAA
CAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTAGTGGA
GTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAG
TGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAA
GAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCC
ACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAAAGGCCTGGCTAGGCCAG
GGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCAAATGTCGCCAGGGTC
AGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGCCAACCTCGTGGA
ACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAGCCC
AGACAGTGCGGCCAACCCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACC
ATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGCTTCATTATTTCTCCT
TTCCTTTCCTCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTAACTCCTTATGGTGCG
AACTAATGTAACCTTCCATCCAGTTATGGGGGATTGGTGCAATTTTAAATT
ATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTATAGAGTTTCTT
TCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATAAAGGGAAGAT
ACAGCTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCCAAAGAGTTATCAGATA
CCCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTA
CTGAAAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCAAG
AAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTAT
GCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGGGAGAACTCCTCTGAGG
ACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCAGTTTCTATGGAGATTCAT
GTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAGAAGCTTTAA
GGCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTA
CCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGA
GGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGGAAGG
GCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTATCTGTAGGGGAA
AAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTC
TGTCTTGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTC
CCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCC
TGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTC
CTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGT
TGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAG
CCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAA
AGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCG
GGGACAGTTGAGGGGGTGGGAATAGGGACGGCAGCGGAACCAGATAGC
ATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTGAGGAAGCAAAAA
AAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTC
CTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCT
GTGATCCTGGAGAGCATTTTCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAA
CCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGACAGTGCACAAG
CTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAGGATCAAAAAA
GGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTG
AAAAGAATCCACCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTC
CTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCA

GGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGC
TGAGAAAGAGGTGGATTACACAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAG
CGATCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCT
GTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAA
ATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAA
GCCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGC
CACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAAGTAAAAAGGTG
GTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAG
AAAGGGCGACGAGTATTTCACTTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGA
GGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGT
GACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACA
TGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGG
AGGGTTTATCGTGCGCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTCAG
TGTTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTG
GTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTT
AGTACAATCCCAGAGCTGATTAACACCAGCACAATTCTGCCGGCCT
GATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTT
CTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTG
ACATTCCTGAAGGAGCTGGGAAGTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGG
AAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGC
TCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCT
GTCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGG
CCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTAT
CTGCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGT
GCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTG
CACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGT
GAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACA
CCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTG
CTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTG
CTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTTAC
AAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGC
CACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCAC
GAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCT
AGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

BTKe.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:44)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAG
GGGGCCCTCCATCACCTACTAGATATATCAGTGCAGTGAAAACCTTCGCTA
AACTAACGCTATACCTATATCATGAAGTGTGTGGACTAGAGACAAGTGCA
TATCCTTACGGCAATTAAGTGGGAAACGTCAAATAGTAACTACCACTCAC
CTTTTTCCGGAAAATCGGCTTAGTTTGCCACCATAGCCACTCTGCTTCCT
GTCATAACGCCGCTTTCCTGGGAAAACGAATTGGTATTTGTTATAAAATA
CTGAAGATCAGCAAGTAAGTCTTACAGGTTTTATCTTAATTTTCGCAGCAG
AAATATTAACGCTCAAGCCAGGCGTGGAGGGAGAGAGACCCGGAAGTCGT
ATGTTATTCTACAACACAAATGTCACATTAACACCAATTATGCGGAATC
CATCTTACCCTGGGCGTACAGAGAATCCTTGCCCTTCTTGTACTGTGTCAC

TTTATGGGGTTGGTGCTTGCCACACTTCTTACAGAAAGTCCGGCGGGTTTT
AGGGACGTTAACCTAGTAAAGAAACAGTTCAGAACGTGCAATGTTATTTG
ACCACAATGGCACAACGCCCTACCTTACCCAGCTAAAGCTGAGGCACTCC
AGGAGGACTCCTCATTACTTGCTACCTCTGACTACAGGGTGGGCCAGCCC
CATGTGCTTCAAGCAGAGCTTCCCTCCCTCCGTCGAGCCCCAAAGAGGGAA
GAGACCTCATTAACTCCACCCCCGGCTAACTCTACCTCTTTGAACCCATCA
CTTCAATTCCTGGCCCCGTAGCCCCGGTCCCTTTAGGGTTGATCCCGGCAAG
ATTGGGTTGCTCTGATATATCGAGTCCACACAGGAGCCTGGACCCATCCC
GGCATAGCACGGGCGACGAAGGGGGGGAAAGATTAAGCTGGATGTTACT
CGGCCCCCACCAGCAAGTCCTACCATGCTTGCGTGAGCGCTATCGGCGCG
GAAAGAAAGAAACCGCGAGGCAACCGGAAGTATATAGGAGGTTCCCGAT
CGCACTTCCTCATGGGAGTCGGTAGGAGCAATCATAGAGTGTAAGGCTCA
GCGCAGCGCCCTCGGGCGGCTGAGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGGCG
GGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGTGGTCCACTCACCCCGACTT
CCTCCCGCCCCGCAGCTTTCAACGTTTCGTCACTTTATCTCTTTTGGTGGA
CTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCAGATCC
TCTGGCCTCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTCGAATGAAGG
GGTCTCCACCTCCACGTTCCATTCTGTTCACCTCAAGGTCACTGGGAA
CACCTTTCGCAGCAAACTGCTAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAAT
TGTTCCAGTTCATCTATCACATGGCCAGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTA
TTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGTTCCGGGGGAGAGGTACAGTAA
TCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACTAAGTACTTTGAAGAAAA
GGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCTTCTGTTGAGGGAGTAAGTC
AGCAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGGCTCCTGTGG
CCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACC
GGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGG
CCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGC
ACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAA
ATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTG
TCTTGTTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCC
TGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTG
GCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCT
GTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTG
TCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCC
CCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAA
GATAGACTCAAGATAGTAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGG
GGACAGTTGAGGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCA
TGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAA
AGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCC
TCTCTGGAAGTGAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTG
TGATCCTGGAGAGCATTTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACC
TCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCCCTGCTGACAGTGCACAAGCT
GTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGG
GGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAA
AAGAATCCACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCT
CTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGG

TGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTG
AGAAAGAGGTGGATTACACAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAGCG
ATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGTGTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGT
GCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAAT
CGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGC
CCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCA
CCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAAGTAAAAAGGTGGT
GGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAA
AGGGCGACGAGTATTTCACTTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGG
GCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGA
CCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATG
ACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGGCAAAGAGGGAG
GGTTTATCGTGC GCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTCACTG
TTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGT
GTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAG
TACAATCCCAGAGCTGATTAATACTACCACCAGCACAACTTCTGCCGGCCTGA
TCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCT
ACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGAC
ATTCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAA
AATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTC
AATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTG
TCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCC
CATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACCTATCT
GCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGC
AAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCA
CCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGA
AGGTGAGTGACTTCGGAAGTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACC
AGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTG
ATGTATAGCAAGTTCTCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGCTG
ATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCAAAA
TTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCAC
ATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAG
AAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGA
TGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

BTKe ΔMyc.BTKp.coBTK (SEQ ID NO:45)

[0286] TTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATA
ATGTAGGGGGGCCCTGTTACTCGGCCCCCACCAGCAAGTCCTACCATGCTTGCGTG
AGCGCTATCGGCGCGGAAAGAAAGAAACCGCGAGGCAAACGGAAGTATATAGG
AGGTTCCCGATCGCACTTCCTCATGGGAGTCGGTAGGAGCAATCATAGAGTGTA
AGGCTCAGCGCAGCGCCCTCGGGCGGCTGAGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGG
CGGGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGTGGTCCACTACCCCGACTTCC

TCCCGCCCCGCAGCTTTCAACGTTTCGTCACCTTTATCTCTTTTGGTGGACTCTGCT
ACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCCAGATCCTCTGGCCTCCC
CGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTCGAATGAAGGGGTCTCCACCTCCAC
GTTCCATTCTGTTCACCTCAAGGTCACCTGGGAACACCTTTCGCAGCAAACCTGC
TAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATTGTTCCAGTTCATCTATCACATGGC
CAGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTATTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGT
TCCGGGGGAGAGGTACAGTAATCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACT
AAGTACTTTGAAGAAAAGGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCTTCTGTT
GAGGGAGTAAGTCAGCAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGG
CTCCTGTGGCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTT
TACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGG
CCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAA
GTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCT
TAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGTCTT
TTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCC
GGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTC
TGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCCTCTCCCTGTGCTGACTG
TCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGA
CCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAG
AAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAA
TGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAG
ATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAA
AAAGGGAACCTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCT
CTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCT
GGAGAGCATTTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAA
CTTTAAGAAAAGACTGTTCCCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTAC
GACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAA
GATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCCTGAGAGGCA
GATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGA
GCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTC
TCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACACAGCTGAAGAACGTGATT

AGATACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTTGTTTTTGGATCGACGGGC
AGTACCTGTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGG
AAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAG
CCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCC
GAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTGGCTCTG
TATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAG
TATTTCAATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAAC
GGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATT
GAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTG
CTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGC GCGATTCTAGTAAGGCC
GGCAAATACACTGTGTCAGTGTTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTG
ATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGA
AGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTA ACTACCACCAGCACAAATTCTGC
CGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCAGCAGAACAAAAATGCTCC
TTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGAC
ATTCCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATG
GAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCG
AGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCACGAGAAAC
TGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTATCATTACAGA
GTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATT
CCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTA
CCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTG
AACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTG
GATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGTCTCCAC
CCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGG
CGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTAC
AAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACA
TCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGC
CGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGA
CGAGGAGAGCTGA

SEQ ID NO:46:B29启动子序列:

AGGAGGGCCATCATGGCCAAGTTGACCAGTGCTGTCCCAGTGC
TCACAGCCAGGGATGTGGCTGGAGCTGTTGAGTTCTGGACTGACAGGTTGGGGT
TCTCCAGAGATTTTGTGGAGGATGACTTTGCAGGTGTGGTCAGAGATGATGTCAC
CCTGTTTCATCTCAGCAGTCCAGGACCAGGTGGTGCCTGACAACACCCTGGCTTGG
GTGTGGGTGAGAGGACTGGATGAGCTGTATGCTGAGTGGAGTGAGGTGGTCTCC
ACCAACTTCAGGGATGCCAGTGGCCCTGCCATGACAGAGATTGGAGAGCAGCCC
TGGGGGAGAGAGTTTGGCCCTGAGAGACCCAGCAGGCAACTGTGTGCACTTTGTG
GCAGAGGAGCAGGACTGA

本领域技术人员将理解,通常,本文使用的术语(尤其是所附权利要求,例如所附权利要求的正文)通常旨在作为“开放式”术语(例如术语“包括”应解释为“包括但不限于”,术语“具有”应解释为“具有至少”,术语“包含”应解释为“包含但不限于”等)。本领域技术人员将进一步理解,如果期望特定数量的介绍性的权利要求详述,在权利要求中将明确地详述该期望,并且在缺少这样的详述的情况下,不存在这样的期望。例如,为了帮助理解,以下所附权利要求可以包含介绍性短语“至少一个”和“一个或多个”的使用以引入权利要求详述。然而,即使当相同的权利要求包含介绍性短语“一个或多个”或“至少一个”,以及例如“一种/一个”的不定冠词(例如“一种”和/或“一个”应该被解释为“至少一个/一种”或“一个或多个/一种或多种”),这些短语的使用也不应被解释为暗示由不定冠词“一个/一种”介绍的权利要求详述将包含这种介绍性权利要求详述的任意特定权利要求限制于仅包含一个这样的详述的实施方式;对于用于介绍权利要求详述的定冠词的使用也是如此。另外,即使明确地引述了特定数量的介绍性权利要求详述,本领域技术人员将认识到,这种引述应该被解释为至少表示所引述的数字(例如,仅有“至少两个”而没有其它修饰语的详述表示至少两个详述或两个以上的详述)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的惯例的情况下,通常这样的结构旨在在本领域技术人员将理解该惯例的意义上(例如,“具有A、B和C中的至少一个的系统”将包括但不限于具有单独的A、具有单独的B、具有单独的C、A和B一起具有、A和C一起具有、B和C一起具有,和/或A、B和C一起具有的系统等)。在使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的惯例的情况下,通常这样的结构旨在在本领域技术人员将理解该惯例的意义上(例如,“具有A、B和C中的至少一个的系统”将包括但不限于具有单独的A、具有单独的B、具有单独的C、A和B一起具有、A和C一起具有、B和C一起具有,和/或A、B和C一起具有的系统等)。本领域技术人员将进一步理解,无论是在说明书、权利要求或附图中,实际上呈现两个以上的供选择的术语的任意转折词和/或短语都应该被理解为考虑包括这些术语之一、任一术语或两个术语的可能性,例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

另外,在以马库什组描述本公开的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开也因此以马库什组的任意单个成员或成员亚组的形式来描述。

序列表

<110> Rawlings, David J.

Sommer, Karen

<120> 用于XLA基因疗法的优化的慢病毒载体

<130> SCRI.148W0

<150> 62/488523

<151> 2017-04-21

<160> 46

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 668

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >0.7UCOE

<400> 1

```

cgcggtgtggc atctgaagca ccaccagcga gcgagagcta gagagaagga aagccaccga 60
cttcaccgcc tccgagctgc tccgggtcgc gggctctgcag cgtctccggc cctccgcgcc 120
tacagctcaa gccacatccg aagggggagg gagccgggag ctgcgcgcgg ggccgctggg 180
gggaggggtg gcaccgcca cgccgggcgg ccacgaaggg cggggcagcg ggcgcgcgcc 240
cgccgggggg aggggcccgc cgccgcgccc gctgggaatt ggggccctag ggggagggcg 300
gaggcgccga cgaccgcggc acttacgtt cgcggcgttg cgcccggttg tccccaaggg 360
gagggaaggg ggaggcgggg cgaggacagt gaccggagtc tcctcagcgg tggcttttct 420
gcttggcagc ctcagcggct ggcgccaaaa ccggactccg cccacttcct cgcccctgcg 480
gtgcgagggt gtggaatcct ccagacgctg ggggaggggg agttgggagc ttaaaaacta 540
gtaccccttt gggaccactt tcagcagcga actctcctgt acaccagggg tcagttccac 600
agacgcgggc caggggtggg tcattgcggc gtgaacaata atttgactag aagttgattc 660
gggtgttt                                     668

```

<210> 2

<211> 668

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >0.7UCOEfwd

<400> 2

```

cgcaaacacc cgaatcaact tctagtcaaa ttattgttca cgccgcaatg acccaccct 60
ggcccgctc tgtggaactg acccctggtg tacaggagag ttcgctgctg aaagtgttcc 120
caaaggggta ctagttttta agtcccaac tccccctccc ccagcgtctg gaggattcca 180

```

caccctcgca ccgcaggggc gaggaagtgg gcggagtccg gttttggcgc cagccgctga 240
 ggctgccaaag cagaaaagcc accgctgagg agactccggt cactgtcctc gccccgcctc 300
 ccccttccct ccccttgggg accaccgggc gccacgccgc gaacggtaag tgccgcggtc 360
 gtcggcgcct ccgcccctcc cctagggccc caattcccag cgggcgcggc gcgcggcccc 420
 tccccccgcc gggcgcgcgc ccgctgcccc gcccttcgtg gccgccccgc gtgggcggtg 480
 ccacccctcc cccagcggc cccgcgcgca gctcccggct ccctccccct tcggatgtgg 540
 cttgagctgt aggcgcggag ggccggagac gctgcagacc cgcgaccgg agcagctcgg 600
 aggcggtgaa gtcggtggct ttccttctct ctagctctcg ctgctggtg gtgcttcaga 660
 tgccacac 668

<210> 3

<211> 455

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >DHS4

<400> 3

aattctatca tagtgtgtct tgtctatgat aactgcattg agaaagatgc tctgcttggt 60
 gagtgagcat ttcacttcct tctggttctg actatctgtc taatagtgg catgtgggtt 120
 gaaaagatag aaaaggggag tagtattagg aagttcagta tgaggaagac ttattagact 180
 tatgcataaa cctaaattct gttgtaatt ggaagagctg aagtgccaca tatgcatctg 240
 tttaggagag caagaactac aaatttggtc ttcagtttg cttgcttaca tcctgagaac 300
 tctgtaggcc acatgtcgtg aatatagcag cctctgcaac agtgaaagcc agaaaaggaa 360
 gtggaaagtc tcaggggagg gggctttctg tcatggattt atgagcacag caagactaac 420
 aagcaaaaag aaaaatgtaa aaggatcttg ttcgt 455

<210> 4

<211> 2404

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >IE4-5

<400> 4

acatctttga gcttcagttt cctcatctgt aaatagggga ataatacata cttcttaagg 60
 ctactgcaaa gatcaaataa gtaatacatt tgaagcattt gggacagagc ctgctacata 120
 gtaagtgtc attaagtgtt agttatcatt gttgttgttt ttaggccaag gttgttgtga 180
 aaattaaatg agataatata taaaaggtat ttagctcaat atctggcaca tagcaataat 240
 tgaatagatg atccttcac ttcgttcctc ctgttcctt tcagtttgaa agacttggt 300
 aatataattt tgaccaacca aacttgcatt caaggagtg tacaaggctg gtatagccag 360
 ccagtgaagta tcagaatcta aatgtttatt aagacaaagg gctgtcatgc aataacccaa 420
 ccataccatt atcagtctgc catccttcct gtttctctag gcagcctttc ctgatgtcaa 480

```

ctcaaccagt taatctctca gtcacttgac atgtggctat atatacacac aaatatgtgt 540
gcatgcatcc tgtgctgcaa gcatttacag tcaagtttat ctgaacacac tgtatggttg 600
atgtgaaatg ctgaaactgt tcaagtttag gtcctcacia agcaaggaat atgaaatatt 660
tccttgggaa atatttatcc acaacaaaga gatgtacagt gctttcgtat acagtgattt 720
acagttttcc atgtgctttt acatgtatta ttacttcatt tgatccttac aacaacccca 780
gaggtagatg tggcatgaat taccattatt ctcccttgag aagaagaaac tgagcatcaa 840
agaagcttgt tggccttctt gccagaaatc acccagtttg taaatggtaa aagagggtt 900
gaaaccaggt tctctgactc tgacttcaag cactctcata catcatctat ttaatttttt 960
ggagctaggt attttatact taggattcta aatattgcat aaccattgaa tgccacacca 1020
cccttgatatt cagtgcacaaa aatgggactt ttcttaataa atagagaaat ggaggtgcct 1080
aaaattacaa aattgcacta gagagatagt gatagaactg ggaaactctt agtctaatat 1140
tttatctttt attcatatga tggaaacta agctcaatgg cagaatcttc agtcagcaat 1200
gggtgttcagg ttatgtgaac tatctgaagg attcctgaac tcttcataatc taggaatgta 1260
gcgtttaaaa gctcttagaa tttttcatac tcttaggtcc tcctgacttg tgcttcaatt 1320
catgcataaa cttattttat aaggtctccg tctgcccttg ctggagataa catttttgtt 1380
tatccaacaa aggttatttt atcttattat taaattctga ctttgtatag aagagaaatg 1440
aagtataat ctatataaat taagtcttga ttagtacata tgggttattc acttgataa 1500
tatggagtaa aattttaatt catggctaatt tacctccacc tccactacct agtggcctcc 1560
cctcaccaat attagccaaa ataaatcaaa tttggaacta caaacctact tcaaaaagg 1620
taaggtatat aataagcaat atcatcaagt caaatagtat ttttttaacc atgtacaagg 1680
catcatgcta ggtgttacga agatgcatga aatatataag atgtggttcc aaccctcaca 1740
gagtttatag acatcacata ataaattctg aagtcaaata taaattaatt taaaattatc 1800
tgctgttcag cattgttcac tagtgcagcc aaacaatgtc atcttgttga aaggcattgg 1860
tagtaaaaac tgtgtctgaa ataccctctt ttcaaagggt tcgtaaattt gatatagtca 1920
gggacacgaa caagatcctt ttacattttt ctttttgctt gttagtcttg ctgtgctcat 1980
aaatccatga cagaaagccc cctcccctga gactttccac ttccttttct ggctttcact 2040
gttgacagagg ctgctatatt cacgacatgt ggctacaga gttctcagga tgtaagcaag 2100
ccaaactgaa gaccacaaatt gtagttcttg ctctcctaaa cagatgcata tgtggcactt 2160
cagctcttcc agattacaac agaatttagg tttatgcata agtctaataa gtcttctca 2220
tactgaactt cctaatacta ctcccctttt ctatcttttc aaccacatg accactatta 2280
gacagatagt cagaaccaga aggaagtga atgctcactc aacaagcaga gcatctttct 2340
caatgcagtt atcatagaca agacacacta tgatagaatt ggtgctgcta tgtattcttt 2400
ttga 2404

```

<210> 5

<211> 837

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >BTKp

<400> 5

tgcatttcct aggagaatcc ctgggggaat cattgcagtt ggagcataat gtagggggcc 60
 cctgagaaaa cctccaggct tcaagtgaac tacctagtct gctttaccgg ttacaggac 120
 tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa tggagaaagt 180
 caacatccac agaaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata ttccgacatt 240
 tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga agtcttgtct 300
 ctacctctgt cttgttttgt cctttggggg ccttcacta tcaagttcaa ctgtgtgtcc 360
 ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttcct ggccagtctc 420
 tttgctctgt gtctgccagc cccagcagc tctctctttt cctgtaagcc cctctccctg 480
 tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg aggatagctt 540
 gatgacctgt ctgctcaggc cagccccatc tagagtctca gtggccccag tcatgttgag 600
 aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag caaatgaagg 660
 gcggggacag ttgagggggg ggaataggga cggcagcagg gaaccagata gcatgctgct 720
 gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact gagtggctgt 780
 gaaaggggtg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat tagtctc 837

<210> 6

<211> 1980

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >coBTK

<400> 6

atggccgctg tgatcctgga gagcattttc ctgaagaggt cccagcagaa aaagaaaacc 60
 tctccccctga actttaagaa aagactgttc ctgctgacag tgcacaagct gtcttactat 120
 gagtacgact ttgagcgggg ccgcccagga tcaaaaaagg ggagcatcga tgtggagaag 180
 attacatgcg tggagaccgt ggtccctgaa aagaatccac cccctgagag gcagatccca 240
 agacggggcg aggagtctc tgagatggag cagattagta tcattgagcg cttcccctat 300
 ccttttcagg tgggtgtacga cgagggacca ctgtatgtgt tctcaccac agaggagctg 360
 agaaagaggt ggattcacca gctgaagaac gtgattagat acaatagcga tctggtgcag 420
 aagtatcacc cttgtttttg gatcgacggg cagtacctgt gctgttccca gacagctaag 480
 aacgctatgg gatgccagat tctggaaaat cggaacggat ctctgaaacc agggagttca 540
 caccgcaaga ccaaaaagcc cctgcctcca acaccgagg aggatcagat cctgaaaaag 600
 cctctgccac ccgagcctgc tgcagcccca gtcagcactt ccgaactgaa aaaggtggtg 660
 gctctgtatg actacatgcc catgaatgct aacgatctgc agctgagaaa gggcgacgag 720
 tatttcattc tggaagagtc taatctgcct tgggtggagg ccagagataa gaacggacag 780
 gaggggtaca tcccatctaa ttatgtgacc gaggtgagg actctattga gatgtacgag 840
 tggatatagca agcacatgac acggtcccag gctgagcagc tgctgaagca ggagggcaaa 900
 gagggagggt ttatcgtgcg cgattctagt aaggccggca aatacactgt gtcagtgttc 960
 gctaagagca ccgagagacc ccagggcgtg atcagacact atgtggtgtg ttccacacct 1020

cagtctcagt actatctggc tgagaagcac ctgttttagta caatcccaga gctgattaac 1080
 taccaccagc acaattctgc cggcctgatc agcaggctga agtatcccgt ctcccagcag 1140
 aacaaaaatg ctccttctac cgctggactg gggtagcgca gttgggagat tgatccaaag 1200
 gacctgacat tcctgaagga gctgggaact gggcagtttg gcgtggtgaa gtatggaaaa 1260
 tggagagggc agtacgatgt ggccatcaag atgatcaagg agggctcaat gagcgaggac 1320
 gagttcatcg aggaggctaa ggtcatgatg aacctgtccc acgagaaact ggtgcagctg 1380
 tatggagtgt gcaccaagca gcggccatt tttatcatta cagagtacat ggctaattggg 1440
 tgtctgctga actatctgcg cgagatgaga cacagattcc agacacagca gctgctggaa 1500
 atgtgcaagg atgtgtgtga ggctatggag tacctggagt ctaagcagtt tctgcaccgg 1560
 gacctggctg ctgcgaattg cctggtgaac gatcagggcg tggatgaagg gagtgacttc 1620
 ggactgtcaa ggatgtgtct ggatgacgag tacaccagct ccgtgggctc taagtttcct 1680
 gtgagatggt ctccacccga ggtgctgatg tatagcaagt tctcctctaa gagcgatata 1740
 tgggcctttg gcgtgctgat gtgggaaatc tacagcctgg gcaagatgcc ttacgagcgg 1800
 ttcacaaatt ccgagacagc tgagcacatc gccagggcc tgcgcctgta ccggccacat 1860
 ctggcctctg agaaggtgta caccatcatg tacagctgtt ggcacgagaa ggccgacgag 1920
 agaccacat tcaagatcct gctgtccaac attctagatg tgatggacga ggagagctga 1980

<210> 7

<211> 1980

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >co2BTK

<400> 7

atggccgccc tgatcctgga aagcatcttc ctgaagcgga gccagcagaa gaagaaaacc 60
 agccccctga acttcaagaa gcggctgttc ctgctgaccg tgcacaagct gtcctactac 120
 gagtacgact tcgagcgggg cagacggggc agcaagaagg gcagcatcga cgtcgagaag 180
 atcacctgcg tggagaccgt ggtgcccag aagaaccccc ctcccagcgc gcagatcccc 240
 agacggggcg aggaaagcag cgagatggaa cagatcagca tcatcgagcg gttcccttac 300
 ccattccaag tgggtgtacga cgaggggccc ctgtacgtgt tcagccccac cgaggaactg 360
 cggaagcggg ggattcacca gctgaagaac gtgatccggt acaacagcga cctggtgcag 420
 aagtaccacc cctgcttttg gatcgacggc cagtacctgt gctgcagcca gaccgccaag 480
 aacgctatgg gctgccagat tctggaaaac cggaacggca gcctgaagcc cggcagcagc 540
 cacagaaaaga ccaagaagcc cctgcccccc acccccgaag aggaccagat cctgaagaag 600
 cctctgcctc ccgagcccg cgtgacact gtgagacca gcgagctgaa gaaagtgggtg 660
 gccctgtacg actacatgcc catgaacgcc aacgacctgc agctgcggaa gggcgacgag 720
 tacttcatcc tggaagaaag caacctgccc tgggtggcggg ccagggacaa gaacggccag 780
 gaaggctaca tccccagcaa ctacgtgacc gaggccgagg actccatcga gatgtacgag 840
 tggtagacga agcacatgac cagaagccag gccgaacagc tgctgaagca ggaaggcaaa 900
 gagggcggct tcatcgtccg ggacagcagc aaggccggca agtacaccgt gagcgtgttc 960

gccaaagagca ccggcgaccc ccagggcgtg atccggcact acgtggtgtg cagcaccccc 1020
 cagagccagt actacctggc cgagaagcac ctgttcagca ccatccccga gctgatcaac 1080
 tatcaccagc acaacagcgc tggactgatt tctcggctga agtaccctgt gtcccagcag 1140
 aacaaaaacg cccccagcac agccggcctg ggctacggca gctgggagat cgacccccag 1200
 gacctgacct tcctgaaaga gctgggcacc ggccagttcg gcgtggtgaa gtacggcaag 1260
 tggaggggccc agtacgacgt ggccatcaag atgatcaagg aaggcagcat gagcgaggac 1320
 gagttcatcg aggaagccaa agtgatgatg aacctgagcc acgagaagct ggtgcagctg 1380
 tacggcgtgt gcaccaagca gcggcccatc ttcatcatca ccgagtacat ggccaacggc 1440
 tgcctgctga actacctgcg ggagatgcgg cacaggttcc agacacagca gctgctcgaa 1500
 atgtgcaagg acgtgtgcga ggctatggaa tacctggaat ccaagcagtt cctgcaccgg 1560
 gacctggccg ccagaaaactg cctggtgaac gaccaggggg tggatgaagg gtccgacttc 1620
 ggccctgagca gatacgtgct ggacgacgag tacaccagca gcgtgggcag caagttcccc 1680
 gtgcggtgga gccccctga ggtgctgatg tacagcaagt tcagcagcaa gagcgacatc 1740
 tgggccttcg gcgtgctgat gtgggagatc tacagcctgg gcaagatgcc ctacgagcgg 1800
 ttcaccaaca gcgagaccgc cgagcacatc gccaggggcc tgcggtgta caggccccac 1860
 ctggccagcg agaaggtgta caccatcatg tacagctgct ggcacgagaa ggccgacgag 1920
 aggccacct tcaagatcct gctgtccaac atcctggacg tgatggacga ggaaagctga 1980

<210> 8

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >GFP

<400> 8

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggcgga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggetacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca ccagtcctgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgaga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 9

<211> 1227

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >Intron 4

<400> 9

```

ctcaaaaaga atacatagca gcaccaattc tatcatagtg tgtcttgtct atgataactg 60
cattgagaaa gatgctctgc ttgttgagtg agcatttcac ttccttctgg ttctgactat 120
ctgtctaata gtggtcatgt gggttgaaaa gatagaaaag gggagtagta ttaggaagtt 180
cagtatgagg aagacttatt agacttatgc ataaacctaa attctgttgt aatctggaag 240
agctgaagtg ccacatatgc atctgttttag gagagcaaga actacaaatt tggcttctcag 300
tttggcttgc ttacatcctg agaactctgt aggccacatg tcgtgaatat agcagcctct 360
gcaacagtga aagccagaaa aggaagtgga aagtctcagg ggagggggct ttctgtcatg 420
gatttatgag cacagcaaga ctaacaagca aaaagaaaaa tgtaaaagga tcttgttcgt 480
gtccctgact atatcaaatt tacgaaacct ttgaaagagg ggtatttcag acacagtttt 540
tactaccaat gcctttcaac aagatgacat tgtttggtg cactagtga caatgctgaa 600
cagcagataa ttttaaatta atttatattt gacttcagaa tttattatgt gatgtctata 660
aactctgtga gggttggaac cacatcttat atatttcatg catcttcgta acacctagca 720
tgatgccttg tacatggta aaaaaatact atttgacttg atgatattgc ttattatata 780
ccttaccctt tttgaagtag gttttagtct ccaaatttga tttatttttg ctaatattgg 840
tgaggggagg ccactaggta gtggaggtg aggttaattag ccatgaatta aaattttact 900
ccatattatc caagtgaata acccatatgt actaatcaag acttaattta tatagattat 960
cacttcattt ctcttctata caaagtcaga atttaataat aagataaaat accctttggt 1020
ggataaaca aaatgttatc tccagcaagg gcagacggag acctataaa ataagtttat 1080
gcatgaattg aagcacaagt caggaggacc taagagtatg aaaaattcta agagctttta 1140
aacgctacat tcctagatat gaagagttca ggaatccttc agatagttca cataacctga 1200
acaccattgc tgactgaaga ttctgcc                                     1227

```

<210> 10

<211> 1163

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >Intron 5

<400> 10

```

ccatcatatg aataaaagat aaaatattag actaagagtt tcccagttct atcactatct 60
ctctagtgca attttgtaat tttaggcacc tccatttctc tatttattaa gaaaagtccc 120
attttttgca ctgaatacaa gggtggtgtg gcattcaatg gttatgcaat atttagaatc 180
ctaagtataa aatacctagc tccaaaaaat taaatagatg atgtatgaga gtgcttgaag 240
tcagagtcag agaacctggt ttcaagccct cttttacat ttacaaactg ggtgatttct 300
ggcaagaagg ccaacaagct tctttgatgc tcagtttctt cttctcaaag gagaataatg 360
gtaattcatg ccacatctac ctctgggggtt gttgtaagga tcaaatgaag taataataga 420

```

tgtaaaagca catggaaaac tgtaaatacac tgtatacgaa agcactgtac atctctttgt 480
 tgtggataaa tatttcccaa ggaaatattt catattcctt gctttgtgag gacctaaact 540
 tgaacagttt cagcatttca catcaaccat acagtgtgtt cagataaact tgactgtaaa 600
 tgcttgcagc acaggatgca tgcacacata tttgtgtgta tatatagcca catgtcaagt 660
 gactgagaga ttaactgggt gagttgacat caggaaaggc tgcctagaga aacaggaagg 720
 atggcagact gataatggta tggttgggtt attgcatgac agccctttgt cttataaac 780
 atttagattc tgatactcac tggctggcta taccagcctt gtacactccc ttgaatgcaa 840
 gtttggtttg tcaaaattat attagccaag tctttcaaac tgaaaggga caggaggaac 900
 gaagatgaag gatcatctat tcaattattg ctatgtgcca gatattgagc taaatacctt 960
 ttatatatta tctcatttaa ttttcacaac aaccttgcc taaaaacaac aacaatgata 1020
 actaacactt aatgagcact tactatgtag caggctctgt cccaagtgt tcaaatgtat 1080
 tacttatttg atctttgcag tagcettaag aagtatgtat tattcccta ttacagatg 1140
 aggaaactga agctcaaaga tgt 1163

<210> 11

<211> 526

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >Intron 13

<400> 11

ggtaggggtg actggccagt tgcaaaaact acctttgctg gccttgcctt agggagtgtc 60
 cttgaggtag actgttctgc agcagctgcc tcaaggacgc tcaagacaga tccaagcaaa 120
 agttattcac tgattttctt cctctagtgg ctacgactgg gactgcaaaa acatagattc 180
 ataaagggtt ttgtcgttgt cttgggtctt tttgtctttt atttttaatt gtgggaaaat 240
 tttcagtact atccctgagt tcattaacta ccatcactaa cataatcata aagggtttg 300
 gggaggttgc ttagtctatc ttcttgcctt atggccacct tgaacctaaa attccagat 360
 tcctctaacc aatgaatccc gtttctgaga ttgacttaag caaagacaga ttagtacttc 420
 taaaaatttc ccttttacta gttttcctat ttctaccca gtagggattt ttgtctattg 480
 taagaattat acattcatga ccccaaagaa tcacaccaag acttta 526

<210> 12

<220>

<223> *

<400> 12

000

<210> 13

<220>

<223> *

<400> 13

000

<210> 14

<211> 2947

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >1Kb

<400> 14

```

tcaaaaagaa tacatagcag caccaattct atcatagtgt gtcttgtcta tgataactgc 60
attgagaaaag atgctctgct tgttgagtga gcatttcact tccttctggg tctgactatc 120
tgtctaataag tggatcatgtg ggttgaaaag atagaaaagg ggagtagtat taggaagttc 180
agtatgagga agacttatta gacttatgca taaacctaaa ttctgttgta atctggaaga 240
gctgaagtgc cacatatgca tctgttttagg agagcaagaa ctacaaattt ggtcttcagt 300
ttggcttgct tacatcctga gaactctgta ggccacatgt cgtgaatata gcagcctctg 360
caacagtgaag agccagaaaa ggaagtggaa agtctcaggg gagggggcct tctgtcatgg 420
atztatgagc acagcaagac taacaagcaa aaagaaaaat gtaaaaggat cttgttcgtg 480
tccttgacta tatcaaatat acgaaacctt tgaaagaggg gtatttcaga cacagttttt 540
actaccaatg cctttcaaca agatgacatt gtttggtcgc actagtgaac aatgctgaac 600
agcagataat tttaaattaa tttatatattg acttcagaat ttattatgtg atgtctataa 660
actctgtgag ggttgggaacc acatcttata tatttcatgc atcttcgtaa cacctagcat 720
gatgccttgt acatggttaa aaaaatacta tttgacttga tgatattgct tattatatac 780
cttacccttt ttgaagtagg tttgtagttc caaatttgat ttattttggc taatattggg 840
gaggggaggc cactaggtag tggaggtgga ggtaattagc catgaattaa aattttactc 900
catattatcc aagtgaataa cccatatgta ctaatcaaga cttaatttat atagattatc 960
acttcatttc tcttctatac aaagtcagaa ttaataata agataaaata ccctttgttg 1020
gataaacaata aatgttatct ccagcaaggg cagacggaga ccttataaaa taagtttatg 1080
catgaattga agcacaagtc aggaggacct aagagtatga aaaattctaa gagcttttaa 1140
acgctacatt cctagatatg aagagttcag gaatccttca gatagttcac ataacctgaa 1200
caccattgct gactgaagat tctgccattg agcttagtat tccatcatat gaataaaaga 1260
taaaatatta gactaagagt ttcccagttc tatcactatc tctctagtgc aattttgtaa 1320
ttttaggcac ctccatttct ctatttatta agaaaagtc cttttttgac actgaatata 1380
agggtggtgt ggcattcaat ggttatgcaa tatttagaat cctaagtata aaatacctag 1440
ctccaaaaaa ttaaatagat gatgtatgag agtgcttgaa gtcagagtca gagaacctgg 1500
tttcaagccc tcttttacca ttacaaaact ggggtgatttc tggcaagaag gccacaagc 1560
ttctttgatg ctgagtttct tcttctcaaa ggagaataat ggtaattcat gccacatcta 1620
cctctggggg tgttgtaagg atcaaatgaa gtaataatac atgtaaaagc acatggaaaa 1680
ctgtaaatca ctgtatacga aagcactgta catctctttg ttgtggataa atatttccca 1740
aggaaatatt tcataatcct tgctttgtga ggacctaaac ttgaacagtt tcagcatttc 1800
acatcaacca tacagtgtgt tcagataaac ttgactgtaa atgcttgagc cacaggatgc 1860
atgcacacat atttgtgtgt atatatagcc acatgtcaag tgactgagag attaactggg 1920

```



```

tgagttgaca tcaggaaagg ctgcctagag aaacaggaag gatggcagac tgataatggt 1980
atggttgggt tattgcatga cagccctttg tcttaataaa catttagatt ctgatactca 2040
ctggctggct ataccagcct tgtacactcc cttgaatgca agtttggttg gtcaaaatta 2100
tattagccaa gtctttcaaa ctgaaaggga acaggaggaa cgaagatgaa ggatcatcta 2160
ttcaattatt gctatgtgcc agatattgag ctaaatacct tttatatatt atctcattta 2220
attttcacaa caaccttggc ctaaaaacaa caacaatgat aactaacact taatgagcac 2280
ttactatgta gcaggctctg tcccaagtgc ttcaaagtga ttacttattt gatctttgca 2340
gtagccttaa gaagtatgta ttattccctt atttacagat gaggaaactg aagctcaaag 2400
atgttatcct tatttctctg gggtaggggtg gactggccag ttgcaaaaac tacctttgct 2460
ggccttgccct tagggagtgt ccttgaggta cactgttctg cagcagctgc ctcaaggacg 2520
ctcaagacag atccaagcaa aagttattca ctgattttct tcctctagtg gctacgactg 2580
ggactgcaaa aacatagatt cataaagggc tttgtcgttg tcttgggtct ttttgtcttt 2640
tatttttaaat tgtgggaaaa ttttcagtac tatccctgag ttcattaact accatcata 2700
acataatcat aaagggattt ggggaggttg cttagtctat cttcttgccct tatggccacc 2760
ttgaacctaa aattcccaga ttctctaac caatgaatcc cgtttctgag attgacttaa 2820
gcaaagacag attagtactt ctaaaaattt cccttttact agttttccta tttctacccc 2880
agtagggatt tttgtctatt gtaagaatta tacattcatg accccaaaga atcacaccaa 2940
gacttta 2947

```

<210> 15

<211> 2953

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >revCONTIG

<400> 15

```

taacaataaa gtcttggtgt gattctttgg ggtcatgaat gtataattct tacaatagac 60
aaaaatccct actggggtag aaataggaaa actagtaaaa gggaaatttt tagaagtact 120
aatctgtctt tgcttaagtc aatctcagaa acgggattca ttggttagag gaatctggga 180
attttaggtt caagggtgcc ataaggcaag aagatagact aagcaacctc cccaaatccc 240
tttatgatta tgtagtgat ggtagttaat gaactcaggg atagtactga aaattttccc 300
acaattaaaa ataaaagaca aaaagacca agacaacgac aaagcccttt atgaatctat 360
gtttttgcag tcccagtcgt agccactaga ggaagaaaat cagtgaataa cttttgcttg 420
gatctgtctt gagcgtcctt gaggcagctg ctgcagaaca gtgtacctca aggacactcc 480
ctaaggcaag gccagcaaag gtagtttttg caactggcca gtccacccta cccagagaa 540
ataaggataa catctttgag cttcagtttc ctcatctgta aataggggaa taatacatac 600
ttcttaaggc tactgcaaag atcaaataag taatacatth gaagcacttg ggacagagcc 660
tgctacatag taagtgtca ttaagtgtta gttatcattg ttgttgtttt taggccaagg 720
ttgttggtgaa aattaaatga gataatatat aaaaggtatt tagctcaata tctggcacat 780
agcaataatt gaatagatga tccttcatct tcgttctcc tgttcccttt cagtttgaaa 840

```

```

gacttggcta atataatttt gaccaaccaa acttgcattc aaggagtggt acaaggctgg 900
tatagccagc cagtgagtat cagaatctaa atgtttatta agacaaaggg ctgtcatgca 960
ataacccaac catacatta tcagtctgcc atccttcctg tttctctagg cagcctttcc 1020
tgatgtcaac tcaaccagtt aatctctcag tcacttgaca tgtggctata tatacacaca 1080
aatatgtgtg catgcatcct gtgctgcaag catttacagt caagtttatc tgaacacact 1140
gtatggttga tgtgaaatgc tgaaactgtt caagtttagg tcctcacaaa gcaaggaata 1200
tgaaatatatt ccttgggaaa tatttatcca caacaaagag atgtacagtg ctttcgtata 1260
cagtgattta cagttttcca tgtgctttta catgtattat tacttcattt gatccttaca 1320
acaaccccag aggtagatgt ggcatgaatt accattattc tcctttgaga agaagaaact 1380
gagcatcaaa gaagcttggt ggcttctctg ccagaaatca cccagtttgt aaatggtaaa 1440
agagggttg aaaccaggtt ctctgactct gacttcaage actctcatac atcatctatt 1500
taattttttg gagctaggta ttttatactt aggattctaa atattgcata accattgaat 1560
gccacaccac ccttgatttc agtgcaaaaa atgggacttt tcttaataaa tagagaaatg 1620
gaggtgccta aaattacaaa attgcactag agagatagtg atagaactgg gaaactctta 1680
gtctaataatt ttatctttta ttcatatgat ggaatactaa gctcaatggc agaactctca 1740
gtcagcaatg gtgttcaggt tatgtgaact atctgaagga ttctgaact cttcatatct 1800
aggaatgtag cgtttaaaag ctcttagaat ttttcatact cttaggtcct cctgacttgt 1860
gcttcaattc atgcataaac ttattttata aggtctccgt ctgcccttgc tggagataac 1920
atttttgttt atccaacaaa gggatattta tcttattatt aaattctgac tttgtataga 1980
agagaaatga agtgataatc tatataaatt aagtcttgat tagtacatat gggttattca 2040
cttggataat atggagtaaa attttaattc atggctaatt acctccacct ccactaccta 2100
gtggcctccc ctccaataa ttagccaaaa taaatcaaat ttggaactac aaacctactt 2160
caaaaagggg aaggfatata ataagcaata tcatcaagtc aaatagtatt tttttaacca 2220
tgtacaaggc atcatgctag gtgttacgaa gatgcatgaa atatataaga tgtggttcca 2280
acctcacag agtttataga catcacataa taaattctga agtcaaatat aaattaattt 2340
aaaattatct gctgttcagc attgttcact agtgcagcca aacaatgtca tcttgttgaa 2400
aggcattggg agtaaaaact gtgtctgaaa taccctctt tcaaagggtt cgtaaatttg 2460
atatagtcag ggacacgaac aagatccttt tacatttttc tttttgcttg ttagtcttgc 2520
tgtgtccata aatccatgac agaaagcccc ctccctgag actttccact tccttttctg 2580
gctttcactg ttgcagaggc tgctatatc acgacatgtg gcctacagag ttctcaggat 2640
gtaagcaagc caaactgaag accaaatttg tagttcttgc tctcctaaac agatgcata 2700
gtggcacttc agctcttcca gattacaaca gaatttaggt ttatgcataa gtctaataag 2760
tcttcctcat actgaacttc ctaatactac tcccccttc tatcttttca acccatatga 2820
ccactattag acagatagtc agaaccagaa ggaagtgaag tgctcactca acaagcagag 2880
catctttctc aatgcagtta tcatagacaa gacacactat gatagaattg gtgctgctat 2940
gtattctttt tga 2953

```

<210> 16

<211> 2282

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >ABCD

<400> 16

```
ctgggggtatg gcaggggctg ggcagcagca gcaatgtacc ttgcttggga cccctaaaaa 60
ccagagagac agcatggctg gtgccattta tcagctagtg gaggaggctg acggagggtg 120
ggagtgtcat cagcacaagg ccctggcagt cccttctggt gattagagag gccgaaaggg 180
tcctttccga caagggtga ggggtggcgg aacaggaaga gaaaaatgtg acatgaggtg 240
accatccgaa caggtagcaa atgttagaaa ggggtacctc tggcaaactt agtggaaaag 300
taatattgca gggagcagtc agataaaaac aagcccttct gtcaaatagt gcttgaagac 360
tcaataggga tacatgggtc aatgaagcct ttagaaaaag aaatactaag aggcagattc 420
tctgagaaca tggtaaaaag tcacgtcca cgttatgaag ttgacctttg tgagctaggg 480
aaaggcctgg ctaggccagg gtgtagcta cctgccttga gctgtaccag gccaaatgtc 540
gccagggtca gagctggctt attaaaggac tgtgtggaag ctgtgccaac ctcgtggtaa 600
caatgggtaa aagactgggc caggagaaag cagcctctgc ctcagcccag acagtgcggc 660
caacccttga ggttgtggca aaggtttctc ctcttaccat tgccctccat gtgcatggct 720
tgcttttctc ttgtcttcat tatttctcct ttcttttctc cggatccacg cgtgaattct 780
ttgtaaactc cttatgggtc gaactaatgt aactttccat ccagttatgg gggattgggtg 840
caattttaaa ttatcactat gatttgctat ttccatttga gcaaatttcc tatagagttt 900
cctttcagtg gactagacct atatcaggaa gtgacttagg tataaaggga agatacagct 960
ttcgaacc accaaagtgtgg cgttctccaa agagtattca gataccccct tctacacca 1020
caatgatctg attgctgaga tctgattgct aactactgaa aataaggaag aactagaatt 1080
ttcagtgaca cagtgtcag caagaagcta gaaaagaggc cttgacatat ttgactccaa 1140
agctacttgg ttatgcatga agccatctgg ggaggggag gagggaggag aactcctctg 1200
aggacctga aacaattggg ccacgtgtga ctttcagttt ctatggagat tcatgtgcag 1260
tggtgaggg caatctgaga gcattggaaa ccagaagct ttaaaccgct aggaaagaca 1320
gggaatggcc agaactctcc tagccaattg agtagtgctt tcaaggagaa atcaagagaa 1380
aacactactt cttggatatt ttggctaagt agtcatttga agtacagttg actggttatt 1440
ttattttaaa tcatactca tagactcttc ccaatcatag gctggctgtg tagttttctg 1500
aattttgctc tggatttctt cttctttttt ttttttattt ttatttttta tttttttttt 1560
gagactccag gctggagtgc agtgtcacga tcttggtcca ctgcaacctc cgcctcccga 1620
gttcaagcga ttctcctgcc tcagctcct gagttgctgg gactacaggc gcctgtcacc 1680
acgcccggct aattttttgt attttaatag agacgggatt tcacatgtt ggccaggctg 1740
gtctctaact cctgacctca agtgatccgc cagctcagc ctcccaaagt gctgggatta 1800
cgggcatgag ccaactgcgc tggacttatt attcttaata gtattttatc ttatgagcga 1860
agataagagc ccaagatggt ttagtttact gattctgcaa gtgctatttc tattaattcc 1920
ttggcatact gcagtttcta tgatggctgc actcttgtaa ataagcttcg tctttctgaa 1980
ttctgttgct ccataggag ctgggaggct gcaaaaggtg gccctgtaaa aatctttgca 2040
tttataattt aataattaca gacccagtg ggacaatgtt tgaaaaatta tattcacctg 2100
```

ctaggaaatt gggaactgaa agtccaatat ctgcctcagt ggagttcttg cacctgcatt 2160
 atccccctctg ggtatatcaa gatcaacagc tgcacagata cttttgcttt tcacagattc 2220
 tacacatatc atataaaggt gaatagtgtg aagctacctc tacaccttac caagcacaca 2280
 gg 2282

<210> 17

<211> 2282

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >DCBA

<400> 17

cctgtgtgct tggttaagggt tagaggtagc ttacactat tcacctttat atgatatgtg 60
 tagaatctgt gaaaagcaaa agtatctgtg cagctgttga tcttgatata cccagaaggg 120
 ataatgcagg tgccagaact ccactgaggc agatattgga ctttcagttc ccaatttcct 180
 agacggtgaa tataatTTTTT caaacattgt cccactgggg tctgtaatta ttaaattata 240
 aatgcaaaga tttttacagg gccacctttt gcagcctccc agctccctat ggagcaacag 300
 aattcagaaa gacgaagctt attaacaaga gtgcagccat catacaaact gcagtatgcc 360
 aaggaattaa tagaaatagc acttgcagaa tcagtaaact aaaccatctt gggctcttat 420
 cttcgctcat aagataaaat actattaaga ataataagtc caggcgcagt ggctcatgcc 480
 cgtaatccca gcactttggg aggctgaggc tggcggatca cttgaggcca ggagtttagag 540
 accagcctgg ccaacatggt gaaatcccgt ctctattaaa atacaaaaaa ttagccgggc 600
 gtggtgacag gcgcctgtag tcccagcaac tcaggaggct gaggcaggag aatcgcttga 660
 actcgggagg cggagggtgc agtgagccaa gatcgtgaca ctgcactcca gcctggagtc 720
 tcaaaaaaaaa aataaaaaat aaaaataaaa aaaaaaaga agaagaatac cagagcaaaa 780
 ttcagaaaac tacacagcca gcctatgatt gggaagagtc tatgagatat gatttaaaat 840
 aaaataacca gtcaactgta cttcaaatga ctacttagcc aaaatatcca agaagtagtg 900
 ttttctcttg atttctcctt gaaagcacta ctcaattggc taggaagatt ctggccattc 960
 cctgtctttc ctacgcgttt aaagcttctg ggtttccaat gctctcagat tgccctcagc 1020
 cactgcacat gaatctccat agaaactgaa agtcacacgt ggcccaattg tttcagggtc 1080
 ctgagaggag ttctccctcc tcttccctc cccagatgg cttcatgcat aaccaagtag 1140
 ctttggagtc aaatatgtca aggctctttt tctagcttct tgctgagcac tgtgtcactg 1200
 aaaattctag ttcttcctta ttttcagtag ttagcaatca gatctcagca atcagatcat 1260
 tgtgggtgta gaagggggta tctgataact ctttggagaa cgcccaaact ttggtttttcg 1320
 aaagctgtat cttcccttta tacctaagtc acttctctgat atgggtctag tccactgaaa 1380
 ggaaactcta taggaaattt gctcaaatgg aaatagcaaa tcatagtgat aattttaaatt 1440
 tgcaccaatc ccccataact ggatggaaaag ttacattagt tcgcaccata aggagtttac 1500
 aaagaattca cgcgtggatc cgaggaaaag aaaggagaaa taatgaagac aagagaaaag 1560
 caagccatgc acatggaggg caatggtgta aggagaaaacc tttgccacaa cctcaagggt 1620
 tggccgcact gtctgggctg aggcagaggc tgctttctcc tggcccagtc ttttaccat 1680

tgttaccacg aggttggcac agcttcaca cagtccttta ataagccagc tctgaccctg 1740
 gcgacatttg gcctgggtaca gctcaaggca ggtagcctac accctggcct agccaggcct 1800
 ttccctagct cacaaaggct aacttcataa cgtggagcgt gagcttttac catgtttctca 1860
 gagaatctgc ctcttagtat ttctttttct aaaggcttca ttgacccatg tatccctatt 1920
 gagtcttcaa gcactatttg acagaagggc ttgtttttat ctgactgctc cctgcaatat 1980
 tactttttcca ctaagtttgc cagaggtacc cttttctaac atttgctacc tgttcggatg 2040
 gtcacctcat gtcacatttt tctcttctg ttccgcccac cctcagccct tgtcggaaag 2100
 gaccctttcg gcctctctaa tcaccagaag ggactgccag ggccttgtgc tgatgacact 2160
 cccaccctcc gtcagcctcc tccactagct gataaatggc accagccatg ctgtctctct 2220
 ggtttttagg ggtcccaagc aaggtacatt gctgctgctg cccagccctc gccatacccc 2280
 ag 2282

<210> 18

<211> 1304

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >AB

<400> 18

ctgggggtatg gcaggggctg ggcagcagca gcaatgtacc ttgcttggga cccctaaaaa 60
 ccagagagac agcatggctg gtgccattta tcagctagtg gaggaggctg acggagggtg 120
 ggagtgtcat cagcacaagg ccctggcagt cccttctggt gattagagag gccgaaaggg 180
 tcctttccga caagggtga ggggtggcgg aacaggaaga gaaaaatgtg acatgaggtg 240
 accatccgaa caggtagcaa atgttagaaa ggggtacctc tggcaaactt agtggaaaag 300
 taatatgtca gggagcagtc agataaaaac aagcccttct gtcaaatagt gcttgaagac 360
 tcaataggga tacatgggtc aatgaagcct ttagaaaaag aaatactaag aggagattc 420
 tctgagaaca tggtaaaagc tcacgctcca cgttatgaag ttgaccttg tgagctaggg 480
 aaaggcctgg ctaggccagg gtgtaggcta cctgccttga gctgtaccag gccaaatgtc 540
 gccagggtca gagctggctt attaaaggac tgtgtggaag ctgtgccaac ctcgtggtaa 600
 caatgggtaa aagactgggc caggagaaag cagcctctgc ctcagcccag acagtgcggc 660
 caacccttga ggttgtggca aaggtttctc ctcttaccat tgccctccat gtgcatggct 720
 tgcttttctc ttgtcttcat tatttctcct ttcttttctc cggatccacg cgtgaattct 780
 ttgtaaactc cttatgggtc gaactaatgt aactttccat ccagttatgg gggattgggtg 840
 caattttaaa ttatcactat gatttgcctat ttccatttga gcaaatttcc tatagagttt 900
 cctttcagtg gactagaccc atatcaggaa gtgacttagg tataaaggga agatacagct 960
 ttcgaaaacc aaagtttggg cgttctccaa agagttatca gataccccct tctacacca 1020
 caatgatctg attgctgaga tctgattgct aactactgaa aataaggaag aactagaatt 1080
 ttcagtgaca cagtgtcag caagaagcta gaaaagggc cttgacatat ttgactccaa 1140
 agctacttgg ttatgcatga agccatctgg ggaggggaag gaggaggag aactcctctg 1200
 aggaccctga aacaattggg ccacgtgtga ctttcagttt ctatggagat tcatgtgcag 1260

tggctgaggg caatctgaga gcattggaaa cccagaagct ttaa 1304
 <210> 19
 <211> 761
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> >A
 <400> 19
 ctgggggtatg gcaggggctg ggcagcagca gcaatgtacc ttgcttggga cccctaaaaa 60
 ccagagagac agcatggctg gtgccattta tcagctagtg gaggaggctg acggagggtg 120
 ggagtgtcat cagcacaagg ccctggcagt cccttctggt gattagagag gccgaaaggg 180
 tcctttccga caagggtga ggggtggcg aacaggaaga gaaaaatgtg acatgaggtg 240
 accatccgaa caggtagcaa atgttagaaa ggggtacctc tggcaaactt agtggaaaag 300
 taatattgca gggagcagtc agataaaaac aagcccttct gtcaaatagt gcttgaagac 360
 tcaataggga tacatgggtc aatgaagcct ttagaaaaag aaatactaag aggcagattc 420
 tctgagaaca tggtaaaaag tcacgctcca cgttatgaag ttgacctttg tgagctaggg 480
 aaaggcctgg ctaggccagg gtgtaggcta cctgccttga gctgtaccag gccaaatgtc 540
 gccagggtca gagctggctt attaaaggac tgtgtggaag ctgtgccaac ctcgtggtaa 600
 caatgggtaa aagactgggc caggagaaaag cagcctctgc ctcagcccag acagtgcggc 660
 caacccttga ggttgtggca aaggtttctc ctcttaccat tgccctccat gtgcatggct 720
 tgcttttctc ttgtcttcat tatttctcct ttcctttcct c 761
 <210> 20
 <211> 531
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> >B
 <400> 20
 gaattctttg taaactcctt atggtgcgaa ctaatgtaac tttccatcca gttatggggg 60
 attggtgcaa ttttaaatta tcactatgat ttgctatttc catttgagca aatttcctat 120
 agagtttcct ttcagtggac tagaccata tcaggaagtg acttaggtat aaagggaaga 180
 tacagctttc gaaaacccaaa gtttgggcgt tctccaaaga gttatcagat acccccttct 240
 acaccacaaa tgatctgatt gctgagatct gattgctaac tactgaaaat aaggaagaac 300
 tagaattttc agtgacacag tgctcagcaa gaagctagaa aagaggcctt gacatatttg 360
 actccaaagc tacttgggta tgcatgaagc catctgggga ggggaaggag gagggagaac 420
 tcctctgagg accctgaaac aattgggcca cgtgtgactt tcagtttcta tggagattca 480
 tgtgcagtgg ctgagggcaa tctgagagca ttggaaaccc agaagcttta a 531
 <210> 21
 <211> 1645

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >BTKe

<400> 21

```

tccatcacct actagatata tcagtgcagt gaaaacttcg ctaaactaac gctataccta 60
tatcatgaag tgtgtggact agagacaagt gcatatcctt acggcaatta actgggaaac 120
gtcaaatagt aactaccact cacctttttc cggaaaatcg gcttagtttg cccaccatag 180
ccactctgct tcctgtcata acgccgcttt cctgggaaaa cgaattggta tttgttataa 240
aatactgaag atcagcaagt aagtcttaca ggttttatct taatttcgca gcagaaatat 300
taacgctcaa gccaggcgtg gagggagaga gaccgggact cgtatgttat tctacaacac 360
aaatgtcaca ttaacaccaa attatgcgga atccatctta cctggggcgt acagagaatc 420
cttgcccttc ttgtactgtg tcactttatg gggttggtgc ttgccacact tcttacagaa 480
agtccggcgg gttttaggga cgtaaaccta gtaaagaaac agttcagaac gtgcaatgtt 540
atttgaccac aatggcacia cgccctacct taccagcta aagctgaggc actccaggag 600
gactcctcat tacttgctac ctctgactac aggggtgggc agcccatgt gcttcaagca 660
gagcttcctc cctccgtcga gccccaaaga gggaagagac ctcatctaact ccacccccgg 720
ctaactctac ctctttgaac ccatcacttc aattcctggc cccgtagccc ggtcccttta 780
gggttgatcc cggcaagatt gggttgctct gatatatcga gtccacacag gagcctggac 840
ccatcccggc atagcacggg cgacgaaggg ggggaaagat taagctggat gttactcggc 900
ccccaccagc aagtcctacc atgcttgctg gagcgctatc ggcgcggaag gaaagaaacc 960
gcgaggcaaa cggaagtata taggagggtc ccgatcgac ttcctcatgg gagtcggtag 1020
gagcaatcat agagtgtgag gctcagcgca gcgccctcgg gcggctgaga ggactcagtt 1080
cggagccgcg gcggggagct taaggaagga ctccgcctaa aggggtgtcc actcaccacc 1140
acttcctccc gccccgcagc tttcaacgtt tcgtcacttt atctcttttg gtggactctg 1200
ctacgtagtg gcgttcagtg aaggagcag tgtttttccc agatcctctg gcctccccgt 1260
ccccgaggga agccaggact aggttcgaat gaaggggtcc tccacctcca cgttcattc 1320
ctgttccacc tcaaggtcac tgggaacacc tttgcagca aactgctaata tcaatgaaga 1380
cctggaggga gccaatgtt ccagttcatc tatcacatgg ccagttggtc cattcaacaa 1440
atggttattg gatgccatt atgtggcagg cactgttccg ggggagaggt acagtaatct 1500
aataggctta taaatgtgca attatgaact aagtactttg aagaaaagga acaatgattg 1560
gcattaaagc agcacccttc tgttgaggga gtaagtcagc agctctaggt tctgaaaagt 1620
gacaatgaaa ttgtttggt cctgt 1645

```

<210> 22

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >BTKe Myc

<400> 22

tgttactcgg cccccaccag caagtcctac catgcttgcg tgagcgctat cggcgcgga 60
 agaaagaaac cgcgaggcaa acggaagtat ataggaggtt cccgatcgca cttcctcatg 120
 ggagtcggta ggagcaatca tagagtgtaa ggctcagcgc agcgccctcg ggcggtgag 180
 aggactcagt tcggagccgc gggcgggagc ttaaggaagg actccgccta aagggtggtc 240
 cactcacccc gacttcctcc cgccccgcag ctttcaacgt ttcgtcactt tatctctttt 300
 ggtggactct gctacgtagt ggcgttcagt gaaggagca gtgtttttcc cagatcctct 360
 ggcctccccg tccccgaggg aagccaggac tagggtcgaa tgaagggtc ctccacctcc 420
 acgttccatt cctgttccac ctcaaggtca ctgggaacac ctttcgcagc aaactgctaa 480
 ttcaatgaag acctggaggg agccaattgt tccagttcat ctatcacatg gccagttggt 540
 ccattcaaca aatggttatt ggatgcccat tatgtggcag gcactgttcc gggggagagg 600
 tacagtaatc taataggett ataaatgtgc aattatgaac taagtacttt gaagaaaagg 660
 aacaatgatt ggcatataag cagcaccett ctgttgaggg agtaagtcag cagctctagg 720
 ttctgaaaag tgacaatgaa attgtttggc tcctgt 756

<210> 23

<211> 1565

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> >BTKp.GFP

<400> 23

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
 ctgagaaaac ctccaggctt caagtacat acctagtctg ctttaccggt ttacaggact 120
 caagagaaag gtggacattg agagttaatc cctgaggcca aatcttaaag ggagaaagtc 180
 aacatccaca gaaaatgggg aagggcaca gtatttctgt gggcttatat tccgacattt 240
 ttatctgtag gggaaaaatg ctttcttaga aaatgactca gcacggggaa gtcttgtctc 300
 tacctctgtc ttgttttgtc ctttgggtc cttcactat caagttcaac tgttgttccc 360
 tgagactcct ctgccccgga ggacaggaga ctgaaaaac gctcttctctg gccagtctct 420
 ttgctctgtg tctgccagcc cccagcatct ctctctttc ctgtaagccc ctctccctgt 480
 gctgactgtc ttcatagtag tttaggtatg ttgtcccttt acctctggga ggatagcttg 540
 atgacctgtc tgctcaggcc agccccatct agagtctcag tggccccagt catgttgaga 600
 aaggttcttt caaagataga ctcaagatag tagtgtcaga ggtcccaagc aaatgaaggg 660
 cggggacagt tgagggggtg gaataggga ggcagcaggg aaccagatag catgctgctg 720
 agaagaaaaa aagacattgg tttaggtcag gaagcaaaa aagggaactg agtggctgtg 780
 aaagggtggg gtttgtcag actgtcctt ctctctggac tgtaagaatt agtctcgagg 840
 ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccgggt ggtgcccac ctggctgagc 900
 tggacggcga cgtaaaccgc cacaagttca gcgtgtccg cgaggcgag ggcgatgcca 960
 cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccg caagctgccc gtgccctggc 1020
 ccaccctcgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgctac cccgaccaca 1080

tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca 1140
 tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca 1200
 ccctgggtgaa ccgcatcgag ctgaaggga tgcacttcaa ggaggacggc aacatcctgg 1260
 ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga 1320
 agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc 1380
 tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgtagtg ctgcccga 1440
 accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca 1500
 tggtcctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca 1560
 agtaa 1565

<210> 24

<211> 2798

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> INT4.BTKp.GFP

<400> 24

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
 ctcaaaaaga atacatagca gcaccaattc tatcatagtg tgtcttgtct atgataactg 120
 cattgagaaa gatgctctgc ttgttgagtg agcatttcac ttccttctgg ttctgactat 180
 ctgtctaata gtggatcatgt gggttgaaaa gatagaaaag gggagtagta ttaggaagtt 240
 cagtatgagg aagacttatt agacttatgc ataaacctaa attctgttgt aatctggaag 300
 agctgaagtg ccacatatgc atctgtttag gagagcaaga actacaaatt tggctttcag 360
 tttggcttgc ttacatcctg agaactctgt aggccacatg tcgtgaatat agcagcctct 420
 gcaacagtga aagccagaaa aggaagtga aagtctcagg ggagggggct ttctgtcatg 480
 gatttatgag cacagcaaga ctaacaagca aaaagaaaa tgtaaaagga tcttggtcgt 540
 gtccctgact atatcaaatt tacgaaacct ttgaaagagg ggtatttcag acacagtttt 600
 tactaccaat gcctttcaac aagatgacat tgtttggtctg cactagtga caatgctgaa 660
 cagcagataa ttttaaatta atttatattt gacttcagaa tttattatgt gatgtctata 720
 aactctgtga gggttggaac cacatcttat atatttcag catcttcgta acacctagca 780
 tgatgccttg tacatggta aaaaaatact atttgacttg atgatattgc ttattatata 840
 ccttaccctt tttgaagtag gtttgtagtt ccaaatttga tttattttgg ctaatattgg 900
 tgaggggagg ccactaggta gtggaggtgg aggttaattg ccatgaatta aaattttact 960
 ccatattatc caagtgaata acccatatgt actaatcaag acttaattta tatagattat 1020
 cacttcattt ctcttctata caaagtcaga atttaataat aagataaaat accctttgtt 1080
 ggataaacia aaatgttatc tccagcaagg gcagacggag accttataaa ataagtttat 1140
 gcatgaattg aagcacaagt caggaggacc taagagtatg aaaaattcta agagctttta 1200
 aacgctacat tcctagatat gaagagttca ggaatccttc agatagttca cataacctga 1260
 acaccattgc tgactgaaga ttctgccggg cccctgagaa aacctccagg cttcaagtga 1320
 catacctagt ctgctttacc ggtttacagg actcaagaga aaggtggaca ttgagagtta 1380

```

atccctgagg ccaaatctta aatggagaaa gtcaacatcc acagaaaatg gggaaggcca 1440
caagtatttc tgtgggctta tattccgaca tttttatctg taggggaaaa atgctttctt 1500
agaaaatgac tcagcacggg gaagtcttgt ctctacctct gtcttgtttt gtcctttggg 1560
gtcccttcac tatcaagttc aactgtgtgt ccctgagact cctctgcccc ggaggacagg 1620
agactcgaaa aacgctcttc ctggccagtc tctttgctct gtgtctgcca gccccagca 1680
tctctcctct ttcctgtaag cccctctccc tgtgtgact gtcttcatag tacttttaggt 1740
atgttggtccc ttacctctg ggaggatagc ttgatgacct gtctgctcag gccagcccca 1800
tctagagtct cagtggcccc agtcatgttg agaaaggttc tttcaaagat agactcaaga 1860
tagtagtgct agagggtccca agcaaatgaa gggcggggac agttgagggg gtggaatagg 1920
gacggcagca gggaaccaga tagcatgctg ctgagaagaa aaaaagacat tggtttaggt 1980
caggaagcaa aaaaaggga ctgagtggct gtgaaagggt ggggtttgct cagactgtcc 2040
ttcctctctg gactgtaaga attagtctcg aggccacct ggtgagcaag ggcgaggagc 2100
tggtcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaag ggccacaagt 2160
tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca 2220
tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccacct cgtgaccacc ctgacctacg 2280
gcgtgcagtg cttcagccgc taccgccacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg 2340
ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca 2400
agaccgcgc cgagggtgaag ttcgaggcg acaccctggt gaaccgcac gagctgaagg 2460
gcacgcactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca 2520
gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga 2580
tccgccaaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgcca cactaccag cagaacaccc 2640
ccatcggcga cggccccgtg ctgctgccc acaaccacta cctgagcacc cagtccgcc 2700
tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagtgc gtgaccgcc 2760
ccgggatcac tctcggcagt gacgagctgt acaagtaa 2798

```

<210> 25

<211> 2735

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> INT5.BTKp.GFP

<400> 25

```

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
catcatatga ataaaagata aaatattaga ctaagagttt cccagttcta tcaactatctc 120
tctagtgcaa ttttgtaatt ttaggcacct ccatttctct atttattaag aaaagtccca 180
ttttttgcac tgaatacaag ggtggtgtgg cattcaatgg ttatgcaata tttagaatcc 240
taagtataaa atacctagct ccaaaaaatt aaatagatga tgtatgagag tgcttgaagt 300
cagagtcaga gaacctggtt tcaagccctc ttttaccatt tacaactgg gtgatttctg 360
gcaagaaggc caacaagctt ctttgatgct cagtttcttc ttctcaaagg agaataatgg 420
taattcatgc cacatctacc tctgggggtt ttgtaaggat caaatgaagt aataatacat 480

```

```

gtaaaagcac atggaaaact gtaaatacact gtatacgaaa gcactgtaca tctctttgtt 540
gtggataaat atttcccaag gaaatatattc atattccttg ctttgtgagg acctaaactt 600
gaacagtttc agcatttcac atcaaccata cagtgtgttc agataaactt gactgtaaat 660
gcttgacgca caggatgcat gcacacatat ttgtgtgtat atatagccac atgtcaagtg 720
actgagagat taactgggtg agttgacatc aggaaaggct gcctagagaa acaggaagga 780
tggcagactg ataatgggtat ggttgggtta ttgcatgaca gccctttgtc ttaataaaca 840
tttagattct gatactcact ggctggctat accagccttg tacactccct tgaatgcaag 900
tttggttggc caaaattata ttagccaagt ctttcaaact gaaagggaac aggaggaacg 960
aagatgaagg atcatctatt caattattgc tatgtgccag atattgagct aaataccttt 1020
tatatatatt ctcatattaat tttcacaaca accttggcct aaaaacaaca acaatgataa 1080
ctaacactta atgagcactt actatgtagc aggtctgtgc ccaagtgtt ccaatgtatt 1140
acttatattg tctttgcagt agccttaaga agtatgtatt attcccctat ttacagatga 1200
ggaaaactgaa gctcaaagat gttagggccc ctgagaaaac ctccaggctt caagtgcacat 1260
acctagtctg ctttaccggt ttacaggact caagagaaag gtggacattg agagttaatc 1320
cctgaggcca aatcttaaat ggagaaagtc aacatccaca gaaaatgggg aagggcacaa 1380
gtattttctg gggcttatat tccgacattt ttatctgtag gggaaaaatg ctttcttaga 1440
aaatgactca gcacggggaa gtcttgtctc tacctctgtc ttgttttgtc ctttggggtc 1500
ccttcactat caagttcaac tgttgttccc tgagactcct ctgccccgga ggacaggaga 1560
ctcgaaaaac gctcttcctg gccagtctct ttgctctgtg tctgccagcc cccagcatct 1620
ctcctctttc ctgtaagccc ctctccctgt gctgactgtc ttcatagtac tttaggtatg 1680
ttgtcccttt acctctggga ggatagcttg atgacctgtc tgctcaggcc agccccatct 1740
agagtctcag tggccccagt catgttgaga aaggttcttt caaagataga ctcaagatag 1800
tagtgtcaga ggtcccaagc aaatgaaggc cggggacagt tgagggggtg gaatagggac 1860
ggcagcaggg aaccagatag catgctgctg agaagaaaaa aagacattgg tttaggtcag 1920
gaagcaaaaa aagggaactg agtggctgtg aaagggtggg gtttgctcag actgtccttc 1980
ctctctggac tgtaagaatt agtctcgagg ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt 2040
tcaccggggt ggtgcccac ctagtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca 2100
gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct 2160
gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccacctctgt gaccacctg acctacggcg 2220
tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca 2280
tgcccgaagg ctacgtccag gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga 2340
cccgcgccga ggtgaagtgc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca 2400
tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc 2460
acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caagtgtaac ttcaagatcc 2520
gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccacca ctaccagcag aacaccccca 2580
tcggcgacgg ccccggtgct ctgcccga accactacct gagcaccag tccgcctga 2640
gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagtctgtg accgccgccg 2700
ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 2735

```

<210> 26

<211> 2097

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> INT13.BTKp.GFP

<400> 26

```

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
ggtaggggtgg actggccagt tgcaaaaact acctttgctg gccttgccctt agggagtgtc 120
cttgaggtagc actgttctgc agcagctgcc tcaaggacgc tcaagacaga tccaagcaaa 180
agttattcac tgattttctt cctctagtgg ctacgactgg gactgcaaaa acatagattc 240
ataaagggtt ttgtcgttgt cttgggtctt tttgtctttt atttttaatt gtgggaaaat 300
tttcagtact atccctgagt tcattaacta ccataactaa cataatcata aagggttttg 360
gggaggttgc ttagtctatc ttcttgccct atggccacct tgaacctaaa attcccagat 420
tcctctaacc aatgaatccc gtttctgaga ttgacttaag caaagacaga ttagtacttc 480
taaaaatttc ctttttacta gttttcctat ttctacccca gtagggattt ttgtctattg 540
taagaattat acattcatga ccccaaagaa tcacaccaag actttagggc ccctgagaaa 600
acctccaggc ttcaagtgc atacctagtc tgctttaccg gtttacagga ctcaagagaa 660
aggtaggacat tgagagttaa tccctgaggc caaatcttaa atggagaaag tcaacatcca 720
cagaaaatgg ggaagggcac aagtatttct gtgggcttat attccgacat ttttatctgt 780
aggggaaaaa tgctttctta gaaaatgact cagcacgggg aagtcttgct tctacctctg 840
tcttgttttg tcctttgggg tcccttcaat atcaagtcca actgtgtgtc cctgagactc 900
ctctgccccg gaggacagga gactcgaaaa acgctcttcc tggccagtct ctttgctctg 960
tgtctgccag cccccagcat ctctcctctt tcctgtaagc ccctctccct gtgctgactg 1020
tcttcatagt actttaggta tgttgccct ttacctctgg gaggatagct tgatgacctg 1080
tctgctcagg ccagccccat ctagagtctc agtggcccca gtcattgtga gaaaggttct 1140
ttcaaagata gactcaagat agtagtgtca gaggtcccaa gcaaatgaag ggcggggaca 1200
gttgaggggg tggaataggg acggcagcag ggaaccagat agcatgctgc tgagaagaaa 1260
aaaagacatt ggtttaggct aggaagcaaa aaaagggaac tgagtggctg tgaaagggtg 1320
gggtttgctc agactgtcct tcctctctgg actgtaagaa ttagtctcga ggccaccatg 1380
gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtgggtgcca tcctggtcga gctggacggc 1440
gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggggc agggcgatgc cacctacggc 1500
aagctgaccc tgaagtcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc 1560
gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgt accccgacca catgaagcag 1620
cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc 1680
aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 1740
aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 1800
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 1860
atcaaggtag acttcaagat ccgccacaac atcaggagac gcagcgtgca gctcgccgac 1920
cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac 1980

```

ctgagcaccc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 2040
 ctggagttcg tgaccgccgc cgggatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtaa 2097
 <210> 27
 <211> 2596
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 1kb.BTKp.GFP
 <400> 27
 gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
 aaactgtagt ctgttagctc accctagaag aaggaaattc tagagtcaag agaagttaag 120
 ttttagacaa gctggaagtt ggaatatact ggagtttaag atcattgact caatgaaaaa 180
 aaaaaaagat ttgtctgcag taaaaccaga gttttaaaaa tgattagaaa tggaccagaa 240
 aagagataag gataatgaga aagggggctc tctaaaacta tttggaactg aaattgggac 300
 aatgtttctg gaaactatct tggcagtatg tatcaaatg caaatgcac atactttttt 360
 gactctggaa atgatgcttg tatagagatc ctaataacat gggaaaataa ttaggaataa 420
 tgtaaataa gaacattaga tctttttttg gaaaaaggtta ccttgaacgg atggatggat 480
 ggatagatac atacatacat gcatacatc atacatagat gttacgaaaa ataggtaaata 540
 taactgaatg tgcaatatga tctcaaatat tataagaaac acacacagaa aaaaatggaa 600
 ggaatatgcc gatatatata tgcctctgga tgagtttatg aatgattttt tcttttttat 660
 atccctgtac ttgacatatt ttctacaata agcatgtttt attttactat attttgtttt 720
 attttgagat ggggggtctc ctatgtttct caggctgacc ttgaactctt gggctcaagc 780
 aatcctccaa tatcagcctc ctgagtagct gggactacag gtgcacccca ctgcaccag 840
 ctgcgtgtgt tattttgata tcgatggaaa aaataaataa aatgtttaag ccaaggaaaa 900
 caaaaactag gttgaaaaag aaggccaaaa gggcacacaa gtccagagtg aaagacagac 960
 accccagcag tcaccctcag agcagaggga gaatattgaa agtattacca ctgatctgat 1020
 ctggcactga ctataaactt gcagattggc tctctggctc tccttccatc atcagttggc 1080
 cagaagggcc cctgagaaaa cctccaggct tcaagtgaca tacctagtct gctttaccgg 1140
 tttacaggac tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa 1200
 tggagaaagt caacatccac agaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata 1260
 ttccgacatt tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga 1320
 agtcttgtct ctacctctgt cttgttttgt ctttgggggt cccttacta tcaagttcaa 1380
 ctgtgtgtcc ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttctt 1440
 ggccagtctc tttgctctgt gtctgccagc cccagcatc tctctctttt cctgtaagcc 1500
 cctctccctg tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg 1560
 aggatagctt gatgacctgt ctgctcaggc cagccccatc tagagtctca gtggccccag 1620
 tcatgttgag aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag 1680
 caaatgaagg gcggggacag ttgagggggg ggaatagga cggcagcagg gaaccagata 1740
 gcatgctgct gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact 1800

gagtggctgt gaaaggggtg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat 1860
 tagtctcgag gccacatgg tgagcaagg cgaggagctg ttcaccggg tggtgccc 1920
 cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 1980
 gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc 2040
 cgtgcccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta 2100
 ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca 2160
 ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt 2220
 cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg 2280
 caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc 2340
 cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 2400
 cagcgtgcag ctgcccgaac actaccagca gaacaccccc atcgcgacg gccccgtgct 2460
 gctgcccgaac aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa 2520
 gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga 2580
 cgagctgtac aagtaa 2596

<210> 28

<211> 4519

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CONTIG.BTKp.GFP

<400> 28

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
 ctcaaaaaga atacatagca gcaccaattc tatcatagtg tgtcttgtct atgataactg 120
 cattgagaaa gatgctctgc ttgttgagtg agcatttcac ttccttctgg ttctgactat 180
 ctgtctaata gtggtcattg gggttgaaaa gatagaaaag gggagtagta ttaggaagtt 240
 cagtatgagg aagacttatt agacttatgc ataaacctaa attctgttgt aatctggaag 300
 agctgaagtg ccacatatgc atctgttttag gagagcaaga actacaaatt tggtcttcag 360
 tttggcttgc ttacatcctg agaactctgt aggccacatg tcgtgaatat agcagcctct 420
 gcaacagtga aagccagaaa aggaagtgga aagtctcagg ggagggggct ttctgtcatg 480
 gatttatgag cacagcaaga ctaacaagca aaaagaaaaa tgtaaaagga tcttgttcgt 540
 gtccctgact atatcaaatt tacgaaacct ttgaaagagg ggtatttcag acacagtttt 600
 tactaccaat gcctttcaac aagatgacat tgtttggtg cactagtga caatgctgaa 660
 cagcagataa ttttaaatta atttatattt gacttcagaa tttattatgt gatgtctata 720
 aactctgtga gggttggaac cacatcttat atatttcag catcttcgta acacctagca 780
 tgatgccttg tacatggta aaaaaatact atttgacttg atgatattgc ttattatata 840
 ccttaccctt tttgaagtag gttttagtct ccaaatgtga tttatttttg ctaatatgtg 900
 tgaggggagg ccactaggta gtggaggtgg aggttaattg ccatgaatta aaattttact 960
 ccatattatc caagtgaata acccatatgt actaatcaag acttaattta tatagattat 1020
 cacttcattt ctcttctata caaagtcaga atttaataat aagataaaat accctttgtt 1080

```

ggataaaca aaatgttatc tccagcaagg gcagacggag accttataaa ataagtttat 1140
gcatgaattg aagcacaagt caggaggacc taagagtatg aaaaattcta agagctttta 1200
aacgctacat tcctagatat gaagagttca ggaatccttc agatagttca cataacctga 1260
acaccattgc tgactgaaga ttctgccatt gagcttagta ttccatcata tgaataaaag 1320
ataaaaatatt agactaagag tttcccagtt ctatcactat ctctctagtg caattttgta 1380
attttaggca cctccatttc tctatttatt aagaaaagtc ccattttttg cactgaatac 1440
aagggtggtg tggcattcaa tggttatgca atatttagaa tcctaagtat aaaataccta 1500
gctccaaaaa attaaataga tgatgtatga gagtgcctga agtcagagtc agagaacctg 1560
gtttcaagcc ctcttttacc atttacaac tgggtgattt ctggcaagaa ggccaacaag 1620
cttctttgat gctcagtttc ttcttctcaa aggagaataa tggtaattca tgccacatct 1680
acctctgggg ttgttgtaag gatcaaatga agtaataata catgtaaaag cacatggaaa 1740
actgtaaadc actgtatacg aaagcaactgt acatctcttt gttgtggata aatatttccc 1800
aaggaaatat ttcatattcc ttgctttgtg aggacctaaa cttgaacagt ttcagcattt 1860
cacatcaacc atacagtgtg ttcagataaa cttgactgta aatgcttgca gcacaggatg 1920
catgcacaca tatttgtgtg tatatatagc cacatgtcaa gtgactgaga gattaactgg 1980
ttgagttgac atcaggaaaag gctgcctaga gaaacaggaa ggatggcaga ctgataatgg 2040
tatggttggg ttattgcatg acagcccttt gtcttaataa acatttagat tctgatactc 2100
actggctggc tataccagcc ttgtacactc ccttgaatgc aagtttggtt ggtcaaaatt 2160
atattagcca agtctttcaa actgaaaggg aacaggagga acgaagatga aggatcatct 2220
attcaattat tgctatgtgc cagatattga gctaaatacc ttttatatat tatctcattt 2280
aattttcaca acaaccttgg cctaaaaaca acaacaatga taactaacac ttaatgagca 2340
cttactatgt agcaggctct gtcccaagtg cttcaaatgt attacttatt tgatctttgc 2400
agtagcctta agaagtatgt attattcccc tatttacaga tgaggaaact gaagctcaaa 2460
gatgttatcc ttatttctct ggggtagggg ggactggcca gttgcaaaaa ctacctttgc 2520
tggccttgcc ttagggagtg tccttgaggt acactgttct gcagcagctg cctcaaggac 2580
gctcaagaca gatccaagca aaagtatttc actgattttc ttcctctagt ggctacgact 2640
gggactgcaa aaacatagat tcataaaggg ctttgtcggt gtcttggtgc tttttgtctt 2700
ttatttttaa ttgtgggaaa attttcagta ctatccctga gttcattaac taccatcact 2760
aacataatca taaagggatt tggggagggt gcttagtcta tcttcttgcc ttatggccac 2820
cttgaaccta aaattcccag attcctctaa ccaatgaatc ccgtttctga gattgactta 2880
agcaaagaca gattagtact tctaaaaatt tcccttttac tagttttcct atttctaccc 2940
cagtagggat ttttgtctat tgtaagaatt atacattcat gaccccaaag aatcacacca 3000
agactttagg gcccgtgaga aaacctccag gcttcaagtg acatacctag tctgctttac 3060
cggtttacag gactcaagag aaaggtggac attgagagtt aatccctgag gccaaatctt 3120
aaatggagaa agtcaacatc cacagaaaat ggggaagggc acaagtattt ctgtgggctt 3180
atattccgac atttttatct gtaggggaaa aatgctttct tagaaaatga ctcagcacgg 3240
ggaagtcttg tctctacctc tgtcttgttt tgtcctttgg ggtcccttca ctatcaagtt 3300
caactgtgtg tccctgagac tcctctgccc cggaggacag gagactcgaa aaacgctctt 3360
cctggccagt ctctttgctc tgtgtctgcc agccccagc atctctctc tttcctgtaa 3420

```

```

gccccctctcc ctgtgctgac tgtcttcata gtacttttagg tatgtttgtcc ctttacctct 3480
gggaggatag cttgatgacc tgtctgctca ggccagcccc atctagagtc tcagtggccc 3540
cagtcattgtt gagaaagggt ctttcaaaga tagactcaag atagtagtgt cagaggtccc 3600
aagcaaatga agggcgggga cagttgaggg ggtggaatag ggacggcagc agggaaccag 3660
atagcatgct gctgagaaga aaaaaagaca ttggtttagg tcaggaagca aaaaaaggga 3720
actgagtggc tgtgaaaggg tggggtttgc tcagactgtc cttcctctct ggactgtaag 3780
aattagtctc gaggccacca tgggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgc 3840
catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 3900
cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct 3960
gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcggtgcagt gcttcagccg 4020
ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtc gccatgcccg aaggctacgt 4080
ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 4140
gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga 4200
cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 4260
ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 4320
cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt 4380
gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtcgcc ctgagcaaag accccaacga 4440
gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcatt 4500
ggacgagctg tacaagtaa

```

4519

<210> 29

<211> 4499

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 3kb.BTKp.GFP

<400> 29

```

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
aaactgtagt ctgttagctc accctagaag aaggaaattc tagagtcaag agaagttaag 120
ttttagacaa gctggaagtt ggaatatact ggagtttaag atcattgact caatgaaaaa 180
aaaaaaagat ttgtctgcag taaaaccaga gttttaaaaa tgattagaaa tggaccagaa 240
aagagataag gataatgaga aagggggctc tctaaaacta tttggaactg aaattgggac 300
aatgtttctg gaaactatct tggcagtatg tatcaaatg caaatgcac atactttttt 360
gactctggaa atgatgctt tatagagatc ctaataacat gggaaaataa ttaggaataa 420
tgttaaataa gaacattaga tctttttttg gaaaaaggtc cttgaacgg atggatggat 480
ggatagatac atacatacat gcatacatc atacatagat gttacgaaaa ataggtaaat 540
taactgaatg tgcaatatga tctcaaatat tataagaaac acacacagaa aaaaatggaa 600
ggaatatgcc gatataatga tgcctctgga tgagtttatg aatgattttt tcttttttat 660
atccctgtac ttgacatatt ttctacaata agcatgtttt attttactat attttgtttt 720
attttgagat ggggggtctc ctatgtttct caggctgacc ttgaactctt gggctcaagc 780

```

```

aatcctccaa tatcagcctc ctgagtagct gggactacag gtgcacccca ctgcacccag 840
ctgcgtgtgt tattttgata tcgatggaaa aaataaataa aatgtttaag ccaaggaaaa 900
caaaaactag gttgaaaaag aaggccaaaa gggcacacaa gtccagagtg aaagacagac 960
accccagcag tcacccctcag agcagaggga gaattattgaa agtattacca ctgatctgat 1020
ctggcactga ctataaactt gcagattggc tctctggctc tccttccatc atcagttggc 1080
cagaatatat tgtcgctaata gcaagacaaa aagagatgat gaatcacaga gacctagaag 1140
tttccaaaac cacagaagaa aaatgtaaaa tgctaaaaac ataaggccag gcgcggtggc 1200
tcaagcctgt aatcccagca ttttgggagg ccgaggcagg tgtcatgggtg tgcggctgta 1260
gtccaagcta ctcaggaggc tgaggcaaga gaattgcttg aaactgggag gtagcgattg 1320
cagtgaacca agattgcgct actgtaccga agcctggatg acagagcgag actctgtctc 1380
aaaaataaat aaataaataa ataaataaat aaaacatgaa ctgctgtgga agaaccagag 1440
agccctaagg cctcctgtaa atgactacag caggagagtt tccttggtea gcatgcagct 1500
ttcgaaaatt gagtttggct tgatgccttc atcacaaatt tgggtccctg tagccttgac 1560
tatgaagctt atcataaaat aattgggttt cactggggcc cgaacaaaag catcttggga 1620
atttaacaag attaaagggt gctttgttgc tgtgggtatg attttttttt cttttttctt 1680
tttttttttt tttagacagg agtctgactc tgtcaccag gctggagtgc agtggcacga 1740
tctcggtca ctgcaacctc cgctcctgg gttcaagcaa ttctcctgcc tcagcctcct 1800
gagtaactgg gattacaggt gcgcgccacc acgccaggt aatttttgta tttttagtag 1860
agacagggtt tctccatggt ggtcaggctg gctgctctca aactcctgac cttgccatcc 1920
agccgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcatg agctaccaca cgtggccata 1980
tgtaaatttt aaacatgtaa accaatactg tatacttttt atagatattt acatctgtaa 2040
tgataatatg aaaacgtacc taggaatgat aaacaccaa ttcaagatat tggtaatctc 2100
taaggaggga gaagactaag attttgagt acataaagggt gtcttgatta tatagatagt 2160
atttcagttc ttaacacgtt ctcttctggt cccaaggcca aggaattctc aattgaaatc 2220
tcagttagaa cgtgaaggat gcttcttggg actgggaaga gattttccgt aggccaaatt 2280
taacctccca ctagagatag ttgataattc taccacattt catagtgaag catcaggaag 2340
acaggactga aaaggcaaga agaatgatg caaattgcat agtccaaaag ataagctgga 2400
cctaggtttg ccagtttgtc taagtaactg agaattcatt ctgagatcaa aaaatcaaaa 2460
taatgttcac agcagcattg tttatcactg aaagcaaaca acctaaatgt ccatcaacag 2520
gagaatgaat aaatatattg gaatgtattc atcatataga atattttatg catataaaaa 2580
tgaattaaaa catatgaagt agaactagcc agataaataa atcctaacat attatattga 2640
ggggaaaaaaa gcaagttgct ggagaatgtg taccatatat atatatataa attttctttt 2700
tttttttttt ttttttctgc gaccgagttt cactcttggt gccaggtg gagtgcaatg 2760
gcaagatctc ggctcactgc aacctctgcc tcccgggttc aagggttct cccgcctcag 2820
cctcctgagt agctgggaga gtagcgttgg ccagctagt ttttgtattt ttagtagaga 2880
cagggtttct ccatgttggc caggtggct gctctcaaac tcctgacctt gtcateccac 2940
cgctcagcc tcccaaagtg ctgggattac agcctgagt taccgcacgg gccctgaga 3000
aaacctcag gcttcaagt acatacctag tctgctttac cggtttacag gactcaagag 3060
aaaggtggac attgagagtt aatccctgag gccaaatctt aatggagaa agtcaacatc 3120

```

cacagaaaat ggggaagggc acaagtatct ctgtgggctt atattccgac atttttatct 3180
 gtaggggaaa aatgctttct tagaaaatga ctcagcacgg ggaagtcttg tctctacctc 3240
 tgtcttggtt tgccttttgg ggtcccttca ctatcaagtt caactgtgtg tccctgagac 3300
 tcctctgccc cggaggacag gagactcgaa aaacgctctt cctggccagt ctctttgctc 3360
 tgtgtctgcc agccccagc atctctctc tttcctgtaa gcccctctcc ctgtgctgac 3420
 tgtcttcata gtactttagg tatgttgctc ctttacctct gggaggatag cttgatgacc 3480
 tgtctgctca ggccagcccc atctagagtc tcagtggccc cagtcagtgt gagaaaggtt 3540
 ctttcaaaga tagactcaag atagtagtgt cagaggtccc aagcaaatga agggcgggga 3600
 cagttgaggg ggtggaatag ggacggcagc aggggaaccag atagcatgct gctgagaaga 3660
 aaaaaagaca ttggtttagg tcaggaagca aaaaaaggga actgagtggc tgtgaaaggg 3720
 tggggtttgc tcagactgtc cttctctctt ggactgtaag aattagtctc gaggccacca 3780
 tggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgc catcctggtc gagctggacg 3840
 gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg 3900
 gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggccccacc 3960
 tcgtgaccac cctgacctac ggctgagcgt gcttcagccg ctaccccgac cacatgaagc 4020
 agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccc aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct 4080
 tcaaggacga cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg 4140
 tgaaccgcat cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca 4200
 agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg 4260
 gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg 4320
 accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact 4380
 acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc 4440
 tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcgt ggacgagctg tacaagtaa 4499

<210> 30

<211> 4519

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> revCONTIG.BTKp.GFP

<400> 30

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
 taaagtcttg gtgtgattct ttggggtcat gaatgtataa ttcttacaat agacaaaaat 120
 ccctactggg gtagaaatag gaaaactagt aaaaggga tttttagaag tactaatctg 180
 tctttgctta agtcaatctc agaaacggga ttcattggtt agaggaatct gggaatttta 240
 ggttcaaggt ggccataagg caagaagata gactaagcaa cctcccaaaa tccctttatg 300
 attatgtagt tgatgtagt taatgaactc aggatagta ctgaaaattt tcccacaatt 360
 aaaaataaaa gacaaaaaga cccaagacaa cgacaaagcc ctttatgaat ctatgttttt 420
 gcagtcccag tcgtagccac tagaggaaga aaatcagtga ataacttttg cttggatctg 480
 tcttgagcgt ccttgaggca gctgctgcag aacagtgtac ctcaaggaca ctccctaagg 540

caaggccagc aaaggtagtt ttgcaactg gccagtccac cctaccccag agaaataagg 600
ataacatctt tgagcttcag tttcctcatc tgtaaataagg ggaataatac atacttctta 660
aggctactgc aaagatcaaa taagtaatac atttgaagca cttgggacag agcctgctac 720
atagtaagtgc ctcatthaagt gttagtattc attgtttgtt tttttaggcc aaggttgttg 780
tgaaaattaa atgagataat atataaaagg tathtagctc aatatctggc acatagcaat 840
aattgaatag atgatccttc atcttcgttc ctctgtttcc ctttcagttt gaaagacttg 900
gctaataataa ttttgaccaa ccaaacttgc attcaaggga gtgtacaagg ctggtatagc 960
cagccagtga gtatcagaat ctaaatgttt attaagacaa agggctgtca tgcaataacc 1020
caaccatacc attatcagtc tgccatcctt cctgtttctc taggcagcct ttctgtatgt 1080
caactcaacc agttaatctc tcagtcactt gacatgtggc tataatatac cacaaatatg 1140
tgtgcatgca tcctgtgctg caagcattta cagtcaagtt tatctgaaca cactgtatgg 1200
ttgatgtgaa atgctgaaac tgttcaagtt taggtcctca caaagcaagg aatatgaaat 1260
atttccttgg gaaatattta tccacaacaa agagatgtac agtgctttcg tatacagtga 1320
tttacagttt tccatgtgct ttacatgta ttattacttc atttgatcct tacaacaacc 1380
ccagaggtag atgtggcatg aattaccatt attctccttt gagaagaaga aactgagcat 1440
caaagaagct tgttggcctt cttgccagaa atcaccagc ttgtaaatgg taaaagaggg 1500
cttgaaacca ggttctctga ctctgacttc aagcactctc atacatcatc tatttaattt 1560
tttgagacta ggtattttat acttaggatt ctaaatattg cataaccatt gaatgccaca 1620
ccacccttgt attcagtga aaaaatggga cttttcttaa taaatagaga aatggaggtg 1680
cctaaaatta caaaattgca ctagagagat agtगतagaa ctgggaaact cttagtctaa 1740
tattttatct tttattcata tgatggaata ctaagctcaa tggcagaatc ttcagtcagc 1800
aatgggtgtc aggttatgtg aactatctga aggattcctg aactcttcat atctaggaat 1860
gtagcgttta aaagctctta gaatttttca tactcttagg tcctcctgac ttgtgcttca 1920
attcatgcat aaacttattt tataaggctc ccgtctgccc ttgctggaga taacattttt 1980
gtttatccaa caaagggtat tttatcttat tattaaattc tgactttgta tagaagagaa 2040
atgaagtgat aatctatata aattaagtct tgattagtag atatgggtta ttcacttgga 2100
taatattggag taaaatttta attcatggct aattacctc acctccacta ctagtggcc 2160
tccccacc aatattagcc aaaataaatc aaatttgga ctacaaacct acttcaaaaa 2220
gggtaaggta tataataagc aatatcatca agtcaaatag tttttttta accatgtaca 2280
aggcatcatg ctaggtgtta cgaagatgca tgaaatatat aagatgtggg tccaaccctc 2340
acagagttta tagacatcac ataataaatt ctgaagtcaa atataaatta atttaaaatt 2400
atctgctgtt cagcattgtt cactagtga gccaaacaat gtcactttgt tgaaaggcat 2460
tggtagttaa aactgtgtct gaaatacccc tctttcaaag gtttcgtaaa tttgatatag 2520
tcagggacac gaacaagatc cttttacatt tttctttttg cttgttagtc ttgctgtgct 2580
cataaatcca tgacagaaag cccctcccc tgagacttcc cacttccctt tctggctttc 2640
actgttgagc aggtgctat attcacgaca tgtggcctac agagtcttca ggatgtaagc 2700
aagccaaact gaagacaaaa tttgtagttc ttgctctcct aaacagatgc atatgtggca 2760
cttcagctct tccagattac aacagaattt aggtttatgc ataagtctaa taagtcttcc 2820
tcatactgaa cttcctaata ctactcccc tttctatctt ttcaaccac atgaccacta 2880

```

ttagacagat agtcagaacc agaaggaagt gaaatgctca ctcaacaagc agagcatctt 2940
tctcaatgca gttatcatag acaagacaca ctatgataga attggtgctg ctatgtattc 3000
tttttgaggg gcccctgaga aaacctccag gcttcaagt acatacctag tctgctttac 3060
cggtttacag gactcaagag aaaggtggac attgagagtt aatccctgag gccaaatctt 3120
aaatggagaa agtcaacatc cacagaaaat ggggaagggc acaagtatct ctgtgggctt 3180
atattccgac atttttatct gtaggggaaa aatgctttct tagaaaatga ctcagcacgg 3240
ggaagtcttg tctctacctc tgtcttgttt tgtcctttgg ggtcccttca ctatcaagtt 3300
caactgtgtg tccctgagac tcctctgccc cggaggacag gagactcgaa aaacgctctt 3360
cctggccagt ctctttgtct tgtgtctgcc agccccagc atctctctc tttcctgtaa 3420
gccccctctc ctgtgtgac tgtcttcata gtactttagg tatgttgctc ctttacctct 3480
gggaggatag cttgatgacc tgtctgtctc ggccagcccc atctagagtc tcagtggccc 3540
cagtcattgt gagaaagggt ctttcaaaga tagactcaag atagtagtgt cagaggctcc 3600
aagcaaatga agggcgggga cagttgaggg ggtggaatag ggacggcagc aggggaaccag 3660
atagcatgct gctgagaaga aaaaaagaca ttggtttagg tcaggaagca aaaaaaggga 3720
actgagtggc tgtgaaaggg tggggtttgc tcagactgtc cttcctctct ggactgtaag 3780
aattagtctc gaggccacca tgggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc 3840
catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 3900
cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct 3960
gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg 4020
ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccc aaggctacgt 4080
ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 4140
gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga 4200
cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 4260
ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 4320
cggcagcgtg cagctcgccc accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt 4380
gctgtgcccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga 4440
gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcatt 4500
ggacgagctg tacaagtaa 4519

```

<210> 31

<211> 3974

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IE.BTKp.GFP

<400> 31

```

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
acatctttga gcttcagttt cctcatctgt aaatagggga ataatacata cttcttaagg 120
ctactgcaaa gatcaaataa gtaatacatt tgaagcattt gggacagagc ctgctacata 180
gtaagtgtc attaagtgtt agttatcatt gttgttgttt ttaggccaag gttgttgtga 240

```



```

aaattaaatg agataatata taaaaggtat ttagctcaat atctggcaca tagcaataat 300
tgaatagatg atccttcac ttcgttcctc ctgttccctt tcagtttgaa agacttggct 360
aatataat tggaccaacca aacttgcatt caagggagtg tacaaggctg gtatagccag 420
ccagtgaagta tcagaatcta aatgtttatt aagacaaagg gctgtcatgc aataacccaa 480
ccataccatt atcagtctgc catccttcct gtttctctag gcagcctttc ctgatgtcaa 540
ctcaaccagt taatctctca gtcacttgac atgtggctat atatacacac aaatatgtgt 600
gcatgcatcc tgtgctgcaa gcatttacag tcaagtttat ctgaacacac tgtatggttg 660
atgtgaaatg ctgaaactgt tcaagtttag gtcttcacaa agcaaggaat atgaaatatt 720
tccttgggaa atattttatcc acaacaaaga gatgtacagt gctttcgtat acagtgattt 780
acagttttcc atgtgctttt acatgtatta ttacttcatt tgatccttac aacaacccca 840
gaggtagatg tggcatgaat taccattatt ctcttttgag aagaagaaac tgagcatcaa 900
agaagcttgt tggccttctt gccagaaatc acccagtttg taaatggtaa aagagggtt 960
gaaaccaggt tctctgactc tgacttcaag cactctcata catcatctat ttaatttttt 1020
ggagctaggt attttatact taggattcta aatattgcat aaccattgaa tgccacacca 1080
cccttgattt cagtgcacaaa aatgggactt ttcttaataa atagagaaat ggaggtgcct 1140
aaaattacaa aattgcacta gagagatagt gatagaactg ggaaactctt agtctaatat 1200
tttatctttt attcatatga tggaaacta agctcaatgg cagaatcttc agtcagcaat 1260
gggtgttcagg ttatgtgaac tatctgaagg attcctgaac tcttcatact taggaatgta 1320
gcgttttaaaa gctcttagaa tttttcatac tcttaggtcc tcctgacttg tgcttcaatt 1380
catgcataaa cttattttat aaggtctccg tctgcccttg ctggagataa cttttttgtt 1440
tatccaacaa agggfatattt atcttattat taaattctga ctttgtatag aagagaaatg 1500
aagtgataat ctatataaat taagtcttga ttagtacata tgggttattc acttgataa 1560
tatggagtaa aattttaatt catggctaatt tacctccacc tccactacct agtggcctcc 1620
cctcaccaat attagccaaa ataaatcaaa tttggaacta caaacctact tcaaaaagg 1680
taaggtatat aataagcaat atcatcaagt caaatagtat ttttttaacc atgtacaagg 1740
catcatgcta ggtgttacga agatgcatga aatatataag atgtggttcc aaccctcaca 1800
gagtttatag acatcacata ataaattctg aagtcaaata taaattaatt taaaattatc 1860
tgctgttcag cattgttcac tagtgcagcc aaacaatgtc atcttggtga aaggcattgg 1920
tagtaaaaac tgtgtctgaa ataccctctt ttcaaagggt tcgtaaattt gatatagtca 1980
gggacacgaa caagatcctt ttacattttt ctttttgctt gttagtcttg ctgtgctcat 2040
aaatccatga cagaaaagccc cctccctga gactttccac ttctttttct ggctttcact 2100
gttgacagagg ctgctatatt cacgacatgt ggctacaga gttctcagga tgtaagcaag 2160
ccaaactgaa gaccaaaattt gtagttcttg ctctcctaaa cagatgcata tgtggcactt 2220
cagctcttcc agattacaac agaatttagg tttatgcata agtctaataa gtcttctca 2280
tactgaactt cctaatacta ctccccctt ctatcttttc aaccacatg accactatta 2340
gacagatagt cagaaccaga aggaagtga atgtcactc aacaagcaga gcattttct 2400
caatgcagtt atcatagaca agacacacta tgatagaatt ggtgctgcta tgtattcttt 2460
ttgaggcccc tgagaaaacc tccaggttc aagtgcata cctagtctgc tttaccggtt 2520
tacaggactc aagagaaaagg tggacattga gagttaatcc ctgaggccaa atcttaaatg 2580

```

gagaaagtca acatccacag aaaatgggga agggcacaag tatttctgtg ggcttatatt 2640
 ccgacatttt tatctgtagg ggaaaaatgc tttcttagaa aatgactcag cacggggaag 2700
 tcttgtctct acctctgtct tgttttgtcc tttgggggtcc cttcactatc aagttcaact 2760
 gtgtgtccct gagactcctc tgccccggag gacaggagac tcgaaaaacg ctcttcctgg 2820
 ccagtctctt tgctctgtgt ctgccagccc ccagcatctc tcctctttcc tgtaagcccc 2880
 tctccctgtg ctgactgtct tcatagtact ttaggtatgt tgtcccttta cctctgggag 2940
 gatagcttga tgacctgtct gctcaggcca gccccatcta gagtctcagt ggccccagtc 3000
 atgttgagaa aggttctttc aaagatagac tcaagatagt agtgtcagag gtcccaagca 3060
 aatgaagggc ggggacagtt gaggggggtgg aatagggacg gcagcaggga accagatagc 3120
 atgctgtcga gaagaaaaaa agacattggg ttaggtcagg aagcaaaaaa aggggaactga 3180
 gtggctgtga aagggtgggg tttgtcaga ctgtccttcc tctctggact gtaagaatta 3240
 gtctcgaggc caccatgggt agcaaggcg aggagctgtt caccggggtg gtgccccatcc 3300
 tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg 3360
 gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccc 3420
 tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt gcagtgttc agccgctacc 3480
 ccgaccacat gaagcagcac gactttctca agtccgcat gccgaaggc tacgtccagg 3540
 agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg 3600
 agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca 3660
 acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg 3720
 acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca 3780
 gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgtctg 3840
 tgcccgacaa ccactacctg agcaccagc cgcacctgag caaagacccc aacgagaagc 3900
 gcgatcacat ggtcctgtg gagttcgtga ccgccgccg gatcactctc ggcattggac 3960
 agctgtacaa gtaa 3974

<210> 32

<211> 4647

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 0.7UCOE.IE.BTKp.GFP

<400> 32

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccg 60
 cgtgtggcat ctgaagcacc accagcgagc gagagctaga gagaaggaaa gccaccgact 120
 tcaccgcctc cgagctgctc cgggtcgcgg gtctgcagcg tctccggccc tccgcgccta 180
 cagctcaagc cacatccgaa gggggaggga gccgggagct gcgcgcgggg ccgccggggg 240
 gaggggtggc accgcccacg ccgggcggcc acgaaggcg gggcagcggg cgcgcgcccc 300
 gcgggggggag gggccgcgcg ccgcgccccg tgggaattgg ggccctaggg ggagggcgga 360
 ggcgcggacg accgcggcac ttaccgttcg cggcgtggcg cccggtggtc cccaagggga 420
 gggaaggggg aggcggggcg aggacagtga ccggagtctc ctcagcggtg gcttttctgc 480

```

ttggcagcct cagcggctgg cgccaaaacc ggactccgcc cacttcctcg cccctgcggt 540
gcgaggggtgt ggaatcctcc agacgctggg ggagggggag ttgggagctt aaaaactagt 600
accccttttg gaccactttc agcagcgaac tctcctgtac accaggggtc agttccacag 660
acgcggggcca ggggtgggtc attgcggcgt gaacaataat ttgactagaa gttgattcgg 720
gtgtttgcgg cccacatctt tgagcttcag tttcctcatc tgtaaataagg ggaataatac 780
atacttctta aggctactgc aaagatcaaa taagtaatac atttgaagca cttgggacag 840
agcctgctac atagtaagt ctcattaagt gttagttatc attgttggtt tttttaggcc 900
aaggttggtt tgaataataa atgagataat atataaaagg tatttagctc aatatctggc 960
acatagcaat aattgaatag atgaccttc atcttcgttc ctctgttcc ctttcagttt 1020
gaaagacttg gctaataataa ttttgaccaa ccaaacttgc attcaaggga gtgtacaagg 1080
ctggtatagc cagccagtga gtatcagaat ctaaagtgtt attaagacaa agggctgtca 1140
tgcaataacc caaccatacc attatcagtc tgccatcctt cctgtttctc taggcagcct 1200
ttcctgatgt caactcaacc agttaatctc tcagtcactt gacatgtggc tatatataca 1260
cacaaatatg tgtgcatgca tcctgtgctg caagcattta cagtcaagtt tatctgaaca 1320
cactgtatgg ttgatgtgaa atgctgaaac tgttcaagtt taggtcctca caaagcaagg 1380
aatatgaaat atttccttgg gaaatattta tccacaacaa agagatgtac agtgctttcg 1440
tatacagtga ttacagttt tccatgtgct ttacatgta ttattacttc atttgatcct 1500
tacaacaacc ccagaggtag atgtggcatg aattaccatt attctccttt gagaagaaga 1560
aactgagcat caaagaagct tgttggcctt cttgccagaa atcaccaggt ttgtaaattg 1620
taaaagaggg ctgaaacca ggttctctga ctctgacttc aagcactctc atacatcatc 1680
tatttaattt ttggagcta ggtattttat acttaggatt ctaaattatt cataaccatt 1740
gaatgccaca ccaccttgt attcagtga aaaaatggga cttttcttaa taaatagaga 1800
aatggaggtg cctaaaatta caaattgca ctagagagat agtgatagaa ctgggaaact 1860
cttagtctaa tattttatct ttattcata tgatggaata ctaagctcaa tggcagaatc 1920
ttcagtcagc aatgggtgtc aggttatgtg aactatctga aggattcctg aactcttcat 1980
atctaggaat gtagcgttta aaagctctta gaatttttca tactcttagg tcctcctgac 2040
ttgtgcttca attcatgcat aaacttattt tataaggtct cegtctgccc ttgctggaga 2100
taacattttt gtttatccaa caaagggtat ttatcttat tattaaattc tgactttgta 2160
tagaagagaa atgaagtgt aatctatata aattaagtct tgattagtag atatgggtta 2220
ttcacttgga taatatggag taaaatttta attcatggct aattacctcc acctccacta 2280
cctagtggcc tcccctcacc aatattagcc aaaataaata aaatttgga ctacaaacct 2340
acttcaaaaa gggtaaggta tataataagc aatatcatca agtcaaatag tattttttta 2400
accatgtaca aggcacatg ctaggtgtta cgaagatgca tgaaatatat aagatgtggt 2460
tccaaccctc acagagtta tagacatcac ataataaatt ctgaagtcaa atataaatta 2520
atttaaaatt atctgctgtt cagcattgtt cactagtga gccaaacaat gtcactttgt 2580
tgaaaggcat tggtagtaaa aactgtgtct gaaatacccc tctttcaaag gtttcgtaaa 2640
tttgatatag tcaggacac gaacaagatc cttttacatt tttctttttg cttgttagtc 2700
ttgctgtgct cataaatcca tgacagaaaag cccctcccc tgagactttc cacttccttt 2760
tctggctttc actgttgcat aggctgctat attcacgaca tgtggcctac agagttctca 2820

```

ggatgtaagc aagccaaact gaagaccaa tttgtagttc ttgctctcct aaacagatgc 2880
 atatgtggca cttcagctct tccagattac aacagaattt aggtttatgc ataagtctaa 2940
 taagtcttcc tcatactgaa cttcctaata ctactccctt tttctatctt ttcaaccac 3000
 atgaccacta ttagacagat agtcagaacc agaaggaagt gaaatgctca ctcaacaagc 3060
 agagcatctt tctcaatgca gttatcatag acaagacaca ctatgataga attggtgctg 3120
 ctatgtattc tttttgaggc ccctgagaaa acctccaggc ttcaagtgac atacctagtc 3180
 tgctttaccg gtttacagga ctcaagagaa aggtggacat tgagagttaa tccctgaggc 3240
 caaatcttaa atggagaaaag tcaacatcca cagaaaatgg ggaagggcac aagtatttct 3300
 gtgggcttat attccgacat ttttatctgt aggggaaaaa tgctttctta gaaaatgact 3360
 cagcacgggg aagtcttgct tctacctctg tcttgttttg tcctttgggg tcccttctact 3420
 atcaagttca actgtgtgct cctgagactc ctctgccccg gaggacagga gactcgaaaa 3480
 acgctcttcc tggccagtct ctttgcctctg tgtctgccag cccccagcat ctctcctctt 3540
 tcctgtaagc ccctctccct gtgtgactg tcttcatagt actttaggta tgttgctcct 3600
 ttacctctgg gaggatagct tgatgacctg tctgctcagg ccagcccat ctagagtctc 3660
 agtggcccca gtcatgttga gaaaggttct ttcaaagata gactcaagat agtagtgtca 3720
 gaggtcccaa gcaaatgaag ggcggggaca gttgaggggg tggaataggg acggcagcag 3780
 ggaaccagat agcatgctgc tgagaagaaa aaaagacatt ggttttaggtc aggaagcaaa 3840
 aaaagggaac tgagtggctg tgaaagggtg gggtttgctc agactgtcct tcctctctgg 3900
 actgtaagaa ttagtctcga ggccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg 3960
 gtggtgcccc tcctggctga gctggacggc gacgtaaacc gccacaagtt cagcgtgtcc 4020
 ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacct tgaagttcat ctgcaccacc 4080
 ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc 4140
 ttcagccgct accccgacca catgaagcag cagacttct tcaagtccgc catgcccga 4200
 ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactaaa gaccgcgcc 4260
 gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc 4320
 aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 4380
 tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac 4440
 atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac 4500
 ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac 4560
 cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact 4620
 ctcggcatgg acgagctgta caagtaa 4647

<210> 33

<211> 3541

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 0.7UCOE.BTKp.coBTK

<400> 33

ccgcgtgtgg catctgaagc accaccagcg agcgagagct agagagaagg aaagccaccg 60

```

acttcaccgc ctccgagctg ctccgggtcg cgggtctgca gctgtctccg ccctccgcgc 120
ctacagctca agccacatcc gaagggggag ggagccggga gctgcgcgcg gggccgctgg 180
ggggaggggt ggcaccgccc acgccgggcg gccacgaagg gcggggcagc gggcgcgcg 240
ccggcggggg gaggggccc gcgccgcgcc cgctgggaat tggggcccta ggggagggc 300
ggaggcgccg acgaccgcgg cacttaccgt tcgcggcgtg gcgcccgggt gtccccaagg 360
ggagggaagg gggaggcggg gcgaggacag tgaccggagt ctctcagcg gtggcttttc 420
tgcttggcag cctcagcggc tggcgccaaa accggactcc gccacttcc tcgcccctgc 480
ggtgcgaggg tgtggaatcc tccagacgct gggggagggg gagttgggag cttaaaaact 540
agtaccctt tgggaccact ttcagcagcg aactctctg tacaccagg gtcagttcca 600
cagacgcggg ccaggggtgg gtcatcgcg cgtgaacaat aatttgacta gaagttgatt 660
cgggtgtttg cggccggggc tagctacgac gcgttccgga attcgccctt gcatttccta 720
ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc ctgagaaaac 780
ctccaggctt caagtacat acctagtctg ctttaccggt ttacaggact caagagaaag 840
gtggacattg agagttaatc cctgaggcca aatcttaaat ggagaaagtc aacatccaca 900
gaaaatgggg aagggcacaa gtatttctgt gggcttatat tccgacattt ttatctgtag 960
gggaaaaatg ctttcttaga aaatgactca gcacggggaa gtcttgtctc tacctctgtc 1020
ttgttttgtc ctttggggtc ctttactat caagttcaac tgttgttccc tgagactcct 1080
ctgccccgga ggacaggaga ctgaaaaaac gctcttctg gccagtctct ttgctctgtg 1140
tctgccagcc cccagcatct ctctctttc ctgtaagccc ctctccctgt gctgactgtc 1200
ttcatagtac tttaggtatg ttgtccctt acctctggga ggatagcttg atgacctgtc 1260
tgctcaggcc agccccatct agagtctcag tggccccagt catgttgaga aaggttcttt 1320
caaagataga ctcaagatag tagtgtcaga ggtcccaagc aaatgaagg cggggacagt 1380
tgaggggggt gaatagggac ggcagcagg aaccagatag catgctgctg agaagaaaa 1440
aagacattgg tttaggtcag gaagcaaaaa aagggaactg agtggctgtg aaagggtggg 1500
gtttgctcag actgtcctc ctctctggac tgtaagaatt agtctcaga aagaagccac 1560
catggccgct gtgatcctgg agagcatttt cctgaagagg tcccagcaga aaaagaaaac 1620
ctctcccctg aactttaaga aaagactgtt cctgctgaca gtgcacaagc tgtcttacta 1680
tgagtacgac tttgagcggg gccgccagg atcaaaaaag gggagcatcg atgtggagaa 1740
gattacatgc gtggagaccg tggctcctga aaagaatcca cccctgaga ggcagatccc 1800
aagacggggc gaggagtcct ctgagatgga gcagattagt atcattgagc gcttccccta 1860
tccttttcag gtggtgtacg acgagggacc actgtatgtg ttctcaccca cagaggagct 1920
gagaaagagg tggattcacc agctgaagaa cgtgattaga tacaatagcg atctggtgca 1980
gaagtatcac cttgttttt ggatcgacgg gcagtacctg tgctgttccc agacagctaa 2040
gaacgctatg ggatgccaga ttctggaaaa tcggaacgga tctctgaaac caggagttc 2100
acaccgcaag accaaaaagc ccctgcctcc aacaccgag gaggatcaga tcctgaaaaa 2160
gcctctgcca cccgagcctg ctgcagcccc agtcagcact tccgaactga aaaagtggt 2220
ggctctgtat gactacatgc ccatgaatgc taacgatctg cagctgagaa agggcgacga 2280
gtatttcatt ctggaagagt ctaatctgcc ttggtggagg gccagagata agaacggaca 2340
ggaggggtac atcccatcta attatgtgac cgaggctgag gactctattg agatgtacga 2400

```

```

gtggtatagc aagcacatga cacggtccca ggctgagcag ctgctgaagc aggagggcaa 2460
agagggagggg tttatcgtgc gcgattctag taaggccggc aaatacactg tgtcagtgtt 2520
cgctaagagc accggagacc cccagggcgt gatcagacac tatgtggtgt gttccacacc 2580
tcagtctcag tactatctgg ctgagaagca cctgtttagt acaatcccag agctgattaa 2640
ctaccaccag cacaattctg ccggcctgat cagcaggctg aagtatcccg tctcccagca 2700
gaacaaaaaat gtccttcta ccgctggact ggggtacggc agttgggaga ttgatccaaa 2760
ggacctgaca ttcctgaagg agctgggaac tgggcagttt ggctggtga agtatggaaa 2820
atggagaggg cagtacgatg tggccatcaa gatgatcaag gagggctcaa tgagcgagga 2880
cgagttcatc gaggaggcta aggtcatgat gaacctgtcc cacgagaaac tggtcagct 2940
gtatggagtg tgcaccaagc agcggcccat tttatcatt acagagtaca tggctaattg 3000
gtgtctgctg aactatctgc gcgagatgag acacagattc cagacacagc agctgctgga 3060
aatgtgcaag gatgtgtgtg aggtatgga gtacctggag tctaagcagt ttctgcaccg 3120
ggacctggct gctcgcaatt gcctggtgaa cgatcagggc gtggtgaagg tgagtactt 3180
cggactgtca aggtatgtgc tggatgacga gtacaccagc tccgtgggct ctaagtttcc 3240
tgtgagatgg tctccacccg aggtgctgat gtatagcaag ttctcctcta agagcgatat 3300
ctgggccttt ggctgctga tgtgggaaat ctacagcctg ggcaagatgc cttacgagcg 3360
gttcacaaat tccgagacag ctgagcacat cgcccagggc ctgcgcctgt accggccaca 3420
tctggcctct gagaagggtg acaccatcat gtacagctgt tggcacgaga aggccgacga 3480
gagaccacaa ttcaagatcc tgctgtccaa cattctagat gtgatggacg aggagagctg 3540
a 3541

```

<210> 34

<211> 5240

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IE.BTKp.coBTK

<400> 34

```

gcatttccta ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc 60
acatctttga gcttcagttt cctcatctgt aatagggga ataatacata cttcttaagg 120
ctactgcaaa gatcaaataa gtaatacatt tgaagcattt gggacagagc ctgctacata 180
gtaagtgctc attaagtgtt agttatcatt gttgttgttt ttaggccaag gttgttgtga 240
aaattaaatg agataatata taaaaggtat ttagctcaat atctggcaca tagcaataat 300
tgaatagatg atccttcacg ttcgttcctc ctgttcctt tcagtttgaa agacttggct 360
aatataattt tgaccaacca aacttgcatt caagggagtg tacaaggctg gtatagccag 420
ccagtgagta tcagaatcta aatgtttatt aagacaaagg gctgtcatgc aataacccaa 480
ccataccatt atcagtctgc catccttcct gtttctctag gcagcctttc ctgatgtcaa 540
ctcaaccagt taatctctca gtcacttgac atgtggctat atatacacac aaatatgtgt 600
gcatgcatcc tgtgctgcaa gcatttacag tcaagtttat ctgaacacac tgtatggttg 660
atgtgaaatg ctgaaactgt tcaagtttag gtcctcacia agcaaggaat atgaaatatt 720

```

```

tccttgggaa atatttatcc acaacaaaga gatgtacagt gctttcgtat acagtgattt 780
acagttttcc atgtgctttt acatgtatta ttacttcatt tgatccttac aacaacccca 840
gaggtagatg tggcatgaat taccattatt ctcttttgag aagaagaaac tgagcatcaa 900
agaagcttgt tggccttctt gccagaaatc acccagtttg taaatggtaa aagagggctt 960
gaaaccaggt tctctgactc tgacttcaag cactctcata catcatctat ttaatttttt 1020
ggagctaggt attttatact taggattcta aatattgcat aaccattgaa tgccacacca 1080
cccttgtatt cagtgcacaaa aatgggactt ttcttaataa atagagaaat ggaggtgcct 1140
aaaattacaa aattgcacta gagagatagt gatagaactg ggaaactctt agtctaatat 1200
tttatctttt attcatatga tggaatacta agtcaatgg cagaatcttc agtcagcaat 1260
ggtgttcagg ttatgtgaac tatctgaagg attcctgaac tcttcatatc taggaatgta 1320
gcgtttaaaa gctcttagaa tttttcatac tcttaggtcc tctgacttg tgcttcaatt 1380
catgcataaa cttattttat aaggtctccg tctgcccttg ctggagataa ctttttgtt 1440
tatccaacaa aggttatttt atcttattat taaattctga ctttgtatag aagagaaatg 1500
aagtgataat ctatataaat taagtcttga ttagtacata tgggttattc acttgataa 1560
tatggagtaa aattttaatt catggctaac tacctccacc tccactacct agtggcctcc 1620
cctcaccaat attagccaaa ataaatcaaa tttggaacta caaacctact tcaaaaagg 1680
taaggtatat aataagcaat atcatcaagt caaatagtat ttttttaacc atgtacaagg 1740
catcatgcta ggtgttacga agatgcatga aatatataag atgtggttcc aaccctcaca 1800
gagtttatag acatcacata ataaattctg aagtcaaata taaattaatt taaaattatc 1860
tgctgttcag cattgttcac tagtgcagcc aaacaatgtc atcttgttga aaggcattgg 1920
tagtaaaaac tgtgtctgaa ataccctctt ttcaaaggtt tcgtaaattt gatatagtca 1980
gggacacgaa caagatcctt ttacattttt ctttttgctt gttagtcttg ctgtgctcat 2040
aaatccatga cagaaagccc cctcccctga gactttccac ttccttttct ggctttcact 2100
gttgacagagg ctgctatatt cacgacatgt ggcctacaga gttctcagga tgtaagcaag 2160
ccaaactgaa gaccaaattt gtagttcttg ctctcctaaa cagatgcata tgtggcactt 2220
cagctcttcc agattacaac agaatttagg tttatgcata agtctaataa gtcttctca 2280
tactgaactt cctaatacta ctccccctt ctatcttttc aaccacatg accactatta 2340
gacagatagt cagaaccaga aggaagtga atgtcactc aacaagcaga gcatctttct 2400
caatgcagtt atcatagaca agacacacta tgatagaatt ggtgctgcta tgtattcttt 2460
ttgaggcccc tgagaaaacc tccaggcttc aagtgcata cctagtctgc tttaccggtt 2520
tacaggactc aagagaaaagg tggacattga gagttaatcc ctgaggccaa atcttaaatg 2580
gagaaaagtca acatccacag aaaatgggga agggcacaag ttttctgtg ggcttatatt 2640
ccgacatttt tatctgtagg ggaaaaatgc tttcttagaa aatgactcag cacggggaag 2700
tcttgtctct acctctgtct tgttttgtcc tttgggtcc cttcactatc aagttcaact 2760
gtgtgtccct gagactcctc tgccccggag gacaggagac tcgaaaaacg ctcttcttg 2820
ccagtctctt tgctctgtgt ctgccagccc ccagcatctc tctcttttcc tgtaagcccc 2880
tctccctgtg ctgactgtct tcatagtact ttaggtatgt tgtcccttta cctctgggag 2940
gatagcttga tgacctgtct gctcaggcca gccccatcta gagtctcagt ggccccagtc 3000
atgttgagaa aggttctttc aaagatagac tcaagatagt agtgtcagag gtcccaagca 3060

```



```

aatgaagggc ggggacagtt gagggggtgg aatagggacg gcagcaggga accagatagc 3120
atgctgctga gaagaaaaaa agacattggt ttaggtcagg aagcaaaaaa aggggaactga 3180
gtggctgtga aagggtgggg ttgtctcaga ctgtccttcc tctctggact gtaagaatta 3240
gtctcgagaa agaagccacc atggccgctg tgatcctgga gagcattttc ctgaagaggt 3300
cccagcagaa aaagaaaacc tctcccctga actttaagaa aagactgttc ctgctgacag 3360
tgcacaagct gtcttactat gagtacgact ttgagcgggg ccgccgagga tcaaaaaagg 3420
ggagcatcga tgtggagaag attacatgcg tggagaccgt ggtccctgaa aagaatccac 3480
cccctgagag gcagatccca agacggggcg aggagtccct tgagatggag cagattagta 3540
tcattgagcg cttcccctat ctttttcagg tgggtgtacga cgagggacca ctgtatgtgt 3600
tctcacccac agaggagctg agaaagaggt ggattcacca gctgaagaac gtgattagat 3660
acaatagcga tctggtgcag aagtatcacc cttgtttttg gatcgacggg cagtacctgt 3720
gctgttccca gacagctaag aacgctatgg gatgccagat tctggaaaat cggaacggat 3780
ctctgaaacc agggagtcca caccgcaaga ccaaaaagcc cctgcctcca acacccgagg 3840
aggatcagat cctgaaaaag cctctgccac ccgagcctgc tgcagcccca gtcagcactt 3900
ccgaactgaa aaaggtggtg gctctgtatg actacatgcc catgaatgct aacgatctgc 3960
agctgagaaa gggcgacgag tatttcattc tggaagagtc taatctgcct tgggtggaggg 4020
ccagagataa gaacggacag gaggggtaca tcccatctaa ttatgtgacc gaggtgagg 4080
actctattga gatgtacgag tggatatagca agcacatgac acggtcccag gctgagcagc 4140
tgctgaagca ggagggcaaa gagggagggt ttatcgtgcg cgattctagt aaggccggca 4200
aatacactgt gtcagtgttc gctaagagca ccggagaccc ccagggcgtg atcagacact 4260
atgtggtgtg ttccacacct cagtctcagt actatctggc tgagaagcac ctgttttagta 4320
caatcccaga gctgattaac taccaccagc acaattctgc cggcctgac agcaggctga 4380
agtatcccg tctccagcag aacaaaaatg ctcttctac cgctggactg gggtagcgca 4440
gttgggagat tgatccaaag gacctgacat tcctgaagga gctgggaact gggcagtttg 4500
gcgtggtgaa gtatggaaaa tggagagggc agtacgatgt ggccatcaag atgatcaagg 4560
agggtcaat gagcgaggac gagttcatcg aggaggctaa ggtcatgatg aacctgtccc 4620
acgagaaaact ggtgcagctg tatggagtgt gcaccaagca gcggccatt tttatcatta 4680
cagagtacat ggctaattggg tgtctgctga actatctgcg cgagatgaga cacagattcc 4740
agacacagca gctgctggaa atgtgcaagg atgtgtgtga ggctatggag tacctggagt 4800
ctaagcagtt tctgcaccgg gacctggctg ctcgcaattg cctggtgaac gatcaggggcg 4860
tggatgaagg gagtgacttc ggactgtcaa ggtatgtgct ggatgacgag tacaccagct 4920
ccgtgggctc taagtcttct gtgagatggt ctccaccga ggtgctgatg tatagcaagt 4980
tctcctctaa gagcgatata tgggcctttg gcgtgctgat gtgggaaatc tacagcctgg 5040
gcaagatgcc ttacgagcgg ttacaaaatt ccgagacagc tgagcacatc gccaggggcc 5100
tgcgcctgta ccggccacat ctggcctctg agaaggtgta caccatcatg tacagctgtt 5160
ggcacgagaa ggccgacgag agaccacat tcaagatcct gctgtccaac attctagatg 5220
tgatggacga ggagagctga

```

<210> 35

<211> 5941

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK

<400> 35

```

ccgcgtgtgg catctgaagc accaccagcg agcgagagct agagagaagg aaagccaccg 60
acttcaccgc ctccgagctg ctccgggtcg cgggtctgca gcgtctccgg ccctccgcgc 120
ctacagctca agccacatcc gaagggggag ggagccggga gctgcgcgcg gggccgctgg 180
ggggaggggt ggcaccgccc acgccgggcg gccacgaagg gcggggcagc gggcgcgcgc 240
ccggcggggg gaggggcccgc gcgccgcgcc cgctgggaat tggggcccta gggggagggc 300
ggaggcgccg acgaccgcgg cacttacgtg tcgcggcgtg gcgcccggtg gtccccaagg 360
ggagggaagg gggaggcggg gcgaggacag tgaccggagt ctctcagcg gtggcttttc 420
tgcttggcag cctcagcggc tggcgccaaa accggactcc gccacttcc tcgccctgc 480
ggtgcgaggg tgtggaatcc tccagacgct gggggagggg gagttgggag cttaaaaact 540
agtaccctt tgggaccact ttcagcagcg aactctctg tacaccagg gtcagttcca 600
cagacgcggg ccaggggtgg gtcattgcgg cgtgaacaat aatttgacta gaagttgatt 660
cgggtgtttg cggccggggc tagcacatct ttgagcttca gtttctcat ctgtaaatag 720
gggaataata catacttctt aaggctactg caaagatcaa ataagtaata catttgaagc 780
acttgggaca gagcctgcta catagtaagt gtcattaag tgttagtatt cattgttggt 840
gttttttaggc caaggttggt gtgaaaatta aatgagataa tatataaag gtatttagct 900
caatatctgg cacatagcaa taattgaata gatgatcctt catcttcgtt cctcctgttc 960
cctttcagtt tgaaagactt ggctaataata atttgacca accaaacttg cattcaaggg 1020
agtgtacaag gctggtatag ccagccagtg agtatcagaa tctaaatggt tattaagaca 1080
aagggtgtgc atgcaataac ccaaccatac cattatcagt ctgccatcct tcctgtttct 1140
ctaggcagcc tttcctgatg tcaactcaac cagttaatct ctcagtcact tgacatgtgg 1200
ctatatatac acacaaatat gtgtgcatgc atcctgtgct gcaagcattt acagtcaagt 1260
ttatctgaac aactgtatg gttgatgtga aatgctgaaa ctgttcaagt ttaggtcctc 1320
acaaagcaag gaatatgaaa ttttccttg ggaaatattt atccacaaca aagagatgta 1380
cagtgccttc gtatacagtg atttacagt ttccatgtgc ttttacatgt attattactt 1440
catttgatcc ttacaacaac ccagaggta gatgtggcat gaattacat tattctcctt 1500
tgagaagaag aaactgagca tcaaagaagc ttgttggcct tcttgccaga aatcaccag 1560
tttgtaaag gtaaaagagg gcttgaaacc aggttctctg actctgactt caagcactct 1620
catacatcat ctatttaatt ttttgagct aggtatttta tacttaggat tctaaatatt 1680
gcataaccat tgaatgccac accacccttg tattcagtgc aaaaaatggg acttttctta 1740
ataaataagag aaatggaggt gcctaaaatt acaaaattgc actagagaga tagtgataga 1800
actgggaac tcttagtcta atattttatc ttttattcat atgatggaat actaagctca 1860
atggcagaat cttcagtcag caatggtgtt caggttatgt gaactatctg aaggattcct 1920
gaactcttca tatctaggaa ttagcgtttt aaaagctctt agaatttttc atactcttag 1980
gtcctcctga cttgtgcttc aattcatgca taaacttatt ttataaggtc tccgtctgcc 2040

```

ctgctggag ataacatttt tgtttatcca acaaagggtt ttttatctta ttattaaatt 2100
 ctgactttgt atagaagaga aatgaagtga taatctatat aaattaagtc ttgattagta 2160
 catatgggtt attcacttgg ataatatgga gtaaaatttt aattcatggc taattacctc 2220
 cacctccact acctagtggc ctcccctcac caatattagc caaaataaat caaatttgga 2280
 actacaaacc tacttcaaaa agggtaagggt atataataag caatatcatc aagtcaaata 2340
 gtattttttt aaccatgtac aaggcatcat gctaggtgtt acgaagatgc atgaaatata 2400
 taagatgtgg ttccaaccct cacagagttt atagacatca cataataaat tctgaagtca 2460
 aatataaaatt aatttaaaat tatctgctgt tcagcattgt tcactagtgc agccaaacaa 2520
 tgtcatcttg ttgaaaggca ttggtagtaa aaactgtgtc tgaaataccc ctctttcaaa 2580
 ggtttcgtaa atttgatata gtcaggga cgaacaagat ctttttacct ttttcttttt 2640
 gcttgtagt cttgctgtgc tcataaatcc atgacagaaa gccccctccc ctgagacttt 2700
 ccacttcctt ttctggcttt cactgttgca gaggtgcta tattcacgac atgtggccta 2760
 cagagttctc aggatgtaag caagccaaac tgaagacaa atttgtagtt cttgctctcc 2820
 taaacagatg catatgtggc acttcagctc ttccagatta caacagaatt taggtttatg 2880
 cataagtcta ataagtcttc ctcatactga acttcctaact actactcccc ttttctatct 2940
 tttcaaccca catgaccact attagacaga tagtcagaac cagaaggaag tgaaatgctc 3000
 actcaacaag cagagcatct ttctcaatgc agttatcata gacaagacac actatgatag 3060
 aattggtgct gctatgtatt ctttttgaa gcgttccgga attcgccctt gcatttccta 3120
 ggagaatccc tgggggaatc attgcagttg gagcataatg tagggggccc ctgagaaaac 3180
 ctccaggctt caagtacat acctagtctg ctttaccggt ttacaggact caagagaaag 3240
 gtggacattg agagttaatc cctgaggcca aatcttaaat ggagaaagtc aacatccaca 3300
 gaaaatgggg aagggcacaa gtatttctgt gggcttatat tccgacattt ttatctgtag 3360
 gggaaaaatg ctttcttaga aaatgactca gcacggggaa gtcttgtctc tacctctgtc 3420
 ttgttttgtc ctttggggtc cttcactat caagttcaac tgttgtgtccc tgagactcct 3480
 ctgccccgga ggacaggaga ctgaaaaaac gctcttccctg gccagtctct ttgctctgtg 3540
 tctgccagcc ccagcatct ctctctttc ctgtaagccc ctctccctgt gctgactgtc 3600
 ttcatagtag tttaggtatg ttgtcccttt acctctggga ggatagcttg atgacctgtc 3660
 tgctcaggcc agccccatct agagtctcag tggccccagt catgttgaga aaggttcttt 3720
 caaagataga ctcaagatag tagtgtcaga ggtcccaagc aaatgaaggc cggggacagt 3780
 tgagggggtg gaataggac ggcagcaggg aaccagatag catgctgctg agaagaaaaa 3840
 aagacatttg tttaggtcag gaagcaaaaa aagggaactg agtggctgtg aaagggtggg 3900
 gtttgctcag actgtccttc ctctctggac tgtaagaatt agtctcgaga aagaagccac 3960
 catggccgct gtgatcctgg agagcatttt cctgaagagg tcccagcaga aaaagaaaac 4020
 ctctcccctg aactttaaga aaagactgtt cctgctgaca gtgcacaagc tgtcttacta 4080
 tgagtacgac tttgagcggg gccgccgagg atcaaaaaag gggagcatcg atgtggagaa 4140
 gattacatgc gtggagaccg tggtcctga aaagaatcca cccctgaga ggcagatccc 4200
 aagacggggc gaggagtcct ctgagatgga gcagattagt atcattgagc gcttccccta 4260
 tccttttcag gtggtgtacg acgagggacc actgtatgtg ttctcaccca cagaggagct 4320
 gagaaagagg tggattcacc agctgaagaa cgtgattaga tacaatagcg atctggtgca 4380

gaagtatcac ccttgttttt ggatcgacgg gcagtacctg tgctgttccc agacagctaa 4440
 gaacgctatg ggatgccaga ttctggaaaa tcggaacgga tctctgaaac caggaggttc 4500
 acaccgcaag accaaaaagc ccctgcctcc aacacccgag gaggatcaga tcctgaaaaa 4560
 gcctctgcca cccgagcctg ctgcagcccc agtcagcact tccgaactga aaaaggtggt 4620
 ggctctgtat gactacatgc ccatgaatgc taacgatctg cagctgagaa agggcgacga 4680
 gtatttcatt ctggaagagt ctaatctgcc ttgggtggagg gccagagata agaacggaca 4740
 ggaggggtac atcccatcta attatgtgac cgaggctgag gactctattg agatgtacga 4800
 gtggtatagc aagcacatga cacggtccca ggctgagcag ctgctgaagc aggagggcaa 4860
 agagggaggg tttatcgtgc gcgattctag taaggccggc aaatacactg tgtcagtgtt 4920
 cgctaagagc accggagacc cccagggcgt gatcagacac tatgtggtgt gttccacacc 4980
 tcagtctcag tactatctgg ctgagaagca cctgtttagt acaatcccag agctgattaa 5040
 ctaccaccag cacaattctg ccggcctgat cagcaggctg aagtatcccg tctcccagca 5100
 gaacaaaaat gctccttcta ccgctggact ggggtacggc agttgggaga ttgatccaaa 5160
 ggacctgaca ttctgaagg agctgggaac tgggcagttt ggcgtggtga agtatggaaa 5220
 atggagaggg cagtacgatg tggccatcaa gatgatcaag gagggtcaa tgagcgagga 5280
 cgagttcatc gaggaggcta aggtcatgat gaacctgtcc cacgagaaac tgggtgcagct 5340
 gtatggagtg tgcaccaagc agcggcccat ttttatcatt acagagtaca tggctaattg 5400
 gtgtctgctg aactatctgc gcgagatgag acacagattc cagacacagc agctgctgga 5460
 aatgtgcaag gatgtgtgtg aggctatgga gtacctggag tctaagcagt ttctgcaccg 5520
 ggacctggct gctcgcaatt gcctggtgaa cgatcagggc gtggtgaagg tgagtactt 5580
 cggactgtca aggtatgtgc tggatgacga gtacaccagc tccgtgggct ctaagtttcc 5640
 tgtgagatgg tctccacccg aggtgctgat gtatagcaag ttctcctcta agagcgatat 5700
 ctgggccttt ggctgtctga tgtgggaaat ctacagcctg ggcaagatgc cttacgagcg 5760
 gttcacaat tccgagacag ctgagcacat cgcccagggc ctgcgcctgt accggccaca 5820
 tctggcctct gagaaggtgt acaccatcat gtacagctgt tggcacgaga aggccgacga 5880
 gagaccaca ttcaagatcc tgctgtccaa cattctagat gtgatggacg aggagagctg 5940
 a 5941

<210> 36

<211> 3856

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ABCD.BTKp.GFP

<400> 36

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggcccgga 60
 tccctgggggt atggcagggg ctgggcagca gcagcaatgt accttgcttg ggaccctaa 120
 aaaccagaga gacagcatgg ctggtgccat ttatcagcta gtggaggagg ctgacggagg 180
 gtgggagtgat catcagcaca aggccctggc agtcccttct ggtgattaga gaggccgaaa 240
 gggtcctttc cgacaagggc tgagggtggg cggaacagga agagaaaaat gtgacatgag 300

```

gtgaccatcc gaacaggtag caaatgttag aaaggggtac ctctggcaaa cttagtggaa 360
aagtaatatc gcagggagca gtcagataaa aacaagccct tctgtcaaat agtgcttgaa 420
gactcaatag ggatacatgg gtcaatgaag cctttagaaa aagaaatact aagaggcaga 480
ttctctgaga acatggtaaa agctcacgct ccacgttatg aagttgacct ttgtgagcta 540
gggaaaggcc tggctaggcc aggggttagg ctacctgcct tgagctgtac caggccaaat 600
gtcgccaggg tcagagctgg cttattaaag gactgtgtgg aagctgtgcc aacctcgtgg 660
taacaatggg taaaagactg ggccaggaga aagcagcctc tgcctcagcc cagacagtgc 720
ggccaaccct tgaggttggt gcaaagggtt ctctctttac cattgccctc catgtgcatg 780
gcttgctttt ctcttgcttt cattattttt ctttctttt cctcggatcc acgcgtgaat 840
tctttgtaaa ctcttatggg tgcgaactaa tgtaactttc catccagtta tgggggattg 900
gtgcaatttt aaattatcac tatgatttgc tatttccatt tgagcaaatt tcctatagag 960
tttcttttca gtggactaga cccatatcag gaagtgactt aggtataaag ggaagataca 1020
gctttcgaaa accaaaagttt gggcgttttc caaagagtta tcagataccc ctttctacac 1080
ccacaatgat ctgattgctg agatctgatt gctaactact gaaaataagg aagaactaga 1140
attttcagtg acacagtgtc cagcaagaag ctagaaaaga ggccttgaca tatttgactc 1200
caaagctact tggttatgca tgaagccatc tggggagggg aaggaggagg gagaactcct 1260
ctgaggaccc tgaacaattt gggccacgtg tgactttcag tttctatgga gattcatgtg 1320
cagtggctga gggcaatctg agagcattgg aaaccagaa gctttaaacg cgtaggaaag 1380
acagggaatg gccagaatct tcctagccaa ttgagtagtg ctttcaagga gaaatcaaga 1440
gaaaacacta cttcttggtt attttggtta agtagtcatt tgaagtacag ttgactgggt 1500
attttatttt aaatcataat tcatagactc ttcccaatca taggctggct gtgtagtttt 1560
ctgaattttg ctctggtatt cttcttcttt ttttttttta tttttatttt ttattttttt 1620
tttgagactc caggctggag tgcagtgtca cgatcttggc tcaactgcaac ctccgcctcc 1680
cgagttcaag cgattctcct gcctcagcct cctgagttgc tgggactaca ggcgcctgtc 1740
accacgcccc gctaattttt tgtattttta tagagacggg atttcacat gttggccagg 1800
ctggtctcta actcctgacc tcaagtgatc cgccagcctc agcctcccaa agtgctggga 1860
ttacgggcat gagccactgc gcctggactt attattctta atagtatttt atcttatgag 1920
cgaagataag agcccaagat ggtttagttt actgattctg caagtgttat ttctattaat 1980
tccttggcat actgcagttt gtatgatggc tgcactcttg ttaataagct tcgtctttct 2040
gaattctgtt gctccatagg gagctgggag gctgcaaaag gtggccctgt aaaaatcttt 2100
gcattttata ttaataaatt acagacccca gtgggacaat gtttgaaaaa ttatattcac 2160
cgtctaggaa attgggaact gaaagtccaa tatctgcctc agtggagttc tggcacctgc 2220
attatccctt ctgggtatat caagatcaac agctgcacag atacttttgc ttttcacaga 2280
ttctacacat atcatataaa ggtgaatagt gtaaagctac ctctacacct taccaagcac 2340
acagggggcc cctgagaaaa cctccaggct tcaagtgaca tacctagtct gctttaccgg 2400
tttacaggac tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa 2460
tgagagaaag caacatccac agaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata 2520
ttccgacatt tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga 2580
agtcttgtct ctacctctgt cttgttttgt ctttgggggt cccttcacta tcaagttcaa 2640

```

```

ctgtgtgtcc ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttctt 2700
ggccagtctc tttgctctgt gtctgccagc ccccagcatc tctcctcttt cctgtaagcc 2760
cctctccctg tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg 2820
aggatagctt gatgacctgt ctgctcaggc cagccccatc tagagtctca gtggccccag 2880
tcatgttgag aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag 2940
caaatgaagg gcggggacag ttgagggggg ggaatagga cggcagcagg gaaccagata 3000
gcatgctgct gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact 3060
gagtggctgt gaaagggtgg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat 3120
tagtctcgag gccaccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccatt 3180
cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 3240
gggcgatgcc acctacggca agctgacctt gaagttcatt tgcaccaccg gcaagctgcc 3300
cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacctt gacctacggc gtgcagtgtt tcagccgcta 3360
ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca 3420
ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt 3480
cgagggcgac accctgggtg accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg 3540
caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc 3600
cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 3660
cagcgtgcag ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgtt 3720
gctgccccgac aaccactacc tgagcaccca gtccgcccgt agcaaagacc ccaacagaaa 3780
gcgcgatcac atggtcctgc tggagttcgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga 3840
cgagctgtac aagtaa

```

3856

<210> 37

<211> 3856

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> DBCA.BTKp.GFP

<400> 37

```

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccccct 60
gtgtgcttgg taagggttag aggtagcttt acactattca cttttatatg atatgtgtag 120
aatctgtgaa aagcaaaaagt atctgtgcag ctgttgatct tgatataccc agaagggata 180
atgcaggtgc cagaactcca ctgaggcaga tattggactt tcagttccca atttcctaga 240
cggatgaatat aatttttcaa acattgtccc actgggggtct gtaattatta aattataaat 300
gcaaagattt ttacagggcc accttttgca gcctcccagc tccctatgga gcaacagaat 360
tcagaaagac gaagcttatt aacaagagtg cagccatcat acaaactgca gtatgccaa 420
gaattaatag aaatagcact tgcagaatca gtaaaactaa ccatcttggg ctcttatctt 480
cgctcataag ataaaatact attaagaata ataagtccag gcgcagtggc tcatgcccgt 540
aatccagca ctttgggagg ctgaggctgg cggtacactt gaggtcagga gttagagacc 600
agcctggcca acatggtgaa atcccgtctc tattaaaata caaaaaatta gccgggcgtg 660

```

gtgacaggcg cctgtagtcc cagcaactca ggaggctgag gcaggagaat cgcttgaact 720
 cgggaggcgg aggttgcagt gagccaagat cgtgacactg cactccagcc tggagtctca 780
 aaaaaaaaaat aaaaaataaa aataaaaaaaaa aaaaagaaga agaataccag agcaaaattc 840
 agaaaactac acagccagcc tatgattggg aagagtctat gagatatgat ttaaaataaa 900
 ataaccagtc aactgtactt caaatgacta cttagccaaa atatccaaga agtagtgttt 960
 tctcttgatt tctccttgaa agcactactc aattggctag gaagattctg gccattccct 1020
 gtctttccta cgcgtttaaa gcttctgggt ttccaatgct ctcagattgc cctcagccac 1080
 tgcacatgaa tctccataga aactgaaagt cacacgtggc ccaattgttt cagggtcctc 1140
 agaggagttc tccctcctcc tccccctccc cagatggctt catgcataac caagtagctt 1200
 tggagtcaaa tatgtcaagg cctcttttct agcttcttgc tgagcactgt gtcactgaaa 1260
 attctagttc ttccttattt tcagtagtta gcaatcagat ctcagcaatc agatcattgt 1320
 ggggtgtagaa gggggtatct gataactctt tggagaacgc ccaaactttg gttttcgaaa 1380
 gctgtatctt ccttttatac ctaagtcact tctgatatg ggtctagtcc actgaaagga 1440
 aactctatag gaaatttgct caaatggaaa tagcaaatca tagtgataat ttaaaattgc 1500
 accaatcccc cataactgga tggaaagtta cattagtctg caccataagg agttttacaaa 1560
 gaattcacgc gtggatccga ggaaaggaaa ggagaaataa tgaagacaag agaaaagcaa 1620
 gccatgcaca tggagggcaa tggtaagagg agaaacctt gccacaacct caagggttgg 1680
 ccgcactgtc tgggctgagg cagaggctgc tttctcctgg ccagtcctt taccattgt 1740
 taccacgagg ttggcacagc ttccacacag tcctttaata agccagctct gaccctggcg 1800
 acatttggcc tggtagagct caaggcaggt agcctacacc ctggcctagc caggcctttc 1860
 cctagctcac aaaggctaac ttcataacgt ggagcgtgag cttttaccat gttctcagag 1920
 aatctgcctc ttagtatttc tttttctaaa ggcttcattg acccatgtat ccctattgag 1980
 tcttcaagca ctatttgaca gaagggttg tttttatctg actgctccct gcaatattac 2040
 ttttccacta agtttgccag aggtaccctt ttctaacatt tgctacctgt tcggatggtc 2100
 acctcatgtc acatttttct ctctctgttc cgcccacct cagcccttgt cggaaggac 2160
 cctttcggcc tctctaata ccagaaggga ctgccagggc cttgtgctga tgacactccc 2220
 accctccgtc agcctcctcc actagctgat aaatggcacc agccatgctg tctctctggt 2280
 ttttaggggt cccaagcaag gtacattgct gctgctgcc agcccctgcc ataccacagg 2340
 gatccgggcc cctgagaaaa cctccaggt tcaagtgaac tacctagtct gctttaccgg 2400
 ttacaggac tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa 2460
 tggagaaaagt caacatccac agaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata 2520
 ttccgacatt tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga 2580
 agtcttgtct ctacctctgt cttgttttgt ctttgggggt cccttacta tcaagttcaa 2640
 ctgtgtgtcc ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttctt 2700
 ggccagtctc tttgctctgt gtctgccagc cccagcctc tctctctttt cctgtaagcc 2760
 cctctccctg tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg 2820
 aggatagctt gatgacctgt ctgctcaggc cagccccatc tagagtctca gtggccccag 2880
 tcatgttgag aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag 2940
 caaatgaagg gcggggacag ttgagggggg ggaataggga cggcagcagg gaaccagata 3000

gcatgctgct gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact 3060
 gagtggctgt gaaagggtgg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat 3120
 tagtctcgag gccacatgg tgagcaagg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccac 3180
 cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 3240
 gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc 3300
 cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta 3360
 ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca 3420
 ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt 3480
 cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg 3540
 caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc 3600
 cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 3660
 cagcgtgcag ctgcccagac actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct 3720
 gctgcccagc aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa 3780
 gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga 3840
 cgagctgtac aagtaa 3856

<210> 38

<211> 2886

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AB.BTKp.GFP

<400> 38

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggcccga 60
 tccctgggggt atggcagggg ctgggcagca gcagcaatgt accttgcttg ggaccctaa 120
 aaaccagaga gacagcatgg ctggtgccat ttatcagcta gtggaggagg ctgacggagg 180
 gtgggagtgat catcagcaca aggccctggc agtcccttct ggtgattaga gaggccgaaa 240
 gggtcctttc cgacaagggc tgagggtggg cggaacagga agagaaaaat gtgacatgag 300
 gtgaccatcc gaacaggtag caaatgttag aaagggttac ctctggcaaa cttagtggaa 360
 aagtaatatt gcaggagca gtcagataaa aacaagccct tctgtcaa atgtgcttgaa 420
 gactcaatag ggatacatgg gtcaatgaag ctttagaaa aagaaatact aagaggcaga 480
 ttctctgaga acatggtaaa agctcacgct ccacgttatg aagttgacct ttgtgagcta 540
 gggaaaggcc tggctaggcc aggtgttag ctacctgct tgagctgtac caggccaaat 600
 gtcgccaggg tcagagctgg cttattaaag gactgtgtgg aagctgtgcc aacctcgtgg 660
 taacaatggg taaaagactg ggccaggaga aagcagctc tgcctcagcc cagacagtgc 720
 ggccaaccct tgaggttgtg gcaaaggttt ctctcttac cattgcctc catgtgcatg 780
 gcttgctttt ctcttgtctt cattatttct ctttctttt cctcgatcc acgcgtgaat 840
 tctttgtaaa ctcttatgg tgcgaaacta tgtaactttc catccagtta tgggggattg 900
 gtgcaatttt aaattatcac tatgatttgc tatttccatt tgagcaaatt tcctatagag 960
 tttcctttca gtggactaga cccatatcag gaagtgactt aggtataaag ggaagataca 1020


```

gctttcgaaa accaaagttt gggcgttctc caaagagtta tcagataccc ctttctacac 1080
ccacaatgat ctgattgctg agatctgatt gctaactact gaaaataagg aagaactaga 1140
attttcagtg acacagtgct cagcaagaag ctagaaaaga ggccttgaca tatttgactc 1200
caaagctact tggttatgca tgaagccatc tggggagggg aaggaggagg gagaactcct 1260
ctgaggaccc tgaacaattt gggccacgtg tgactttcag tttctatgga gattcatgtg 1320
cagtggctga gggcaatctg agagcattgg aaaccagaa gctttaaacg cgtaggggcc 1380
cctgagaaaa cctccaggct tcaagtgaac tacctagtct gctttaccgg tttacaggac 1440
tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa tggagaaagt 1500
caacatccac agaaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata ttccgacatt 1560
tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga agtcttgtct 1620
ctacctctgt cttgttttgt cctttggggg cccttcaact tcaagttcaa ctgtgtgtcc 1680
ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttctt ggccagtctc 1740
tttgctctgt gtctgccagc ccccagcatc tctctctttt cctgtaagcc cctctccctg 1800
tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg aggatagctt 1860
gatgacctgt ctgctcaggc cagcccatc tagagtctca gtggccccag tcatgttgag 1920
aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag caaatgaagg 1980
gcggggacag ttgagggggg ggaataggga cggcagcagg gaaccagata gcatgctgct 2040
gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact gagtggctgt 2100
gaaaggggtg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat tagtctcgag 2160
gccaccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tgggtgccc atctggtcgag 2220
ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 2280
acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 2340
cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 2400
atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 2460
atcttcttca aggacgacgg caactacaag accgcgccc aggtgaagtt cgaggcgac 2520
accctgggtg accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 2580
gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 2640
aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 2700
ctcgccgacc actaccagca gaacacccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgcac 2760
aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 2820
atggctctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 2880
aagtaa 2886

```

<210> 39

<211> 2349

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> A.BTKp.GFP

<400> 39

```

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggcccgga 60
tccttgggggt atggcagggg ctgggcagca gcagcaatgt accttgcttg ggaccctaa 120
aaaccagaga gacagcatgg ctggtgccat ttatcagcta gtggaggagg ctgacggagg 180
gtgggagtgt catcagcaca aggccctggc agtcccttct ggtgattaga gaggccgaaa 240
gggtcctttc cgacaagggc tgagggtggg cggaacagga agagaaaaat gtgacatgag 300
gtgaccatcc gaacaggtag caaatgttag aaaggggtac ctctggcaaa cttagtggaa 360
aagtaatatt gcagggagca gtcagataaa aacaagccct tctgtcaaat agtgcttgaa 420
gactcaatag ggatacatgg gtcaatgaag ctttagaaa aagaaatact aagaggcaga 480
ttctctgaga acatggtaaa agctcacgct ccacgttatg aagttgacct ttgtgagcta 540
gggaaaggcc tggctaggcc aggggttagg ctacctgcct tgagctgtac caggccaaat 600
gtcgccaggg tcagagctgg cttattaaag gactgtgtgg aagctgtgcc aacctcgtgg 660
taacaatggg taaaagactg ggccaggaga aagcagcctc tgcctcagcc cagacagtgc 720
ggccaaccct tgaggttgtg gcaaaggttt ctctctttac cattgcctc catgtgcatg 780
gcttgctttt ctcttgtctt cattatttct ctttctctt cctcgatcc acgcgtaggg 840
gcccctgaga aaacctccag gttcaagtg acatacctag tctgctttac cggtttacag 900
gactcaagag aaaggtggac attgagagtt aatccctgag gccaaatctt aaatggagaa 960
agtcaacatc cacagaaaaat ggggaagggc acaagtattt ctgtgggctt atattccgac 1020
atttttatct gtaggggaaa aatgctttct tagaaaatga ctcagcacgg ggaagtcttg 1080
tctctacctc tgtcttgttt tgtcctttgg ggtcccttca ctatcaagtt caactgtgtg 1140
tccttgagac tcctctgccc cggaggacag gagactcgaa aaacgctctt cctggccagt 1200
ctctttgctc tgtgtctgcc agccccagc atctctctc tttcctgtaa gccccctcc 1260
ctgtgctgac tgtcttcata gtactttagg tatgttgtcc ctttacctct gggaggatag 1320
cttgatgacc tgtctgtctc ggccagcccc atctagagtc tcagtggccc cagtcatgtt 1380
gagaaagggt ctttcaaaga tagactcaag atagtagtgt cagaggtccc aagcaaatga 1440
agggcgggga cagttgaggg ggtggaatag ggacggcagc agggaaccag atagcatgct 1500
gctgagaaga aaaaaagaca ttggtttagg tcaggaagca aaaaaaggga actgagtggc 1560
tgtgaaaggg tggggtttgc tcagactgtc cttcctctct ggactgtaag aattagtctc 1620
gaggccacca tggtagcaaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc catcctggtc 1680
gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgaggcgat 1740
gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gccctgccc 1800
tggccccacc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac 1860
cacatgaagc agcacgactt cttcaagtc gccatgccc aaggctacgt ccaggagcgc 1920
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc 1980
gacacctggt tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga cggcaacatc 2040
ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag 2100
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg 2160
cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc 2220
gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat 2280
cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat ggacgagctg 2340

```

tacaagtaa 2349

<210> 40

<211> 2119

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> B.BTKp.GFP

<400> 40

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggcccgga 60

tccacgcgtg aattctttgt aaactcetta tgggtgcgaac taatgtaact ttccatccag 120

ttatggggga ttggtgcaat tttaaattat cactatgatt tgctatttcc atttgagcaa 180

atttcctata gaggtttcct tcagtggact agaccatat caggaagtga cttaggtata 240

aagggaagat acagctttcg aaaaccaaag tttgggcgtt ctccaaagag ttatcagata 300

cccccttcta caccacaat gatctgattg ctgagatctg attgctaact actgaaaata 360

aggaagaact agaattttca gtgacacagt gtcagcaag aagctagaaa agaggccttg 420

acatatattga ctccaaagct acttggttat gcatgaagcc atctggggag gggaaggagg 480

agggagaact cctctgagga ccctgaaaca attgggccac gtgtgacttt cagtttctat 540

ggagattcat gtgcagtggc tgagggcaat ctgagagcat tggaaacca gaagctttaa 600

acgcgtaggg gccctgaga aaacctccag gcttcaagt acatacctag tctgctttac 660

cggtttacag gactcaagag aaaggtggac attgagagtt aatccctgag gccaaatctt 720

aaatggagaa agtcaacatc cacagaaaat ggggaagggc acaagtattt ctgtgggctt 780

atattccgac atttttatct gtaggggaaa aatgctttct tagaaaatga ctcagcacgg 840

ggaagtcttg tctctacctc tgtcttgttt tgtcctttgg ggtcccttca ctatcaagtt 900

caactgtgtg tccctgagac tcctctgccc cggaggacag gagactcgaa aaacgctctt 960

cctggccagt ctctttgctc tgtgtctgcc agccccagc atctctctc tttcctgtaa 1020

gccccctctcc ctgtgctgac tgtcttcata gtactttagg tatgttgtcc ctttacctct 1080

gggaggatag cttgatgacc tgtctgctca ggccagcccc atctagagtc tcagtggccc 1140

cagtcattgt gagaaagggt ctttcaaaga tagactcaag atagtagtgt cagaggtccc 1200

aagcaaatga agggcgggga cagttgagg ggtggaatag ggacggcagc agggaaccag 1260

atagcatgct gctgagaaga aaaaaagaca ttggtttagg tcaggaagca aaaaaaggga 1320

actgagtggc tgtgaaaggg tggggtttgc tcagactgtc cttcctctct ggactgtaag 1380

aattagtctc gaggccacca tgggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc 1440

catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 1500

cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct 1560

gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg 1620

ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtc gccatgcccg aaggctacgt 1680

ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 1740

gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcactgact tcaaggagga 1800

cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 1860

ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 1920
 cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt 1980
 gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga 2040
 gaagcgcgat cacatgggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat 2100
 ggacgagctg tacaagtaa 2119

<210> 41

<211> 4809

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 0.7UCOE.AB.BTKp.coBTK

<400> 41

tttcttagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccgcgt 60
 gtggcatctg aagcaccacc agcgagcgag agctagagag aaggaaagcc accgacttca 120
 ccgcctccga gctgctccgg gtcgcgggtc tgcagcgtct ccggccctcc gcgcctacag 180
 ctcaagccac atccgaaggg ggagggagcc gggagctgcg cgcggggccg ccggggggag 240
 ggggtggcacc gcccacgccg ggcgggccacg aaggcgggg cagcgggcgc gcgcccggcg 300
 gggggagggg ccgcgcgccg cgcccgttg gaattggggc cctaggggga gggcggaggc 360
 gccgacgacc gcggcactta ccgttcgcgg cgtggcgccc ggtggtcccc aaggggaggg 420
 aagggggagg cggggcgagg acagtgaccg gagtctctc agcgggtggt tttctgcttg 480
 gcagcctcag cggctggcgc caaaaccgga ctccgcccac ttctcgcgc ctgcggtgcg 540
 aggggtgtgga atcctccaga cgctggggga gggggagttg ggagcttaaa aactagtacc 600
 cctttgggac cactttcagc agcgaactct cctgtacacc aggggtcagt tccacagacg 660
 cgggccaggg gtgggtcatt gcggcgtgaa caataattg actagaagtt gattcgggtg 720
 tttgcggccc tgggggtatgg caggggctgg gcagcagcag caatgtacct tgcttgggac 780
 ccctaaaaac cagagagaca gcatggctgg tgccatttat cagctagtgg aggaggctga 840
 cggagggtgg gagtgtcatc agcacaaggc cctggcagtc ctttctggtg attagagagg 900
 ccgaaagggt cctttccgac aagggtgag ggtgggcgga acaggaagag aaaaatgtga 960
 catgagggtga ccatccgaac aggtagcaaa tgtagaaag ggtacctct ggcaaactta 1020
 gtgaaaaagt aatattgcag ggagcagtc gataaaaaca agcccttctg tcaaatagtg 1080
 cttgaagact caatagggat acatgggtca atgaagcctt tagaaaaaga aatactaaga 1140
 ggcagattct ctgagaacat ggtaaaagct cacgctccac gttatgaagt tgacctttgt 1200
 gagctaggga aaggcctggc taggccaggg tgtaggtac ctgccttgag ctgtaccagg 1260
 ccaaatgtcg ccagggtcag agctggtta ttaaaggact gtgtggaagc tgtgccaacc 1320
 tcgtggtaac aatgggtaaa agactgggcc aggagaaagc agcctctgcc tcagcccaga 1380
 cagtgcggcc aacccttgag gttgtggcaa aggtttctcc tcttaccatt gccctccatg 1440
 tgcattgctt gcttttctct tgtcttcatt atttctcctt tcctttctc ggatccacgc 1500
 gtgaattctt tgtaaaactcc ttatggtgcg aactaatgta actttccatc cagttatggg 1560
 ggattggtgc aattttaaat tatcactatg atttgctatt tccatttgag caaatttctt 1620

atagagtttc ctttcagtgg actagaccca tatcaggaag tgacttaggt ataaaggga 1680
 gatacagctt tcgaaaacca aagtttgggc gttctccaaa gagttatcag ataccctt 1740
 ctacacccac aatgatctga ttgctgagat ctgattgcta actactgaaa ataaggaaga 1800
 actagaatatt tcagtgcacac agtgctcagc aagaagctag aaaagaggcc ttgacatatt 1860
 tgactccaaa gctacttggg tatgcatgaa gccatctggg gaggggaagg aggagggaga 1920
 actcctctga ggaccctgaa acaattgggc cacgtgtgac tttcagtttc tatggagatt 1980
 catgtgcagt ggctgagggc aatctgagag cattggaaac ccagaagctt taaggccct 2040
 gagaaaacct ccaggcttca agtgacatac ctagtctgct ttaccggttt acaggactca 2100
 agagaaaagg ggacattgag agttaatccc tgaggccaaa tcttaaattg agaaagtcaa 2160
 catccacaga aaatggggaa gggcacaagt atttctgtgg gcttatattc cgacattttt 2220
 atctgtaggg gaaaaatgct ttcttagaaa atgactcagc acggggaagt cttgtctcta 2280
 cctctgtctt gttttgtcct ttggggtccc ttactatca agttcaactg tgtgtccctg 2340
 agactcctct gccccggagg acaggagact cgaaaaacgc tcttctggc cagtctcttt 2400
 gctctgtgtc tgccagcccc cagcatctct cctcttctct gtaagccct ctccctgtgc 2460
 tgactgtctt catagtactt taggtatgtt gtccctttac ctctgggagg atagcttgat 2520
 gacctgtctg ctcaggccag ccccatctag agtctcagtg gccccagtca tgttgagaaa 2580
 ggttctttca aagatagact caagatagta gtgtcagagg tccaagcaa atgaaggcg 2640
 gggacagttg aggggggtga ataggacgg cagcaggga ccagatagca tgctgctgag 2700
 aagaaaaaaa gacattggtt taggtcagga agcaaaaaa gggaactgag tggctgtgaa 2760
 aggggtgggt ttgctcagac tgtccttct ctctggactg taagaattag tctcgagaaa 2820
 gaagccacca tggccgctgt gatcctggag agcattttcc tgaagaggtc ccagcagaaa 2880
 aagaaaacct ctccctgaa cttaagaaa agactgttcc tgctgacagt gcacaagctg 2940
 tcttactatg agtacgactt tgagcggggc cgccgaggat caaaaaagg gagcatcgat 3000
 gtggagaaga ttacatgcgt ggagaccgtg gtccctgaaa agaattcacc ccctgagagg 3060
 cagatcccaa gacggggcga ggagtcctct gagatggagc agattagtat cattgagcgc 3120
 ttcccctatc cttttcaggt ggtgtacgac gagggaccac tgtatgtgtt ctcaccaca 3180
 gaggagctga gaaagagggt gattcaccag ctgaagaacg tgattagata caatagcgat 3240
 ctgggtgcaga agtatcacc ttgtttttgg atcgacgggc agtacctgtg ctgttccag 3300
 acagctaaga acgctatggg atgccagatt ctggaaaatc ggaacggatc tctgaaacca 3360
 gggagttcac accgcaagac caaaaagccc ctgcctccaa caccgagga ggatcagatc 3420
 ctgaaaaagc ctctgccacc cgagcctgct gcagccccag tcagcacttc cgaactgaaa 3480
 aagggtggtg ctctgtatga ctacatgcc atgaatgcta acgatctgca gctgagaaag 3540
 ggcgacgagt atttcattct ggaagagtct aatctgcctt ggtggagggc cagagataag 3600
 aacggacagg aggggtacat cccatctaat tatgtgaccg aggtgagga ctctattgag 3660
 atgtacgagt ggtatagcaa gcacatgaca cgggtcccagg ctgagcagct gctgaagcag 3720
 gagggcaaa agggagggtt tatcgtgcgc gattctagta aggccggcaa atacactgtg 3780
 tcagtgttcg ctaagagcac cggagacccc caggcgctga tcagacacta tgtgtgtgtg 3840
 tccacacctc agtctcagta ctatctggct gagaagcacc tgttttagtac aatcccagag 3900
 ctgattaact accaccagca caattctgcc ggcctgatca gcaggctgaa gtatcccgtc 3960

tcccagcaga acaaaaatgc tccttctacc gctggactgg ggtacggcag ttgggagatt 4020
 gatccaaagg acctgacatt cctgaaggag ctgggaactg ggcagtttgg cgtggtgaag 4080
 tatggaaaat ggagagggca gtacgatgtg gccatcaaga tgatcaagga gggctcaatg 4140
 agcgaggacg agttcatcga ggaggctaag gtcatgatga acctgtccca cgagaaactg 4200
 gtgcagctgt atggagtgtg caccaagcag cggcccatTT ttatcattac agagtacatg 4260
 gctaattgggt gtctgctgaa ctatctgcgc gagatgagac acagattcca gacacagcag 4320
 ctgctggaaa tgtgcaagga tgtgtgtgag gctatggagt acctggagtc taagcagttt 4380
 ctgcaccggg acctggctgc tcgcaattgc ctggtgaacg atcagggcgt ggtgaagggtg 4440
 agtgacttcg gactgtcaag gtatgtgctg gatgacgagt acaccagctc cgtgggctct 4500
 aagtttcctg tgagatggtc tccacccgag gtgctgatgt atagcaagtt ctcttctaag 4560
 agcgatatct gggcctttgg cgtgctgatg tgggaaatct acagcctggg caagatgcct 4620
 tacgagcggg tcacaaattc cgagacagct gagcacatcg cccagggcct gcgcctgtac 4680
 cggccacatc tggcctctga gaaggtgtac accatcatgt acagctgttg gcacgagaag 4740
 gccgacgaga gaccacatt caagatcctg ctgtccaaca ttctagatgt gatggacgag 4800
 gagagctga 4809

<210> 42

<211> 4136

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AB.BTKp.coBTK

<400> 42

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccctgg 60
 ggtatggcag gggctgggca gcagcagcaa tgtaccttgc ttgggacccc taaaaaccag 120
 agagacagca tggctgggtgc catttatcag ctagtggagg aggctgacgg aggggtgggag 180
 tgtcatcagc acaaggccct ggcagtcctt tctggtgatt agagaggccg aaagggtcct 240
 ttccgacaag ggctgagggt gggcggaaca ggaagagaaa aatgtgacat gaggtgacca 300
 tccgaacagg tagcaaatgt tagaaagggg tacctctggc aaacttagtg gaaaagtaat 360
 attgcaggga gcagtcagat aaaaacaagc ctttctgtca aatagtgcct gaagactcaa 420
 tagggataca tgggtcaatg aagcctttag aaaaagaaat actaagaggc agattctctg 480
 agaacatggt aaaagctcac gctccacgtt atgaagttga cttttgtgag ctagggaaag 540
 gcctggctag gccagggtgt aggtacctg cttgagctg taccaggcca aatgtcgcca 600
 gggtcagagc tggcttatta aaggactgtg tggaagctgt gccaacctcg tggtaacaat 660
 gggtaaaaga ctgggccagg agaaagcagc ctctgcctca gccagacag tgcggccaac 720
 ccttgagggt gtggcaaagg tttctcctct taccattgcc ctccatgtgc atggcttget 780
 tttctcttgt cttcattatt tctcctttcc tttcctcgga tccacgcgtg aattctttgt 840
 aaactcctta tgggtcgaac taatgtaact ttccatccag ttatggggga ttggtgcaat 900
 tttaaattat cactatgatt tgctatttcc atttgagcaa atttcctata gagtttcctt 960
 tcagtggact agaccatat caggaagtga cttaggtata aagggaagat acagctttcg 1020

```

aaaaccaaag tttgggcgtt ctccaaagag ttatcagata cccctttcta caccacaat 1080
gatctgattg ctgagatctg attgctaact actgaaaata aggaagaact agaattttca 1140
gtgacacagt gctcagcaag aagctagaaa agaggccttg acatatttga ctccaaagct 1200
acttggttat gcatgaagcc atctggggag gggaaggagg agggagaact cctctgagga 1260
ccctgaaaca attgggccac gtgtgacttt cagtttctat ggagattcat gtgcagtggc 1320
tgagggcaat ctgagagcat tggaaacca gaagctttaa ggcccctgag aaaacctcca 1380
ggcttcaagt gacataccta gtctgcttta ccggtttaca ggactcaaga gaaaggtgga 1440
cattgagagt taatccctga ggccaaatct taaatggaga aagtcaacat ccacagaaaa 1500
tggggaaggg cacaagtatt tctgtgggct tatattccga cttttttatc tgtaggggaa 1560
aaatgctttc ttagaaaaatg actcagcacg gggaagtctt gtctctacct ctgtcttggt 1620
ttgtcctttg gggtccttc actatcaagt tcaactgtgt gtccctgaga ctctctgcc 1680
ccggaggaca ggagactcga aaaacgctct tcttgccag tctctttgct ctgtgtctgc 1740
cagccccag catctctcct ctttctgtga agccctctc cctgtgctga ctgtcttcat 1800
agtactttag gtatgttgtc cttttacctc tgggaggata gcttgatgac ctgtctgctc 1860
aggccagccc catctagagt ctcagtggcc ccagtcatgt tgagaaaggt tctttcaaag 1920
atagactcaa gatagtagtg tcagaggtcc caagcaatg aaggcgggg acagttgagg 1980
gggtggaata gggacggcag cagggaacca gatagcatgc tgctgagaag aaaaaagac 2040
attggtttag gtcaggaagc aaaaaaaggg aactgagtgg ctgtgaaagg gtggggtttg 2100
ctcagactgt ccttctctc tggactgtaa gaattagtct cgagaaagaa gccaccatgg 2160
ccgctgtgat cctggagagc attttctga agaggtccca gcagaaaaag aaaacctctc 2220
ccctgaactt taagaaaaga ctgttctgc tgacagtga caagctgtct tactatgagt 2280
acgactttga gcggggccgc cgaggatcaa aaaaggggag catcgatgtg gagaagatta 2340
catgcgtgga gaccgtggtc cctgaaaaga atccaccccc tgagaggcag atcccaagac 2400
ggggcgagga gtctctgag atggagcaga ttagtatcat tgagcgcttc ccctatcctt 2460
ttcaggtggt gtacgacgag ggaccactgt atgtgttctc acccacagag gagctgagaa 2520
agaggtggat tcaccagctg aagaacgtga ttagatacaa tagcgatctg gtgcagaagt 2580
atcaccttg tttttggatc gacgggcagt acctgtgctg ttcccagaca gctaagaacg 2640
ctatgggatg ccagattctg gaaaatcgga acgcatctct gaaaccaggg agttcacacc 2700
gcaagaccaa aaagccccg cctccaacac ccgaggagga tcagatcctg aaaaagcctc 2760
tgccaccgga gcctgtgca gcccagtcga gcaattccga actgaaaaag gtggtggctc 2820
tgtatgacta catgcccattg aatgctaacg atctgcagct gagaaagggc gacgagtatt 2880
tcattctgga agagtctaatt ctgccttggt ggagggccag agataagaac ggacaggagg 2940
ggtacatccc atctaattat gtgaccgagg ctgaggactc tattgagatg tacgagtgg 3000
atagcaagca catgacacgg tcccaggtg agcagctgct gaagcaggag ggcaaagagg 3060
gagggtttat cgtgcgcgat tctagtaagg ccggcaaata cactgtgtca gtgttcgcta 3120
agagcaccgg agacccccag ggcgtgatca gacactatgt ggtgtgttcc acacctcagt 3180
ctcagtacta tctggctgag aagcacctgt ttagtacaat cccagagctg attaactacc 3240
accagcaca ttttgccggc ctgatcagca ggctgaagta tcccgtctcc cagcagaaca 3300
aaaatgctcc ttctaccgct ggactggggg acggcagttg ggagattgat ccaaaggacc 3360

```

tgacattcct gaaggagctg ggaactgggc agtttggcgt ggtgaagtat ggaaaatgga 3420
 gagggcagta cgatgtggcc atcaagatga tcaaggaggg ctcaatgagc gaggacgagt 3480
 tcatcgagga ggctaaggct atgatgaacc tgtcccacga gaaactggtg cagctgtatg 3540
 gagtgtgcac caagcagcgg cccattttta tcattacaga gtacatggct aatgggtgtc 3600
 tgctgaacta tctgcgcgag atgagacaca gattccagac acagcagctg ctggaaatgt 3660
 gcaaggatgt gtgtgaggct atggagtacc tggagtctaa gcagtttctg caccgggacc 3720
 tggctgctcg caattgcctg gtgaacgatc agggcgtggt gaaggtgagt gacttcggac 3780
 tgtcaaggta tgtgctggat gacgagtaca ccagctccgt gggctctaag tttcctgtga 3840
 gatggtctcc acccgagggt ctgatgtata gcaagttctc ctctaagagc gatattctggg 3900
 cctttggcgt gctgatgtgg gaaatctaca gcctgggcaa gatgccttac gagcggttca 3960
 caaattccga gacagctgag cacatcgccc agggcctgcg cctgtaccgg ccacatctgg 4020
 cctctgagaa ggtgtacacc atcatgtaca gctgttggca cgagaaggcc gacgagagac 4080
 ccacattcaa gatcctgctg tccaacattc tagatgtgat ggacgaggag agctga 4136

<210> 43

<211> 5782

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BTKe.AB.BTKp.coBTK

<400> 43

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccctcc 60
 atcacctact agatatatca gtgcagtga aacttcgcta aactaacgct atacctatat 120
 catgaagtgt gtggactaga gacaagtga tatccttac gcaattaact gggaaacgtc 180
 aaatagtaac taccactcac ctttttccgg aaaatcggct tagtttgccc accatagcca 240
 ctctgcttcc tgtcataacg ccgctttcct gggaaaacga attggtatgt gttataaaat 300
 actgaagatc agcaagtaag tcttacaggt tttatcttaa tttcgcagca gaaatattaa 360
 cgctcaagcc aggcgtggag ggagagagac ccggaactgt atgttattct acaacacaaa 420
 tgtcacatta acaccaaatt atgcggaatc catcttacc tgggcgtaca gagaatcctt 480
 gcccttcttg tactgtgtca ctttatgggg ttggtgcttg ccacacttct tacagaaagt 540
 ccggcgggtt ttagggacgt taacctagta aagaaacagt tcagaacgtg caatgttatt 600
 tgaccacaat ggcacaacgc cctaccttac ccagctaaag ctgaggcact ccaggaggac 660
 tcctcattac ttgctacctc tgactacagg gtgggccagc cccatgtgct tcaagcagag 720
 cttcctccct ccgtcgagcc ccaaagaggg aagagacctc attaactcca cccccggcta 780
 actctacctc tttgaaccca tcaattcaat tcttgcccc gtagcccggt ccctttaggg 840
 ttgatcccg caagattggg ttgctctgat atatcgagtc cacacaggag cctggacce 900
 tcccggcata gcacgggcga cgaagggggg gaaagattaa gctggatgtt actcgcccc 960
 caccagcaag tcctaccatg cttgcgtgag cgctatcggc gcggaagaa agaaaccgcg 1020
 aggcaaacgg aagtatatag gaggttcccc atcgcacttc ctcatgggag tcggtaggag 1080
 caatcataga gtgtaaggct cagcgcagcg ccctcgggcg gctgagagga ctcagttcgg 1140


```

agccgcgggc gggagcttaa ggaaggactc cgcctaaagg gtggtccact caccgact 1200
tcctcccccc cgcagcttt caacgtttcg tcactttatc tcttttggtg gactctgcta 1260
cgtagtggcg ttcagtgaag ggagcagtgt ttttccaga tcctctggcc tccccgtccc 1320
cgagggaagc caggactagg gtcgaatgaa ggggtcctcc acctccacgt tccattcctg 1380
ttccacctca aggtcactgg gaacaccttt cgcagcaaac tgctaattca atgaagacct 1440
ggaggggagcc aattgttcca gttcatctat cacatggcca gttggtccat tcaacaaatg 1500
gttattggat gcccattatg tggcaggcac tgttccgggg gagaggtaca gtaatctaata 1560
aggcttataa atgtgcaatt atgaactaag tactttgaag aaaaggaaca atgattggca 1620
ttaaagcagc acccttctgt tgaggggagta agtcagcagc tctaggttct gaaaagtgc 1680
aatgaaattg tttggctcct gtctggggta tggcaggggc tgggcagcag cagcaatgta 1740
ccttgcttgg gacccctaaa aaccagagag acagcatggc tgggtgccatt tatcagctag 1800
tgaggaggc tgacggaggg tgggagtgtc atcagcaca ggccctggca gtcccttctg 1860
gtgattagag aggccgaaag ggtcctttcc gacaagggt gaggggtggc ggaacaggaa 1920
gagaaaaatg tgacatgagg tgaccatccg aacaggtagc aaatgttaga aaggggtacc 1980
tctggcaaac ttagtgaaa agtaatatg caggagcag tcagataaaa acaagccctt 2040
ctgtcaaata gtgcttgaag actcaatagg gatacatgg tcaatgaagc ctttagaaaa 2100
agaaatacta agaggcagat tctctgagaa catggtaaaa gtcacgctc cacgttatga 2160
agttgacctt tgtgagctag ggaaaggcct ggctaggcca ggtgttaggc tacctgcctt 2220
gagctgtacc aggccaaatg tcgccagggt cagagctggc ttattaaagg actgtgtgga 2280
agctgtgcca acctcgtggt aacaatgggt aaaagactgg gccaggagaa agcagcctct 2340
gcctcagccc agacagtgcg gccaacctt gaggttgtgg caaaggtttc tcctcttacc 2400
attgccctcc atgtgcatgg cttgcttttc tcttgtcttc attatttctc ctttcctttc 2460
ctcggatcca cgcgtgaatt ctttgtaaac tccttatggt gcgaactaat gtaactttcc 2520
atccagttat gggggatttg tgcaatttta aattatcact atgatttgct atttccattt 2580
gagcaaatth cctatagagt ttcctttcag tggactagac ccatatcagg aagtgactta 2640
ggtataaagg gaagatacag ctttcgaaaa ccaaagtttg ggcgttctcc aaagagttat 2700
cagatacccc ctctacacc cacaatgatc tgattgctga gatctgattg ctaactactg 2760
aaaataagga agaactagaa ttttcagtga cacagtgtc agcaagaagc tagaaaagag 2820
gccttgacat atttgactcc aaagctactt ggttatgcat gaagccatct ggggagggga 2880
aggaggagg agaactcctc tgaggaccct gaaacaattg ggccacgtgt gactttcagt 2940
ttctatggag attcatgtgc agtggctgag ggcaatctga gagcattgga aaccagaaag 3000
ctttaaggcc cctgagaaaa cctccaggct tcaagtgaac tacctagtct gctttaccgg 3060
tttacaggac tcaagagaaa ggtggacatt gagagttaat ccctgaggcc aaatcttaaa 3120
tgagaaaagt caacatccac agaaaatggg gaagggcaca agtatttctg tgggcttata 3180
ttccgacatt tttatctgta ggggaaaaat gctttcttag aaaatgactc agcacgggga 3240
agtcttgtct ctacctctgt cttgttttgt ctttgggt cccttacta tcaagttcaa 3300
ctgtgtgtcc ctgagactcc tctgccccgg aggacaggag actcgaaaaa cgctcttctc 3360
ggccagtctc tttgtctgt gtctgccagc cccagcatc tctcctcttt cctgtaagcc 3420
cctctccctg tgctgactgt cttcatagta ctttaggtat gttgtccctt tacctctggg 3480

```

```

aggatagctt gatgacctgt ctgctcaggc cagccccatc tagagtctca gtggccccag 3540
tcatgttgag aaaggttctt tcaaagatag actcaagata gtagtgtcag aggtcccaag 3600
caaatgaagg gcggggacag ttgaggggggt ggaataggga cggcagcagg gaaccagata 3660
gcatgctgct gagaagaaaa aaagacattg gtttaggtca ggaagcaaaa aaagggaact 3720
gagtggctgt gaaaggggtg ggtttgctca gactgtcctt cctctctgga ctgtaagaat 3780
tagtctcgag aaagaagcca ccatggccgc tgtgatcctg gagagcattt tcctgaagag 3840
gtcccagcag aaaaagaaaa cctctcccct gaactttaag aaaagactgt tcctgctgac 3900
agtgcacaag ctgtcttact atgagtacga ctttgagcgg ggccgccgag gatcaaaaaa 3960
ggggagcatc gatgtggaga agattacatg cgtggagacc gtggtccctg aaaagaatcc 4020
accccctgag aggcagatcc caagacgggg cgaggagtcc tctgagatgg agcagattag 4080
tatcattgag cgcttcccct atccttttca ggtggtgtac gacgagggac cactgtatgt 4140
gttctcacc cagaggagc tgagaaagag gtggattcac cagctgaaga acgtgattag 4200
atacaatagc gatctggtgc agaagtatca cccttgtttt tggatcgacg ggcagtacct 4260
gtgctgttcc cagacagcta agaacgctat gggatgccag attctggaaa atcggaacgg 4320
atctctgaaa ccagggagtt cacaccgcaa gacaaaaag cccctgcctc caacaccgca 4380
ggaggatcag atcctgaaaa agcctctgcc acccgagcct gctgcagccc cagtcagcac 4440
ttccgaactg aaaaaggtgg tggctctgta tgactacatg cccatgaatg ctaacgatct 4500
gcagctgaga aaggcgacg agtatttcat tctggaagag tctaactctgc cttggtggag 4560
ggccagagat aagaacggac aggaggggta catcccatct aattatgtga ccgaggctga 4620
ggactctatt gagatgtacg agtggtatag caagcacatg acacggtccc aggctgagca 4680
gctgctgaag caggagggca aagagggagg gtttatcgtg cgcgattcta gtaaggccgg 4740
caaatacact gtgtcagtgt tcgctaagag caccggagac ccccagggcg tgatcagaca 4800
ctatgtggtg tgttccacac ctcatgtctca gtactatctg gctgagaagc acctgtttag 4860
tacaatccca gagctgatta actaccacca gcacaattct gccggcctga tcagcaggct 4920
gaagtatccc gtctcccagc agaacaaaaa tgctccttct accgctggac tggggtacgg 4980
cagttgggag attgatcaa aggacctgac attcctgaag gagctgggaa ctgggcagtt 5040
tggcgtggtg aagtatggaa aatggagagg gcagtacgat gtggccatca agatgatcaa 5100
ggagggtc atgagcgagg acgagttcat cgaggaggct aaggtcatga tgaacctgtc 5160
ccacgagaaa ctggtgcagc tgtatggagt gtgcaccaag cagcggccca tttttatcat 5220
tacagagtac atggctaagt ggtgtctgct gaactatctg cgcgagatga gacacagatt 5280
ccagacacag cagctgctgg aaatgtgcaa ggatgtgtgt gaggctatgg agtacctgga 5340
gtctaagcag tttctgcacc gggacctggc tgctcgcaat tgcttgggtga acgatcaggg 5400
cgtggtgaag gtgagtgact tcggactgtc aaggtatgtg ctggatgacg agtacaccag 5460
ctccgtgggc tctaagtttc ctgtgagatg gtctccacc gaggtgctga tgtatagcaa 5520
gttctcctct aagagcgata tctgggcctt tggcgtgctg atgtgggaaa tctacagcct 5580
gggcaagatg ccttacgagc ggttcacaaa ttccgagaca gctgagcaca tcgccaggg 5640
cctgcgcctg taccggccac atctggcctc tgagaaggtg tacaccatca tgtacagctg 5700
ttggcacgag aaggccgac agagaccac attcaagatc ctgctgtcca acattctaga 5760
tgtgatggac gaggagagct ga 5782

```

<210> 44

<211> 4478

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BTKe.BTKp.coBTK

<400> 44

```

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccctcc 60
atcacctact agatatatca gtgcagtga aacttcgcta aactaacgct atacctatat 120
catgaagtgt gtggactaga gacaagtgc tatecttac gcaattaact gggaaacgtc 180
aaatagtaac taccactcac ctttttccgg aaaatcggt tagtttgccc accatagcca 240
ctctgcttcc tgtcataacg ccgctttcct gggaaaacga attggtatth gttataaaat 300
actgaagatc agcaagtaag tcttacaggt tttatcttaa tttcgcagca gaaatattaa 360
cgctcaagcc aggcgtggag ggagagagac ccggaactcg atgttattct acaacacaaa 420
tgtcacatta acaccaaatt atgcggaatc catcttacc tgggcgtaca gagaatcctt 480
gcccttcttg tactgtgtca ctttatgggg ttggtgcttg ccacacttct tacagaaagt 540
ccggcgggtt ttagggacgt taacctagta aagaaacagt tcagaacgtg caatgttatt 600
tgaccacaat ggcacaacgc cctaccttac ccagctaaag ctgaggcact ccaggaggac 660
tcctcattac ttgctacctc tgactacagg gtgggccagc cccatgtgct tcaagcagag 720
cttctccct ccgtcgagcc ccaaagaggg aagagacctc attaaactca cccccggcta 780
actctacctc ttgtaacca tcacttcaat tcctggcccc gtagccccgt ccctttaggg 840
ttgatccccg caagattggg ttgctctgat atatcgagtc cacacaggag cctggacca 900
tcccggcata gcacgggcga cgaagggggg gaaagattaa gctggatgtt actcgcccc 960
caccagcaag tcctaccatg cttgcgtgag cgctatcggc gcggaagaa agaaaccgcg 1020
aggcaaaccg aagtatatag gaggttcccg atcgacttc ctcattggag tcggtaggag 1080
caatcataga gtgtaaggct cagcgcagcg ccctcgggcg gctgagagga ctcagttcgg 1140
agccgcgggc gggagcttaa ggaaggactc cgcctaaagg gtggtccact caccgact 1200
tcctcccgcc ccgcagcttt caacgtttcg tcactttatc tcttttggtg gactctgcta 1260
cgtagtggcg ttcagtgaag ggagcagtg ttttcccaga tcctctggcc tcccgtccc 1320
cgagggaagc caggactagg gtcgaatgaa ggggtcctcc acctccagct tccattcctg 1380
ttccacctca aggtcactgg gaacaccttt cgcagcaaac tgctaattca atgaagacct 1440
ggagggagcc aattgttcca gttcatctat cacatggcca gttggtccat tcaacaaatg 1500
gttattggat gccattatg tggcaggcac tgttccgggg gagaggtaca gtaatcta 1560
aggcttataa atgtgcaatt atgaactaag tactttgaag aaaaggaaca atgattggca 1620
ttaaagcagc acccttctgt tgaggagta agtcagcagc tctaggttct gaaaagtga 1680
aatgaaattg tttggctcct gtggccctg agaaaacctc caggcttcaa gtgacatacc 1740
tagtctgctt taccggttta caggactcaa gagaaagtg gacattgaga gttaatccct 1800
gaggccaaat cttaaatgga gaaagtcaac atccacagaa aatggggaag ggcacaagta 1860
tttctgtggg cttatatcc gacattttta tctgtagggg aaaaatgctt tcttagaaaa 1920

```

tgactcagca	cggggaagtc	ttgtctctac	ctctgtcttg	ttttgtcctt	tggggtcctt	1980
tcactatcaa	gttcaactgt	gtgtccctga	gactcctctg	ccccggagga	caggagactc	2040
gaaaaacgct	cttcctggcc	agtctctttg	ctctgtgtct	gccagccccc	agcatctctc	2100
ctcttttcctg	taagccccctc	tccctgtgct	gactgtcttc	atagtacttt	aggtatgttg	2160
tcccttttacc	tctgggagga	tagcttgatg	acctgtctgc	tcaggccagc	cccatctaga	2220
gtctcagtgg	ccccagtcac	gttgagaaaag	gttctttcaa	agatagactc	aagatagtag	2280
tgtcagaggt	cccaagcaaa	tgaagggcgg	ggacagttga	gggggtggaa	tagggacggc	2340
agcagggaac	cagatagcat	gctgctgaga	agaaaaaaag	acattggttt	aggtcaggaa	2400
gcaaaaaaaag	ggaactgagt	ggctgtgaaa	gggtgggggtt	tgctcagact	gtccttcctc	2460
tctggactgt	aagaattagt	ctcgagaaaag	aagccacat	ggccgctgtg	atcctggaga	2520
gcatttttctt	gaagaggtcc	cagcagaaaa	agaaaacctc	tccctgaac	tttaagaaaa	2580
gactgttcct	gctgacagtg	cacaagctgt	cttactatga	gtacgacttt	gagcggggcc	2640
gccgaggatc	aaaaaagggg	agcatcgatg	tggagaagat	tacatgcgtg	gagaccgtgg	2700
tccctgaaaa	gaatccaccc	cctgagaggc	agatcccaag	acggggcgag	gagtcctctg	2760
agatggagca	gattagtatc	attgagcgct	tcccttatcc	ttttcaggtg	gtgtacgacg	2820
agggaccact	gtatgtgttc	tcaccacacg	aggagctgag	aaagaggtgg	attcaccagc	2880
tgaagaacgt	gattagatac	aatagcgatc	tggtgcagaa	gtatcacctt	tgttttttgga	2940
tcgacgggca	gtacctgtgc	tgttcccaga	cagctaagaa	cgctatggga	tgccagattc	3000
tggaaaatcg	gaacggatct	ctgaaaccag	ggagttcaca	ccgcaagacc	aaaaagcccc	3060
tgctccaac	acccgaggag	gatcagatcc	tgaaaaagcc	tctgccaccc	gagcctgctg	3120
cagccccagt	cagcacttcc	gaactgaaaa	aggtggtggc	tctgtatgac	tacatgcccc	3180
tgaatgctaa	cgatctgcag	ctgagaaaag	gcgacgagta	tttcattctg	gaagagtcta	3240
atctgccttg	gtggagggcc	agagataaga	acggacagga	gggttacatc	ccatctaatt	3300
atgtgaccga	ggctgaggac	tctattgaga	tgtacgagtg	gtatagcaag	cacatgacac	3360
gggtcccaggc	tgagcagctg	ctgaagcagg	agggcaaaga	gggagggttt	atcgtgcgcg	3420
attctagtaa	ggccggcaaa	tacactgtgt	cagtgttcgc	taagagcacc	ggagaccccc	3480
agggcgtgat	cagacactat	gtggtgtgtt	ccacacctca	gtctcagtac	tatctggctg	3540
agaagcacct	gtttagtaca	atcccagagc	tgattaacta	ccaccagcac	aattctgccg	3600
gcctgatcag	caggctgaag	tatcccgtct	cccagcagaa	caaaaatgct	ccttctaccg	3660
ctggactggg	gtacggcagt	tgggagattg	atccaaagga	cctgacattc	ctgaaggagc	3720
tgggaactgg	gcagtttggc	gtggtgaagt	atggaaaatg	gagagggcag	tacgatgtgg	3780
ccatcaagat	gatcaaggag	ggctcaatga	gcgaggacga	gttcacgcag	gaggctaagg	3840
tcatgatgaa	cctgtcccac	gagaaaactgg	tgcagctgta	tggagtgtgc	accaagcagc	3900
ggccccat	tattattaca	gagtacatgg	ctaattgggtg	tctgctgaac	tatctgcgcg	3960
agatgagaca	cagattccag	acacagcagc	tgctggaaat	gtgcaaggat	gtgtgtgagg	4020
ctatggagta	cctggagtct	aagcagtttc	tgcaccggga	cctggctgct	cgcaattgcc	4080
tggatgaacga	tcagggcgtg	gtgaaggatga	gtgacttcgg	actgtcaagg	tatgtgctgg	4140
atgacgagta	caccagctcc	gtgggctcta	agtttctctg	gagatggtct	ccacccgagg	4200
tgctgatgta	tagcaagttc	tcctctaaga	gcgatatctg	ggcctttggc	gtgctgatgt	4260

gggaaatcta cagcctgggc aagatgcctt acgagcgggt cacaattcc gagacagctg 4320
 agcacatcgc ccagggcctg cgcctgtacc ggccacatct ggcctctgag aaggtgtaca 4380
 ccatcatgta cagctgttgg cacgagaagg ccgacgagag acccacattc aagatcctgc 4440
 tgtccaacat tctagatgtg atggacgagg agagctga 4478

<210> 45

<211> 3589

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BTKe Myc.BTKp.coBTK

<400> 45

tttcctagga gaatccctgg gggaatcatt gcagttggag cataatgtag ggggccctgt 60
 tactcgcccc ccaccagcaa gtcctaccat gcttgctga gcgctatcgg cgcggaaaga 120
 aagaaaccgc gaggcaaacg gaagtatata ggaggttccc gatcgactt cctcatggga 180
 gtcggtagga gcaatcatag agtgtaaggc tcagcgcagc gccctcgggc ggctgagagg 240
 actcagttcg gagccgcggg cgggagctta aggaaggact ccgcctaaag ggtggtccac 300
 tcaccccgac ttctctccgc cccgcagctt tcaacgtttc gtcactttat ctcttttggg 360
 ggactctgct acgtagtggc gttcagtga gggagcagtg tttttcccag atcctctggc 420
 ctccccgtcc ccgagggaag ccaggactag ggtcgaatga aggggtcctc cacctccacg 480
 ttccattcct gttccacctc aaggtcactg ggaacacctt tcgcagcaaa ctgctaattc 540
 aatgaagacc tggaggaggc caattgttcc agttcatcta tcacatggcc agttggtcca 600
 ttcaacaaat gggtattgga tgcccattat gtggcaggca ctgttccggg ggagaggtac 660
 agtaatctaa taggcttata aatgtgcaat tatgaactaa gtactttgaa gaaaaggaac 720
 aatgattggc attaaagcag cacccttctg ttgaggaggat aagtcagcag ctctaggttc 780
 tgaaaagtga caatgaaatt gtttggctcc tgtggccctt gagaaaacct ccaggcttca 840
 agtgacatac ctagtctgct ttaccggttt acaggactca agagaaagggt ggacattgag 900
 agttaatccc tgaggccaaa tcttaaatgg agaaagtcaa catccacaga aaatggggaa 960
 gggcacaagt atttctgtgg gcttatattc cgacattttt atctgtaggg gaaaaatgct 1020
 ttcttagaaa atgactcagc acggggaagt cttgtcteta cctctgtctt gttttgtcct 1080
 ttgggggtccc ttactatca agttcaactg tgtgtccctg agactcctct gccccggagg 1140
 acaggagact cgaaaaacgc tcttcttggc cagtctcttt gctctgtgtc tgccagcccc 1200
 cagcatctct cctctttcct gtaagccctt ctccctgtgc tgactgtctt catagtactt 1260
 taggtatgtt gtccctttac ctctgggagg atagcttgat gacctgtctg ctcaggccag 1320
 ccccatctag agtctcagtg gccccagtca tgttgagaaa ggttctttca aagatagact 1380
 caagatagta gtgtcagagg tcccaagcaa atgaaggcg gggacagttg agggggtgga 1440
 atagggacgg cagcagggaa ccagatagca tgctgctgag aagaaaaaaa gacattggtt 1500
 taggtcagga agcaaaaaaa gggaactgag tggctgtgaa aggggtgggt ttgctcagac 1560
 tgtcttctct ctctggactg taagaattag tctcgagaaa gaagccacca tggccgctgt 1620
 gatcctggag agcattttcc tgaagaggtc ccagcagaaa aagaaaacct ctcccctgaa 1680

```

ctttaagaaa agactgttcc tgctgacagt gcacaagctg tcttactatg agtacgactt 1740
tgagcggggc cgccgaggat caaaaaaggg gagcatcgat gtggagaaga ttacatgcgt 1800
ggagaccgtg gtccctgaaa agaatccacc ccctgagagg cagatcccaa gacggggcga 1860
ggagtcctct gagatggagc agattagtat cattgagcgc ttcccctatc cttttcaggt 1920
ggtgtacgac gagggaccac tgtatgtgtt ctcaccaca gaggagctga gaaagaggtg 1980
gattcaccag ctgaagaacg tgattagata caatagcgat ctggtgcaga agtatcacc 2040
ttgttttttg atcgacgggc agtacctgtg ctgttcccag acagctaaga acgctatggg 2100
atgccagatt ctggaaaatc ggaacggatc tctgaaacca gggagttcac accgcaagac 2160
caaaaagccc ctgcctccaa cccccgagga ggatcagatc ctgaaaaagc ctctgccacc 2220
cgagcctgct gcagccccag tcagcacttc cgaactgaaa aaggtggtgg ctctgtatga 2280
ctacatgccc atgaatgcta acgatctgca gctgagaaag ggcgacgagt atttcattct 2340
ggaagagtct aatctgcctt ggtggagggc cagagataag aacggacagg aggggtacat 2400
cccataat tatgtgaccg aggtgagga ctctattgag atgtacgagt ggtatagcaa 2460
gcacatgaca cggctcccagg ctgagcagct gctgaagcag gagggcaaag agggagggtt 2520
tatcgtgcgc gattctagta aggccggcaa atacactgtg tcagtgttcg ctaagagcac 2580
cggagacccc cagggcgtga tcagacacta tgtggtgtgt tccacacctc agtctcagta 2640
ctatctggct gagaagcacc tgttttagtac aatcccagag ctgattaact accaccagca 2700
caattctgcc ggctgatca gcaggctgaa gtatcccgct tcccagcaga acaaaaatgc 2760
tccttctacc gctggactgg ggtacggcag ttgggagatt gatccaaagg acctgacatt 2820
cctgaaggag ctgggaactg ggcagtttg cgtggtgaag tatggaaaat ggagagggca 2880
gtacgatgtg gccatcaaga tgatcaagga gggctcaatg agcgaggacg agttcatcga 2940
ggaggctaag gtcatgatga acctgtccca cgagaaactg gtgcagctgt atggagtgtg 3000
caccaagcag cggccccatt ttatcattac agagtacatg gctaattgggt gtctgctgaa 3060
ctatctgcgc gagatgagac acagattcca gacacagcag ctgctggaaa tgtgcaagga 3120
tgtgtgtgag gctatggagt acctggagtc taagcagttt ctgcaccggg acctggctgc 3180
tcgcaattgc ctggtgaacg atcagggcgt ggtgaagggt agtgacttcg gactgtcaag 3240
gtatgtgctg gatgacgagt acaccagctc cgtgggctct aagtttcctg tgagatggct 3300
tccacccgag gtgctgatgt atagcaagtt ctctctaag agcgatatct gggcctttgg 3360
cgtgctgatg tgggaaatct acagcctggg caagatgcct tacgagcggg tcacaaattc 3420
cgagacagct gagcacatcg ccagggcct gcgcctgtac cggccacatc tggcctctga 3480
gaaggtgtac accatcatgt acagctgttg gcacgagaag gccgacgaga gaccacatt 3540
caagatcctg ctgtccaaca ttctagatgt gatggacgag gagagctga 3589

```

<210> 46

<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> *

<400> 46

aggagggcca tcatggccaa gttgaccagt gctgtcccag tgctcacagc cagggatgtg 60
gctggagctg ttgagttctg gactgacagg ttggggttct ccagagattt tgtggaggat 120
gactttgcag gtgtggtcag agatgatgtc accctgttca tctcagcagt ccaggaccag 180
gtggtgcctg acaacaccct ggcttgggtg tgggtgagag gactggatga gctgtatgct 240
gagtggagtg aggtggtctc caccaacttc agggatgcca gtggccctgc catgacagag 300
attggagagc agccctgggg gagagagttt gccttgagag acccagcagg caactgtgtg 360
cactttgtgg cagaggagca ggactga 387

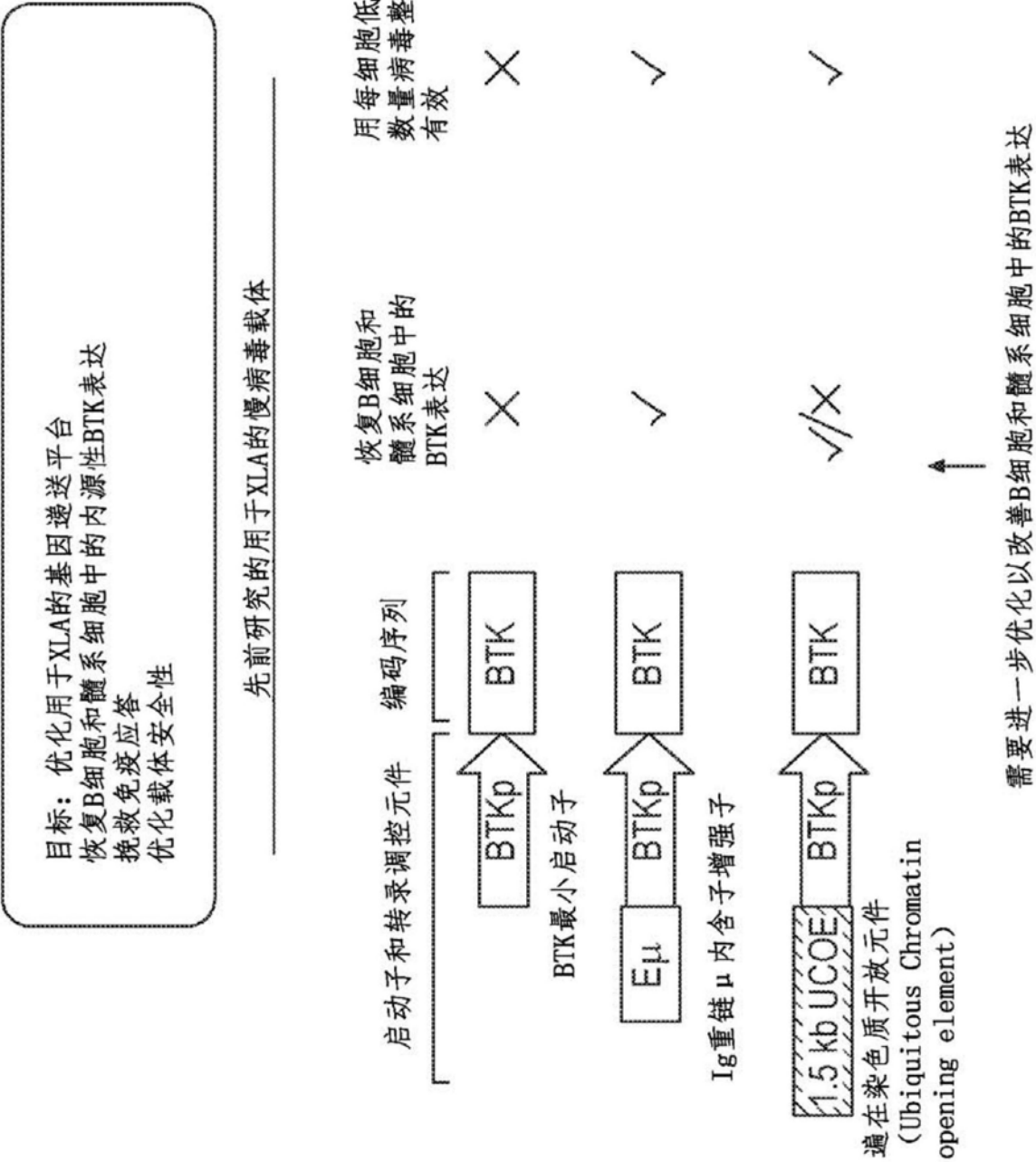
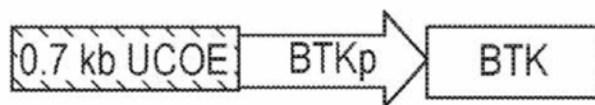


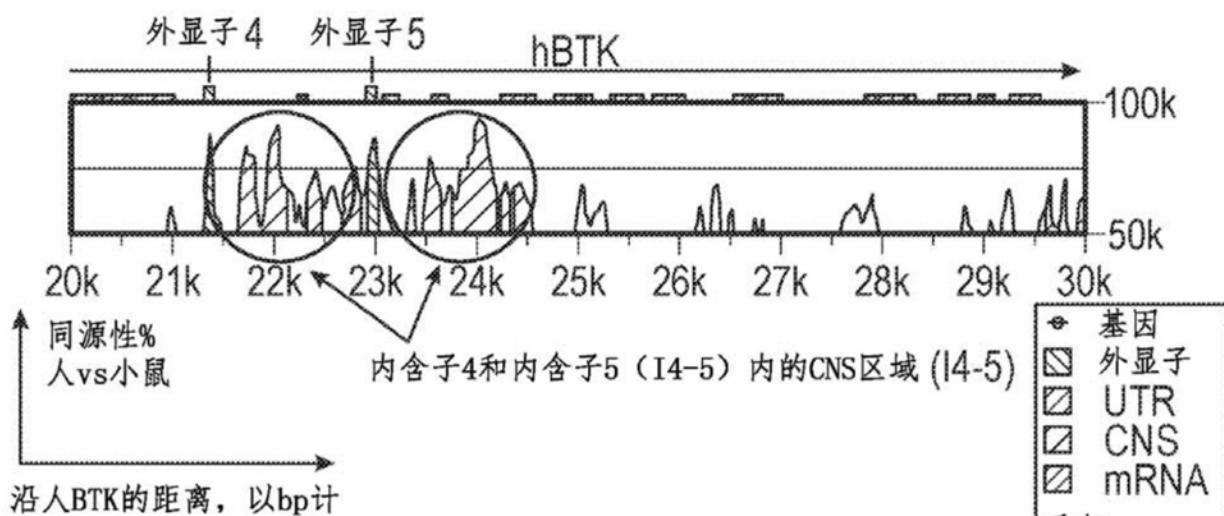
图1

优化用于XLA基因疗法的慢病毒载体

- 1) 通过将UCOE元件的大小降低至0.7kb来改善病毒滴度



- 2) 鉴别内源性人BTK内在B细胞和髓系细胞中促进表达的转录元件。
对包括在BTK启动子上游的保守非编码序列（CNS）的表达进行测试。



在临床前模型中测试的慢病毒载体：

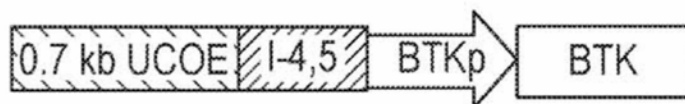
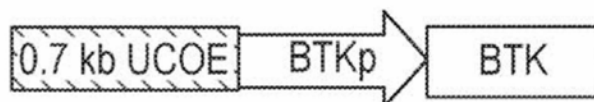
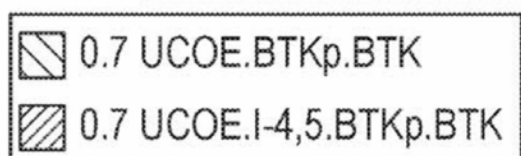


图2

临床前模型

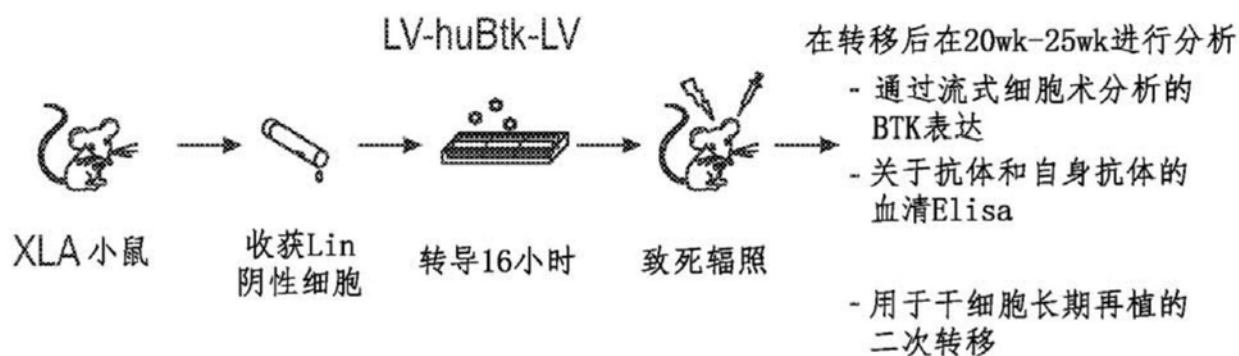


图3

两种载体均将BTK表达恢复至受影响的造血细胞

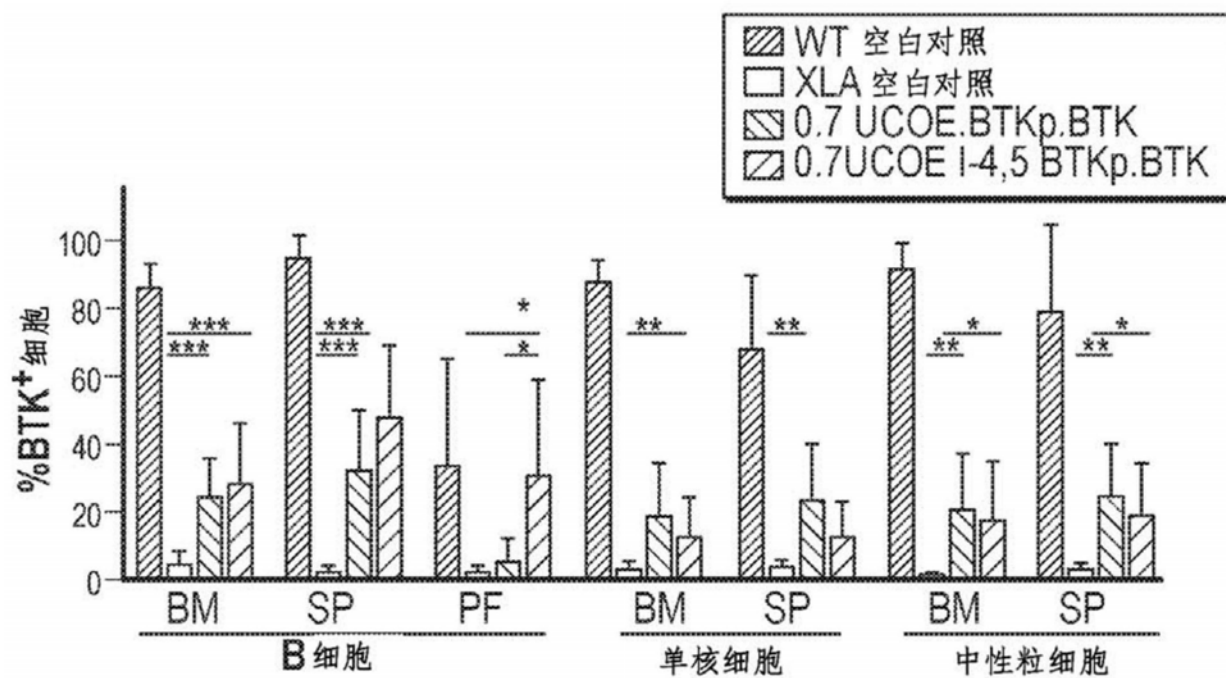


图4

两种载体均挽救了B细胞发育和功能

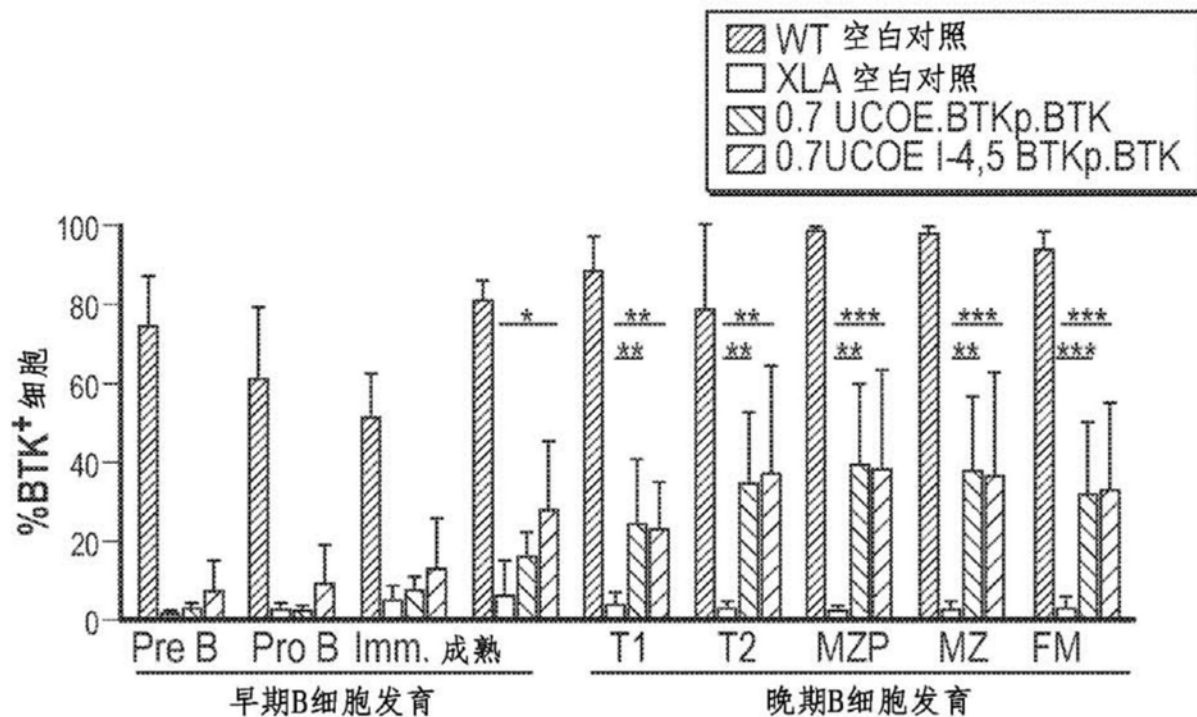


图5

两种载体均挽救了B细胞发育和功能

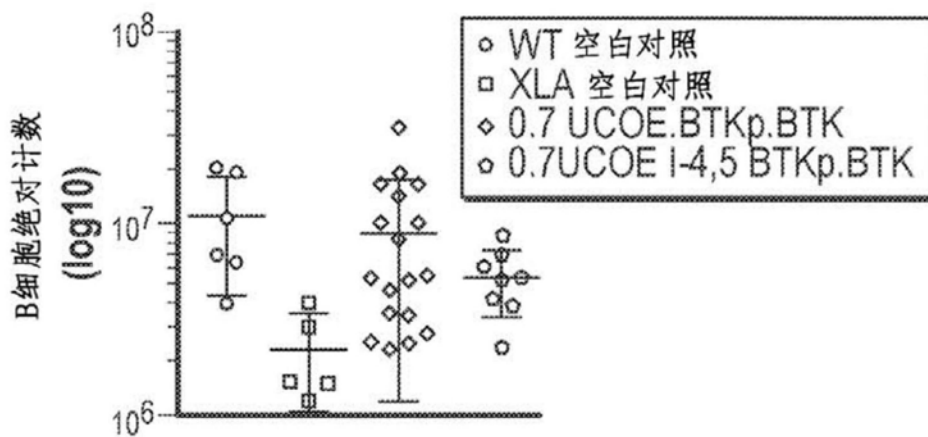


图6A

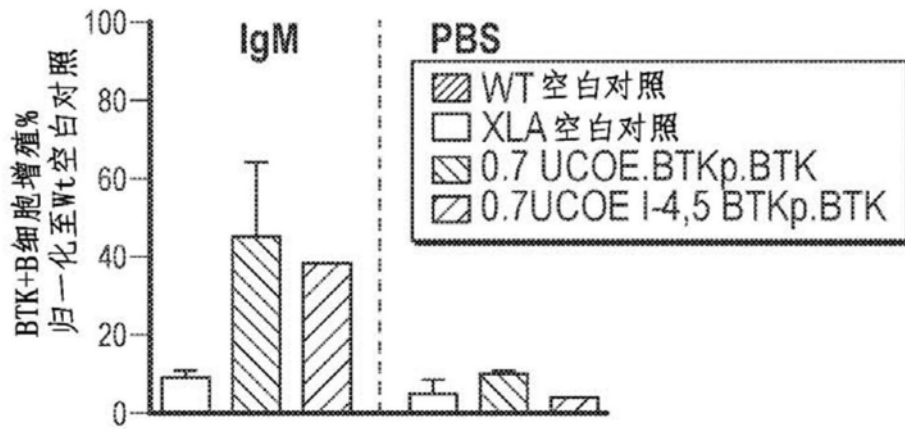


图6B

两种载体均恢复免疫应答而无显著抗-dsDNA自身抗体

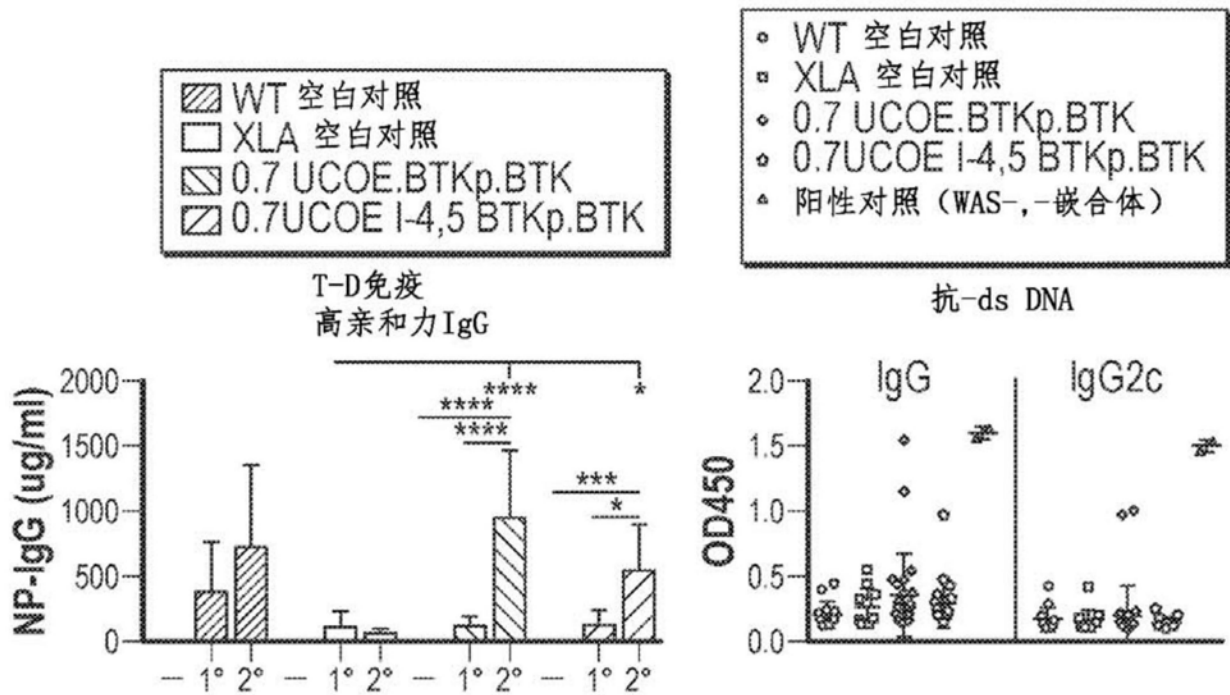


图7A

图7B

0.7UCOE. I-45. BTKp. BTK与0.7 UCOE. BTKp. BTK同样有效地表达BTK，
但具有较少的病毒整合

◊ 0.7 UCOE.BTKp.BTK
○ 0.7UCOE I-4,5 BTKp.BTK

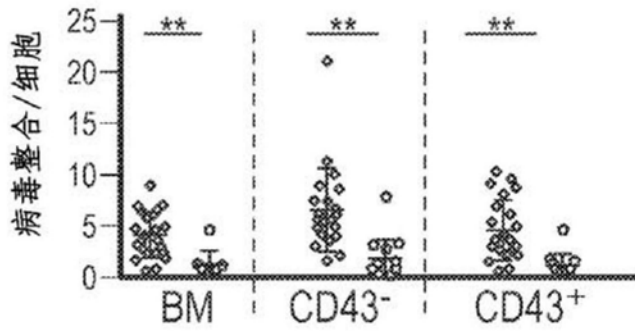


图8A

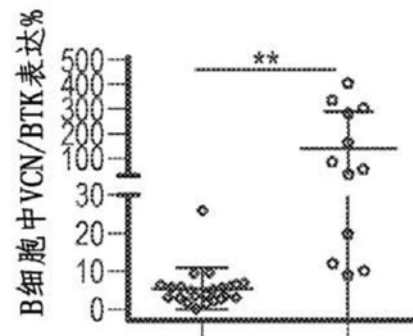


图8B

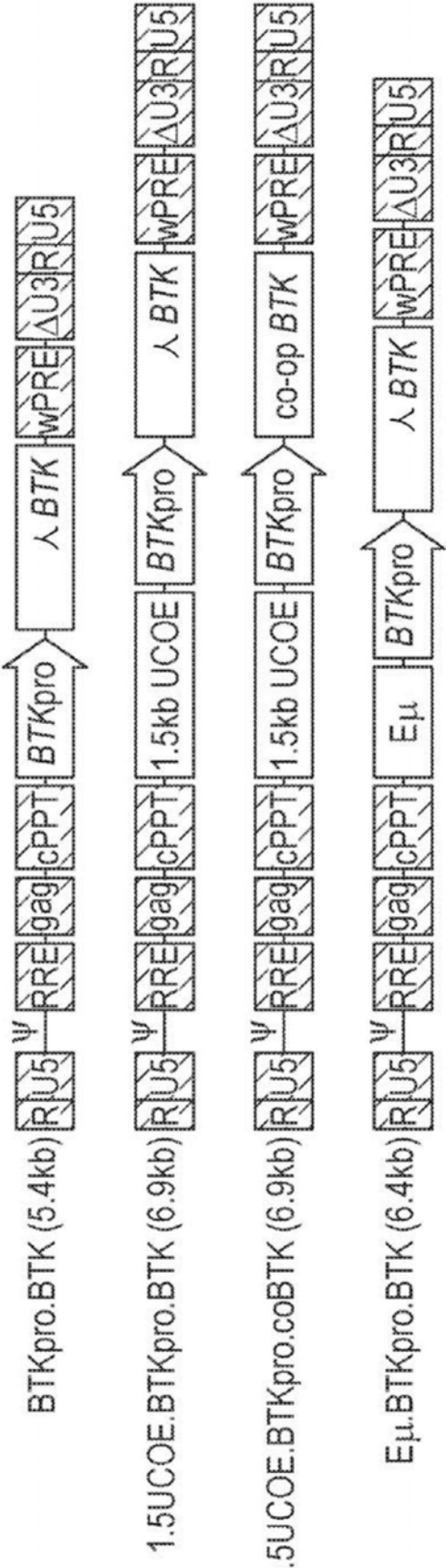


图9A

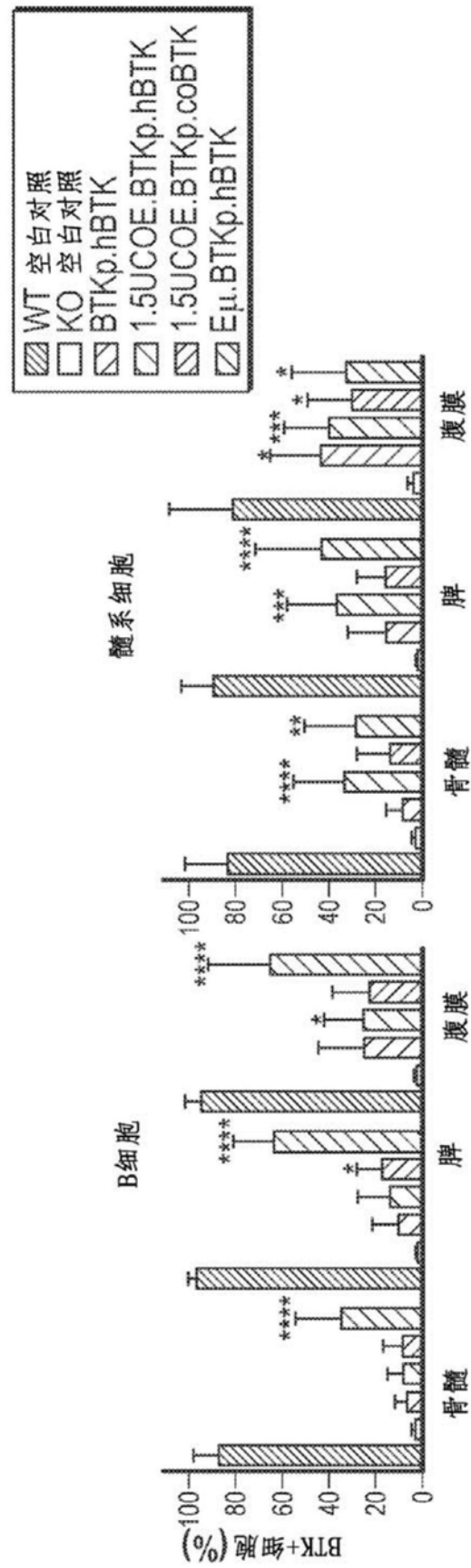


图9B

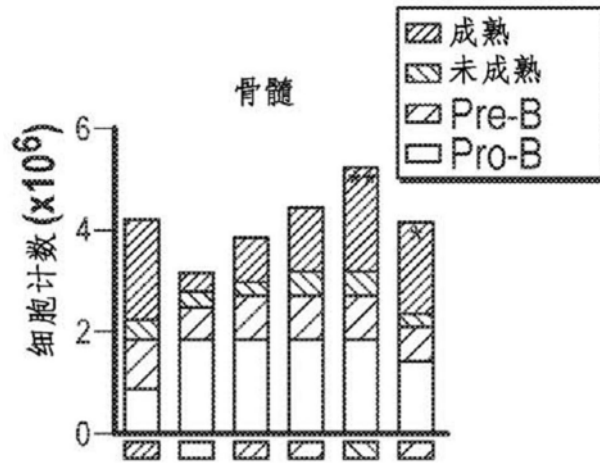


图9C

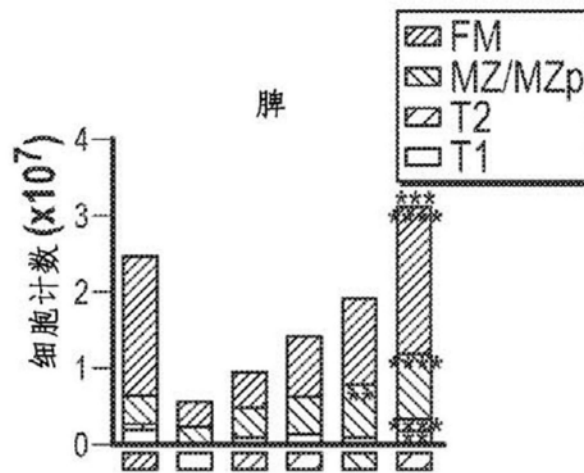


图9D

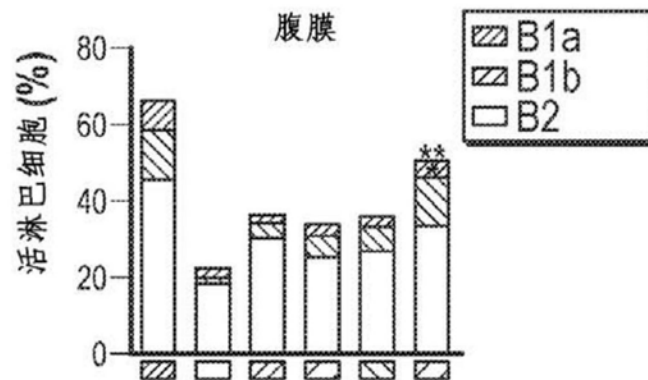


图9E

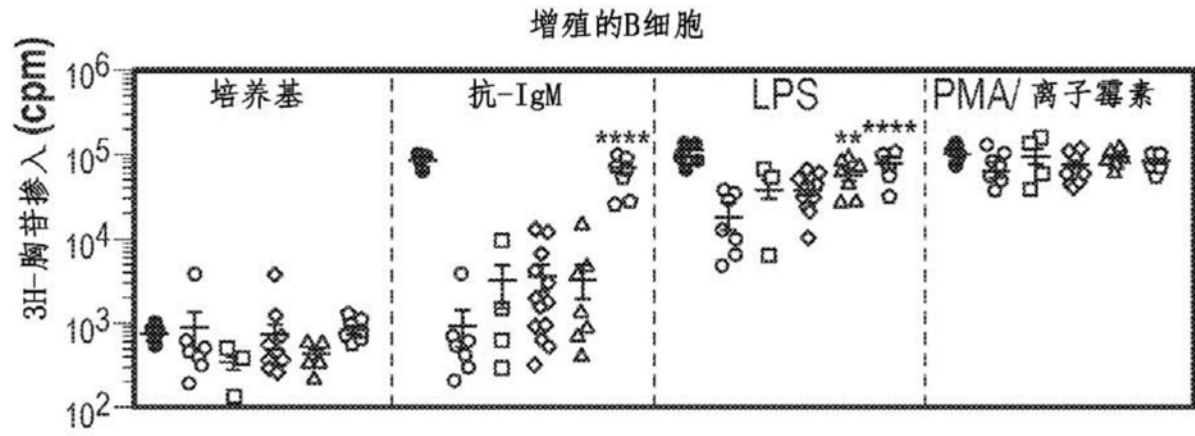


图9F

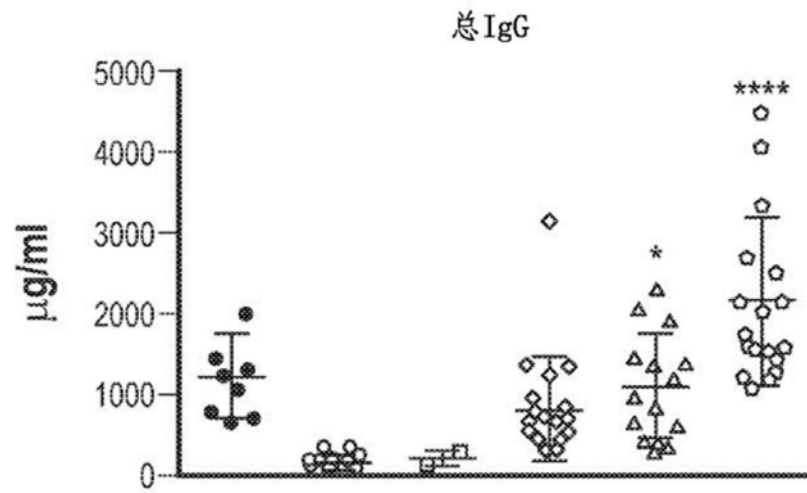


图9G

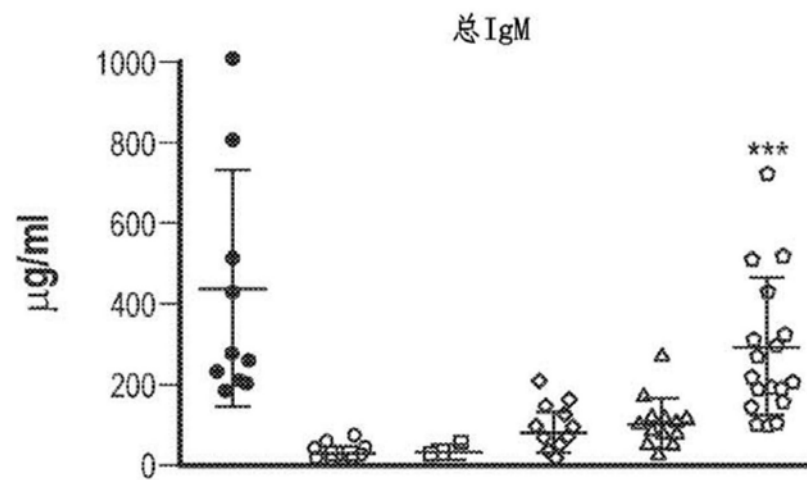


图9H

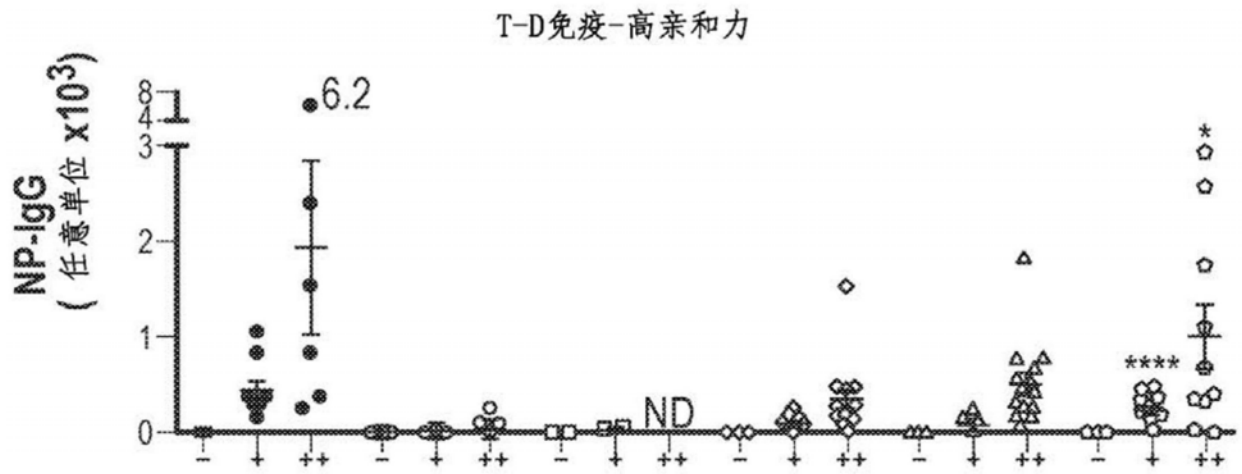


图9I

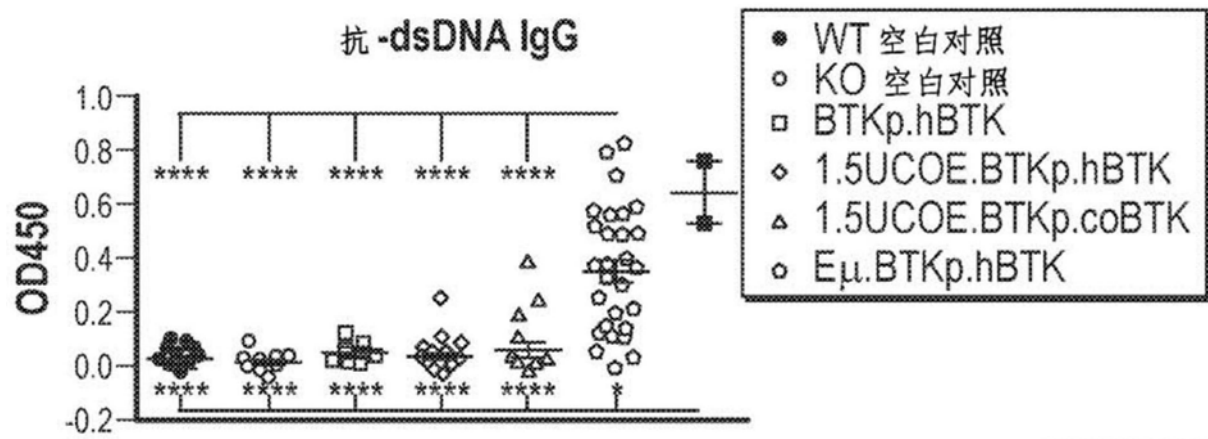


图10A

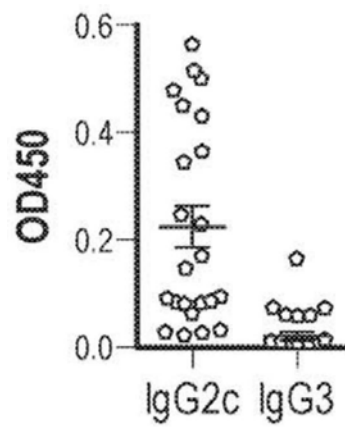


图10B

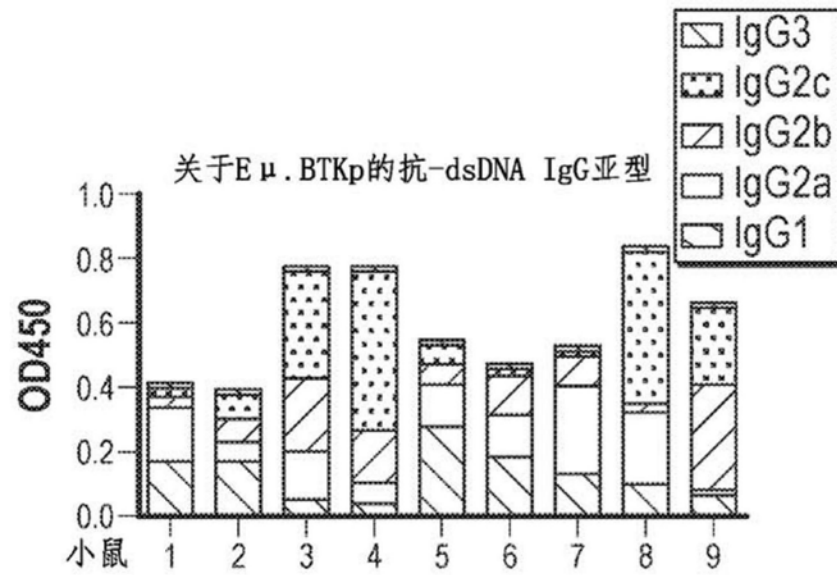


图10C

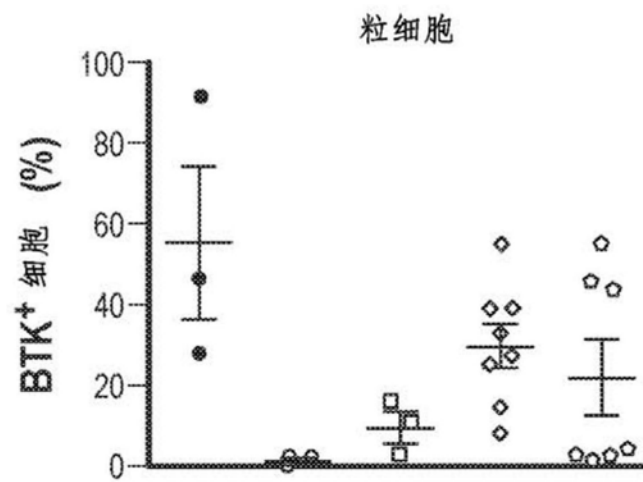


图11A

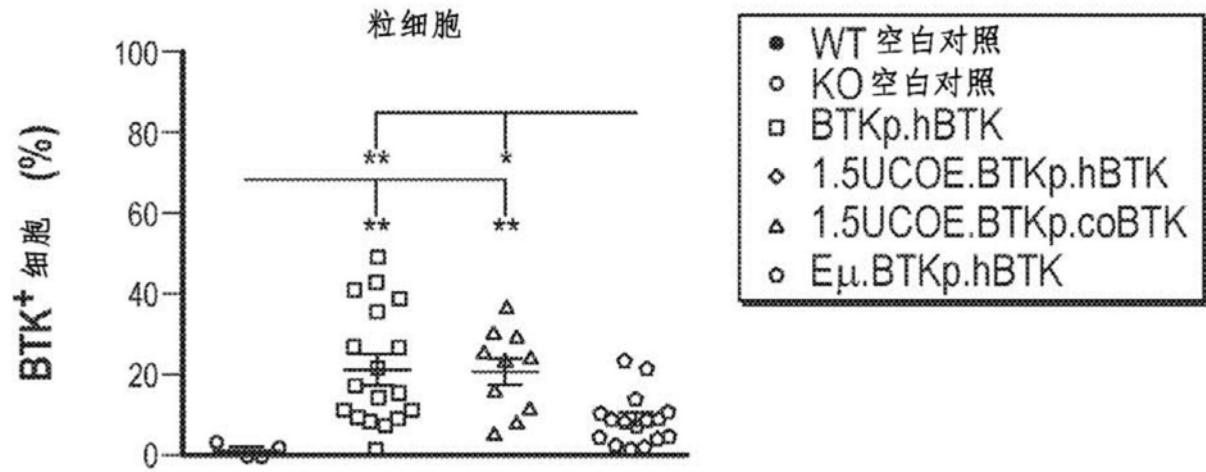


图11B

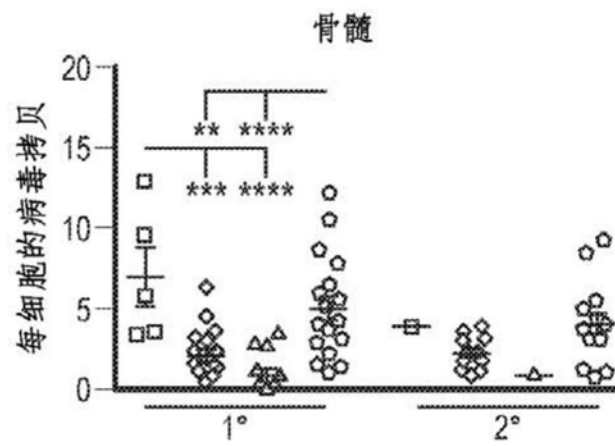


图11C

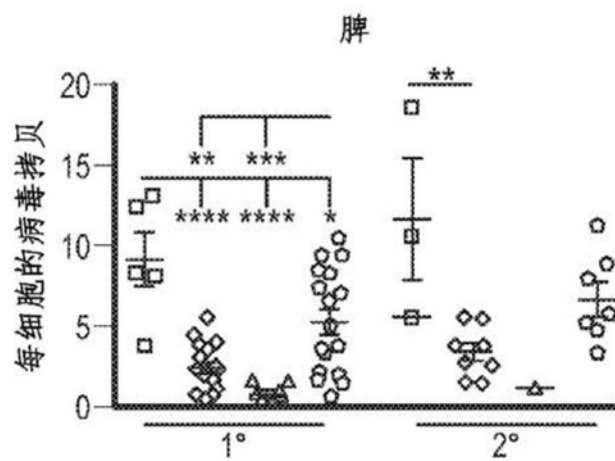


图11D

0.7UCOE.BTKpro.coBTK (6.1 kb)



图12A

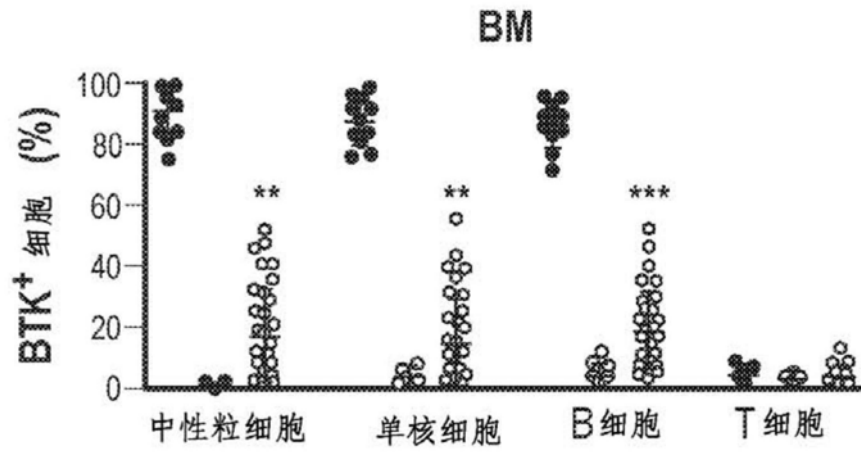


图12B

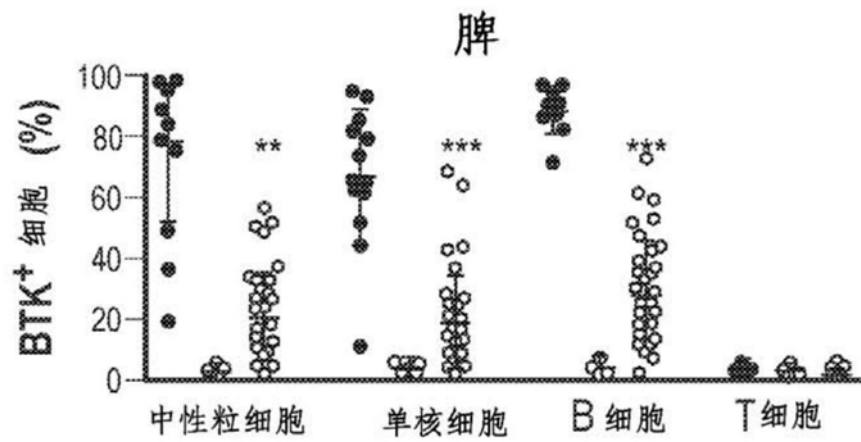


图12C

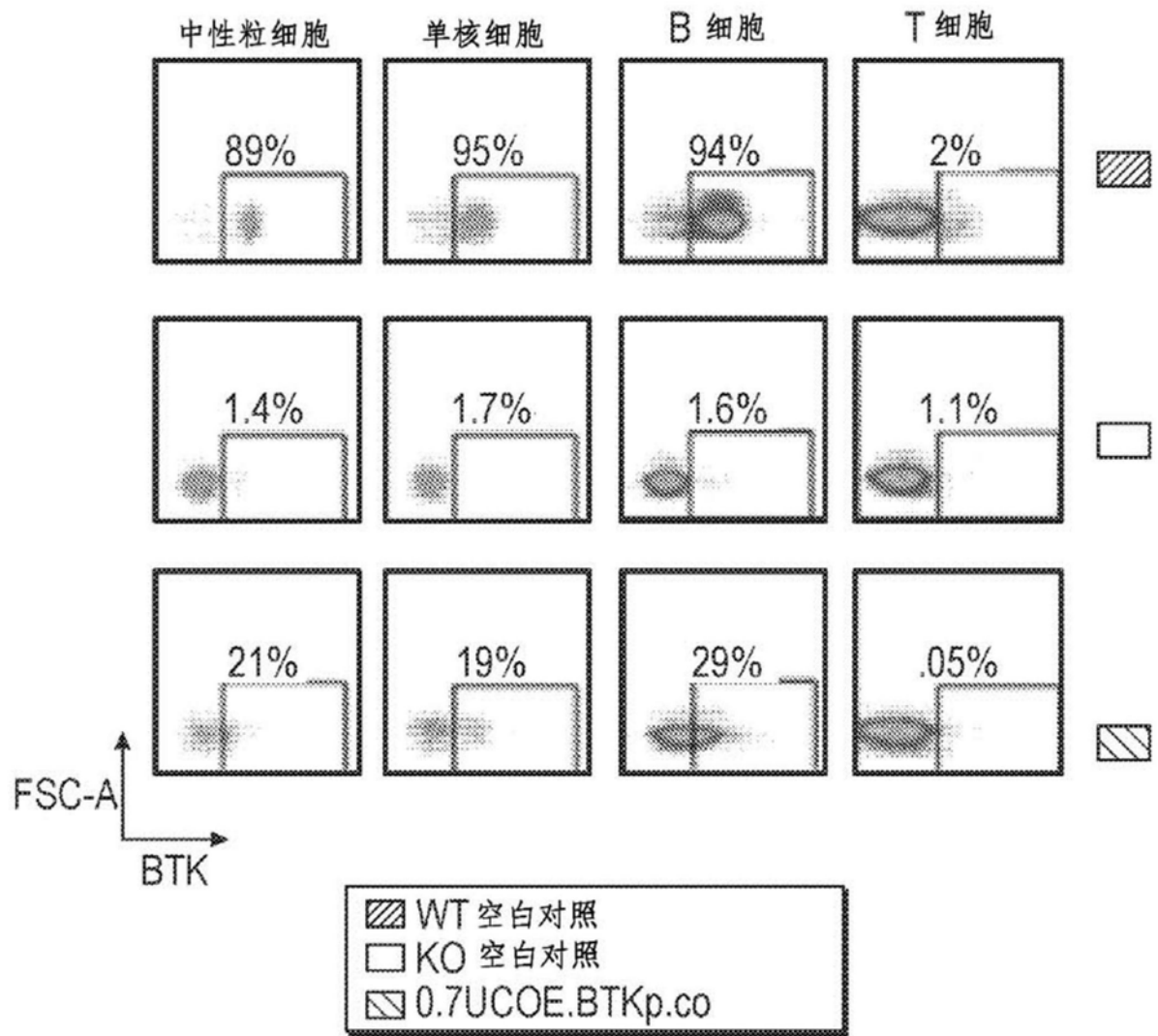


图12D

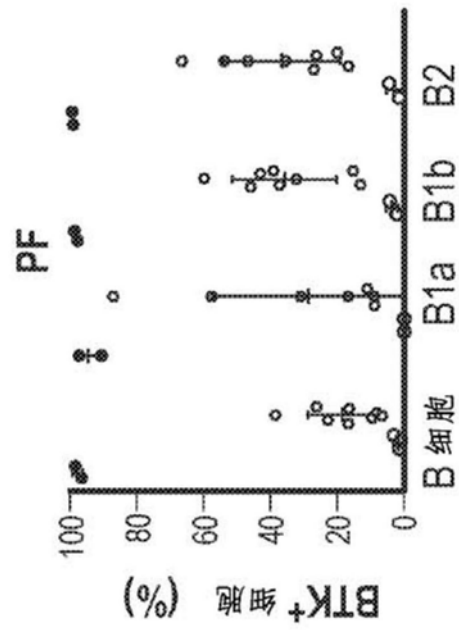


图12E

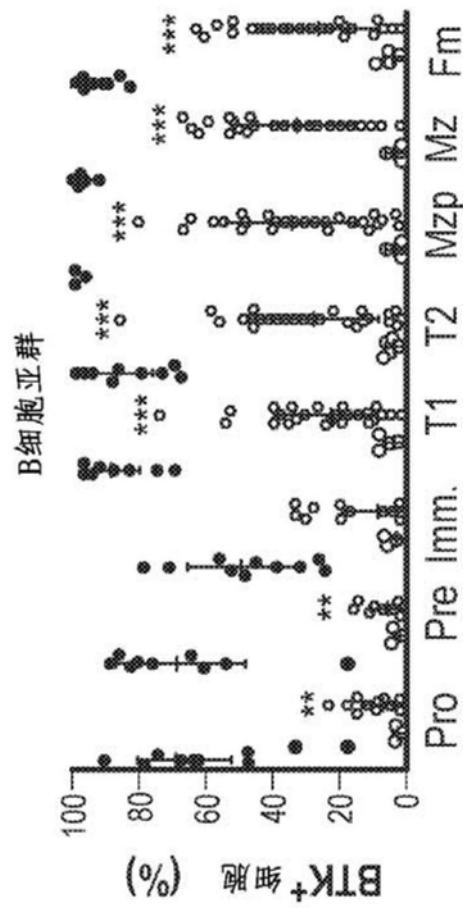


图12F

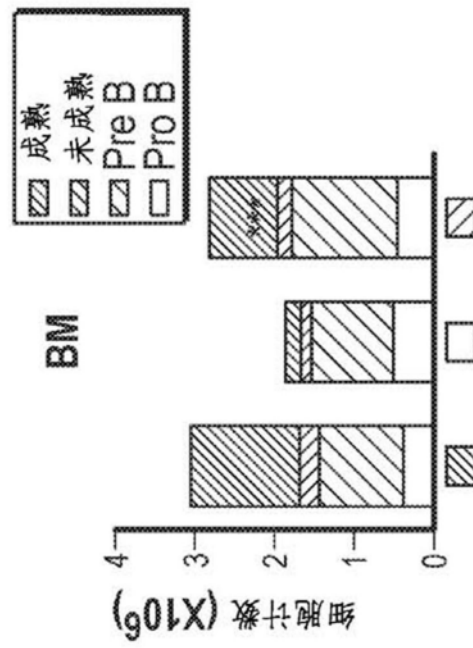


图12G

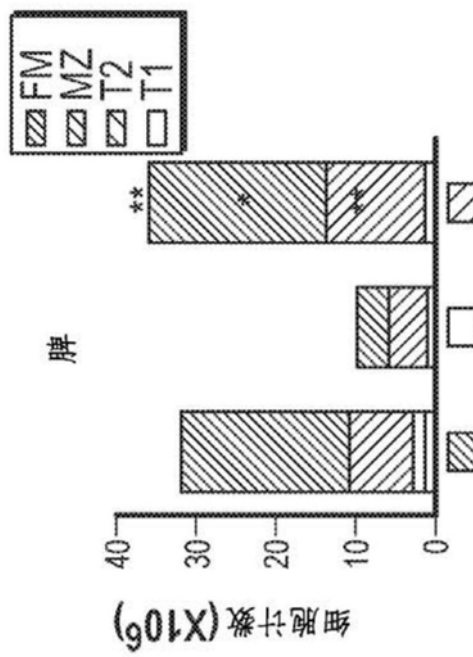


图12H

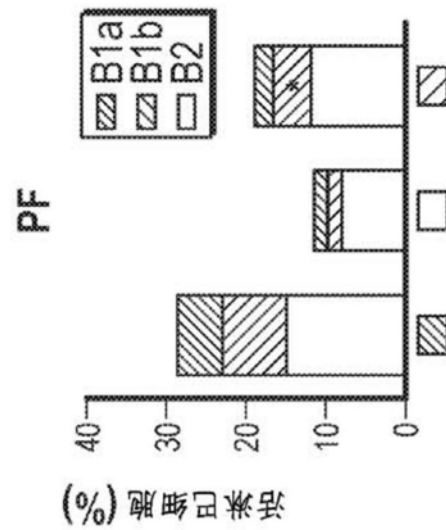


图12I

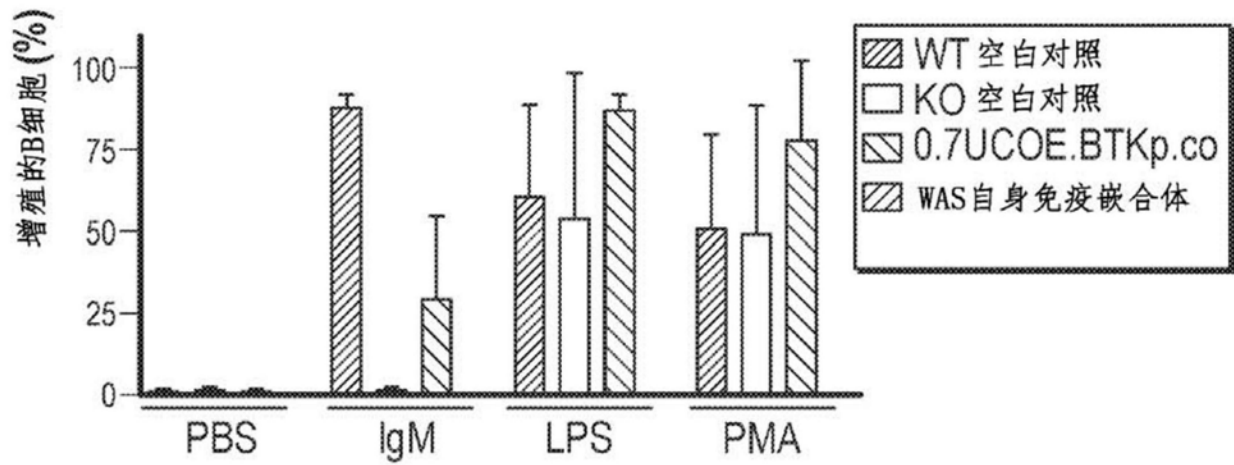


图13A

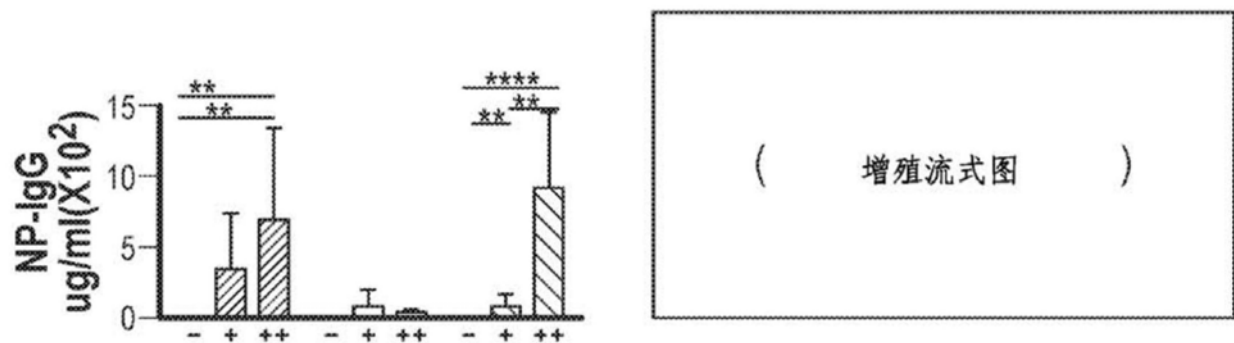


图13C

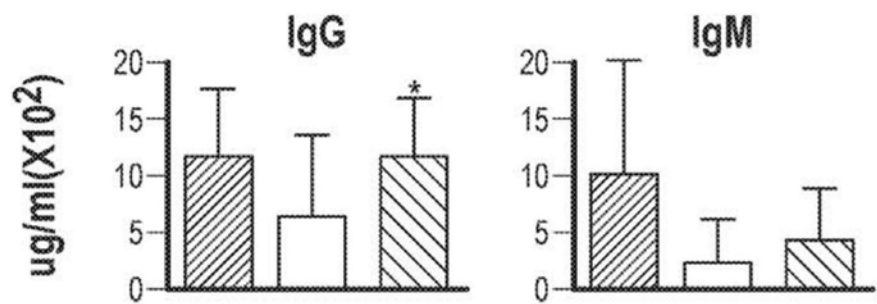


图13D

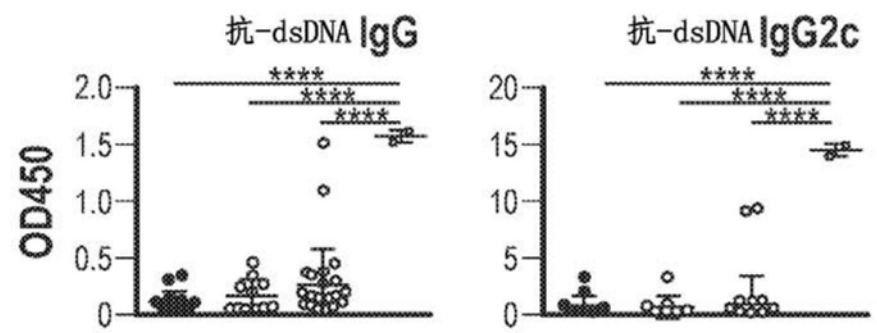


图13E

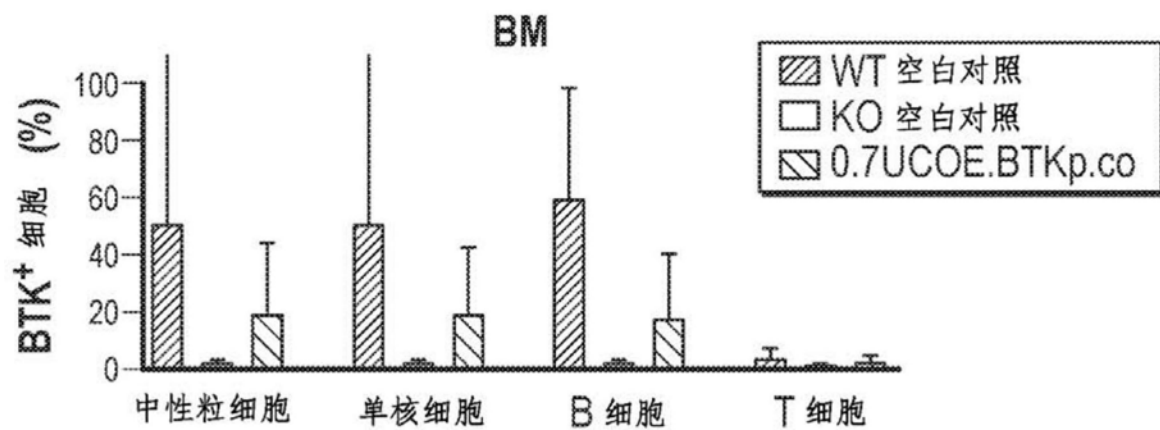


图14A

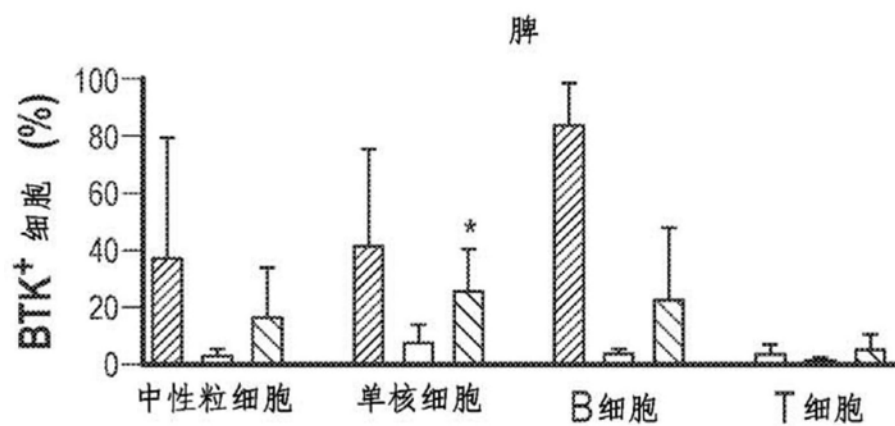


图14B

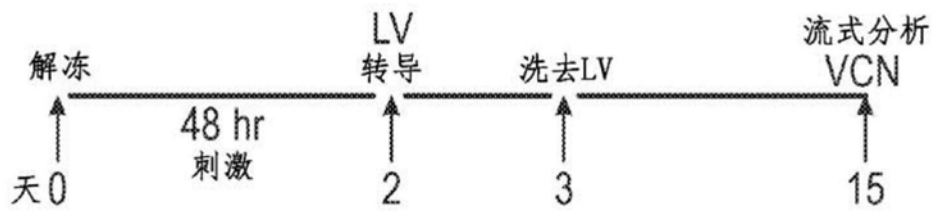
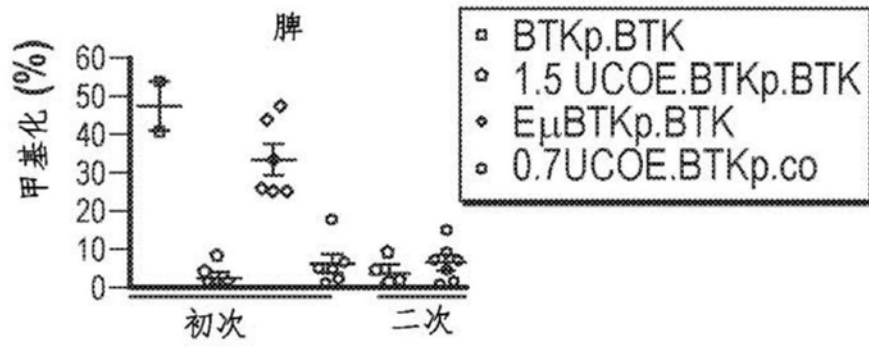
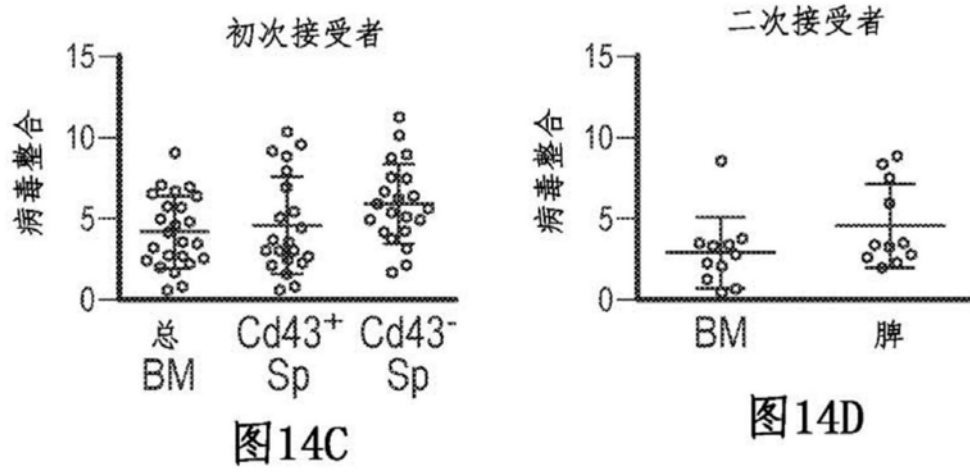


图15A

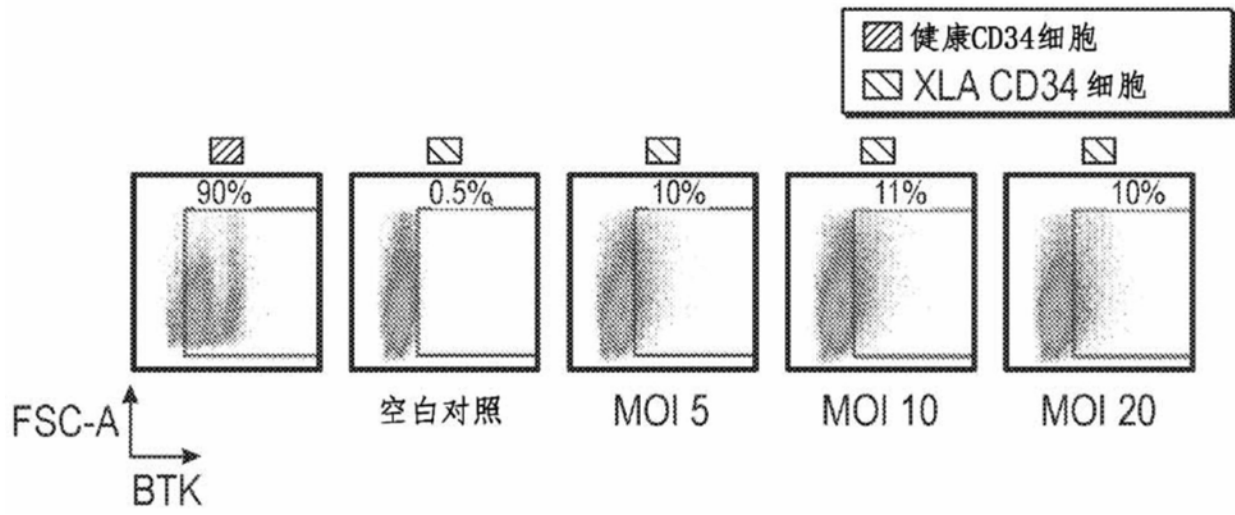


图15B

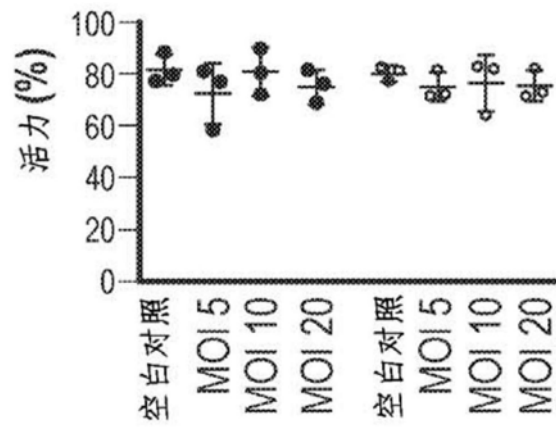


图15C

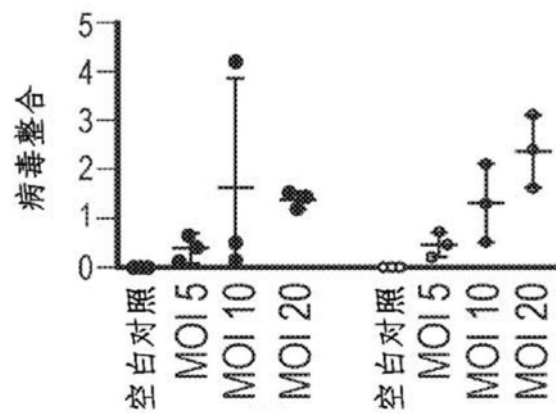


图15D

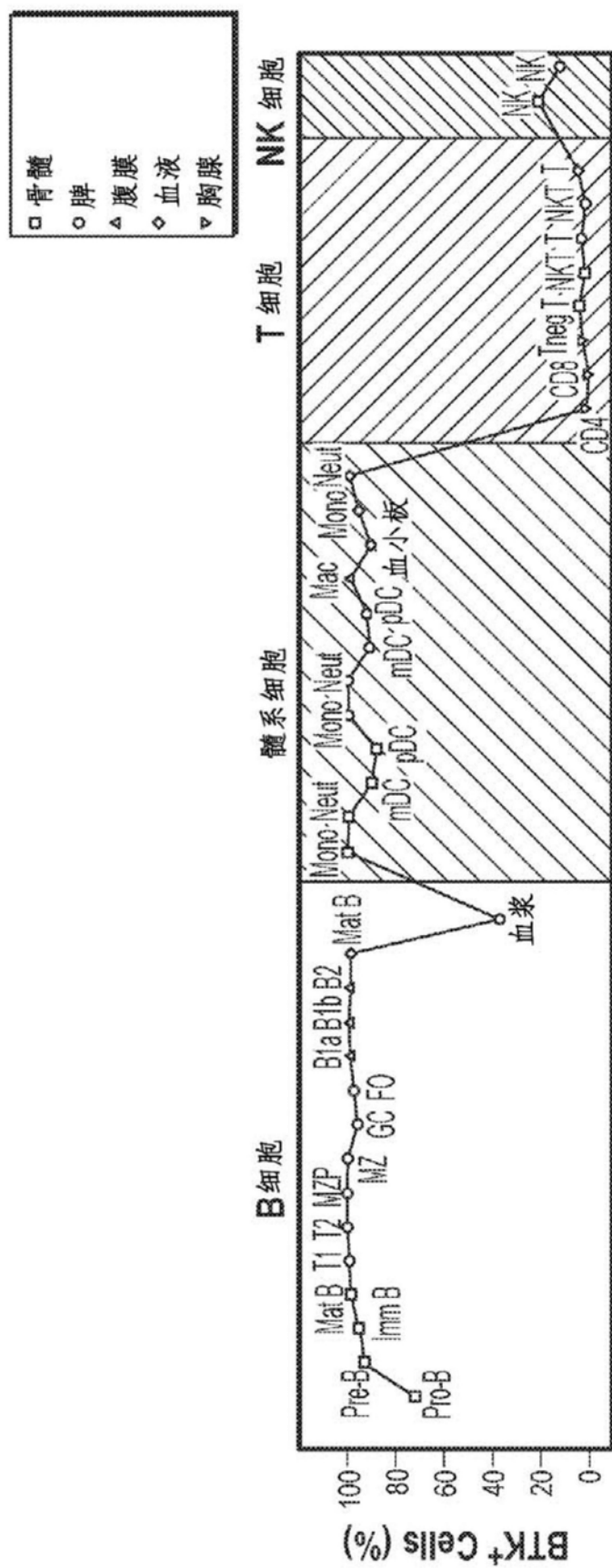


图 16A

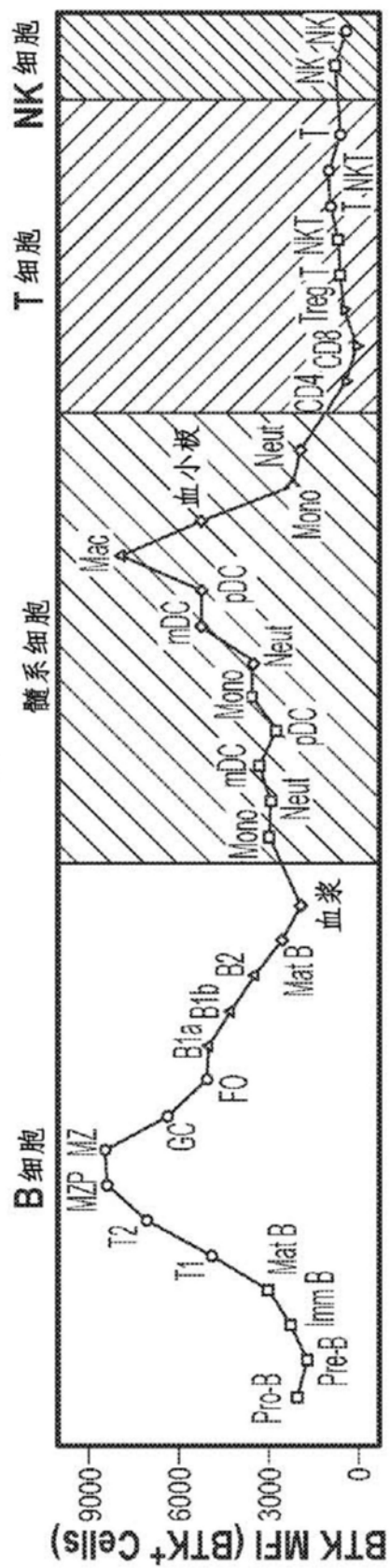


图 16B

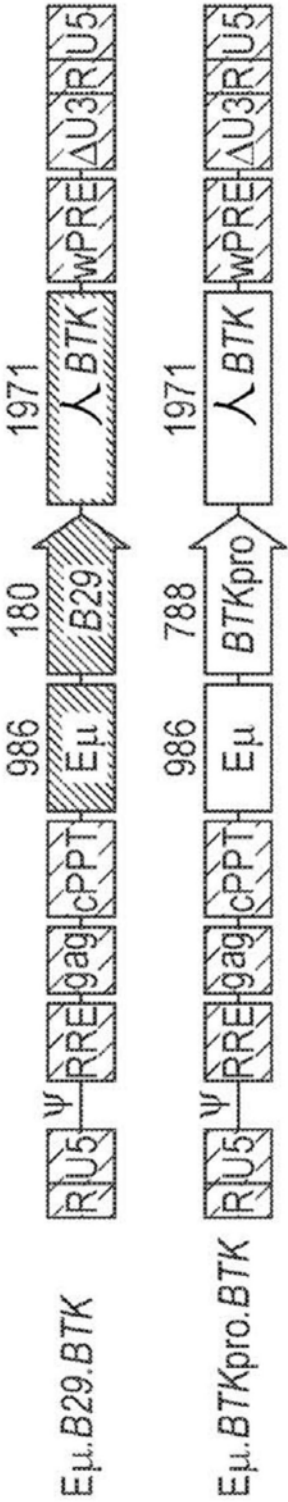


图16C

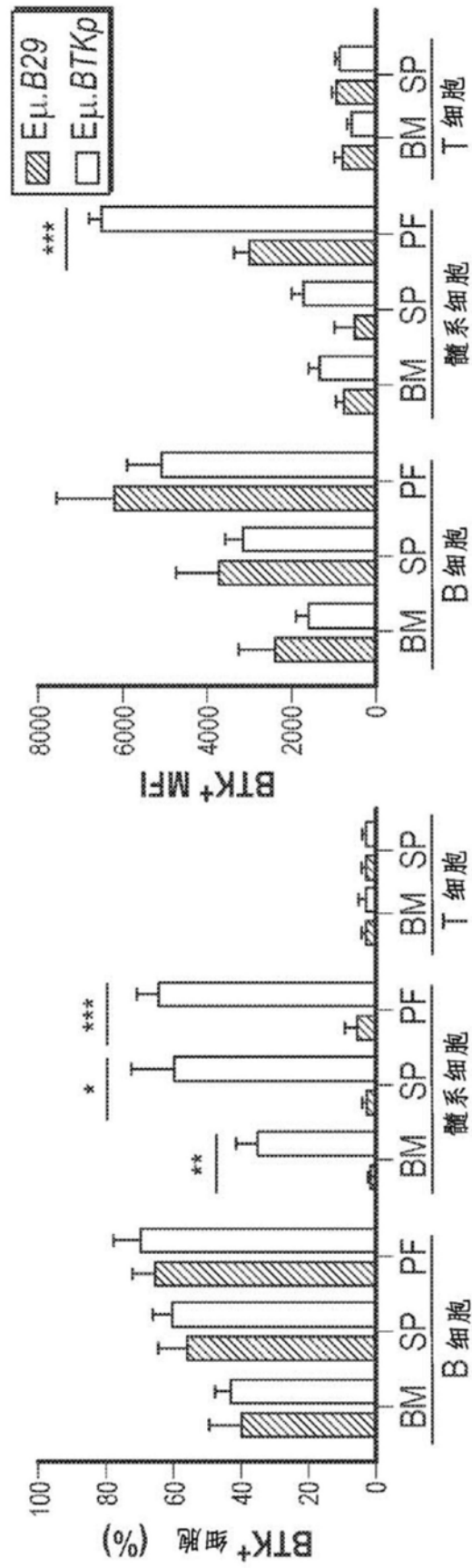


图16D

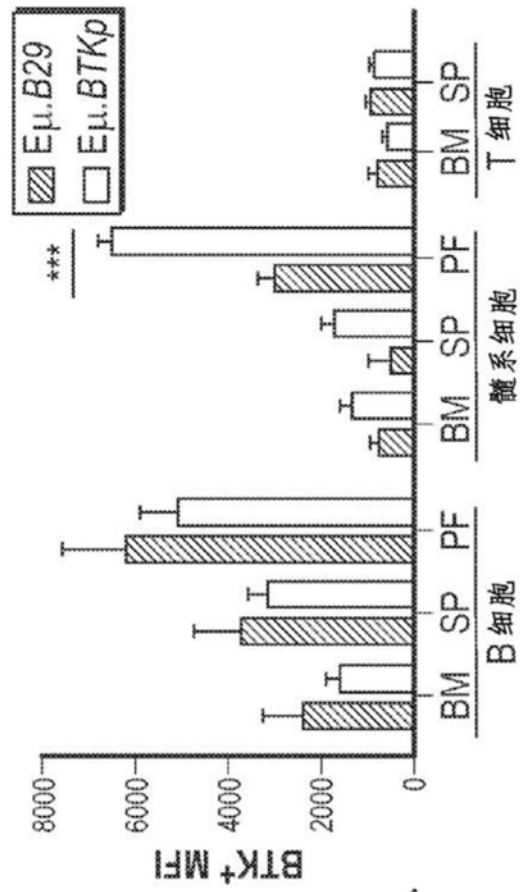


图16E

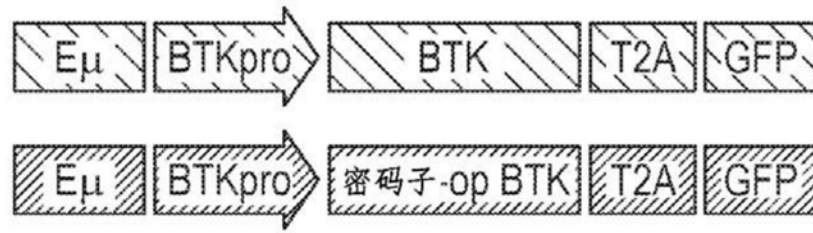


图17A

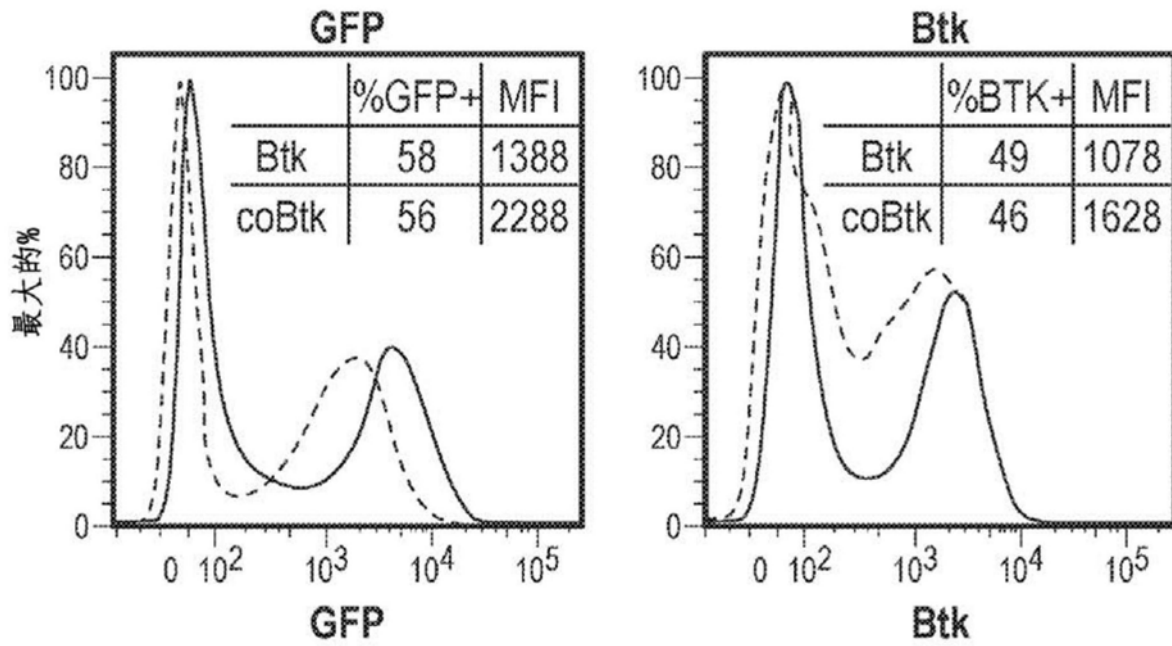


图17B

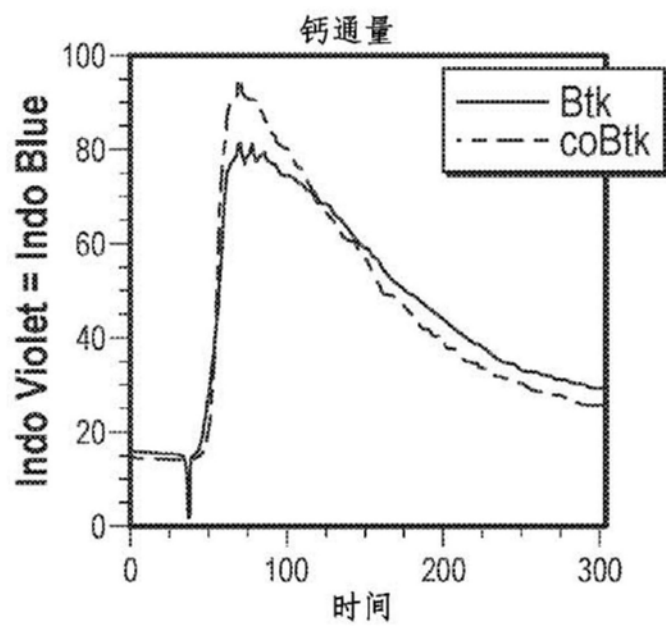


图17C

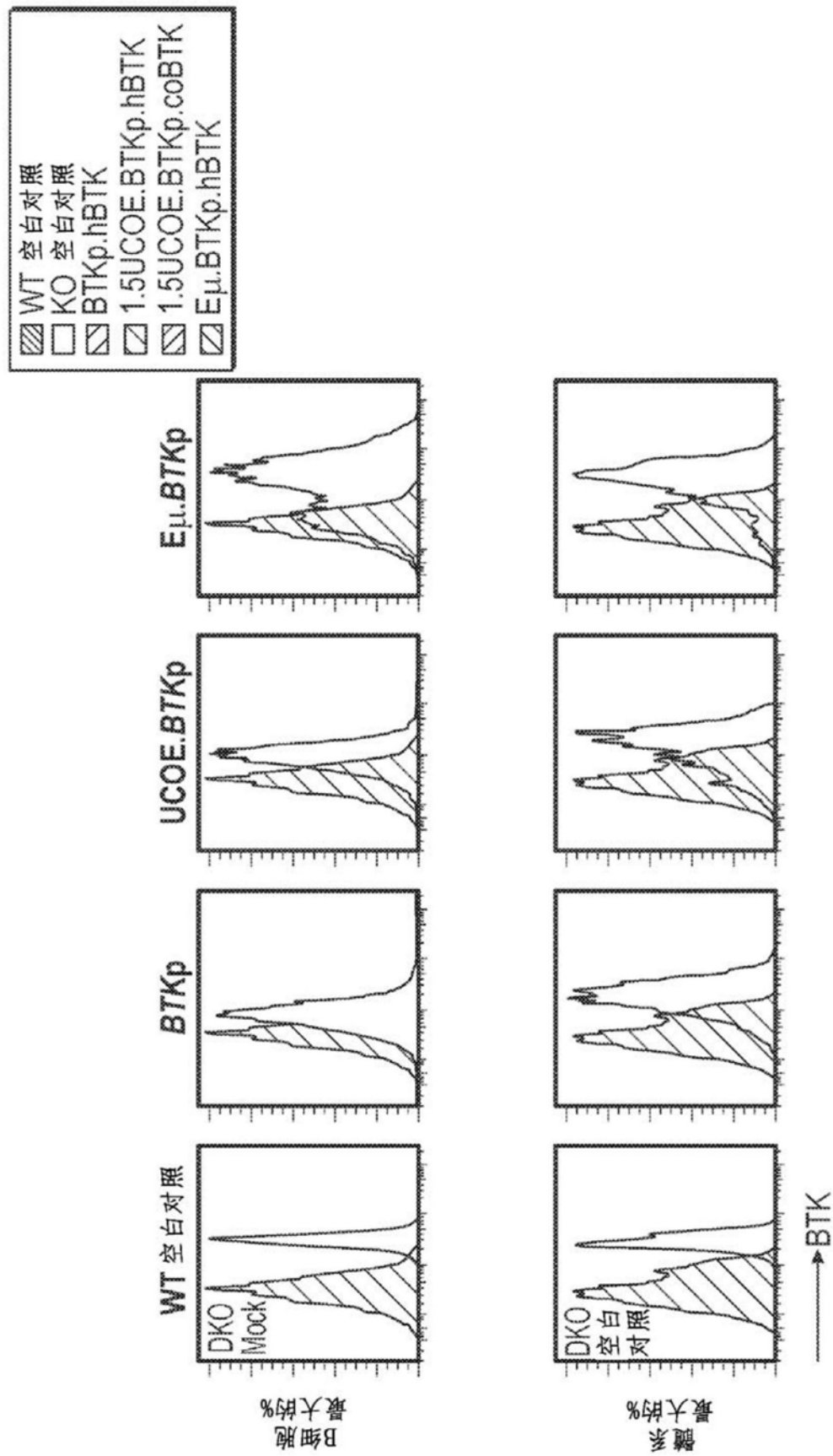


图18A

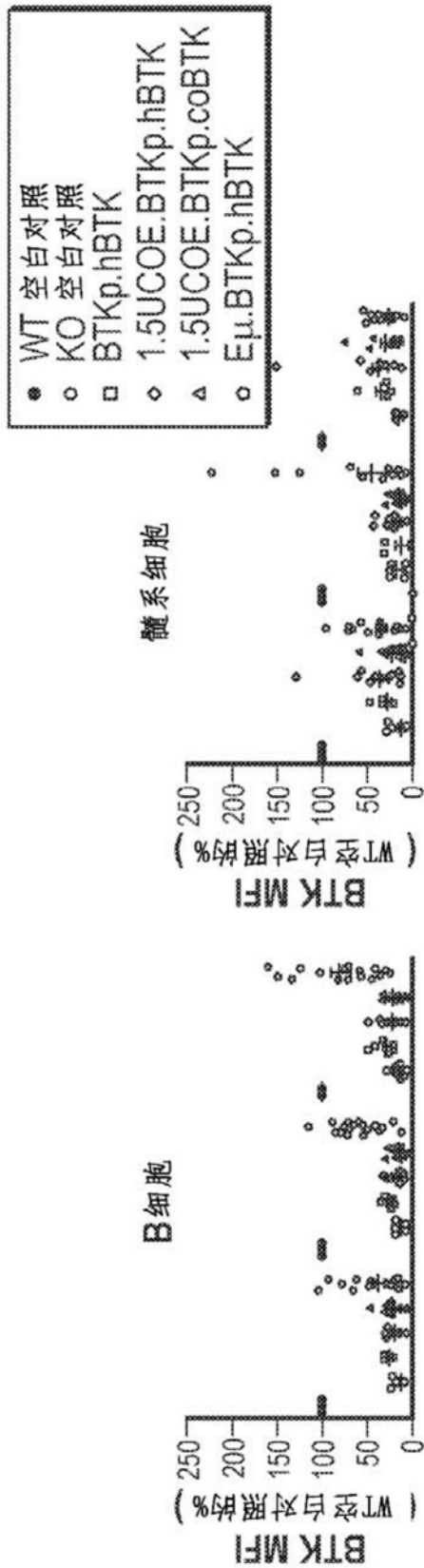


图18B

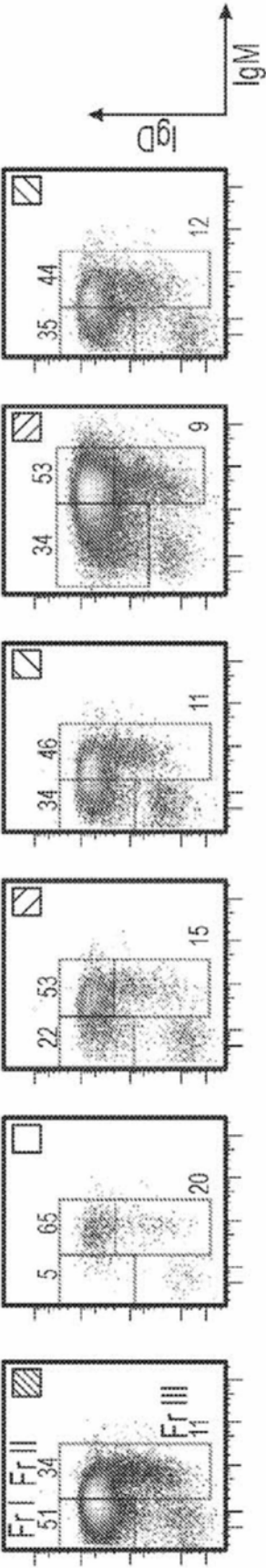


图18C



图18D

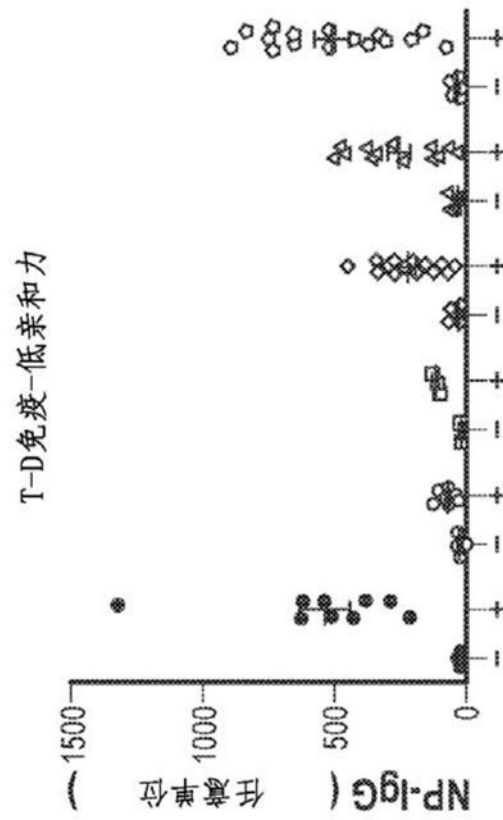


图18E

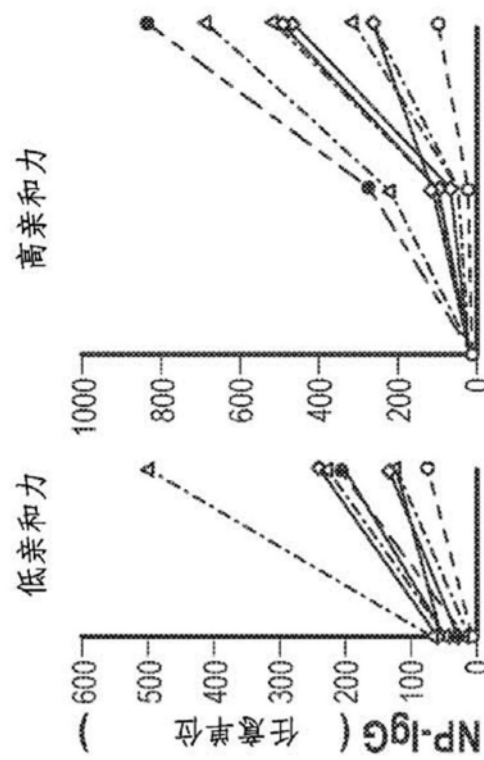


图18F

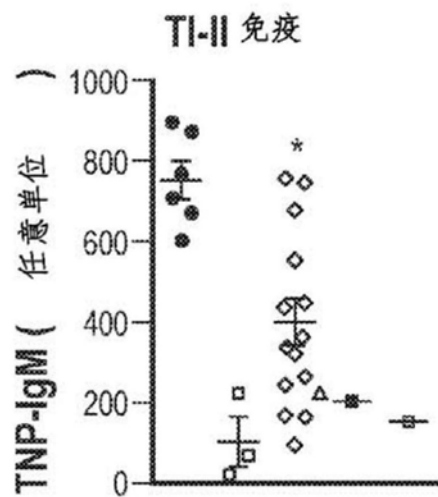


图18G

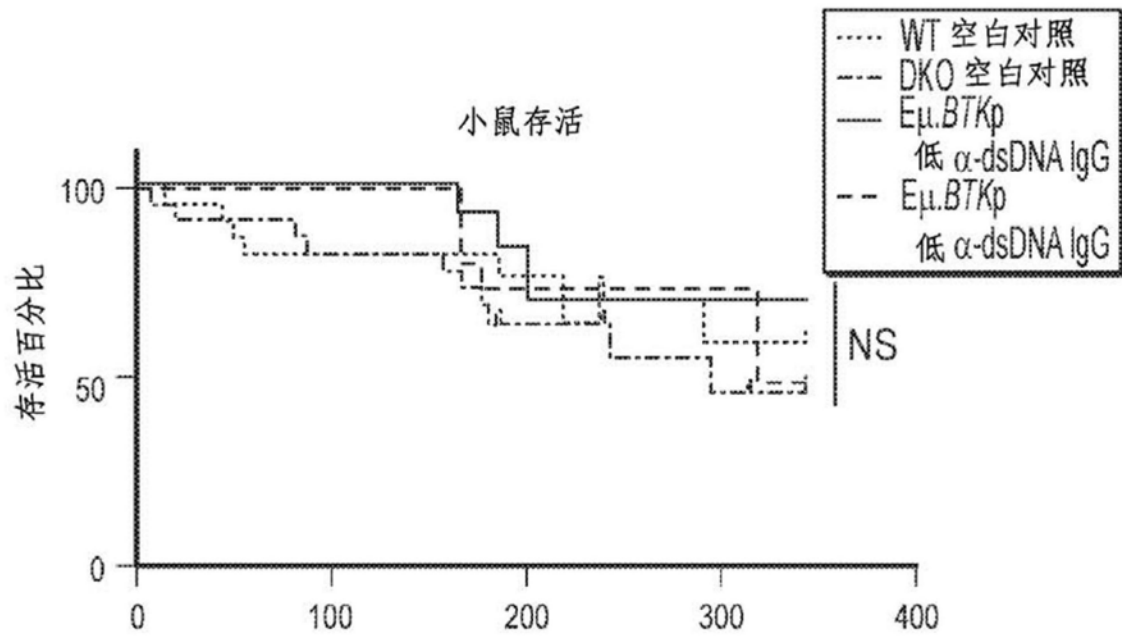


图19A

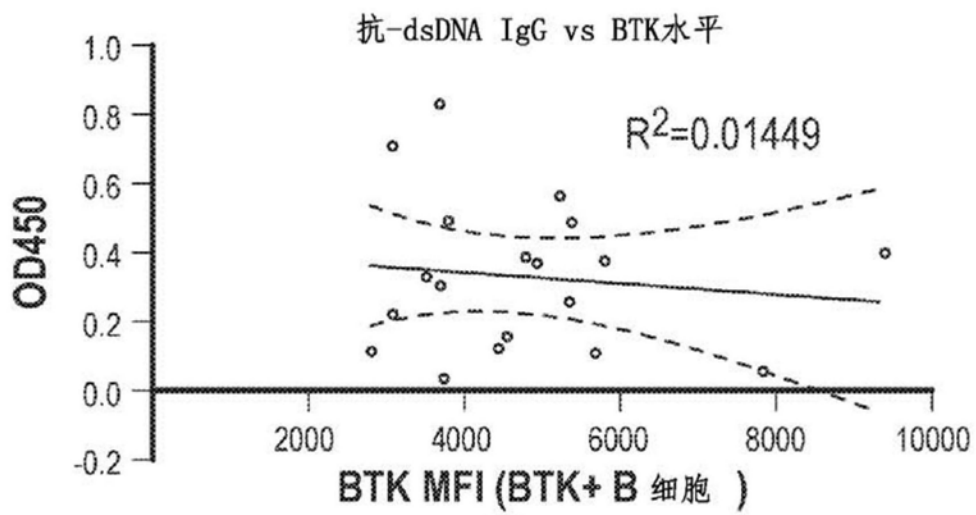


图19B

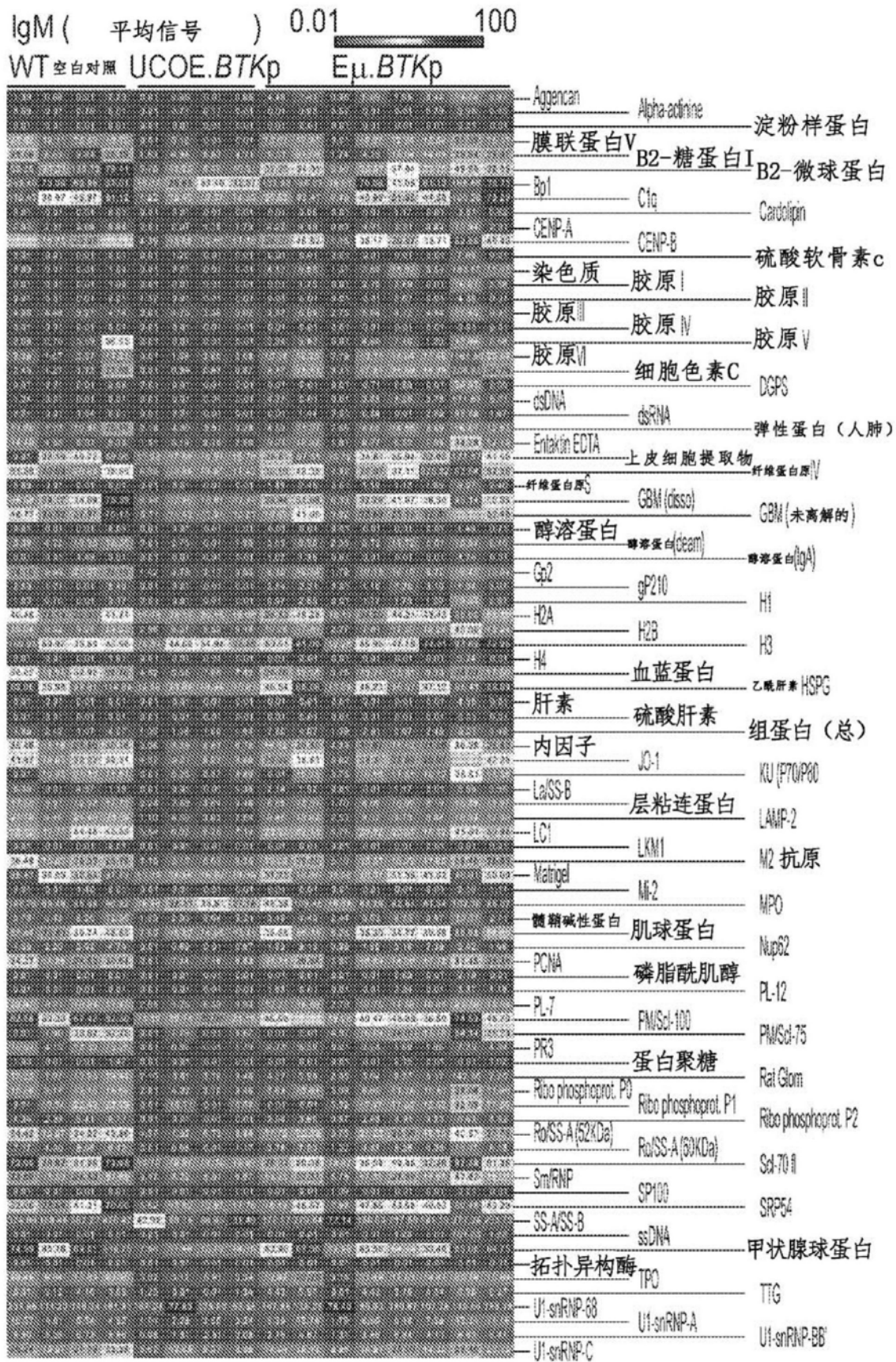


图20-1

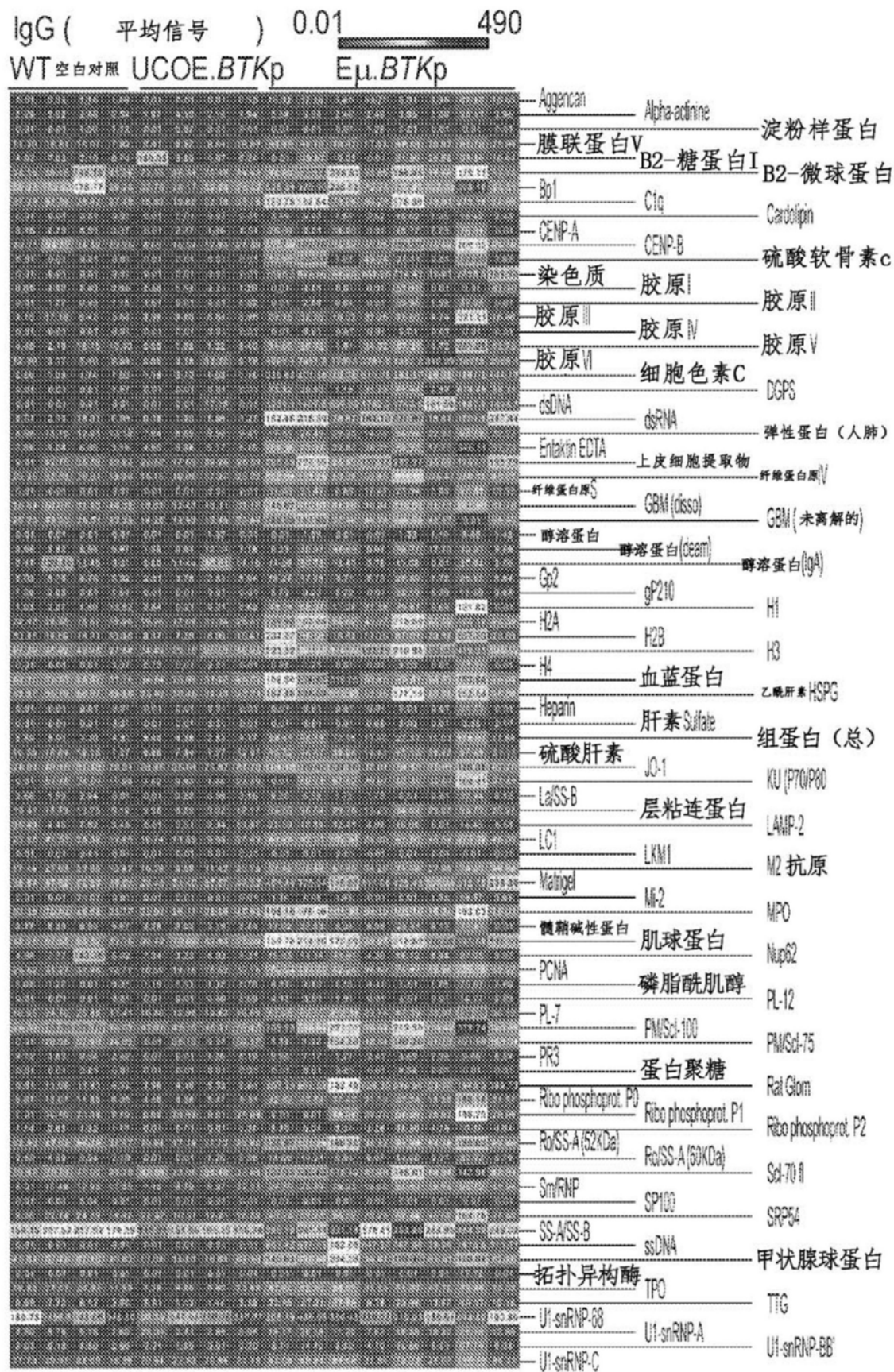


图20-2

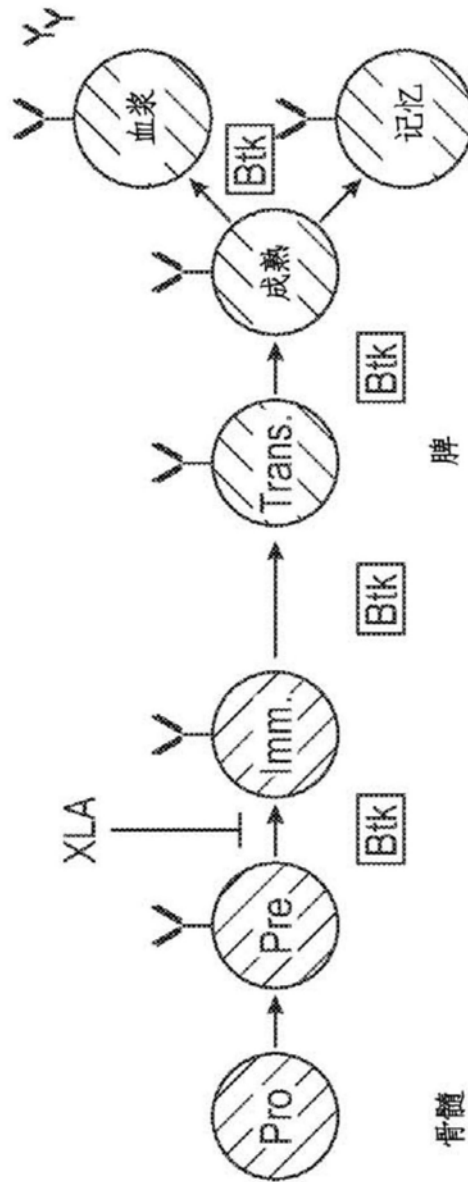


图21

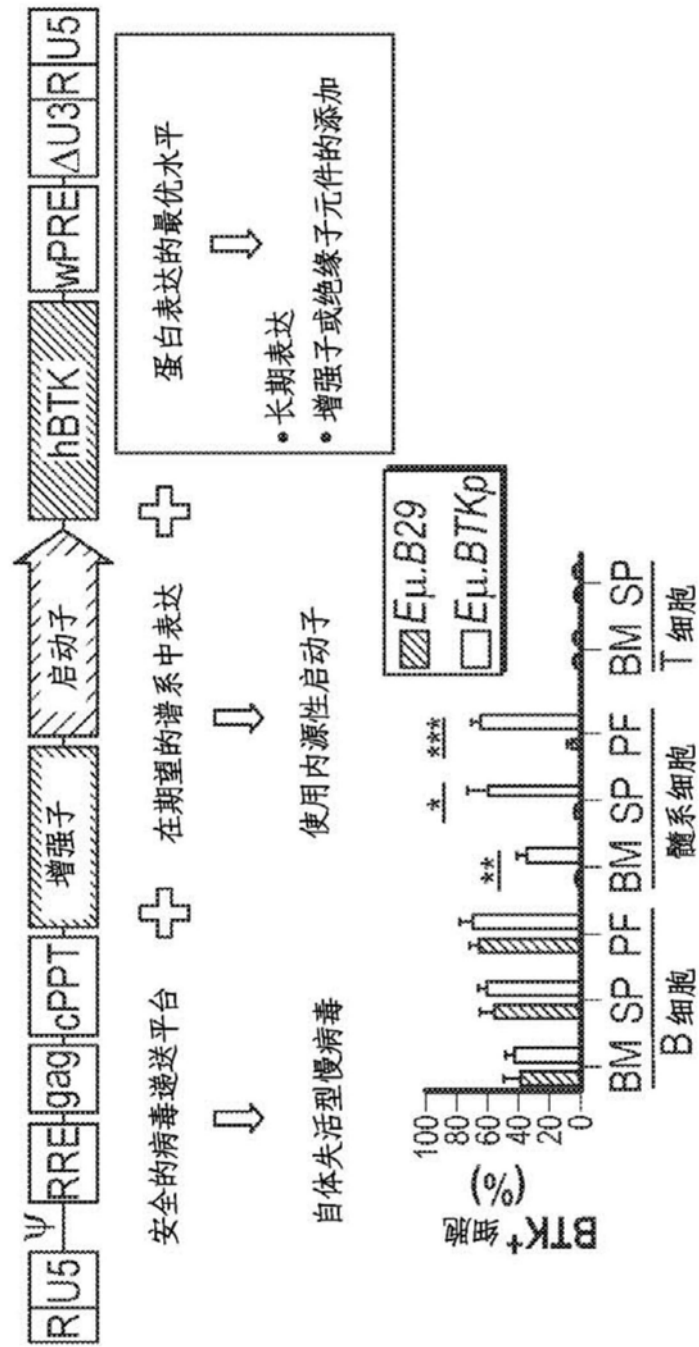


图22

慢病毒载体

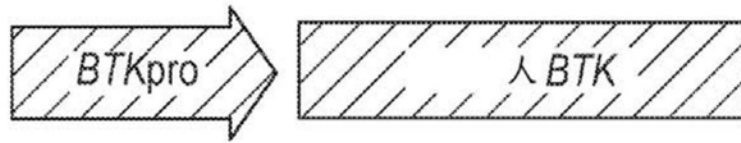
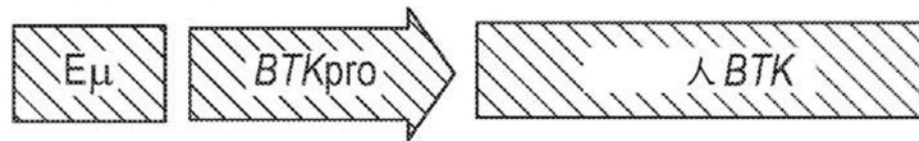
 $BTKpro.BTK (BTKp)$  $UCOE.BTKpro.BTK (UCOE.BTKp)$  $UCOE.BTKpro.co-opBTK (UCOE.BTKp.co)$  $E\mu.BTKpro.BTK (E\mu.BTKp)$ 

图23

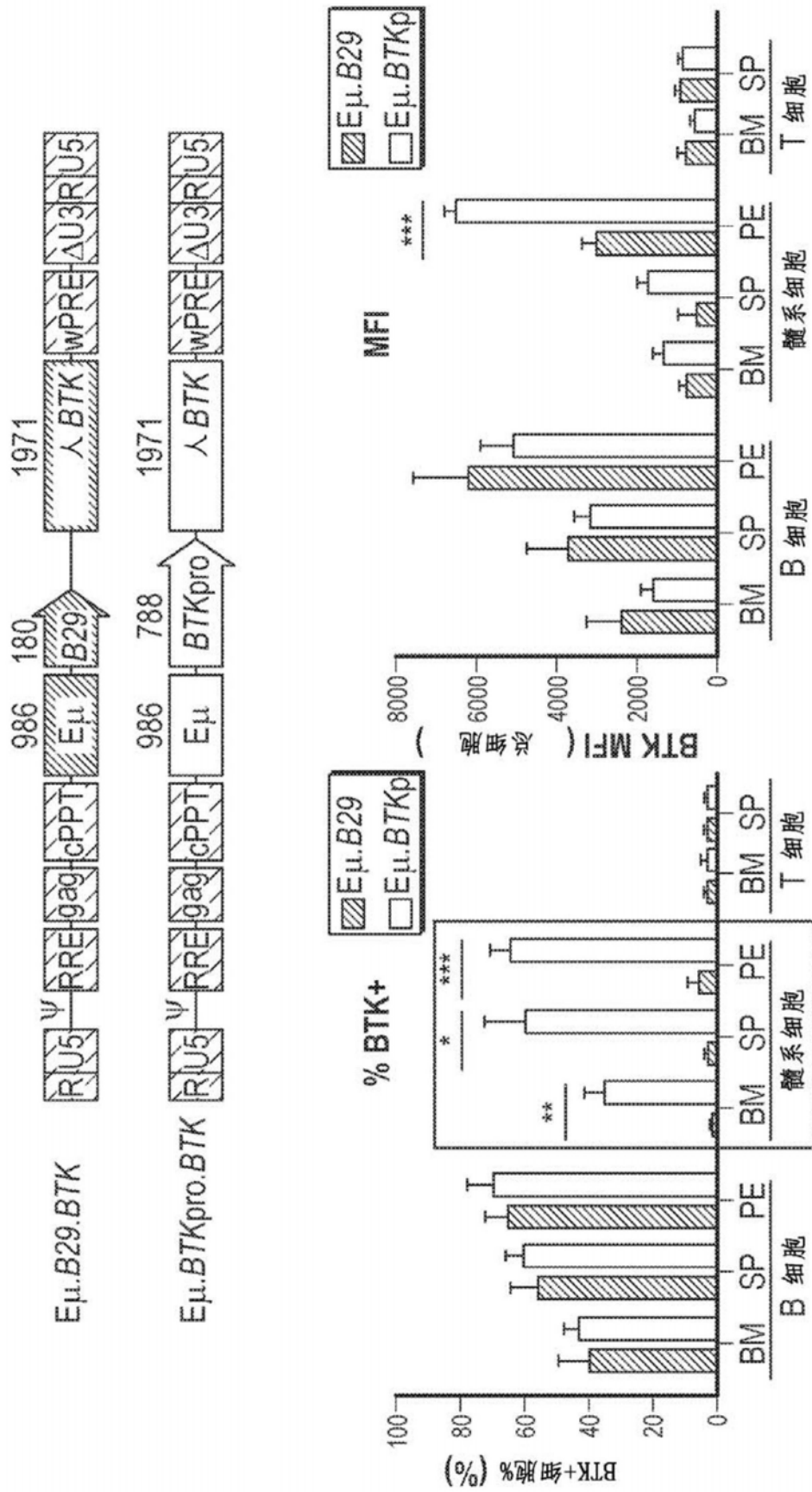


图24

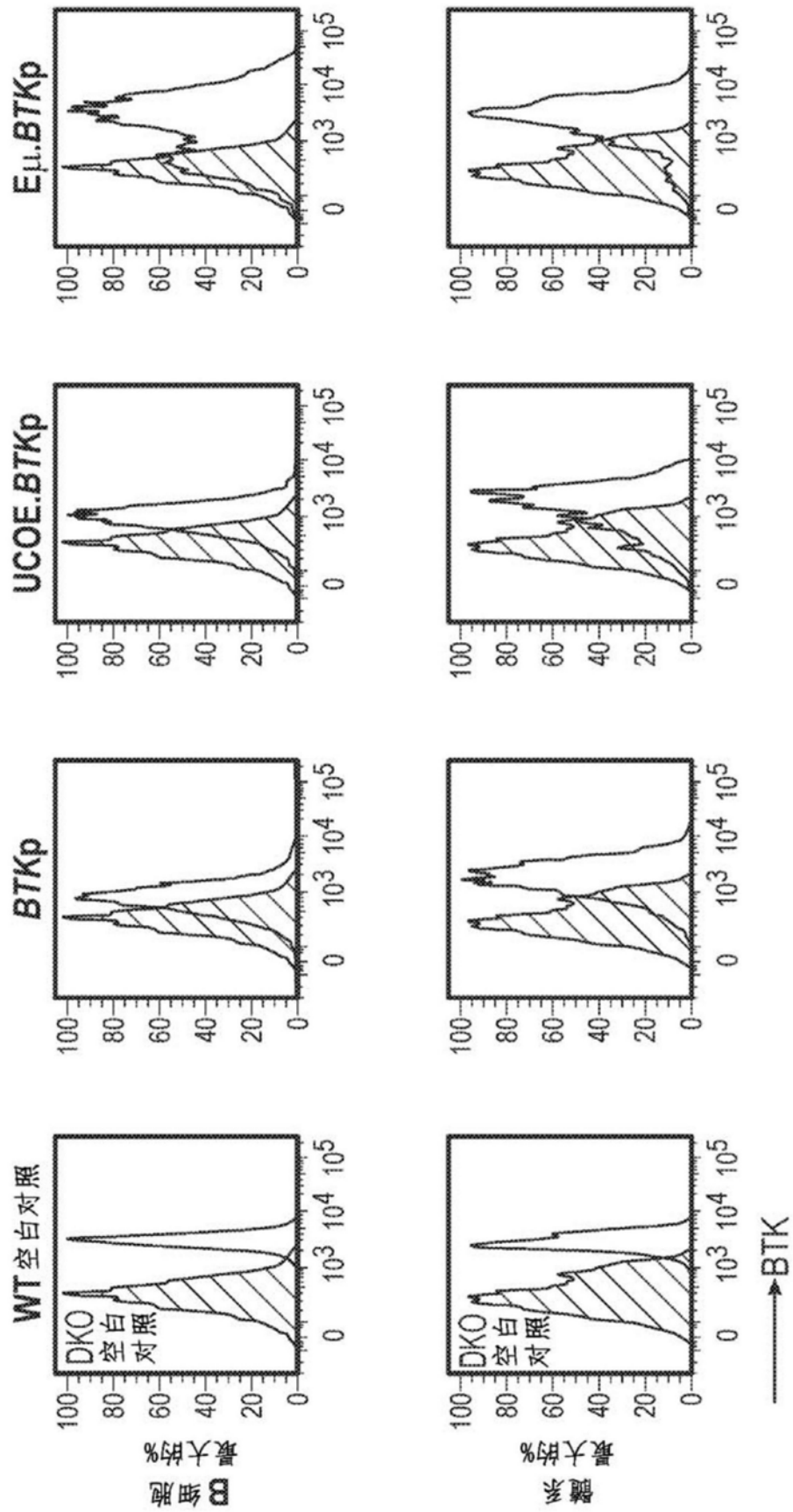


图25

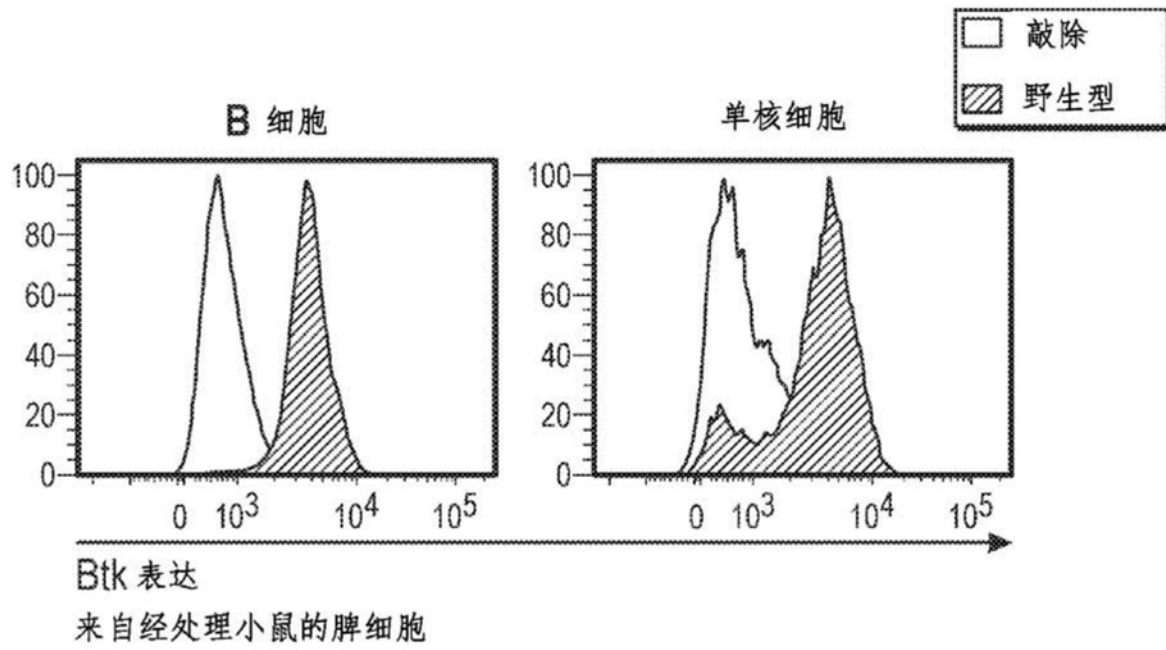


图26

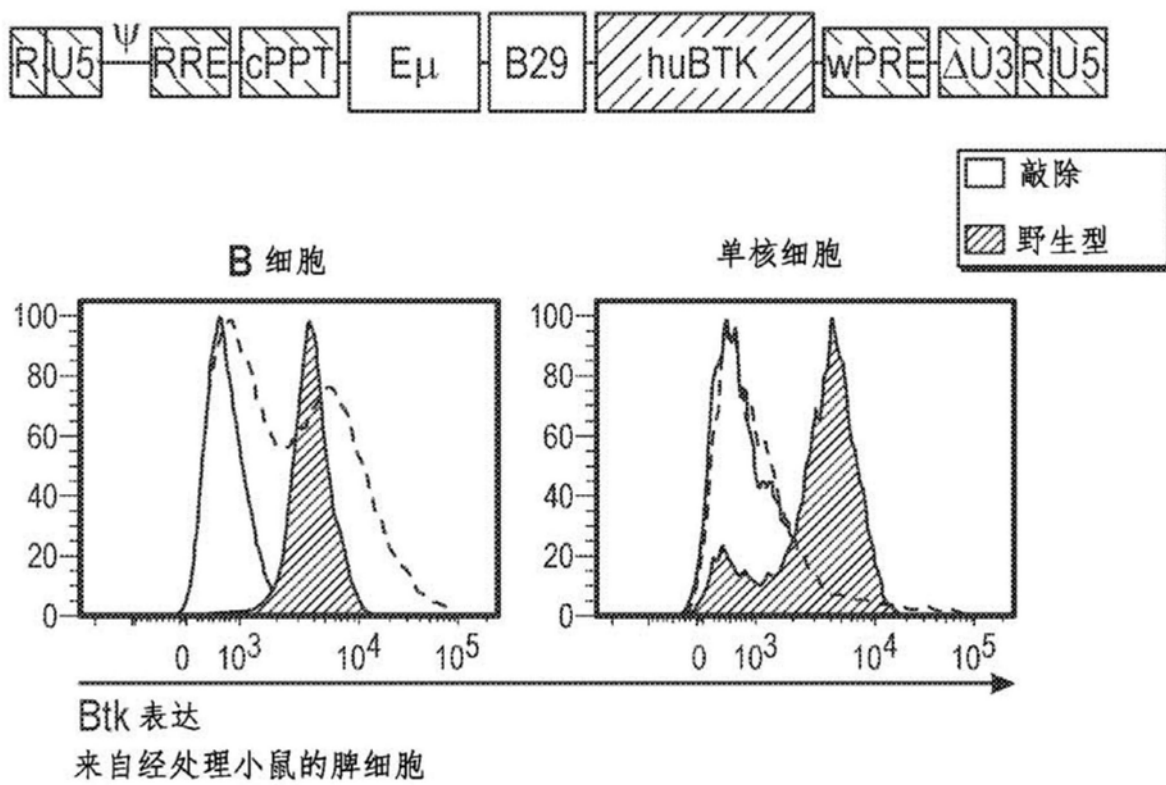


图27

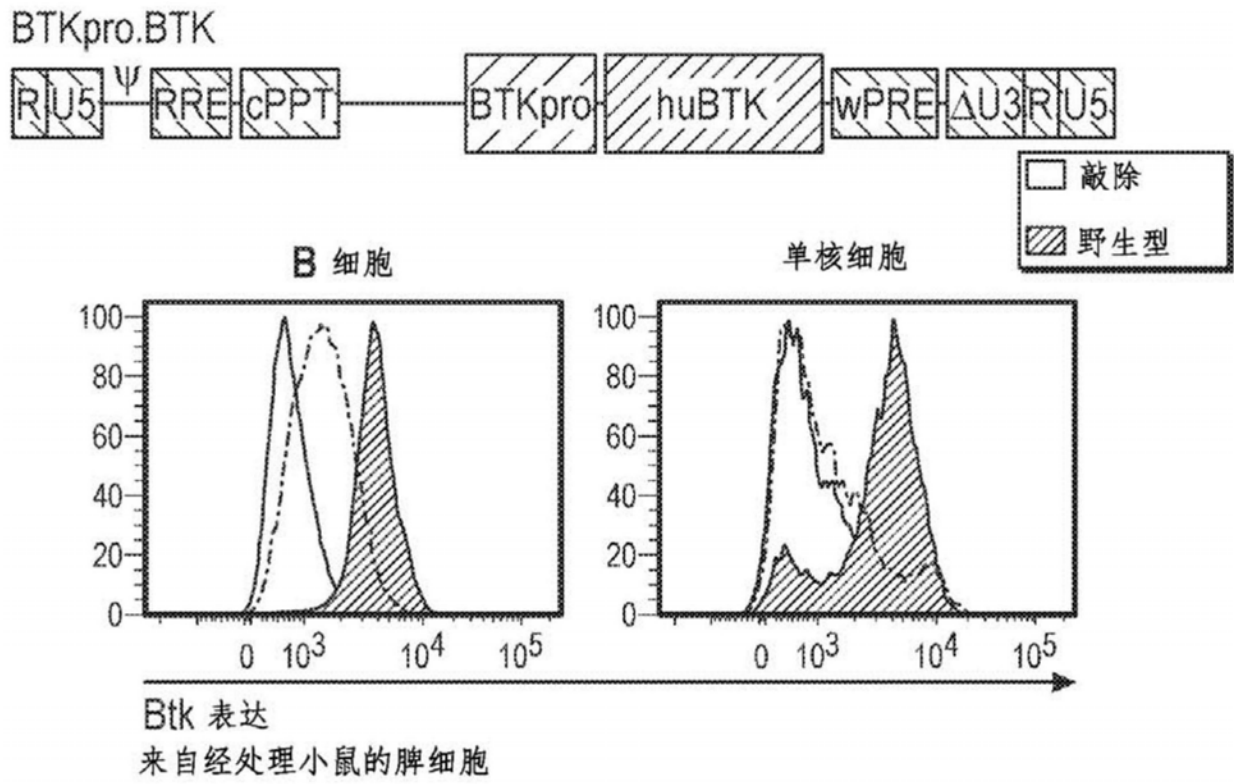


图28

UCOE.BTKpro.BTK

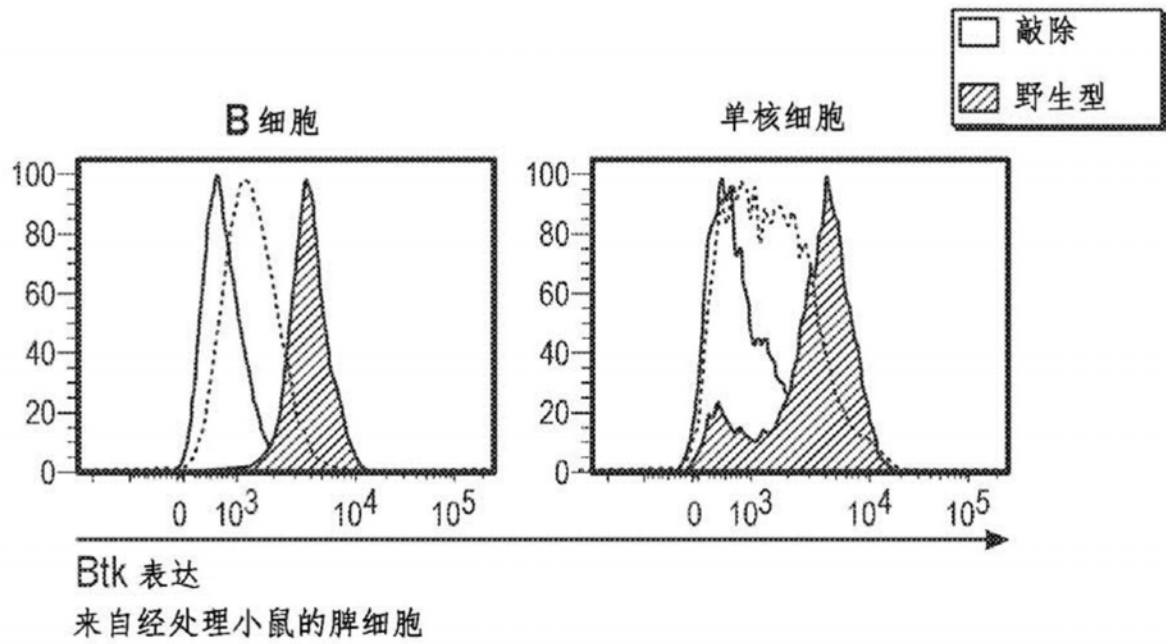


图29

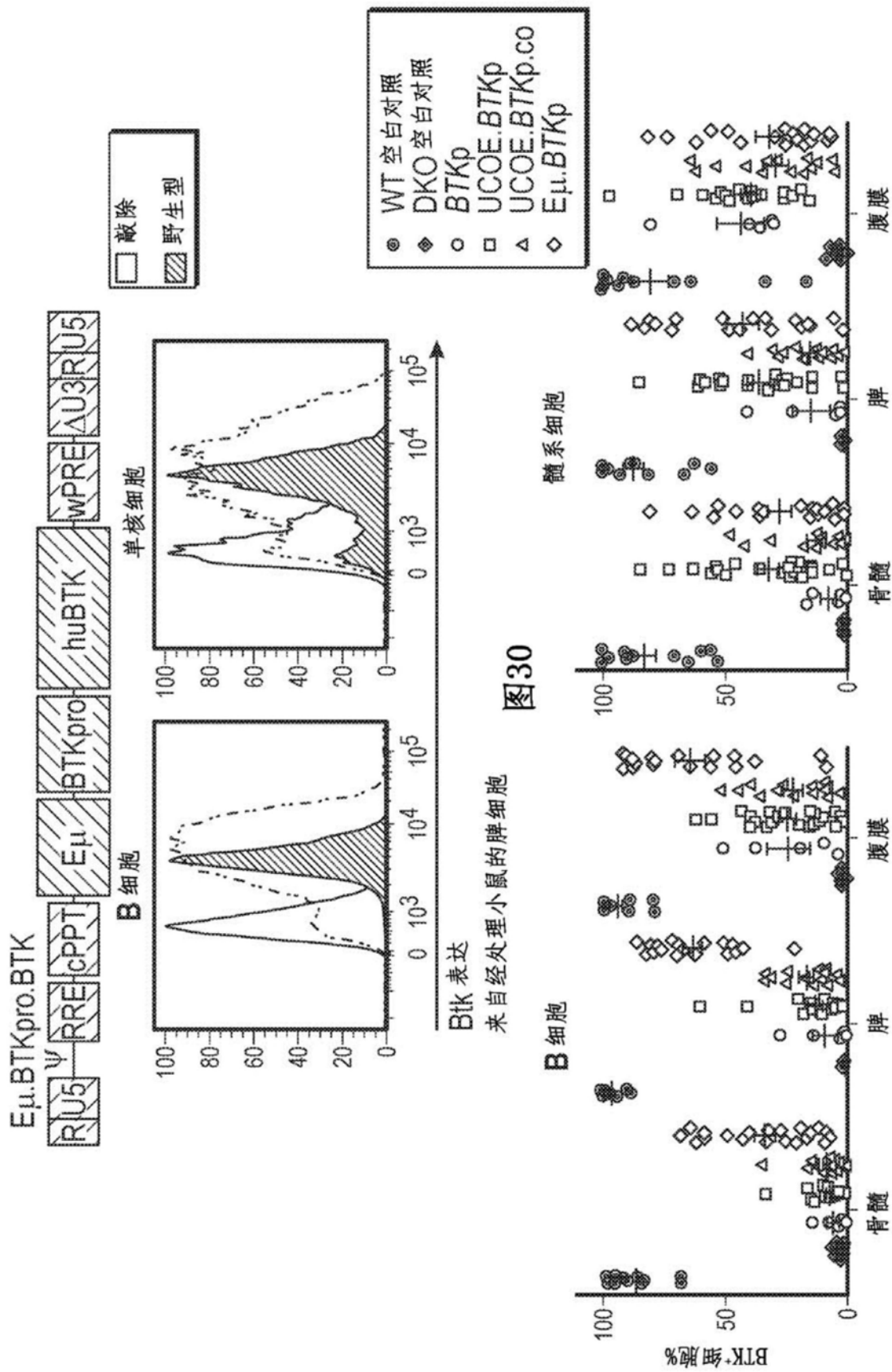


图31

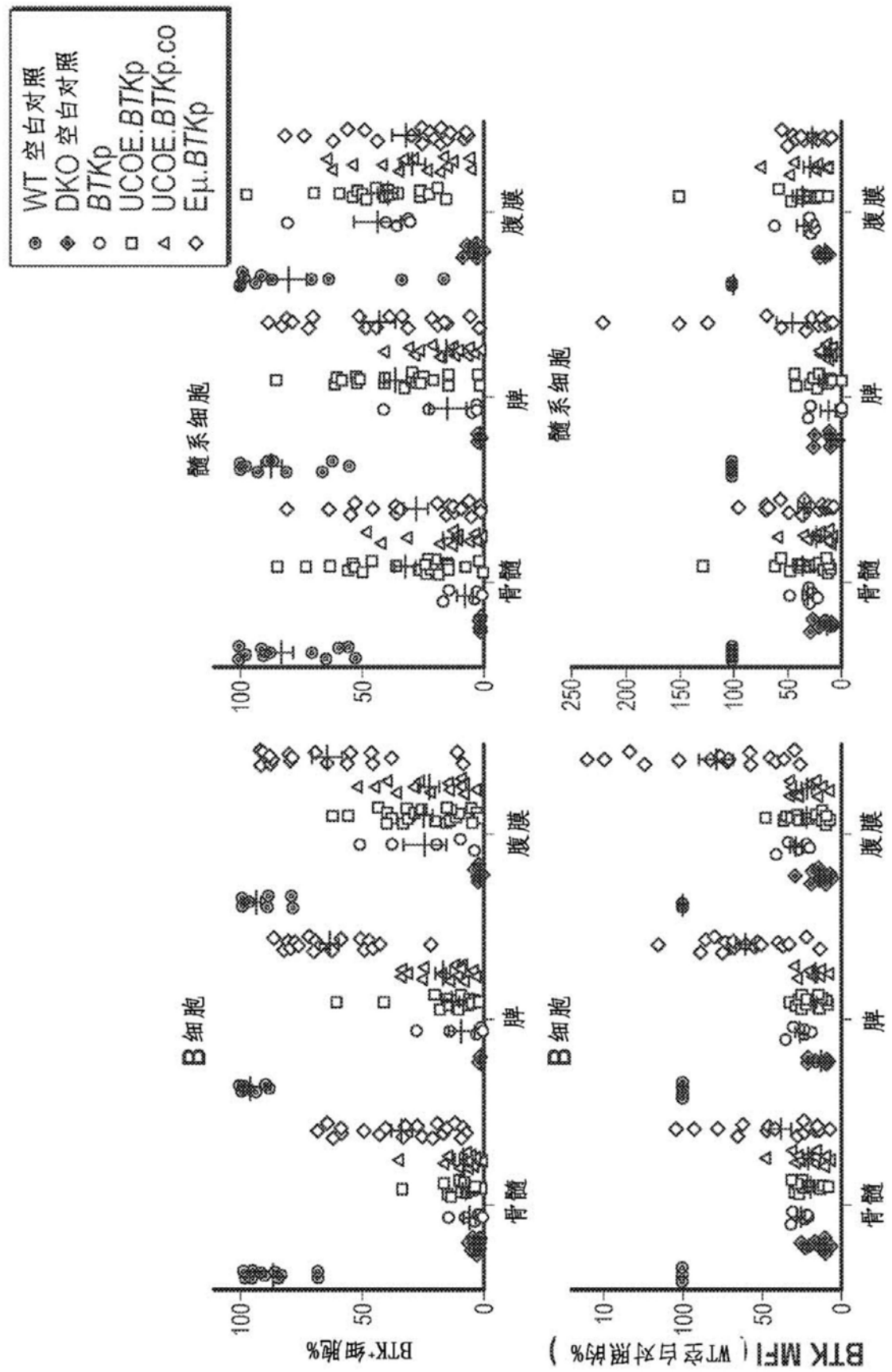


图32

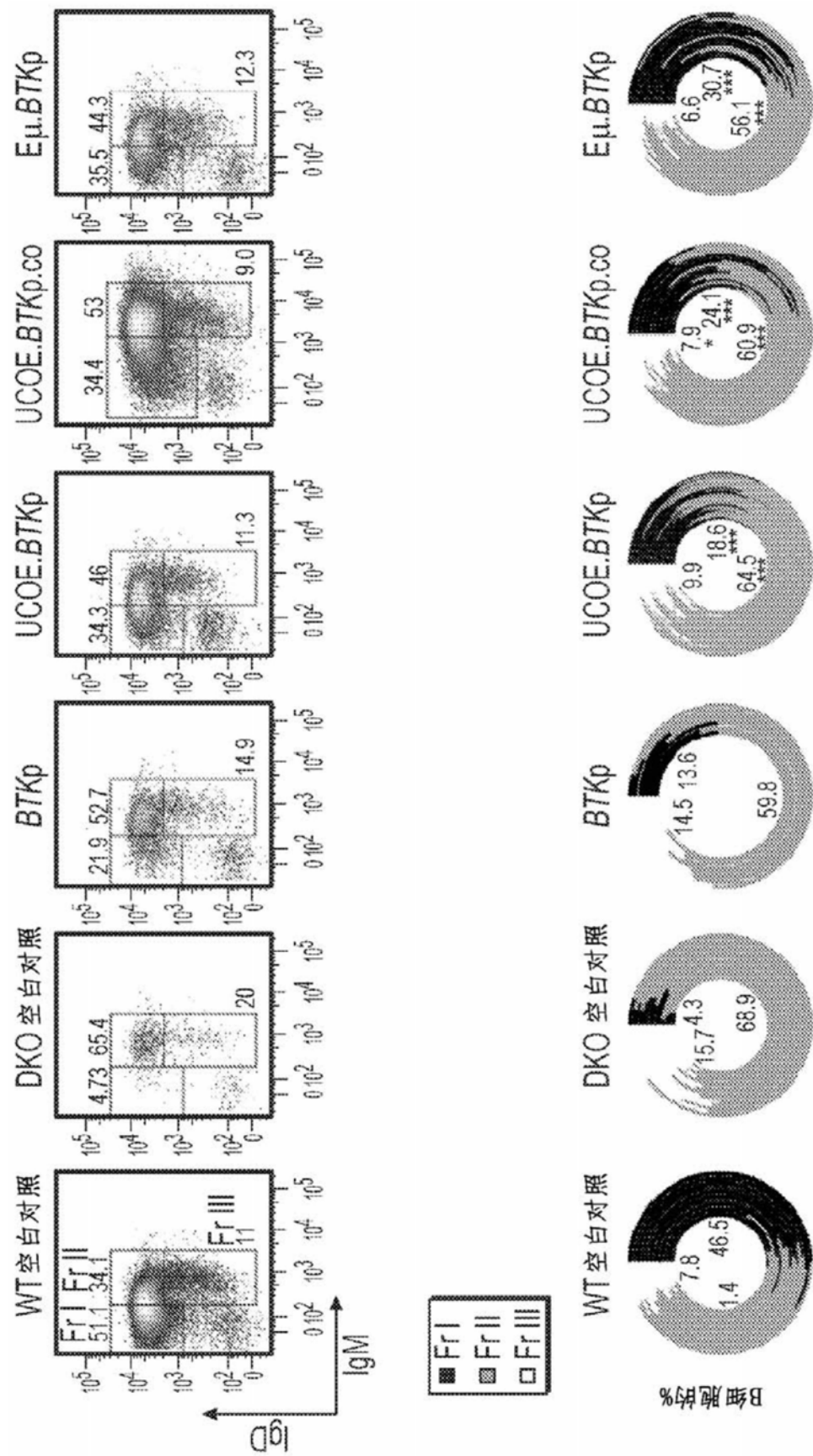
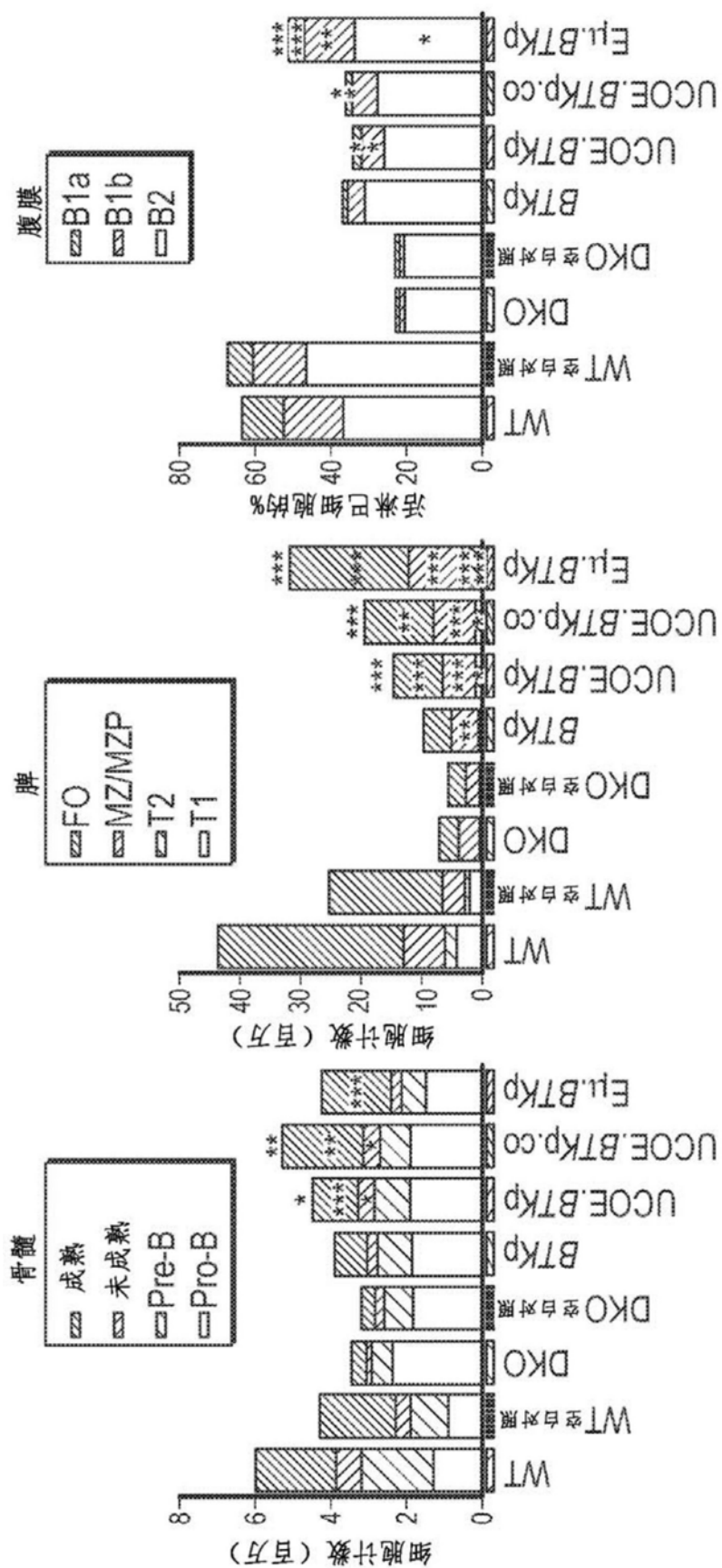


图33



每种WT或KO空白对照N~20-30, 每种LV构建体30-40接受者; >10 独立的实验队列

图34

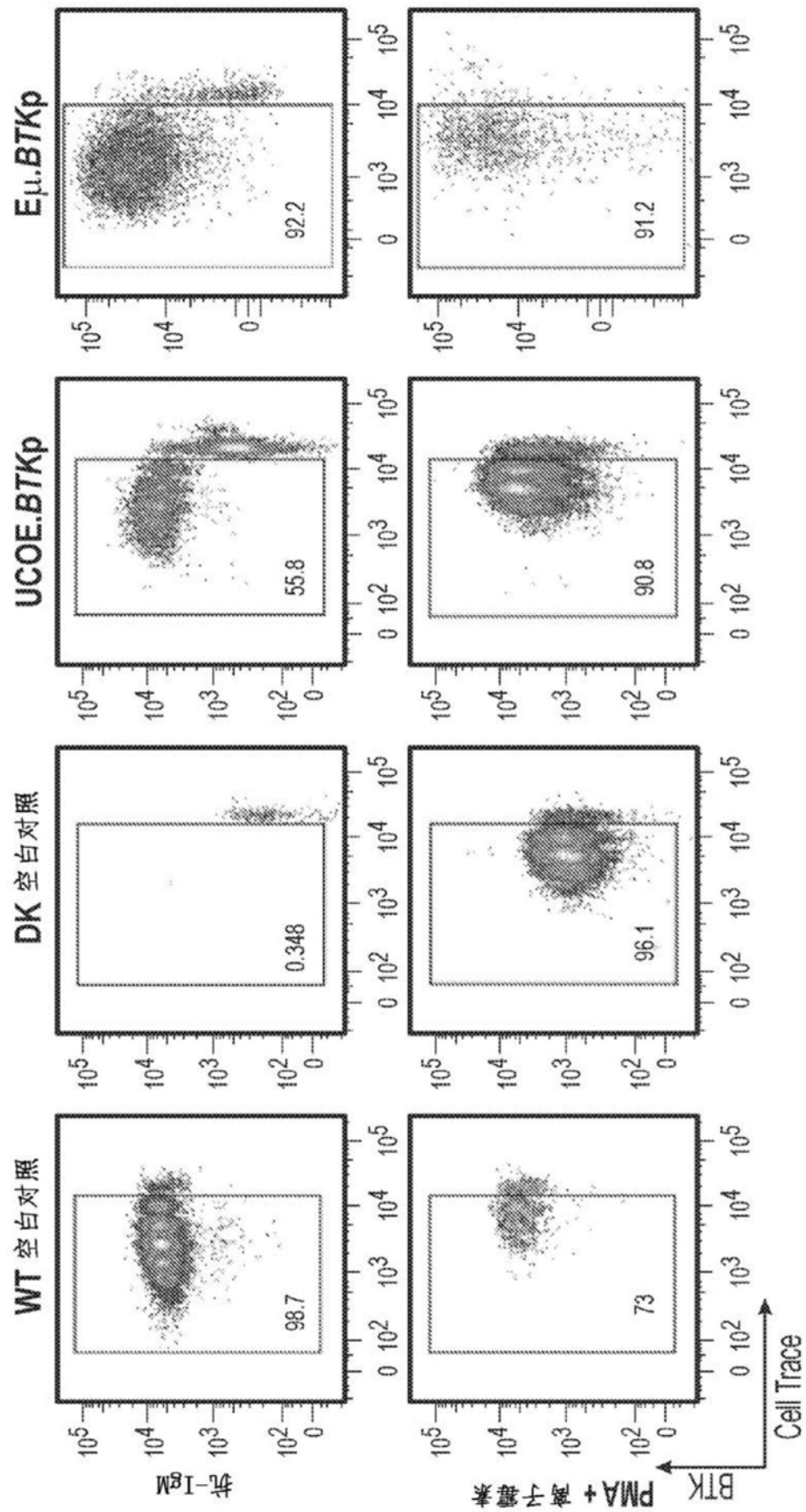


图35

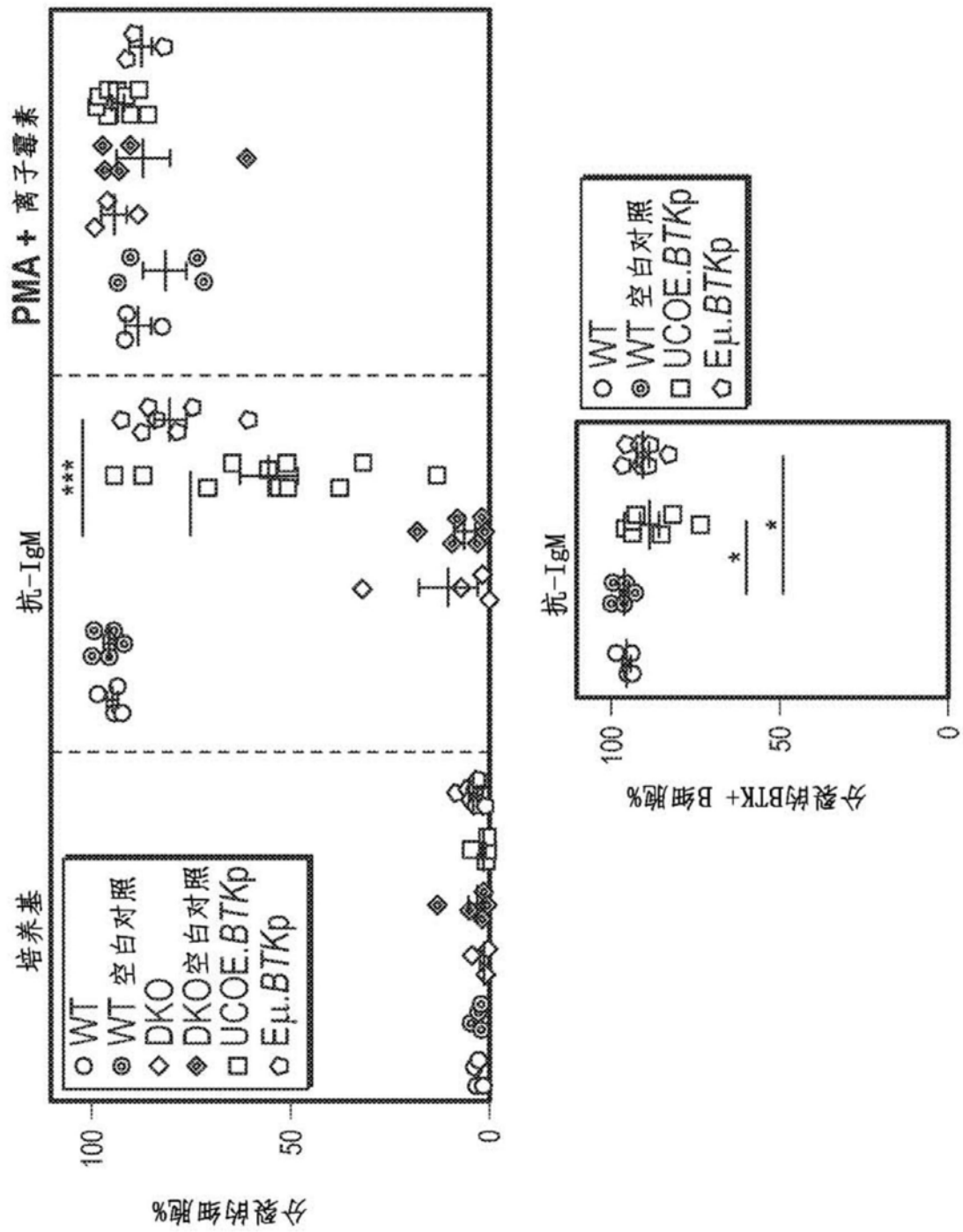


图36

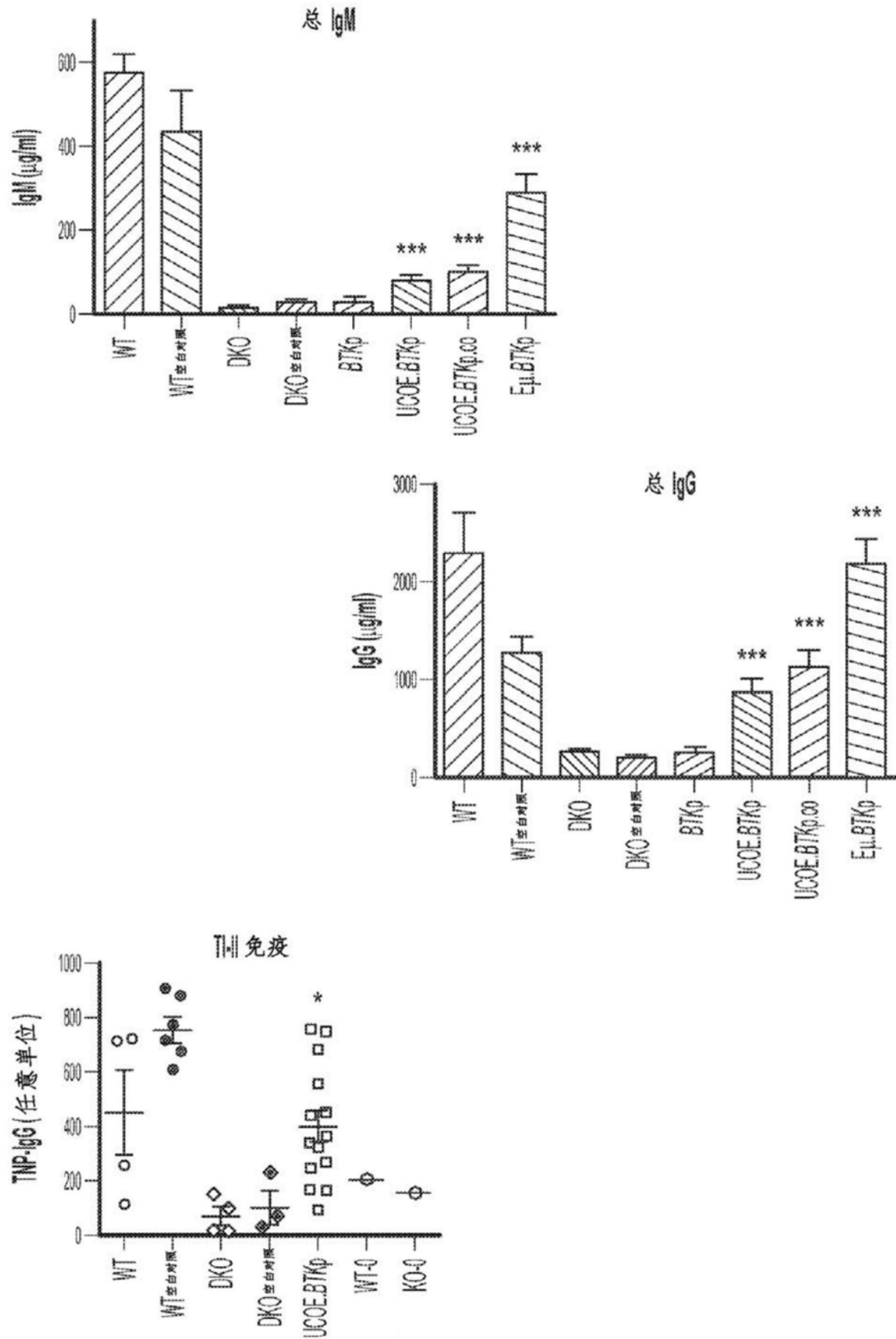


图37

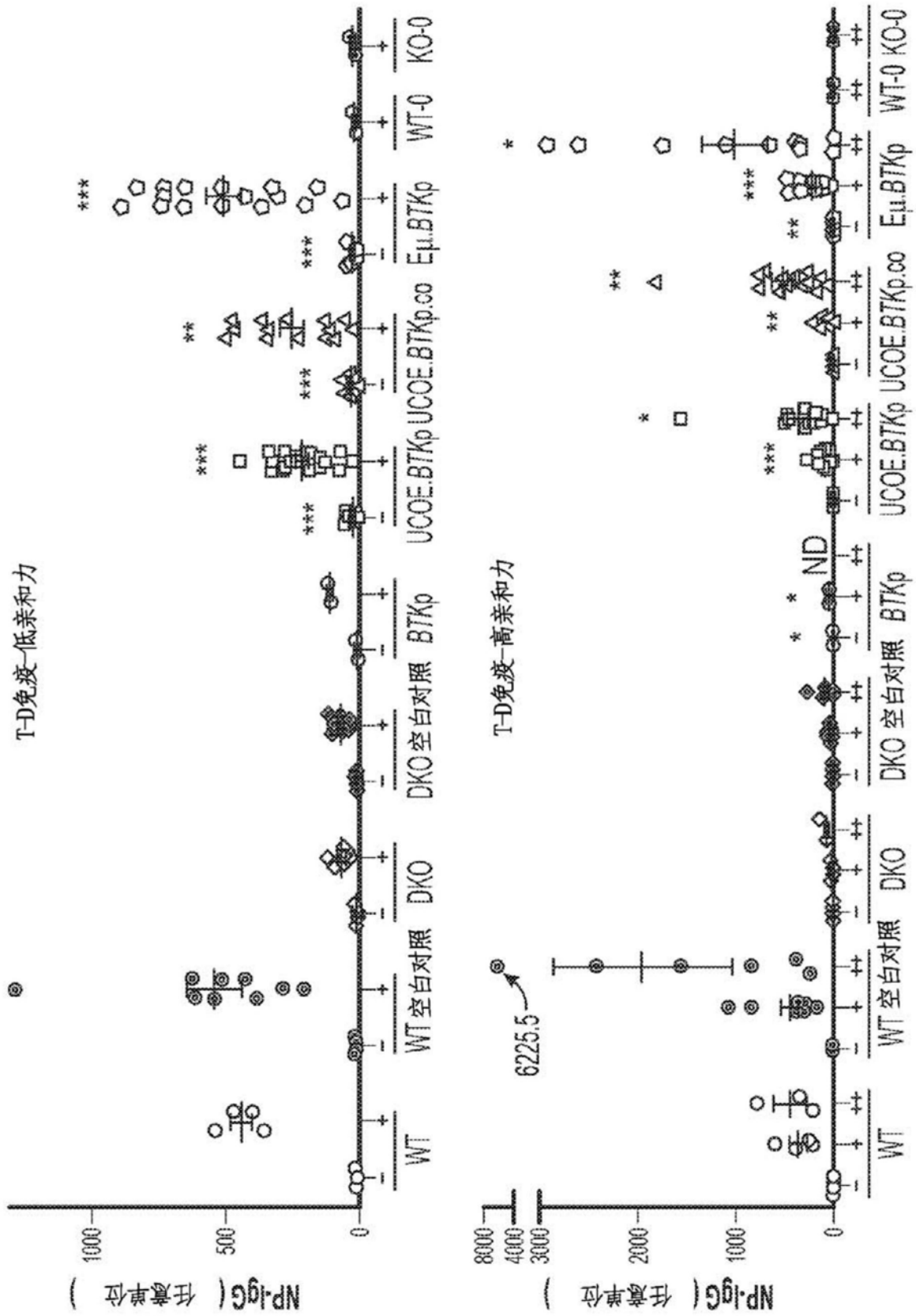


图38

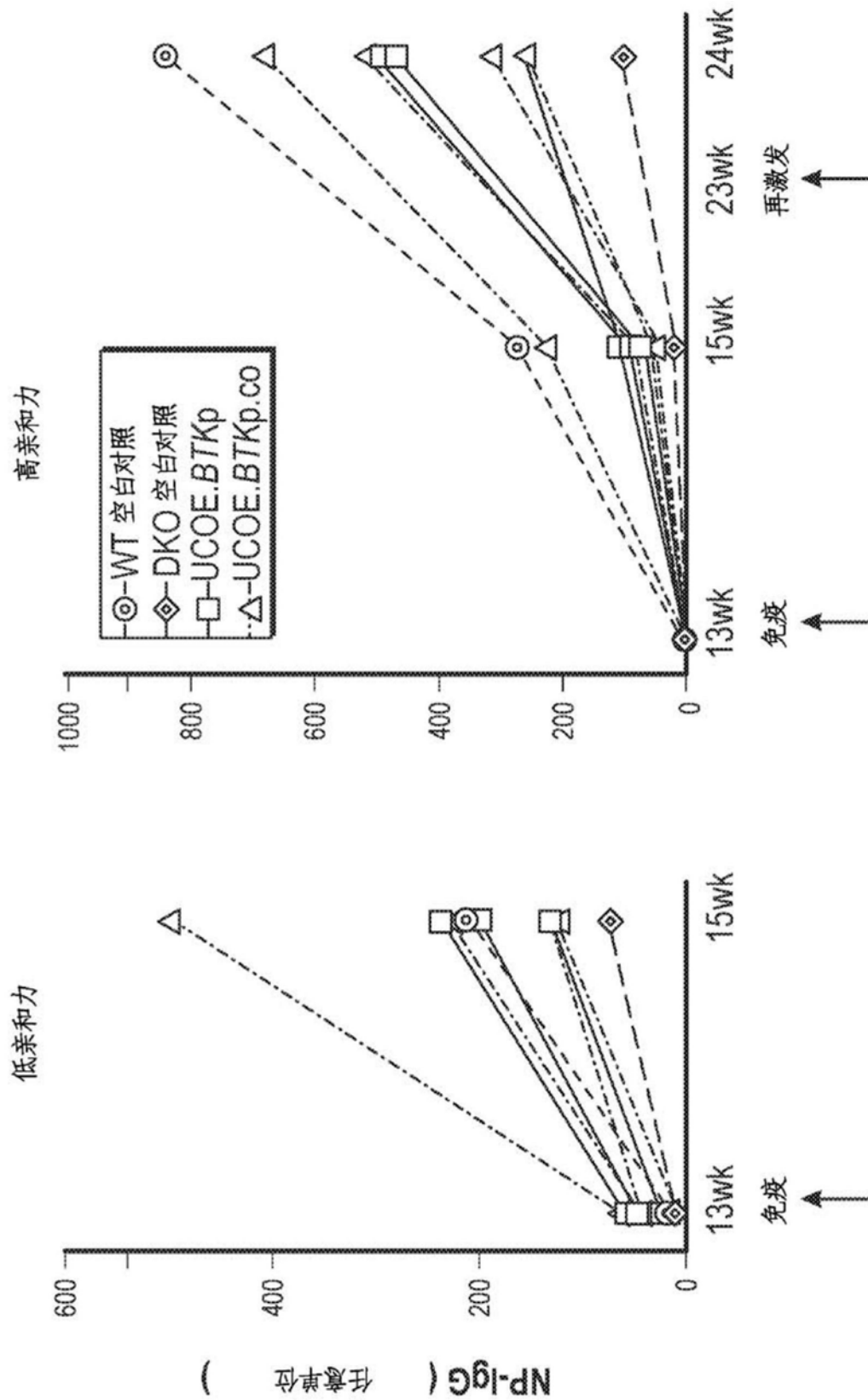


图39

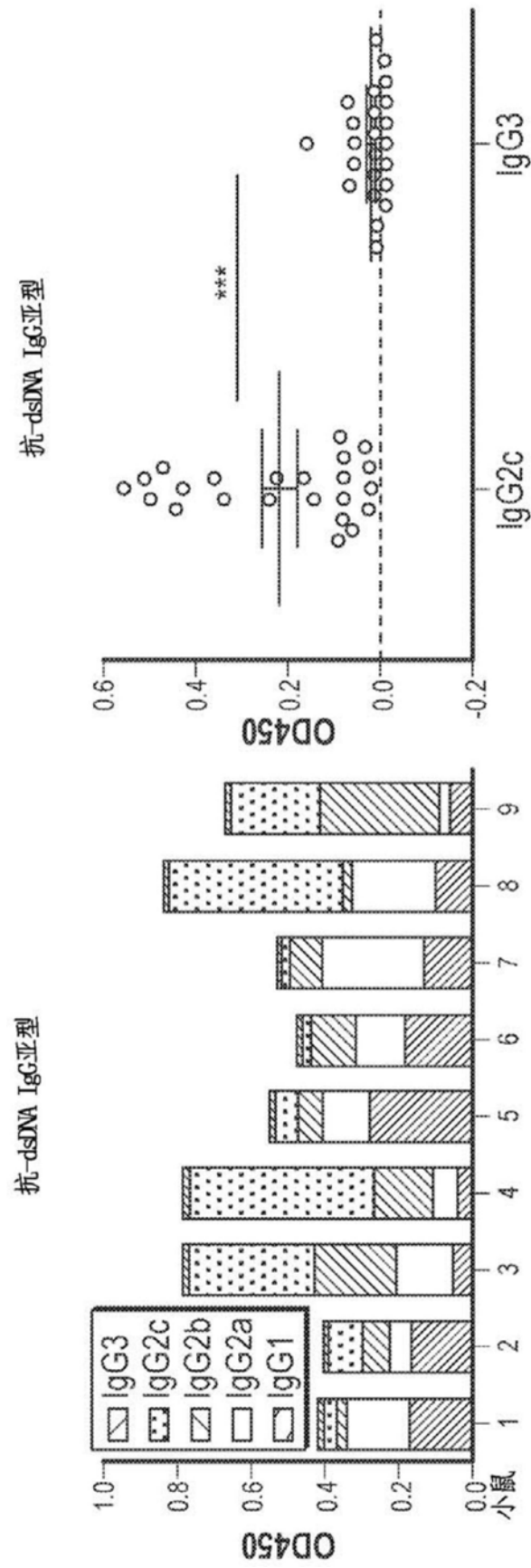


图40

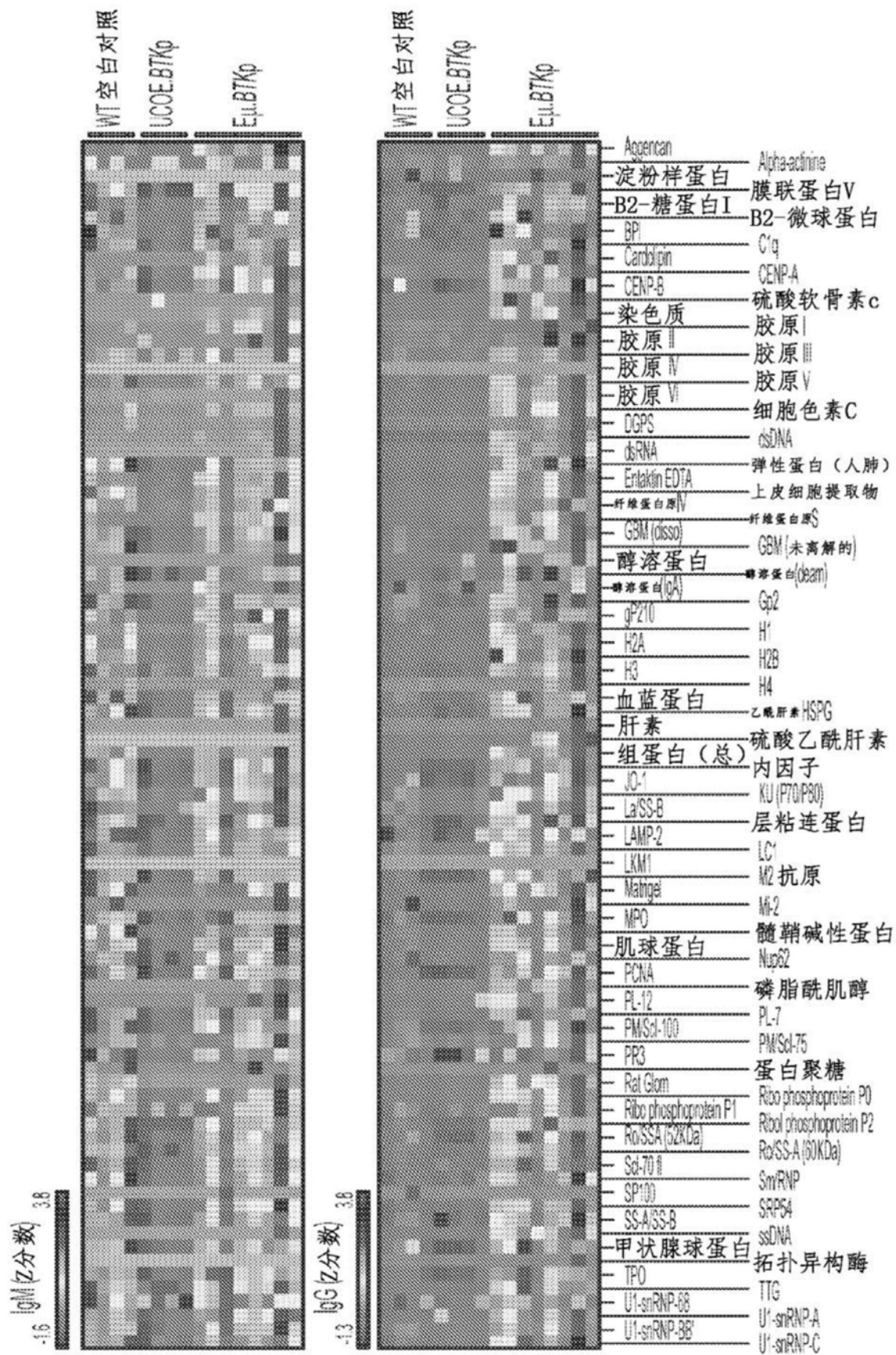


图41

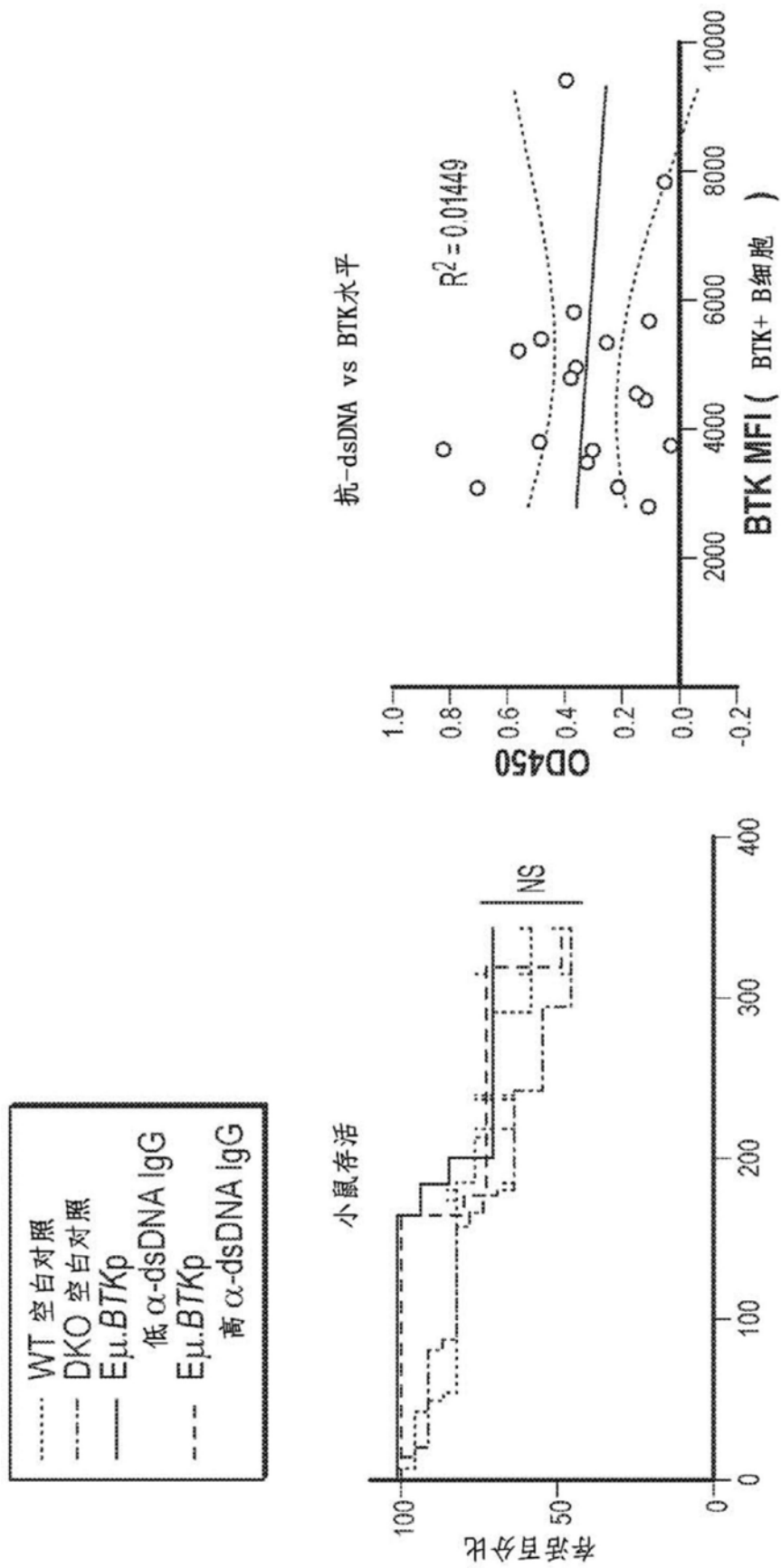


图42

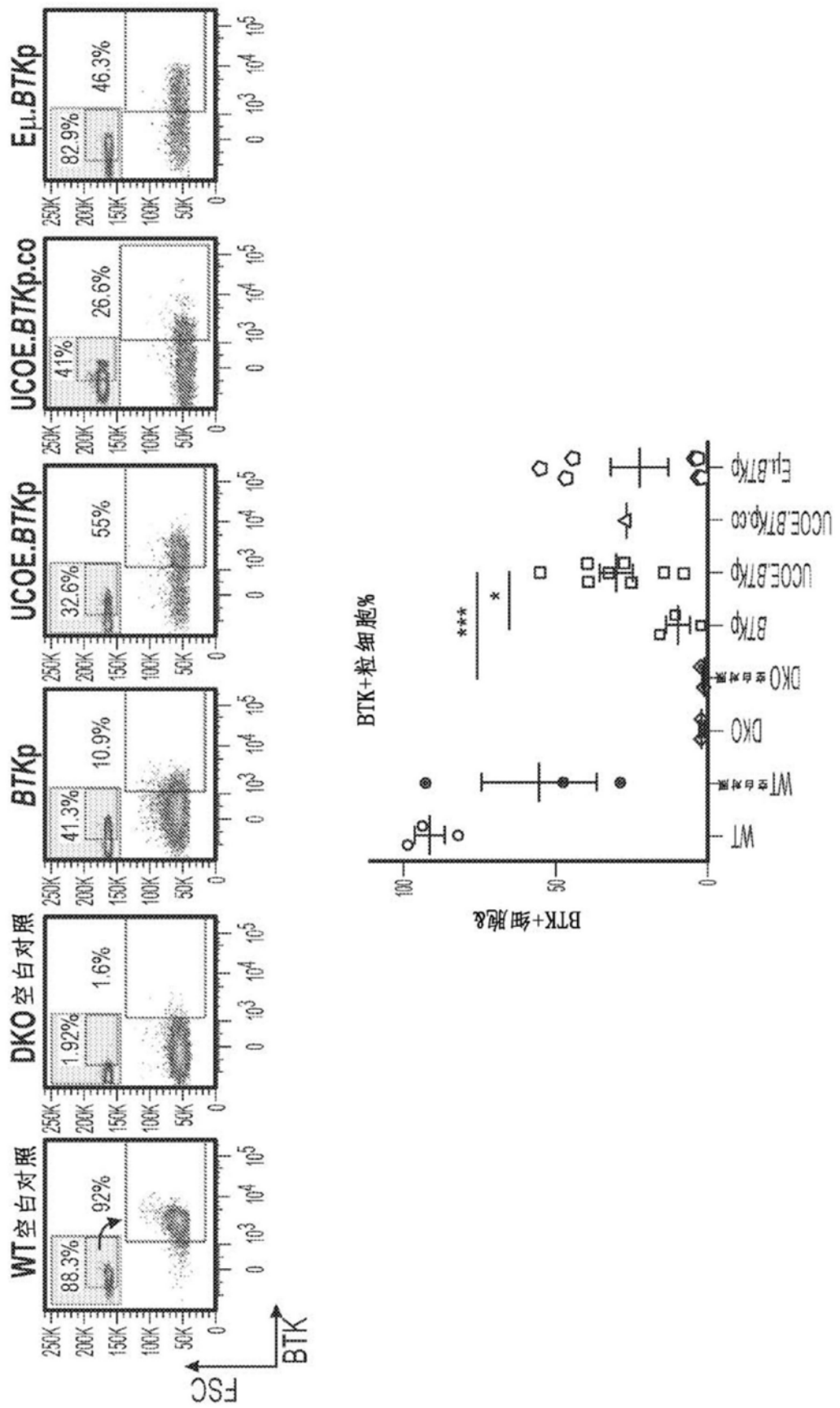


图43

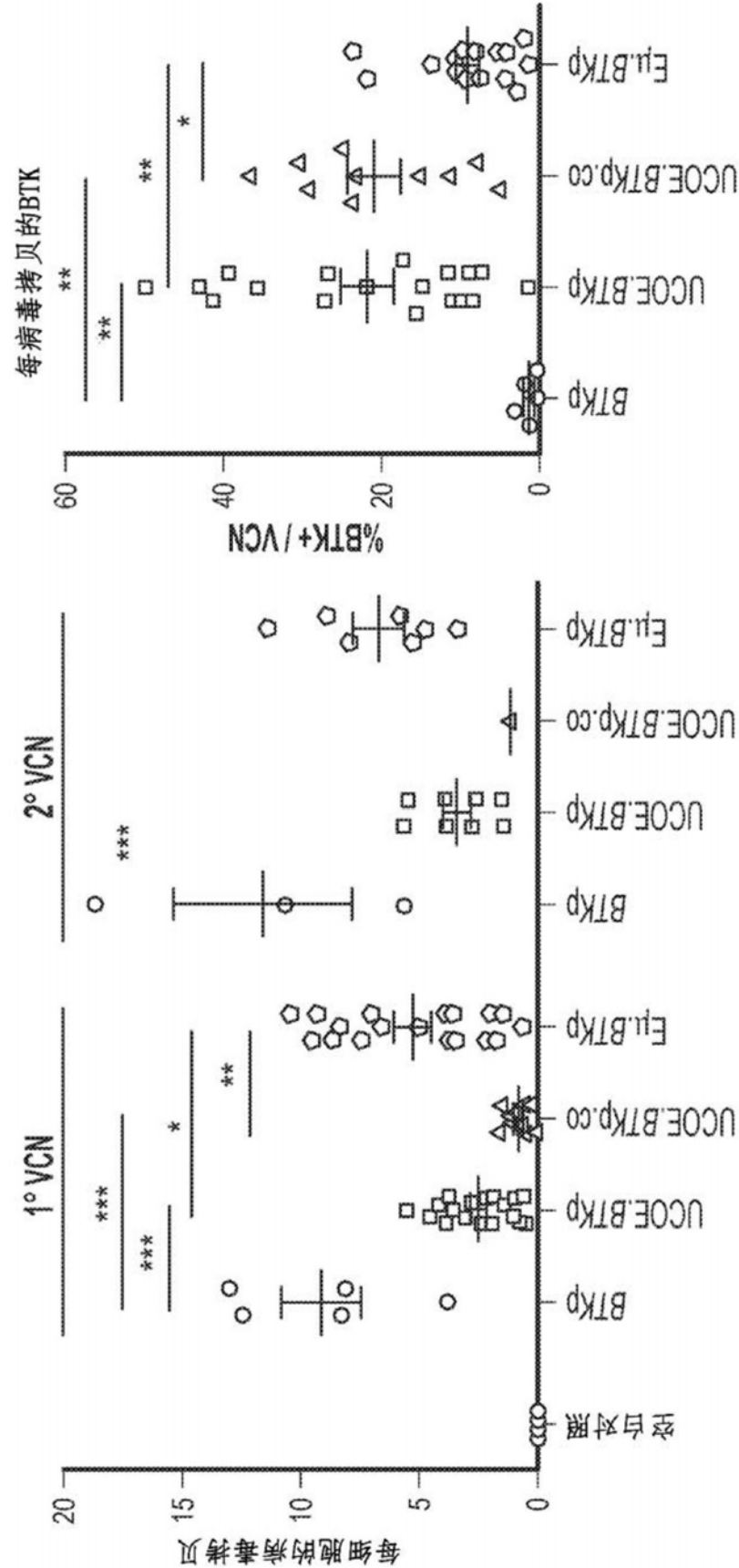


图44

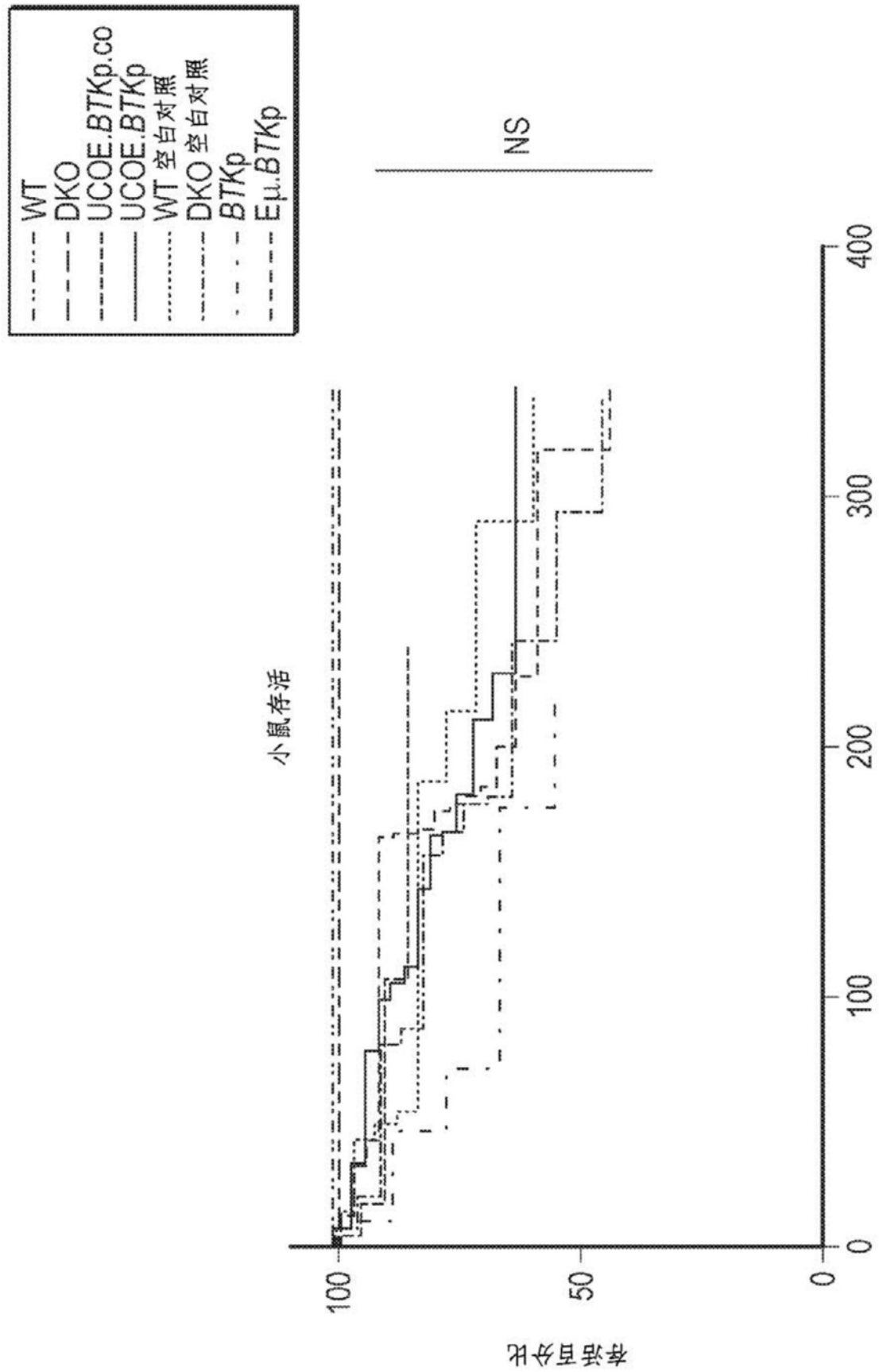


图45

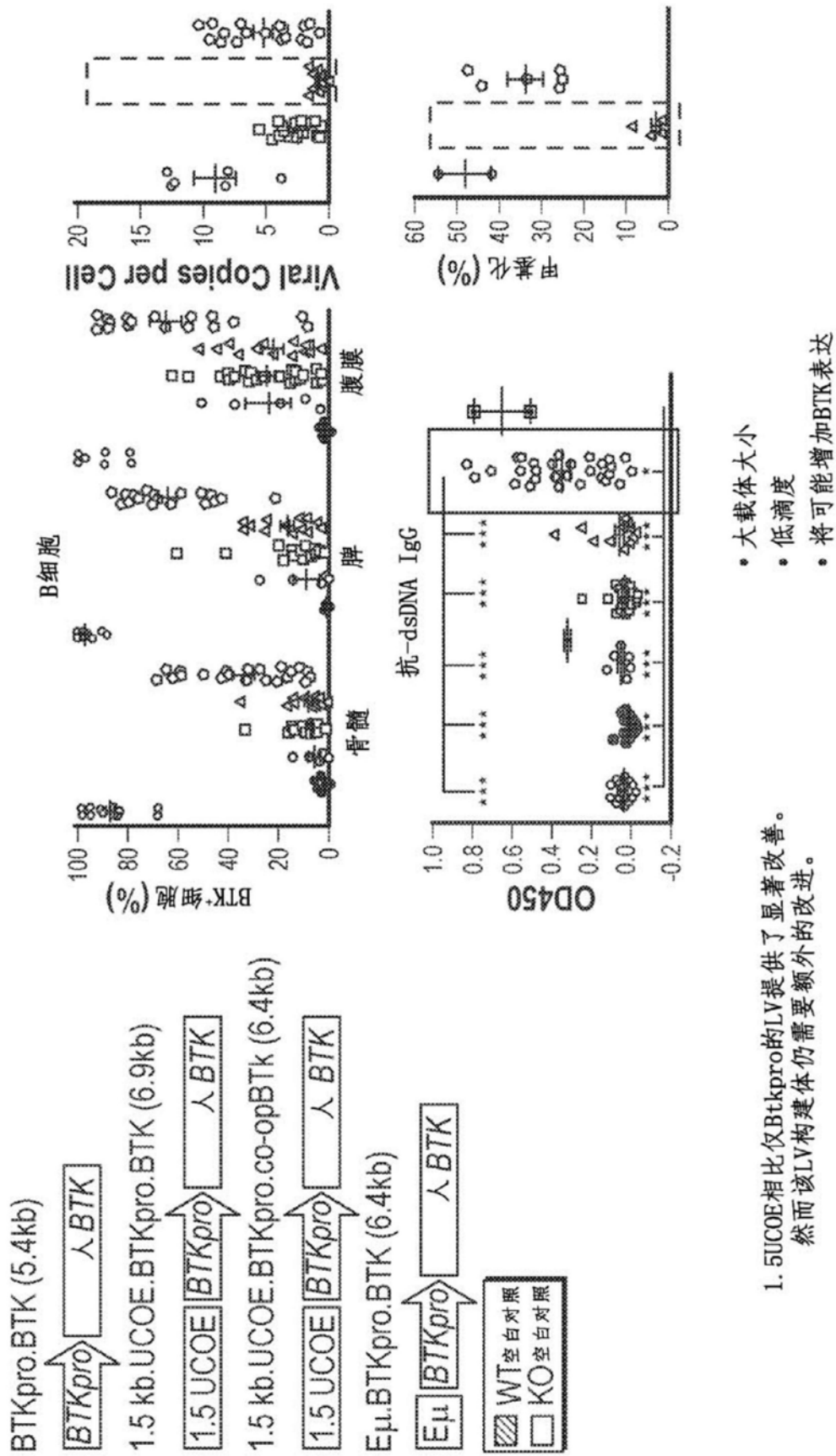


图46

0. 7UCOE. BTKp和0. 7UCOE. IE. BTKp挽救BTK表达和脾B细胞计数

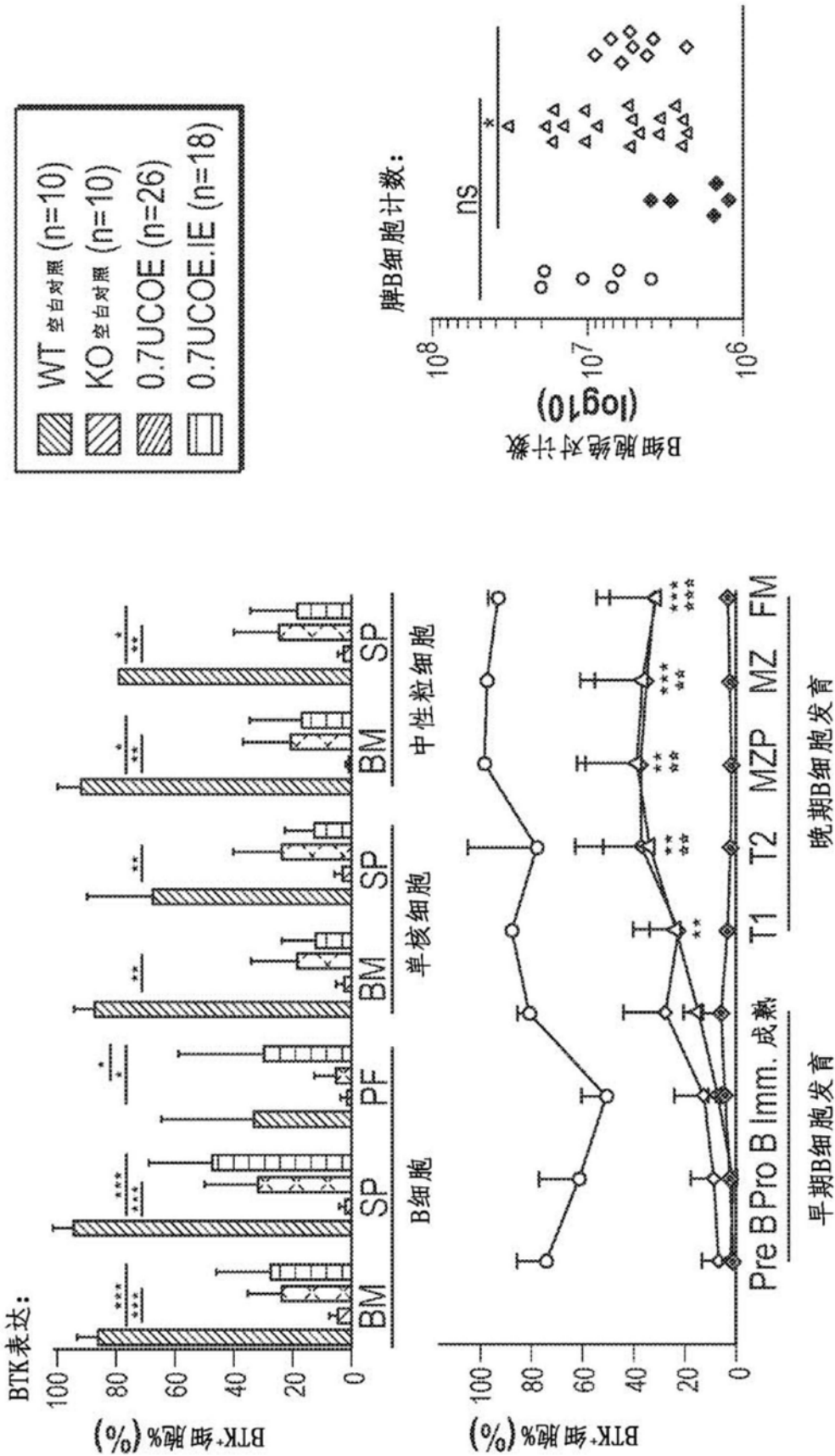


图47

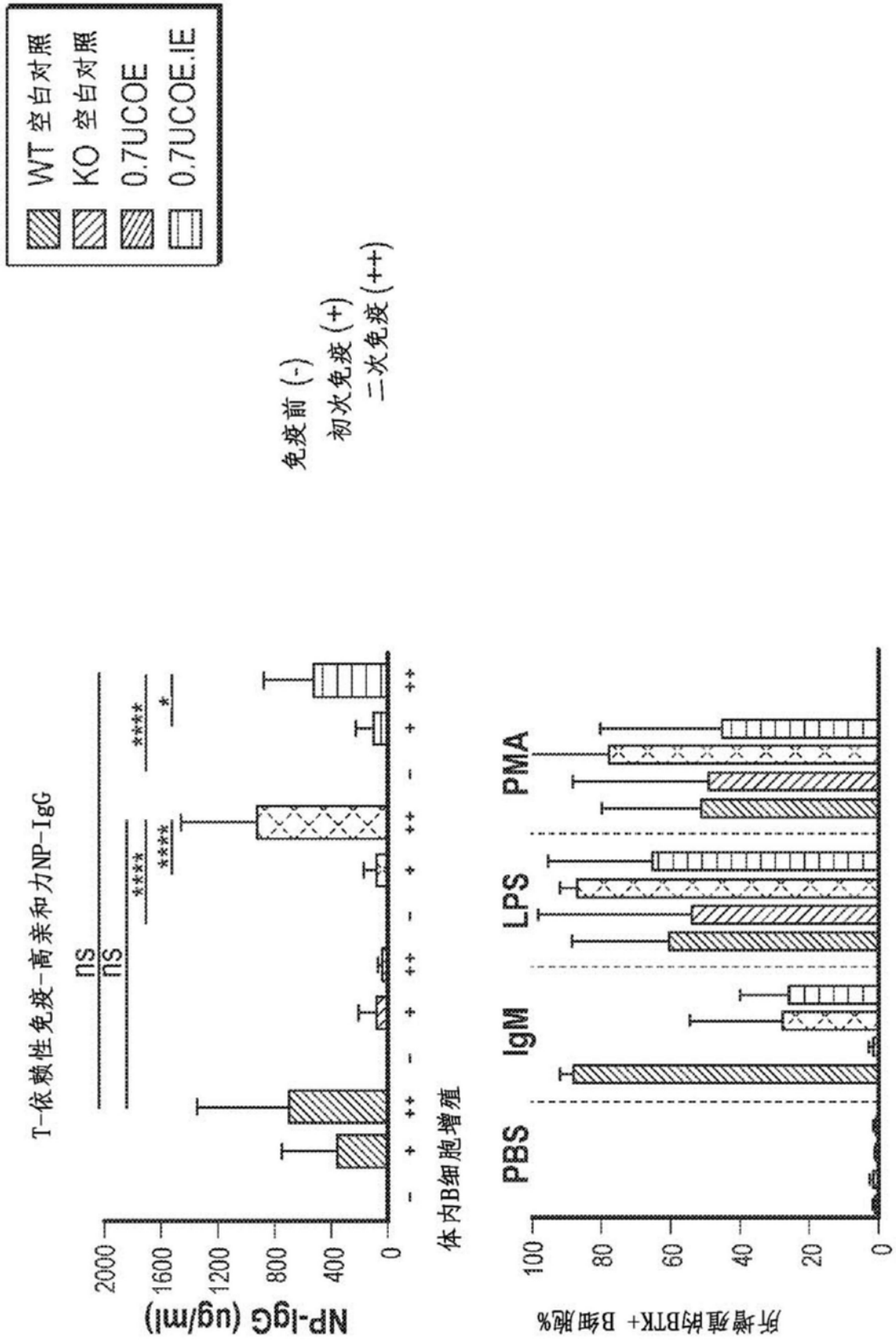
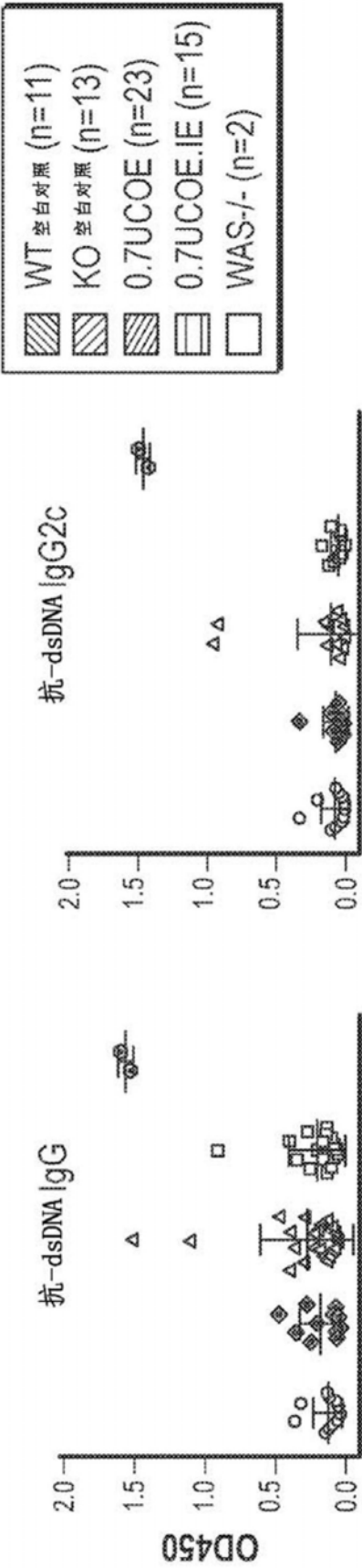


图48

与自身免疫对照（和先前的非Btk启动子载体）相比，0.7UCOE和0.7UCOE. IE均产生低自身抗体滴度：



0.7UCOE. IE以每细胞较少的病毒整合表现出类似的功效：

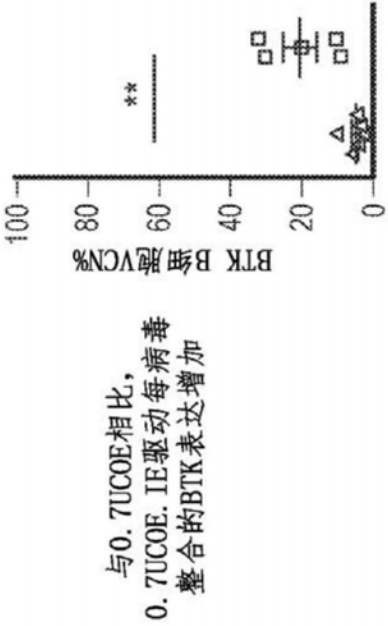
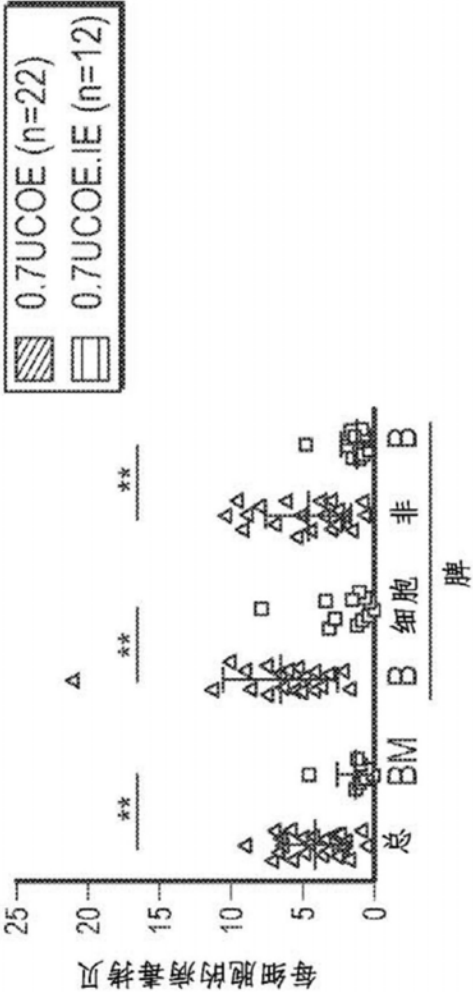
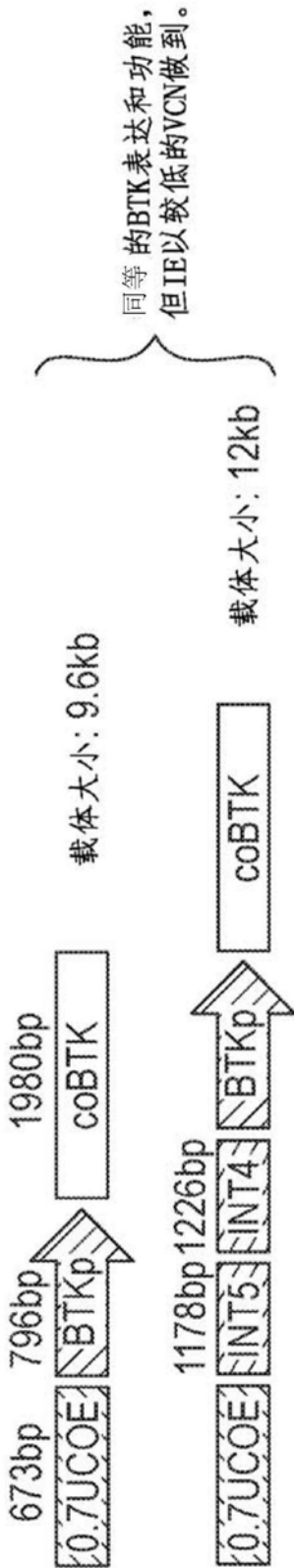


图49

具有DNase超敏位点的新BTK构建体的开发和测试



接下来的步骤:

- 截短内含子增强子元件
- 使用更新的ENCODE数据库鉴别用于测试的其它保守增强子元件

图50

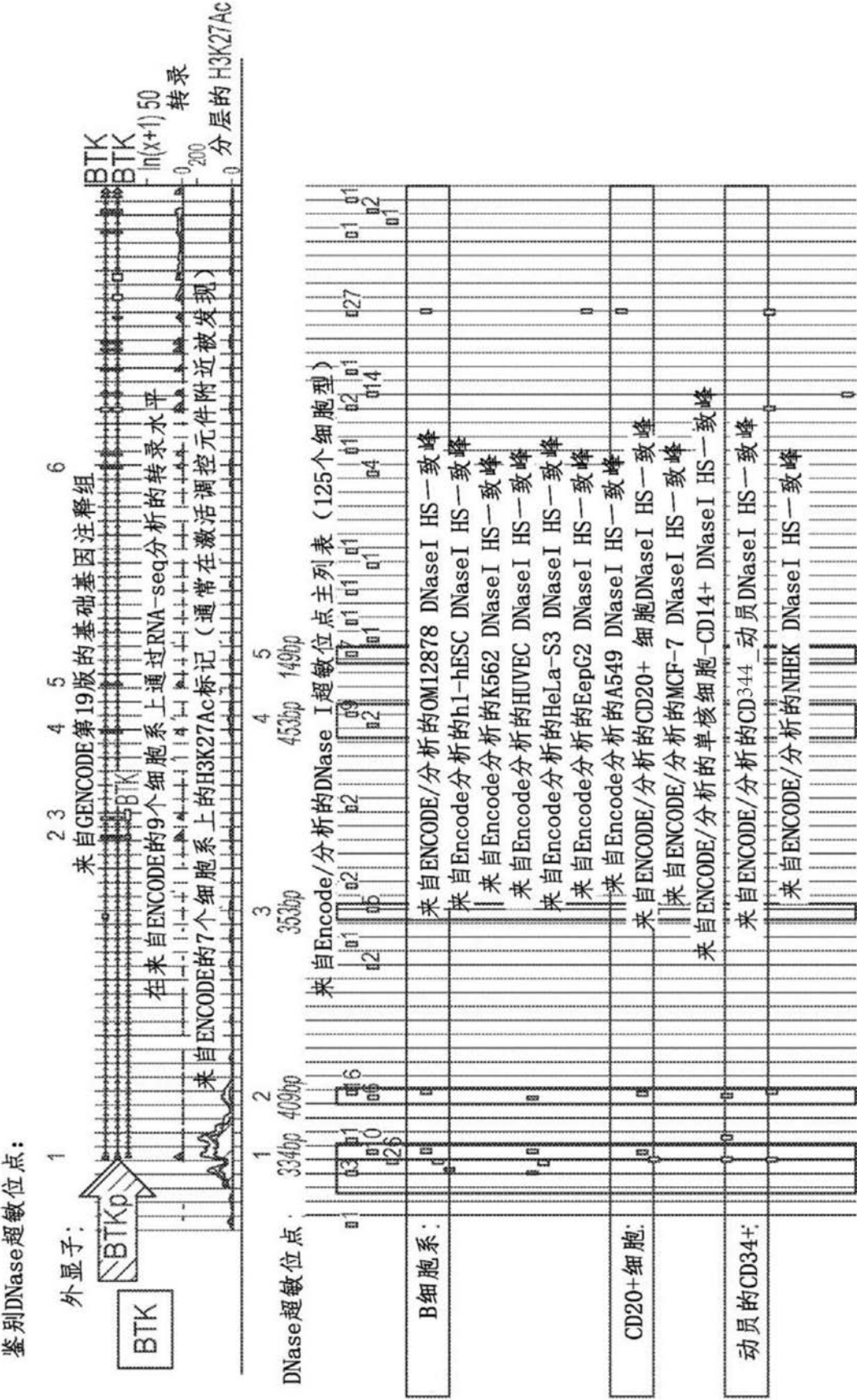


图51-1

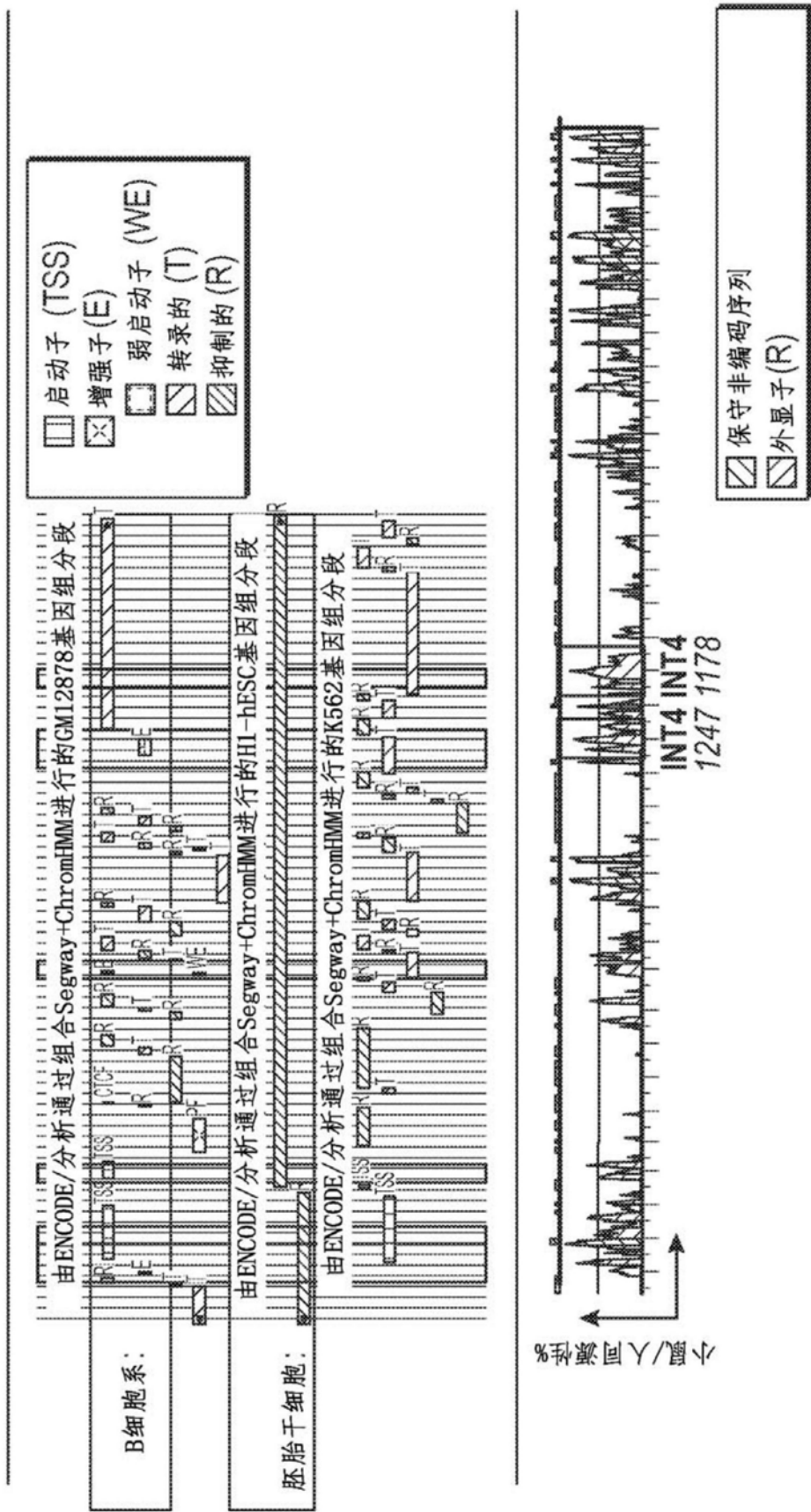


图51-2

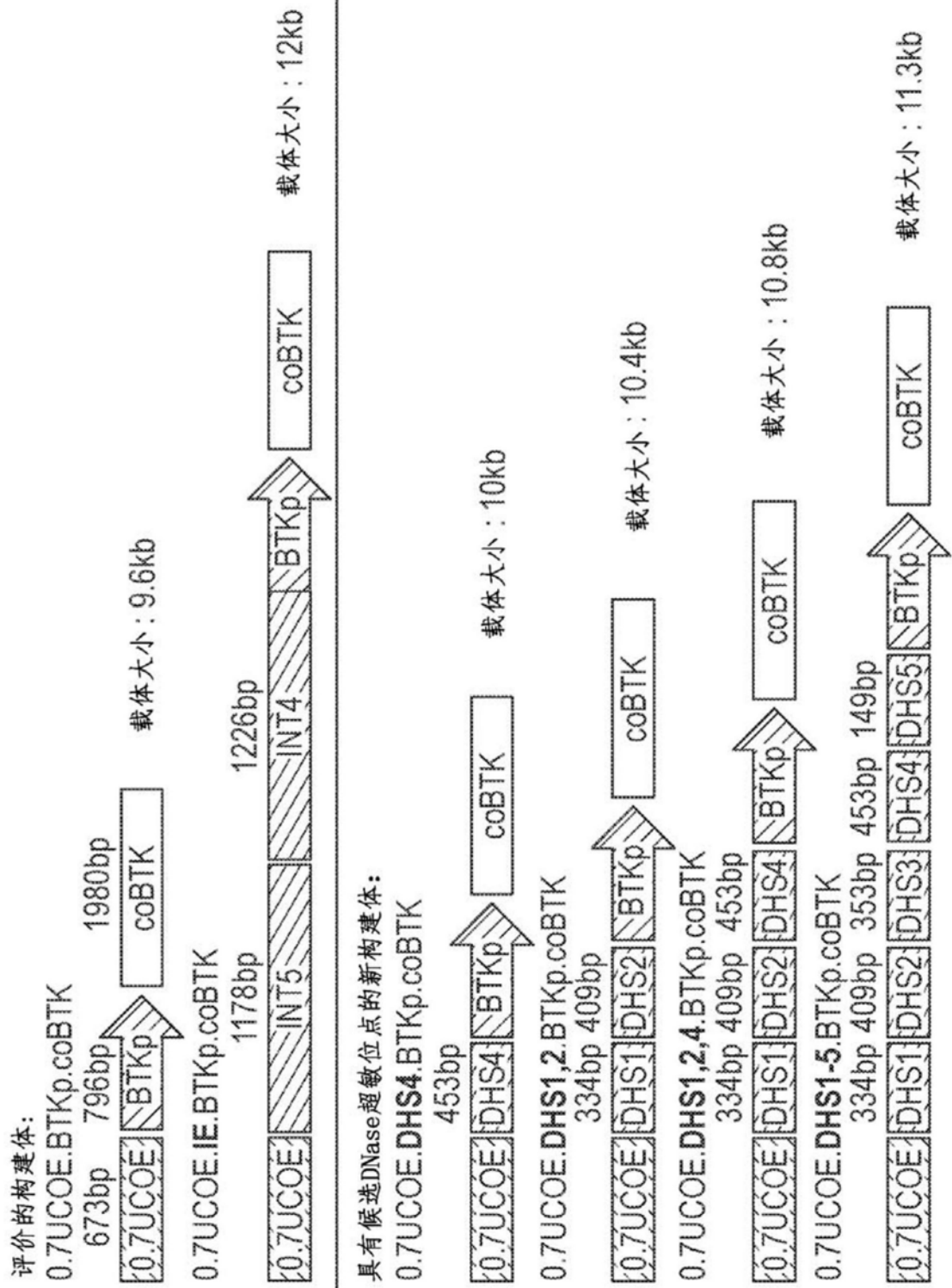


图52

DHS构建体和0.7UCOE及0.7UCOE. IE的体内比较

- 实验#10设置：每1×10⁶细胞40 μl病毒（希望得到匹配的VCN），过夜转导。
- 将1×10⁶细胞/条件R0注射到TBKBP小鼠中（移植前900rad辐照）

LV载体	添加体积	滴度	小鼠的#
 0.7UCOE.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	1.31E+08	4
 0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	1.14E+08	4
 0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	4.11E+07	4
 0.7UCOE.DHS1,2.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	1.18E+08	4
 0.7UCOE.DHS1,2,4.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	4.29E+07	3
 0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTK	每1×10 ⁶ 细胞40 μl	9.86E+07	3
 KO 空白对照/WT 空白对照			2 对于每种

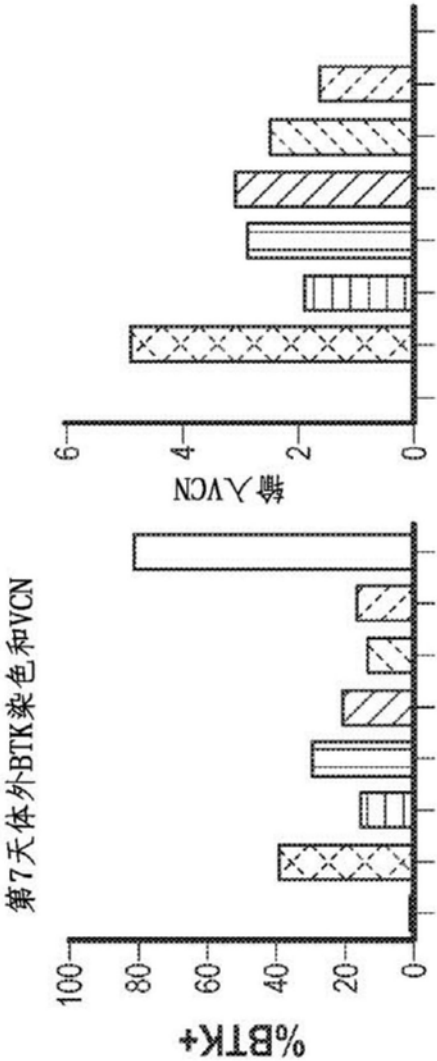


图53

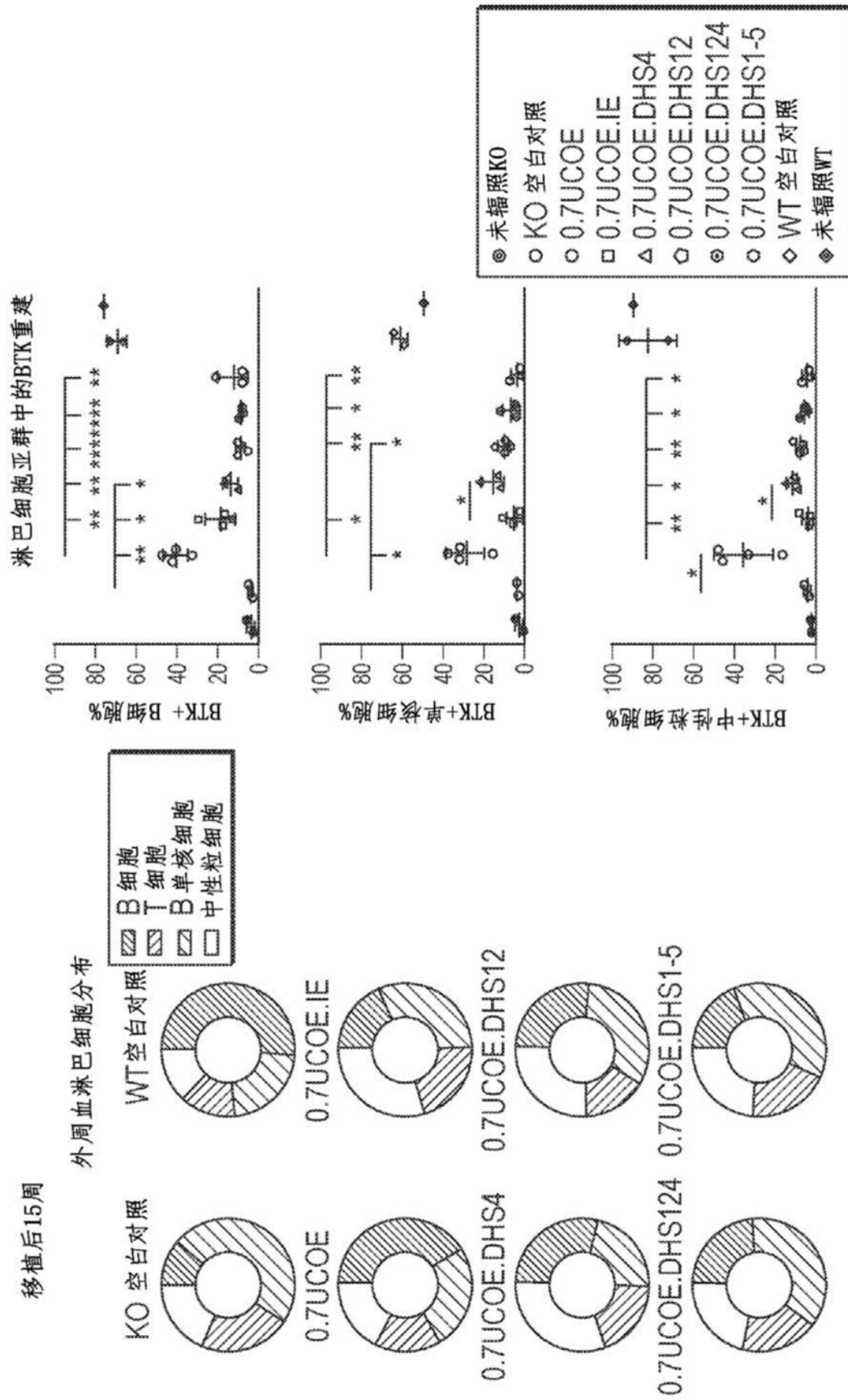


图54

BTK Exp #10 总结:

- 比较UCOE和IE与新DHS构建体
- 体积匹配40 μl病毒/百万细胞
- 本实验使用的病毒具有比Exp#12低的滴度

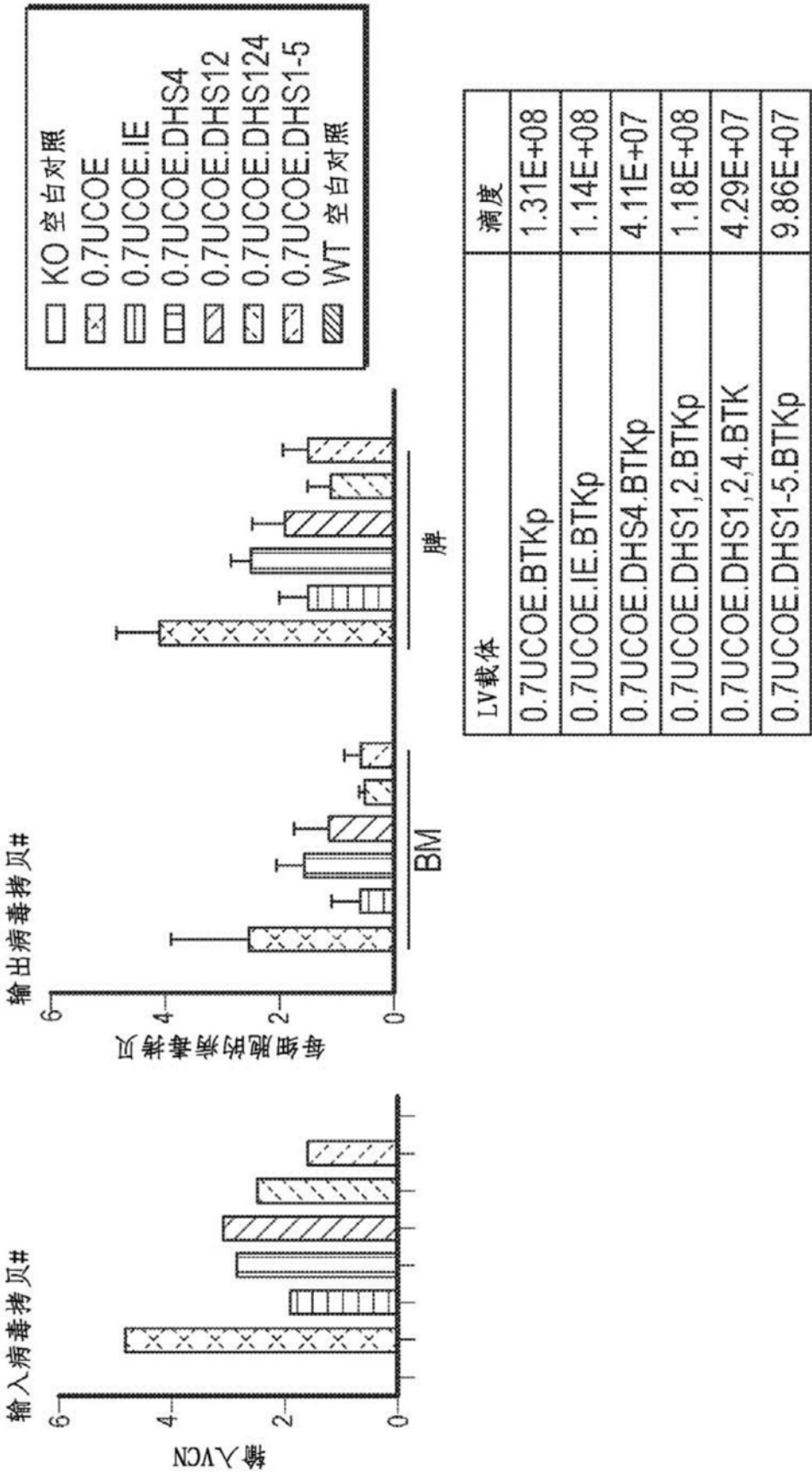


图55

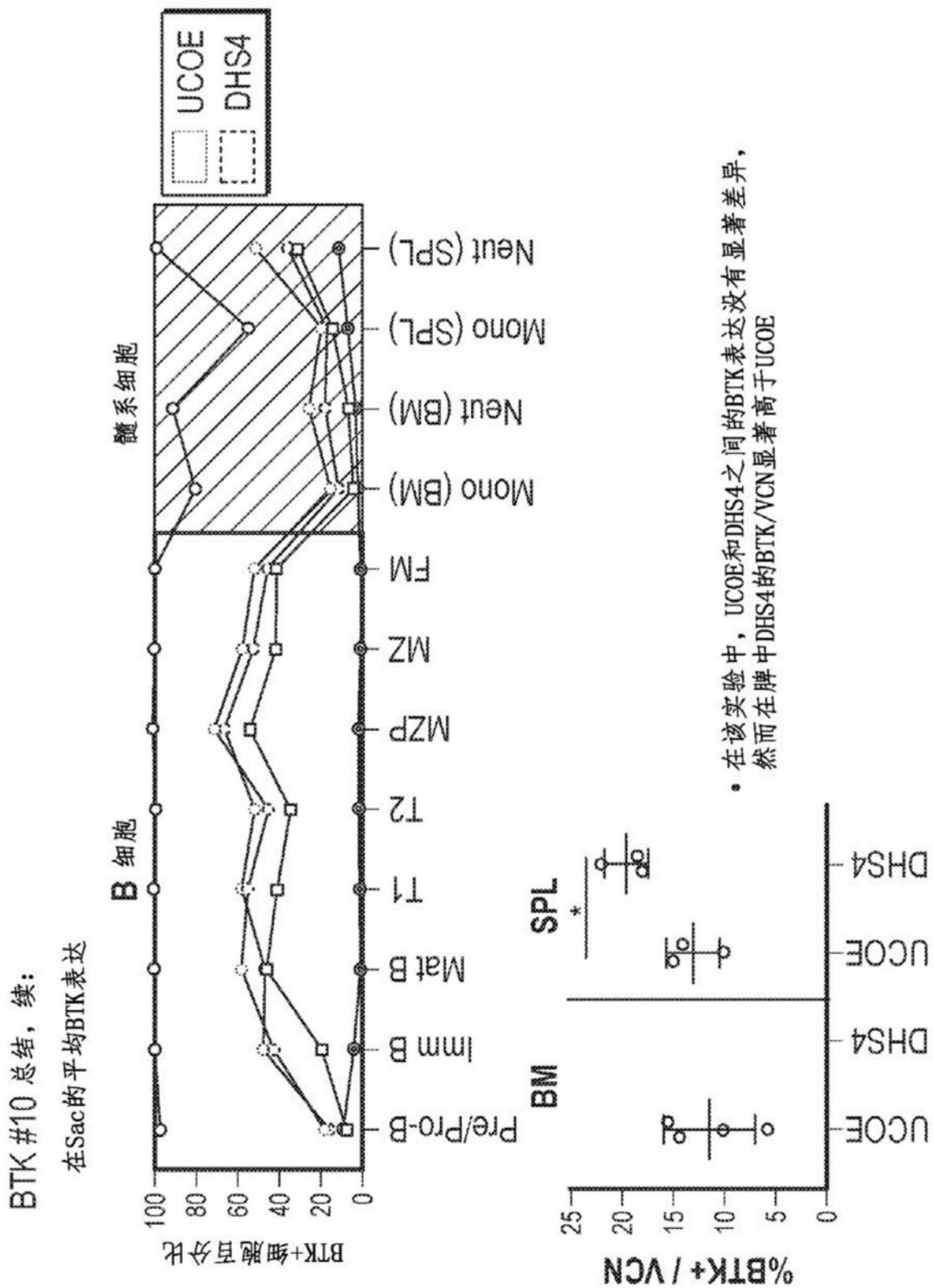


图56

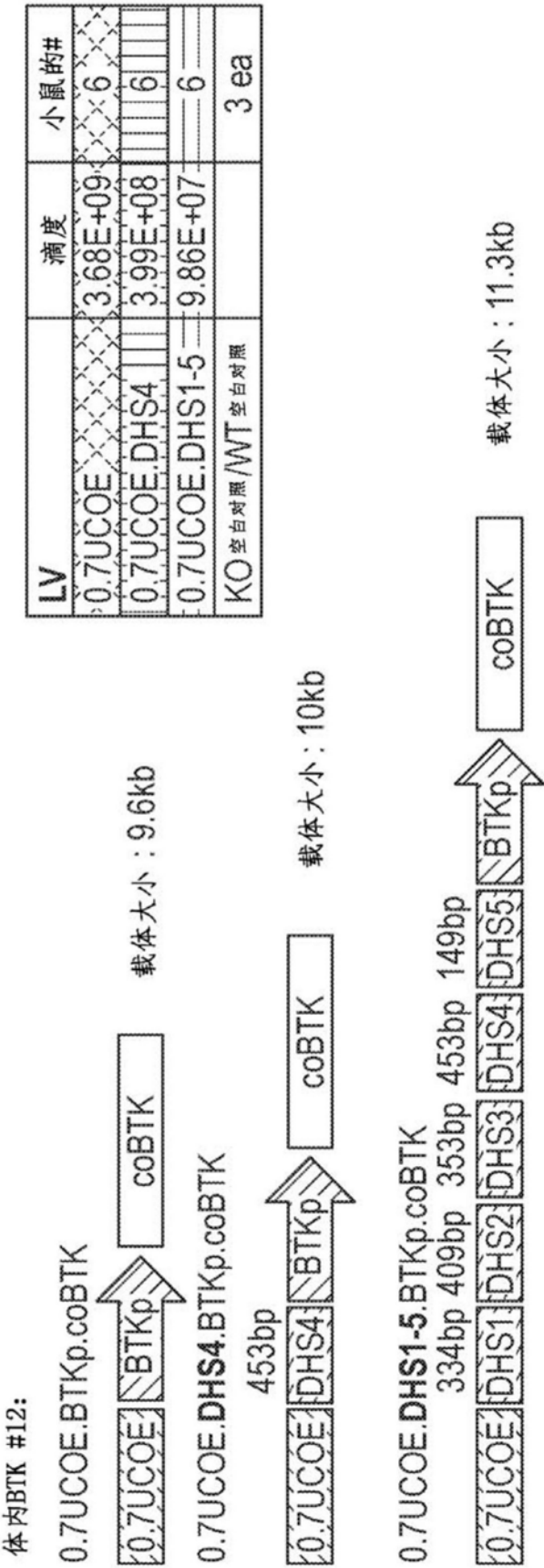


图57-1

实验设置:

- 从TBK供体小鼠收获的Lin细胞
- 转导:
 - 匹配体积: 10 μ l/百万细胞 (目标: 如体外测试所预测的, 匹配的输出VCN ~3)
 - 16hr 转导, SCGM转导培养基 (mSCF, mTPO) + 凝聚胶中 4×10^6 细胞/ml
 - 移植 1.5×10^6 细胞/小鼠 (接受者: TBK, 900rad辐照)

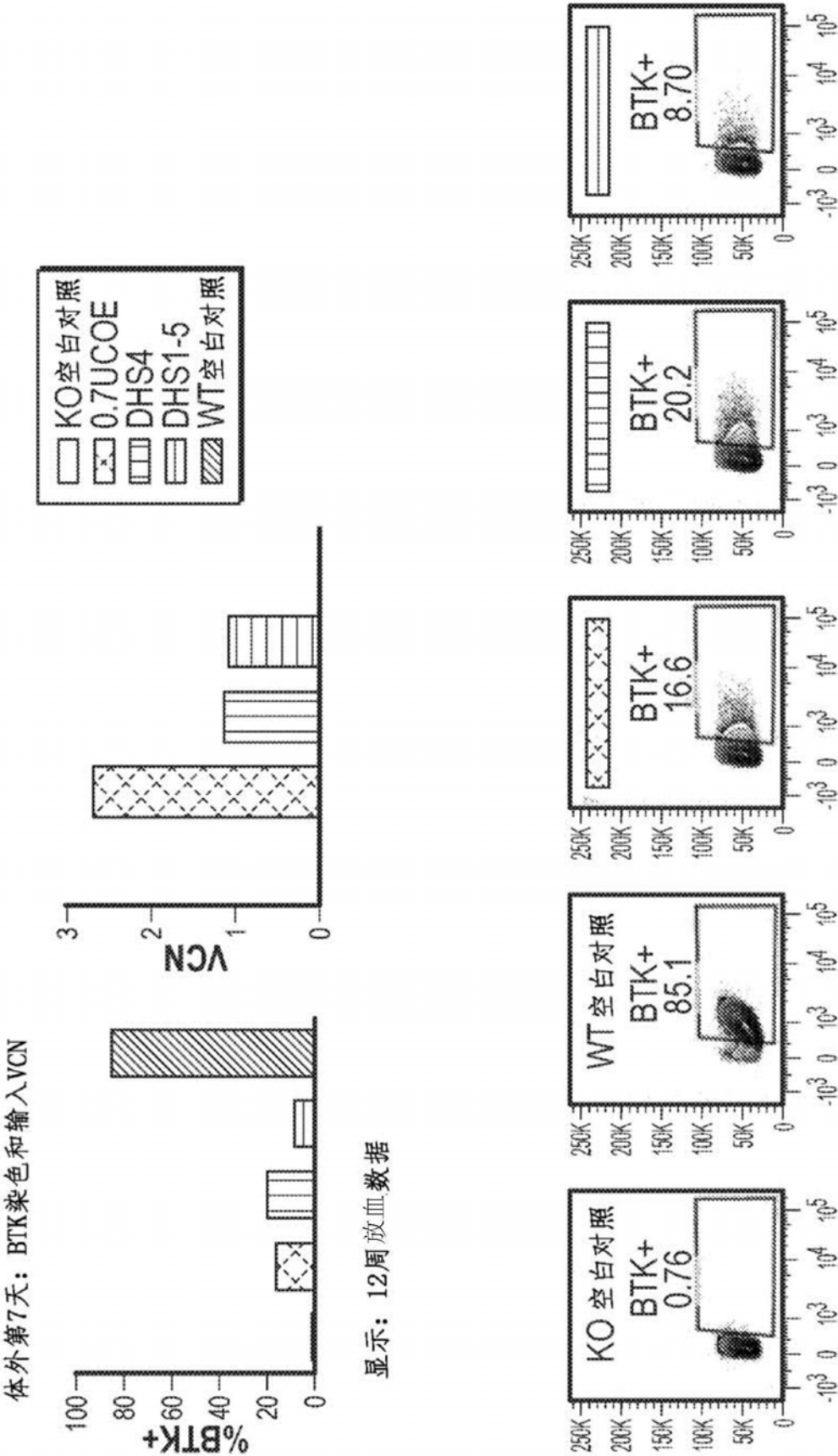


图57-2

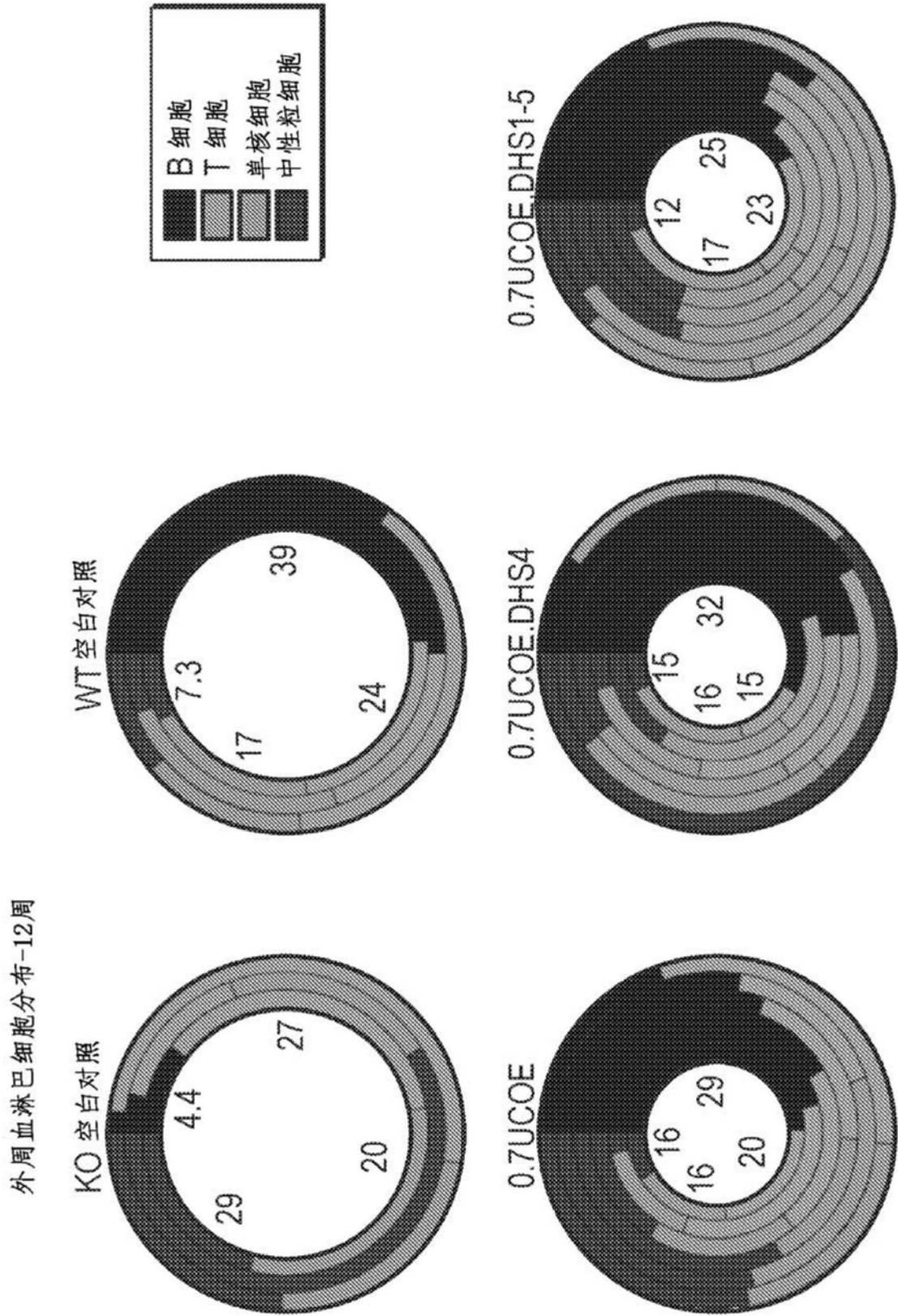


图58

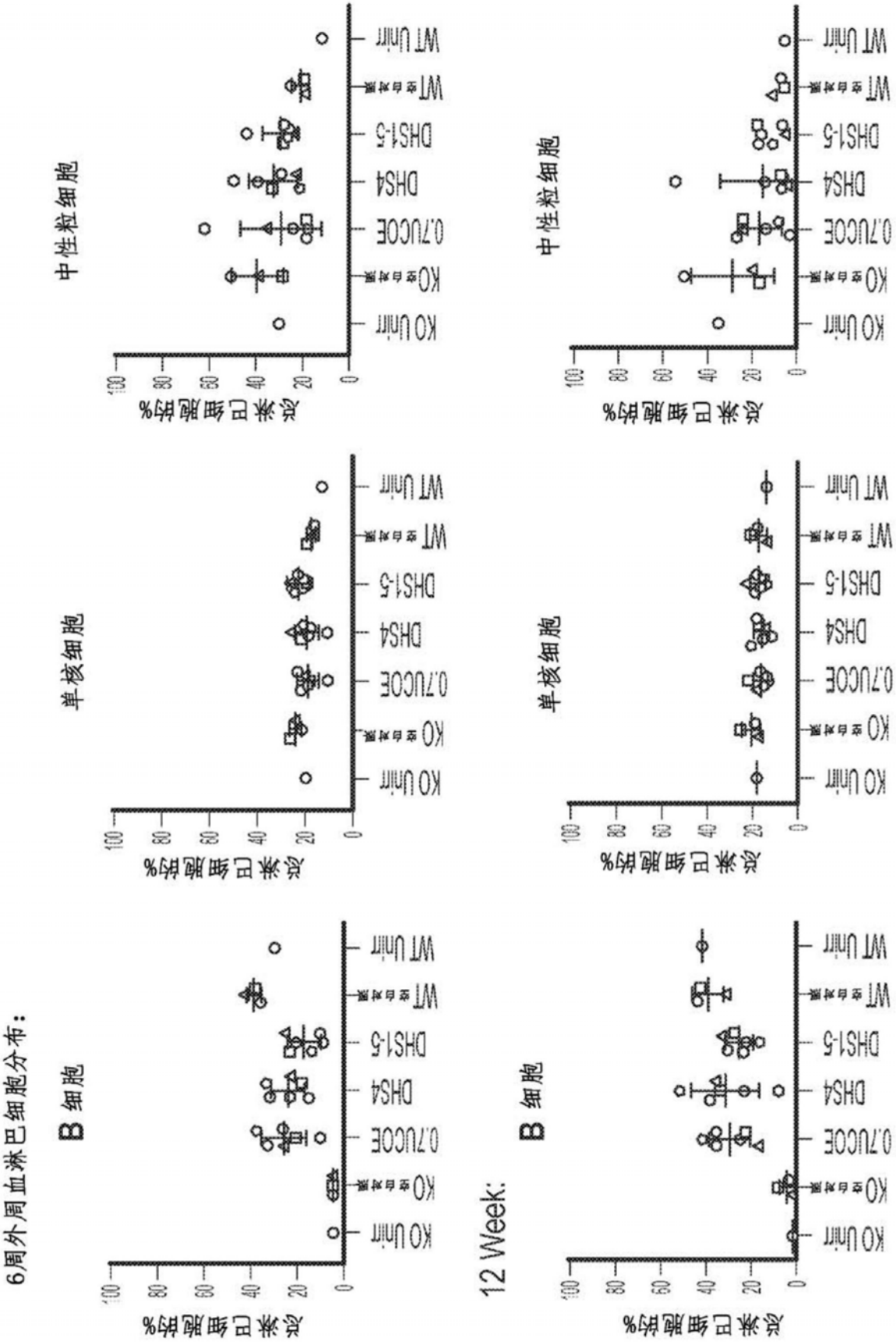


图59

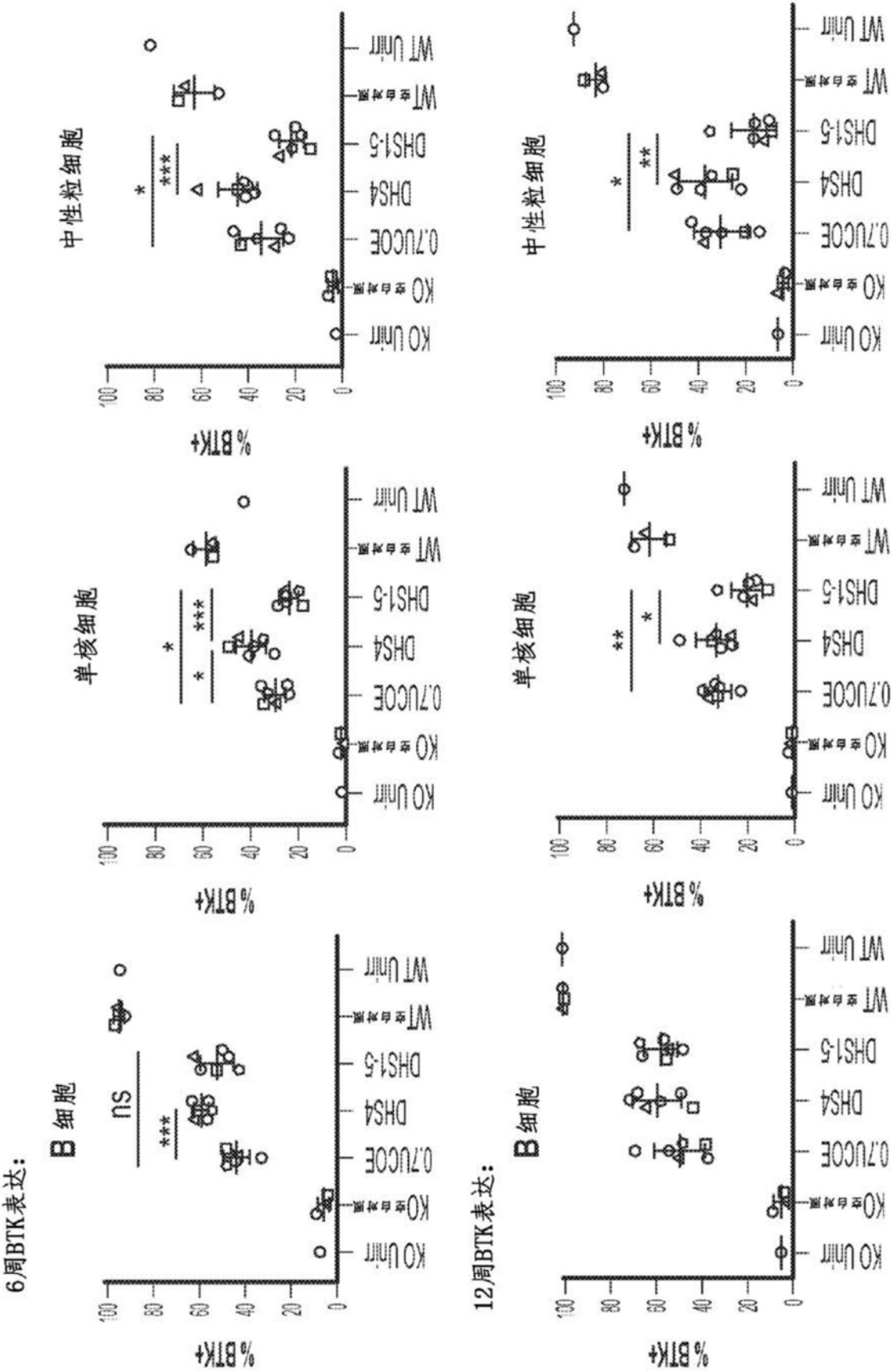
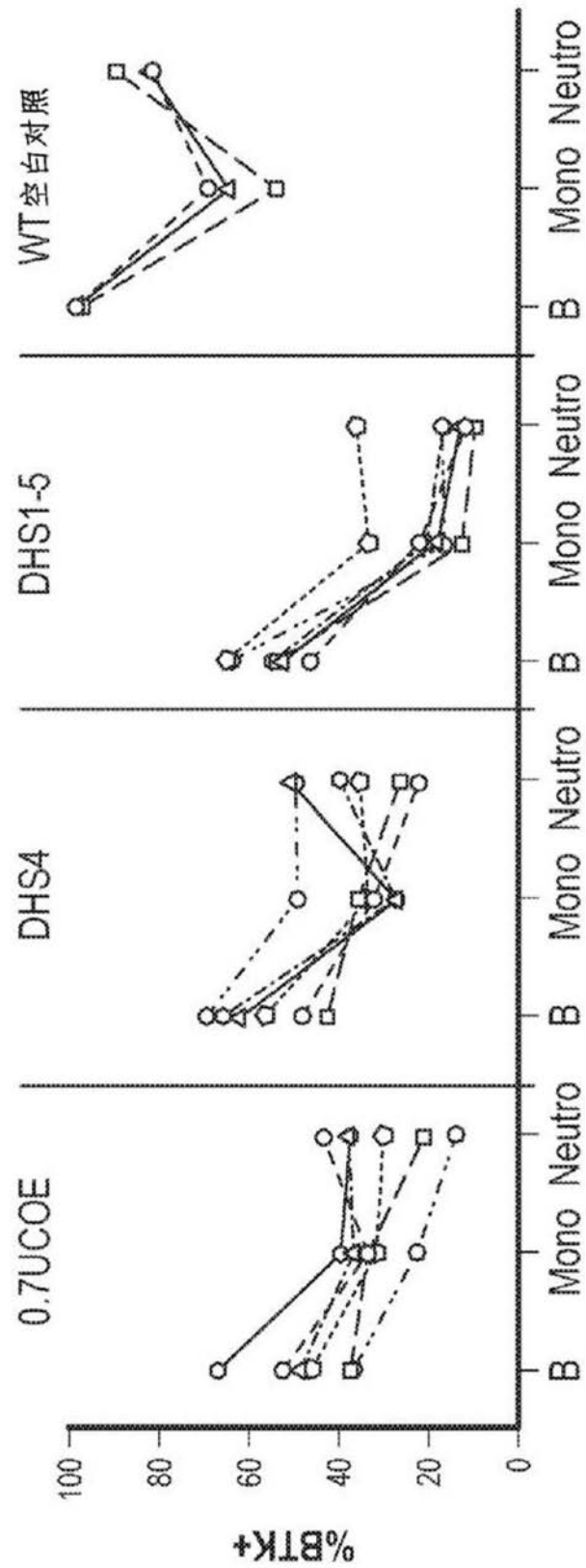


图60



12周放血：细胞亚群中的BTK表达

图61

原coBTK和新coBTK的体外比较

目的：比较两种不同版本的密码子优化BTK的BTK表达/染色

设置：

从TBK小鼠分离的Lin细胞

转导培养基：完全SCGM+mSCF+mTPO+凝聚胺

向 1×10^6 细胞添加 $5 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l}$ 或 $20 \mu\text{l}$ 病毒 (4×10^6 细胞/ml)

体内培养7天，然后在第七天BTK染色和VCN

慢病毒构建体：

0.7UCOE.BTKp.coBTK (滴度: $1.17\text{E}+09$)

0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK (滴度: $1.09\text{E}+09$)

0.7UCOE.BTKp.newcoBTK (滴度: $1.81\text{E}+08$)

0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK (滴度: $1.13\text{E}+08$)

图62

体外比较-TKB谱系阴性细胞
体积匹配的病毒（第7天BTK染色）

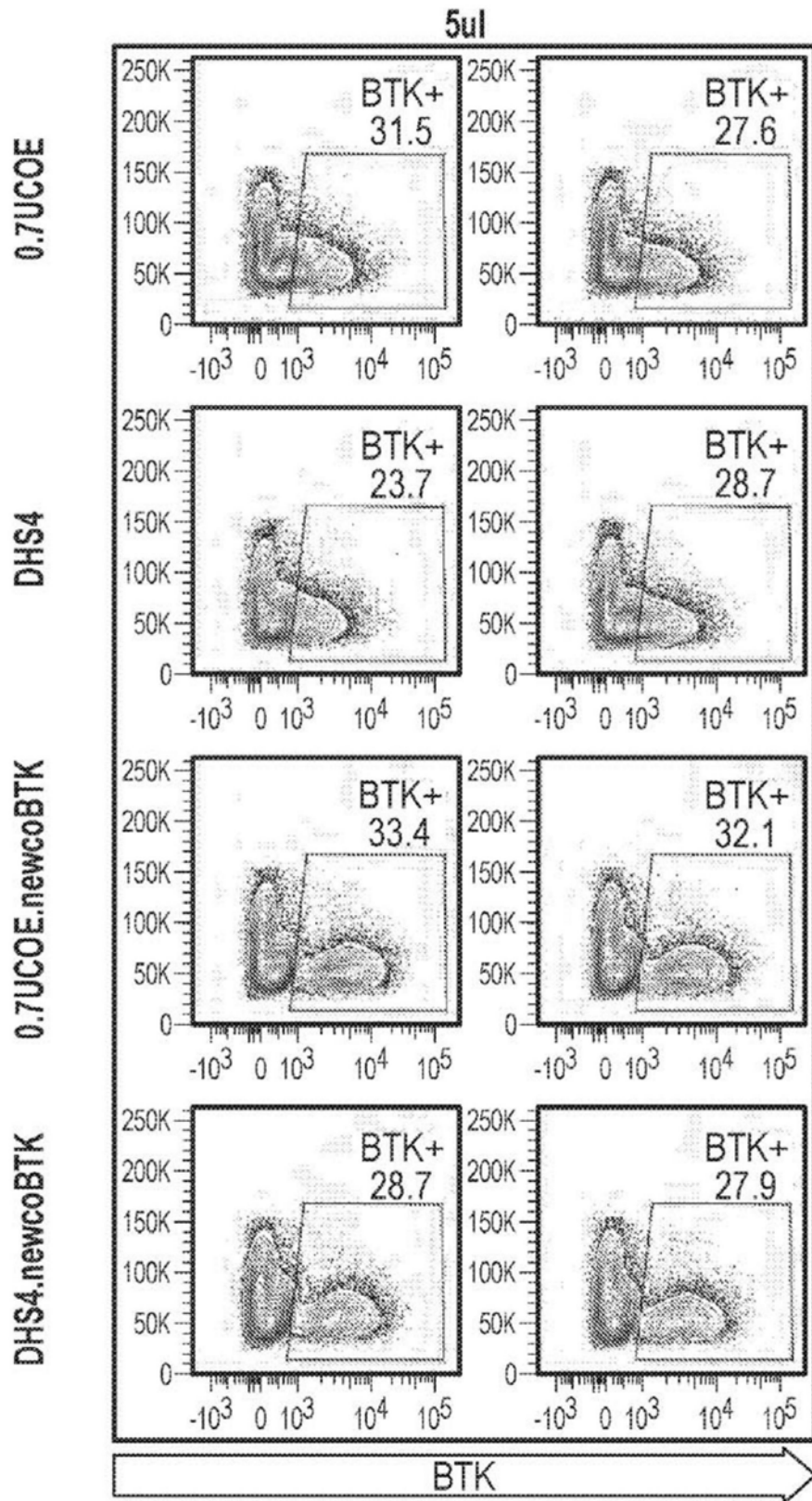


图63-1

体外比较-TKB谱系阴性细胞
体积匹配的病毒（第7天BTK染色）

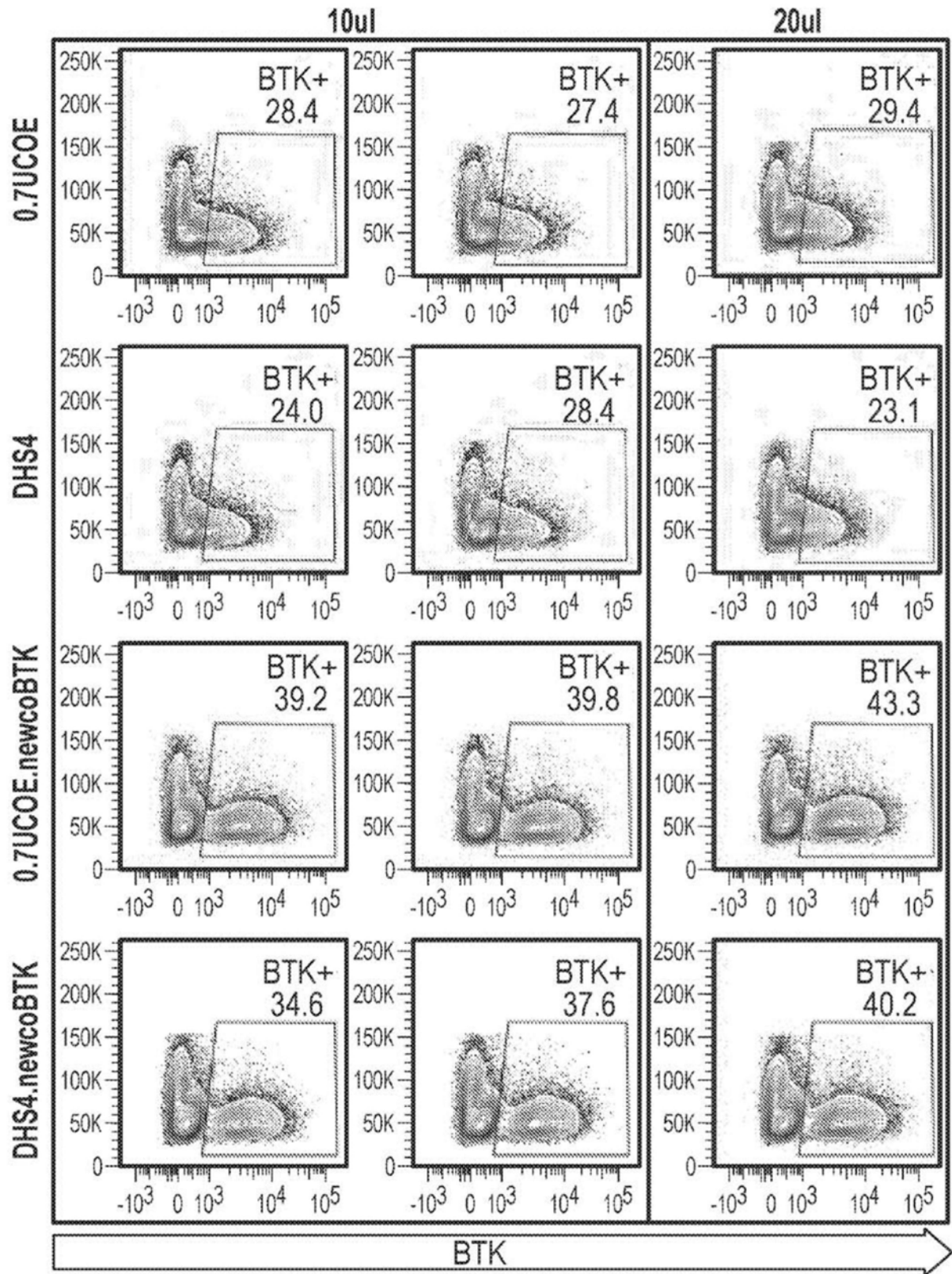


图63-2

体外比较-TKB谱系阴性细胞
体积匹配的病毒（第7天染色）

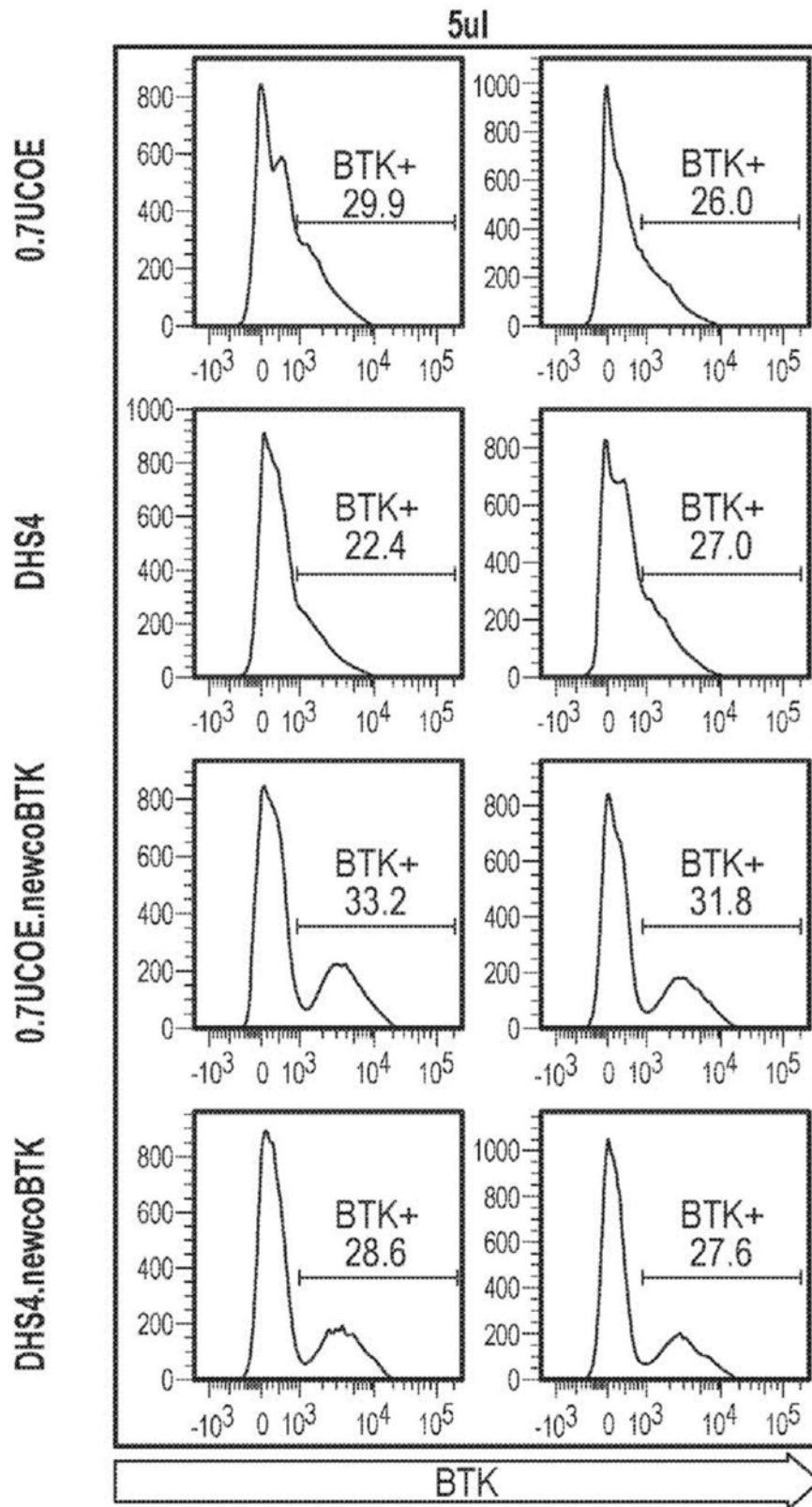


图63-3

体外比较-TKB谱系阴性细胞
体积匹配的病毒（第7天染色）

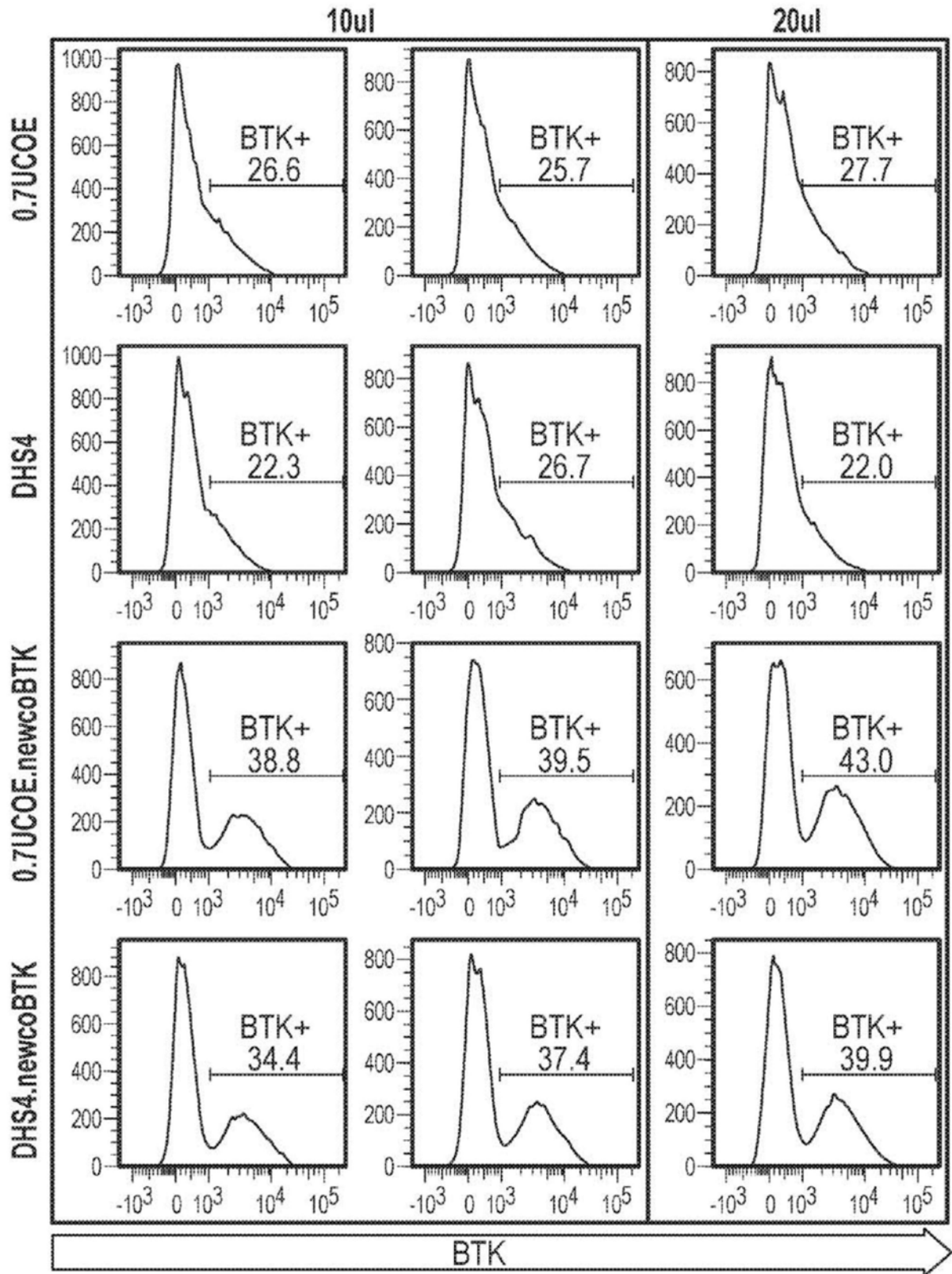


图63-4

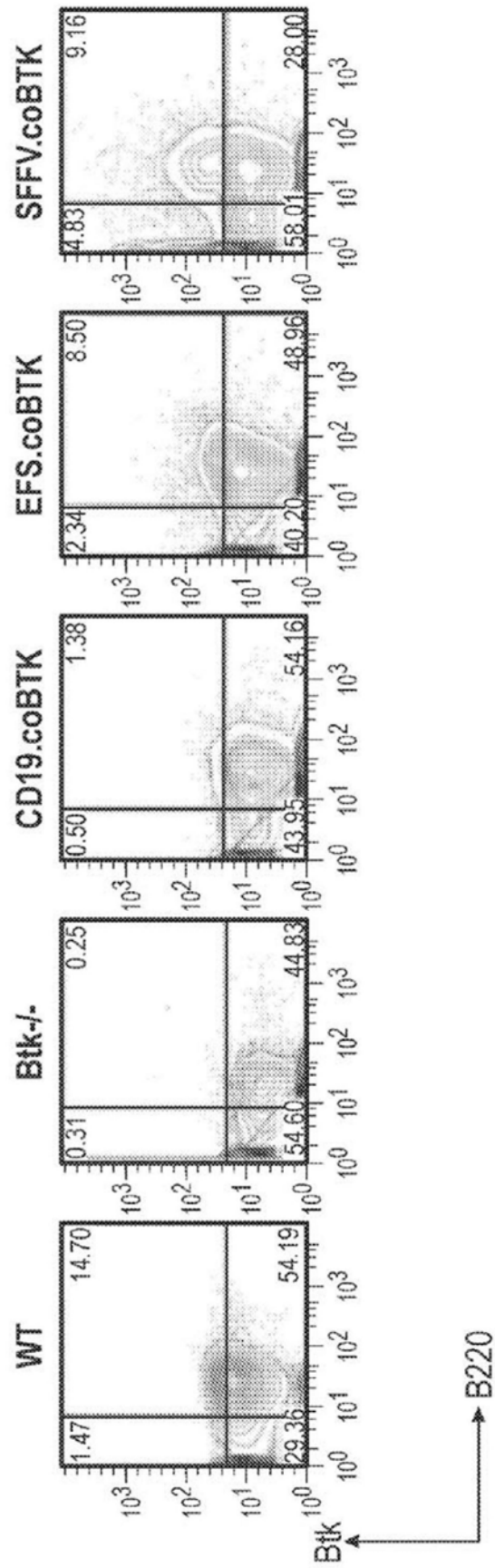


图63-5

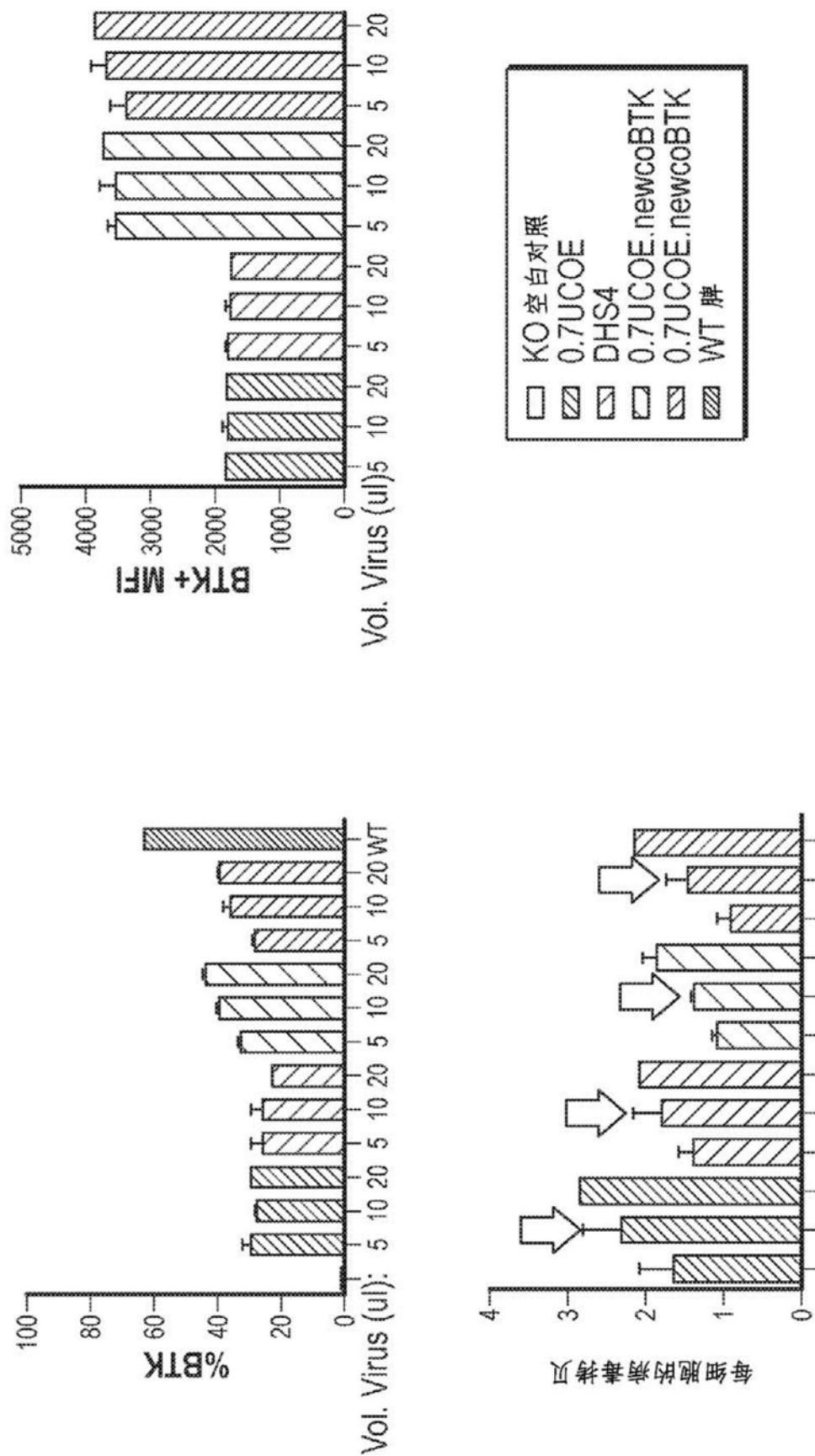


图64

实验组:

0.7UCOE.BTKp.coBTK (滴度: $1.17\text{E}+09$) - 5只小鼠

0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK (滴度: $1.09\text{E}+09$) - 5只小鼠

0.7UCOE.BTKp.newcoBTK (滴度: $1.81\text{E}+08$) - 5只小鼠

0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK (滴度: $1.13\text{E}+08$) - 5只小鼠

KO空白对照 - 3只小鼠

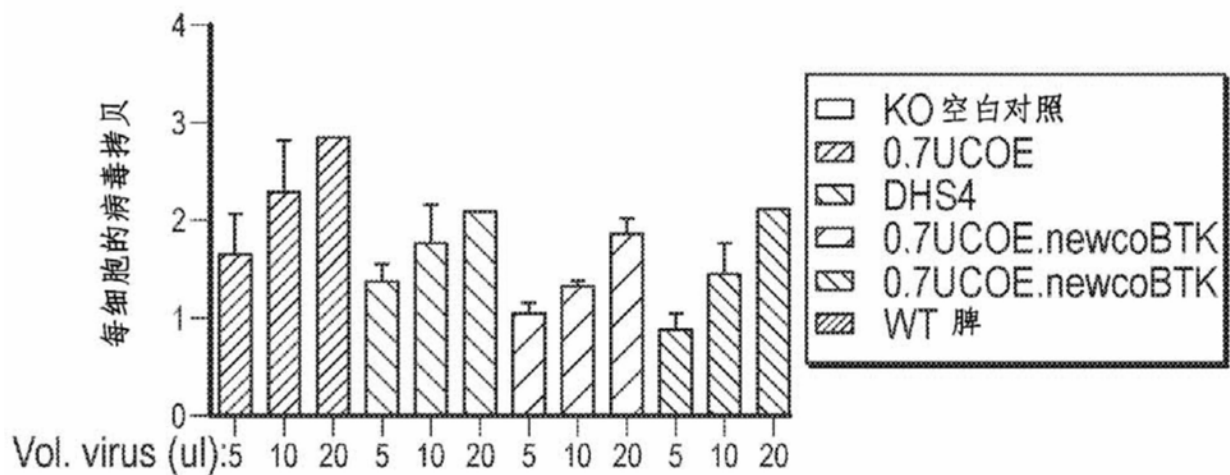
WT空白对照 - 3只小鼠

未辐照对照 - 每种1只

增加或减少来自实验组的小鼠

转导设置:

体积匹配: $10\mu\text{l}$ /百万细胞 (为了与目前的体内实验保持一致)



输入, 体内BTK #12
(预期的匹配VCN)

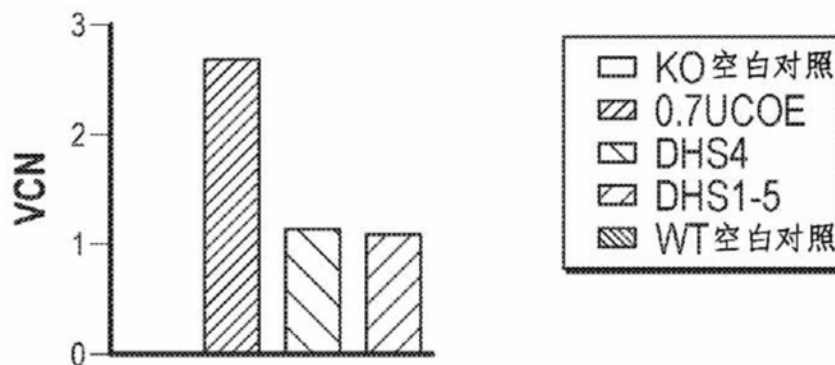
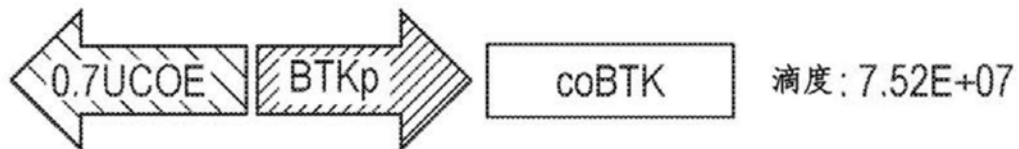


图65

0.7UCOE. BTKp. coBTK仍然是基因疗法的强力候选，
但是目前滴度已降低（从 10^9 到 10^7 ）

目前，我们的UCOE元件处于“反向方向”，其可能由于反义转录而降低滴度：



通过将UCOE置于正向方向，滴度增加：

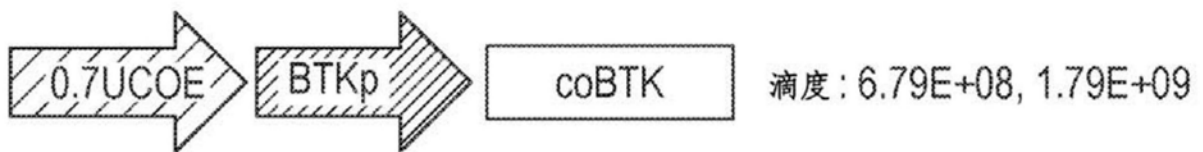


图66

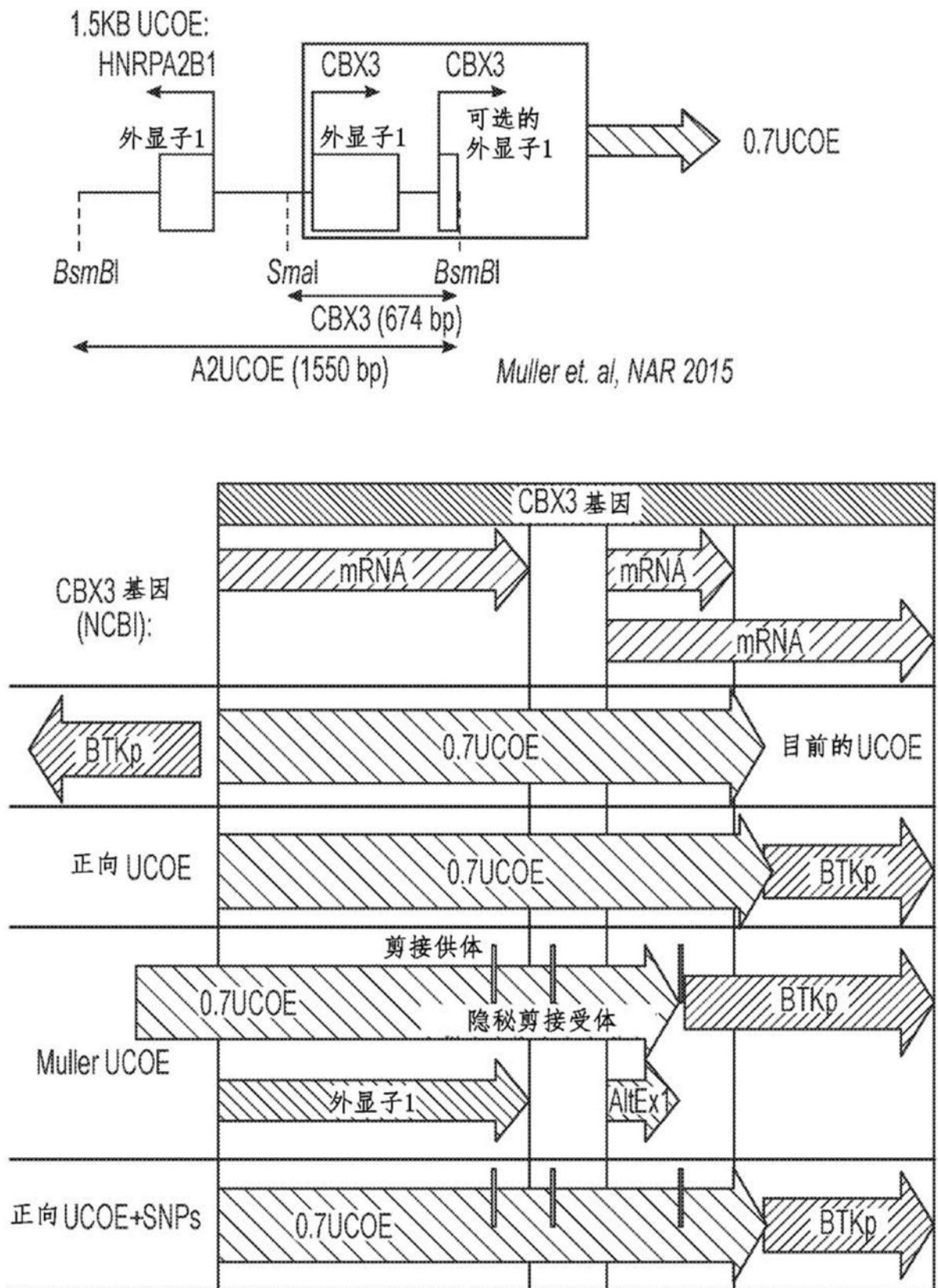


图67

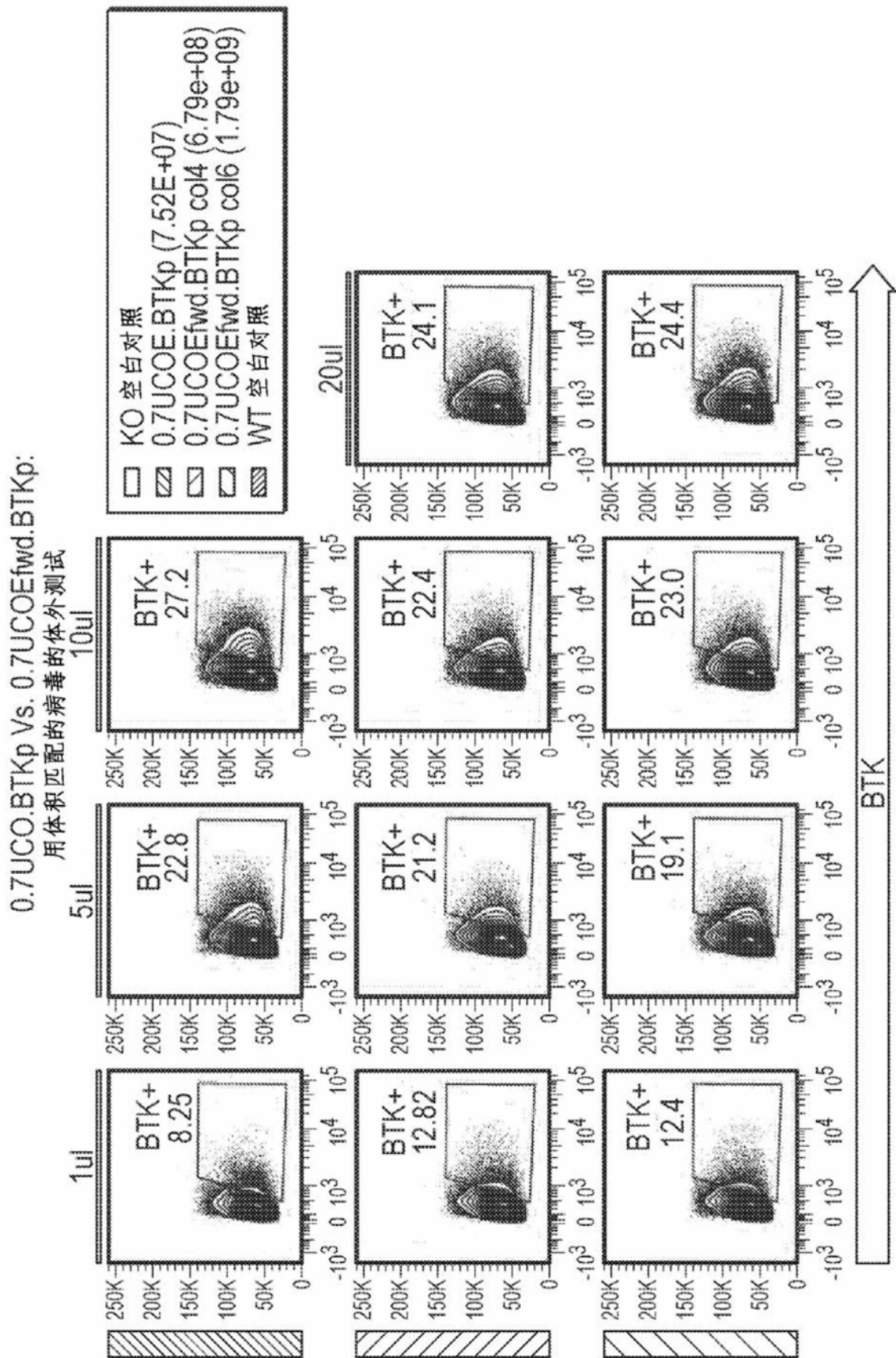


图68-1

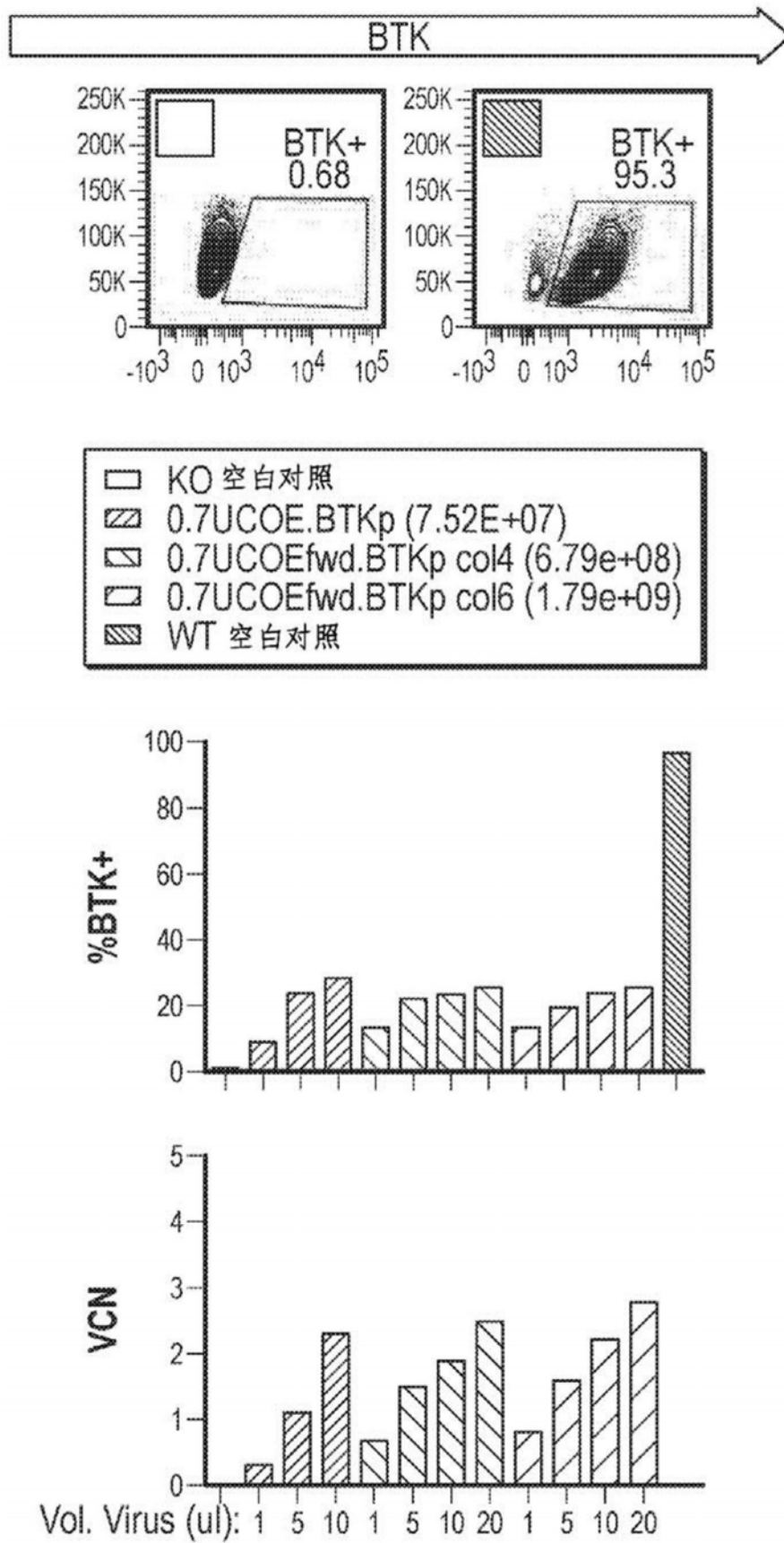


图68-2

关于完成临床BTK LV构建体的计划

- 启动子
 - BTK启动子是最优启动子
- UCOE元件
 - 0.7kb UCOE有效地避免BTK表达沉默并引起载体滴度增加
 - 将UCOE置于正向朝向显著增加滴度，但不改变BTK表达
 - 这提示了我们目前的（反向）UCOE与高滴度构建体等效地运作
 - 目前就确定最终载体选择来比较两种方向
- 增强子元件
 - 与0.7UCOE. Btkp相比，0.7UCOE. IE. btkp以较少的病毒整合表现出对Btk表达功能的挽救
 - 与较大的IE构建体相比，添加较小的增强子元件（DHS位点）并未增加滴度
 - 但是，UCOE（正向）使IE滴度增加 $>1 \log$ ，表明正向UCOE将在所有构建体中增加滴度
 - 与0.7UCOE. IE. Btkpro相比，0.7UCOE. DHS4. Btkp表现出在B细胞和髓系细胞中BTK表达增加，暗示0.7UCOE. DHS4. Btkp载体可能是最优的
- 密码子优化的BTK
 - 与我们先前的co-Btk构建体相比，“Dutch构建体”引起BTK表达的显著增加，并将用于最优载体中

图69

BTK 体内 #12:

- 在2/27用NP-CGG进行免疫，在3/6第七天出血
 - 对总IgG、IgM和NP特异性IgG/M进行ELISA
 - 可在三月（3/27）进行二次免疫
- 根据免疫，在四月上中旬中Sac

BTK 体内 #13:

- （将0.7UCOE与0.7UCOEfwd比较，每种6只小鼠）
- 在3/8 NP-CGG免疫以及12周出血

新的（Dutch）密码子优化BTK:

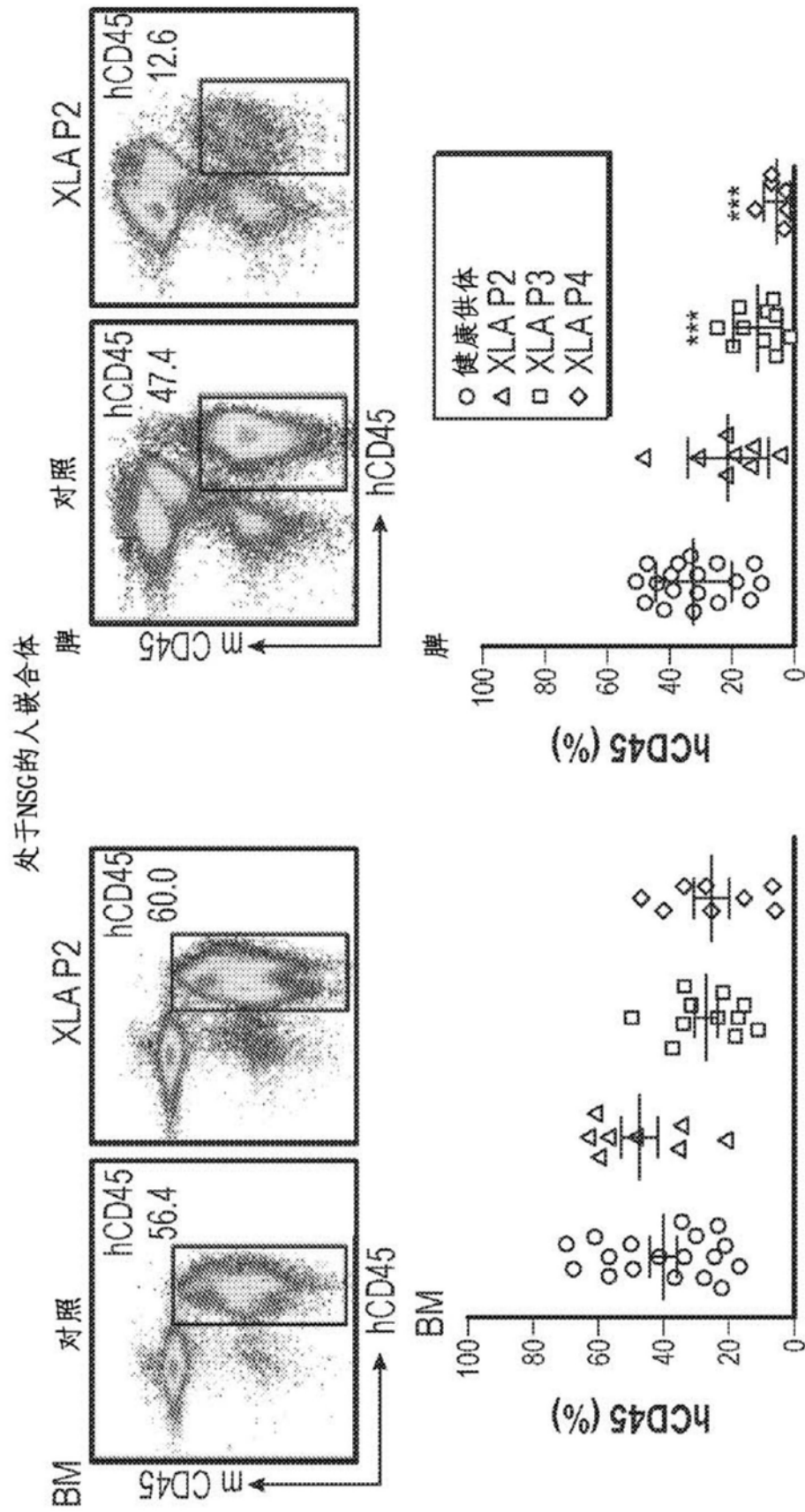
- 克隆至0.7UCOE、0.7UCOEfwd和0.7UCOE.DHS4构建体中
- 体内测试正在进行

图70

XLA患者CD34+ HSC细胞库
机构审查委员会（IRB）批准的XLA患者干细胞单采

患者ID	性别	位置	类型	cDNA	蛋白	样品	BTK表达	单采的	注解
XLA P1	M	-	-	-	-	CD34	+	NIH	
XLA P2	M	内含子 12	假定的 剪接变体	Del 外显子 13	假定为零， 归因于无义 介导的mRNA 降解	CD34, PBMC	-	Seattle Children's	
XLA P3	M	编码	错义	C.1766A >G	p>E589G	CD34, PBMC	+	Seattle Children's	XLA P3 和XLA P4 是亲属
XLA P4	M	编码	错义	C.1766A >G	p>E589G	CD34, PBMC	+		

图71



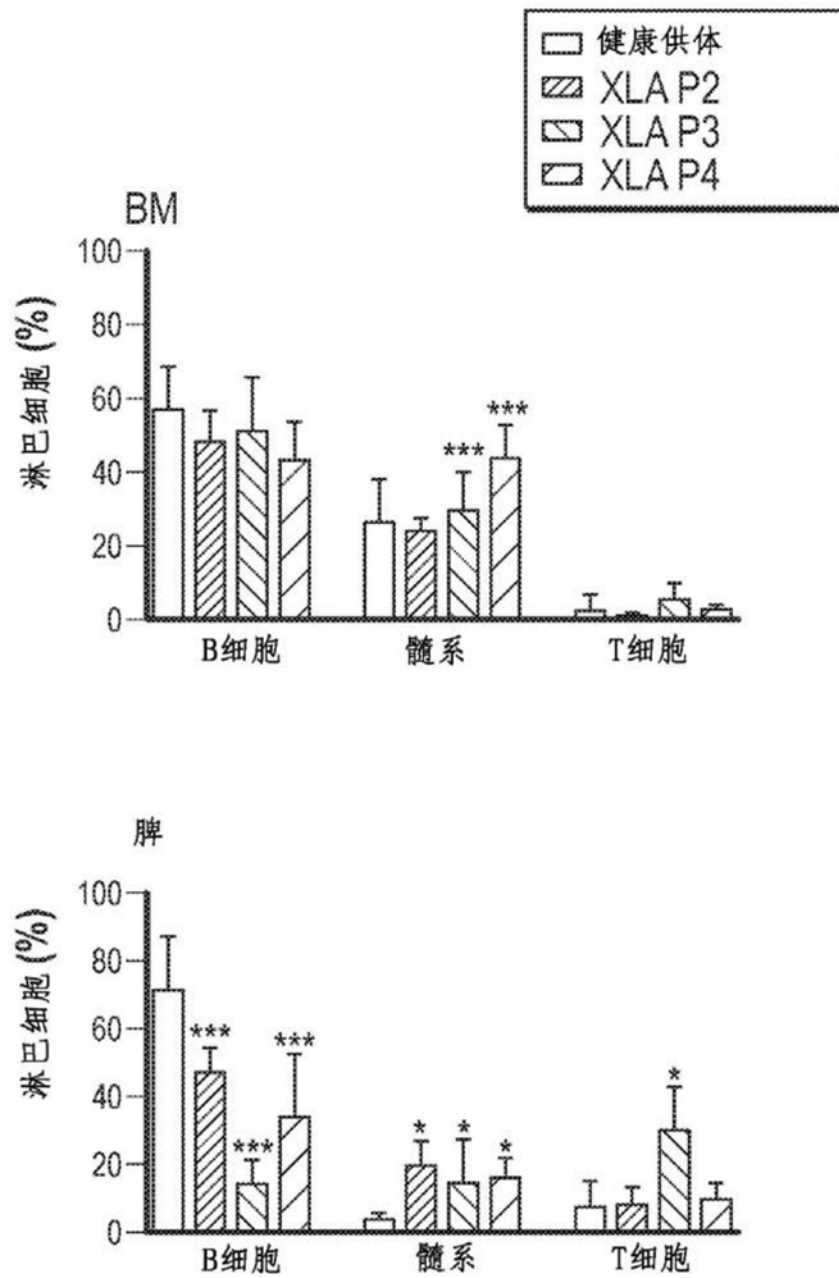
hCD45细胞在BM中的同等植入，但是在外周中的分化hCD45百分比显著较低

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)

Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图72

人淋巴细胞重建



在BM中B细胞%相当，然而在脾中显著较低，而髓系细胞和T细胞相对增加

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)
Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图73

植入的XLA干细胞的表型（脾）

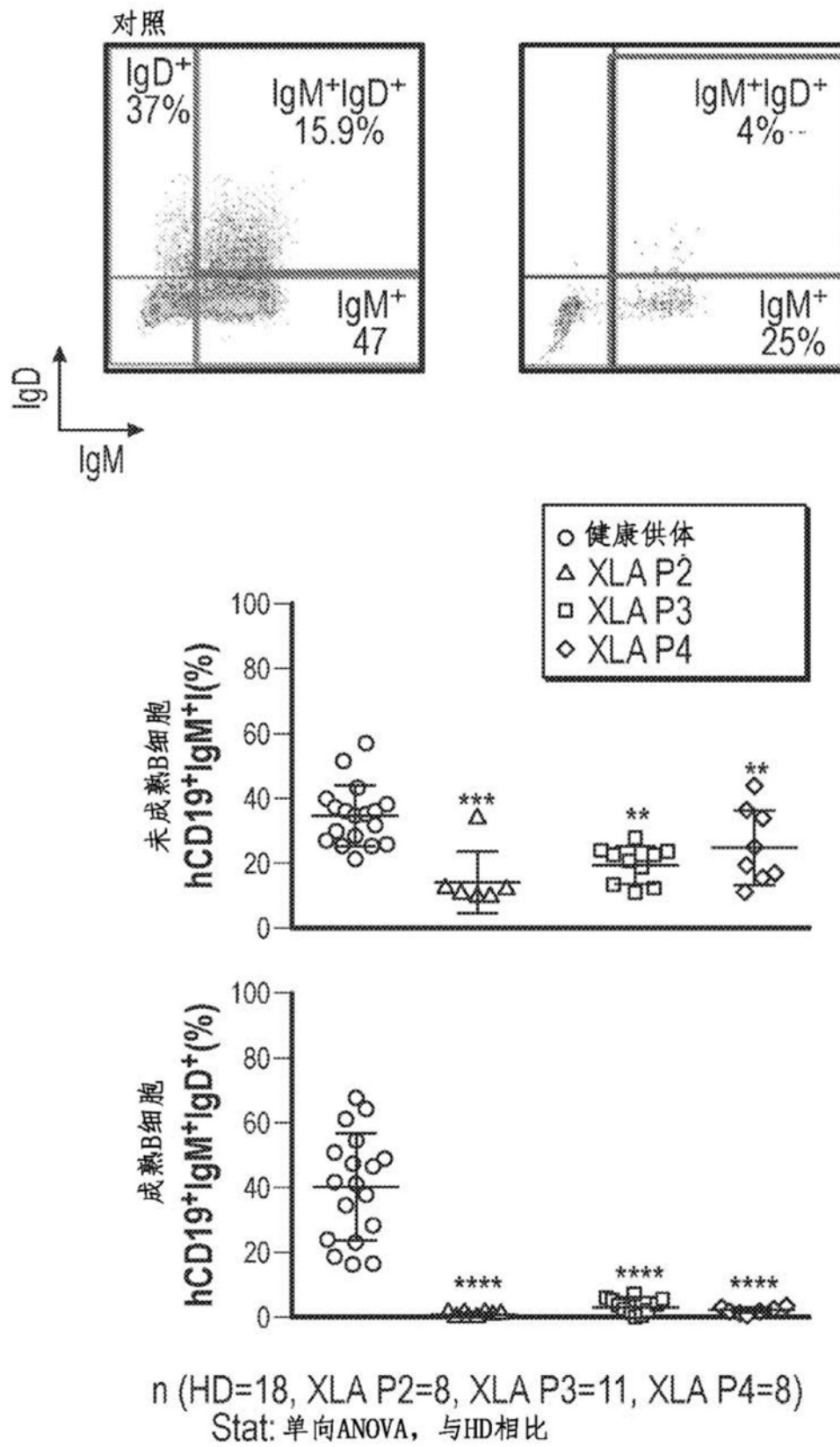
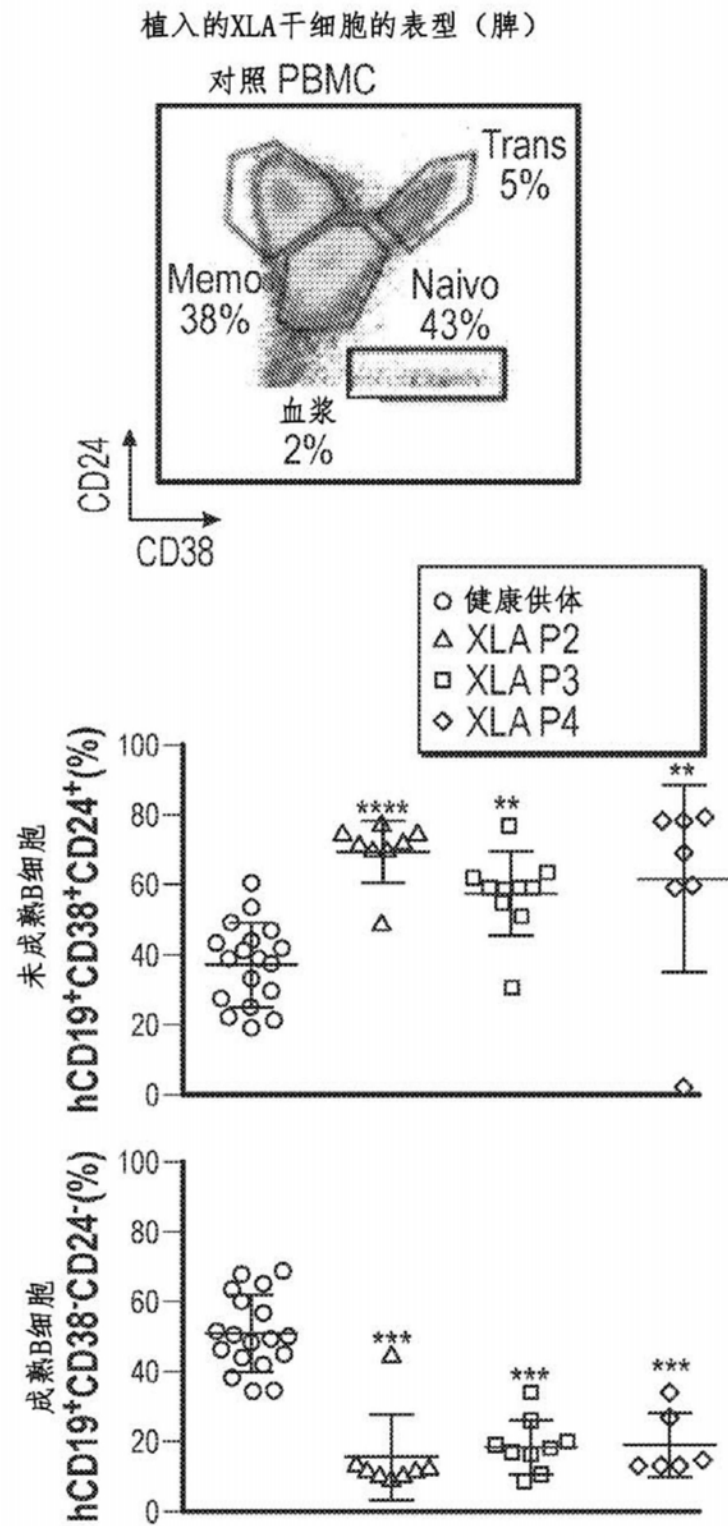


图74



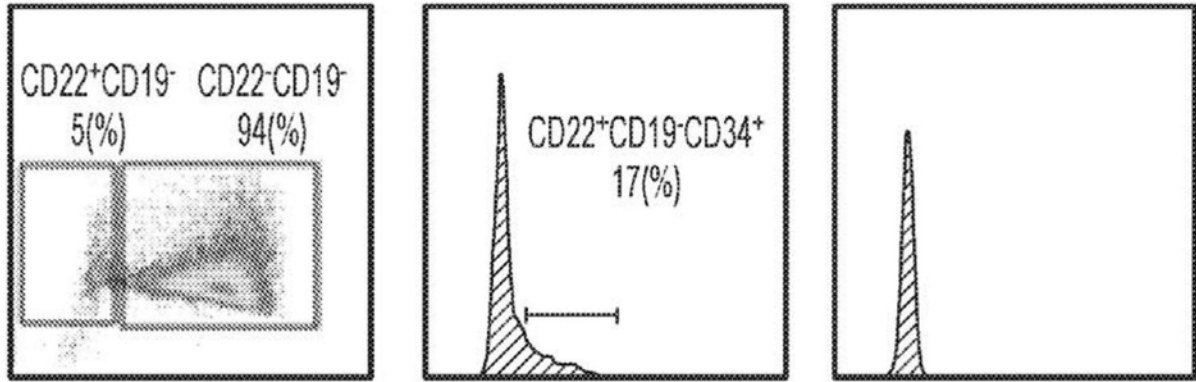
XLA实验组具有显著较高的未成熟B细胞百分比并缺乏成熟B细胞

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)

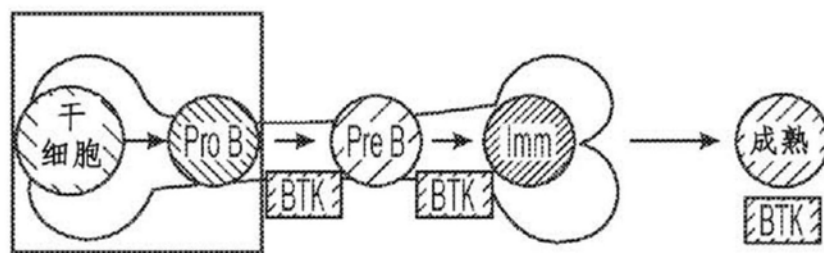
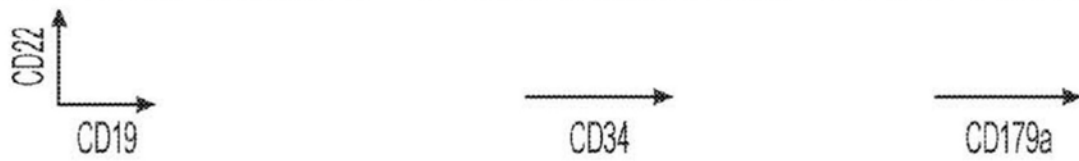
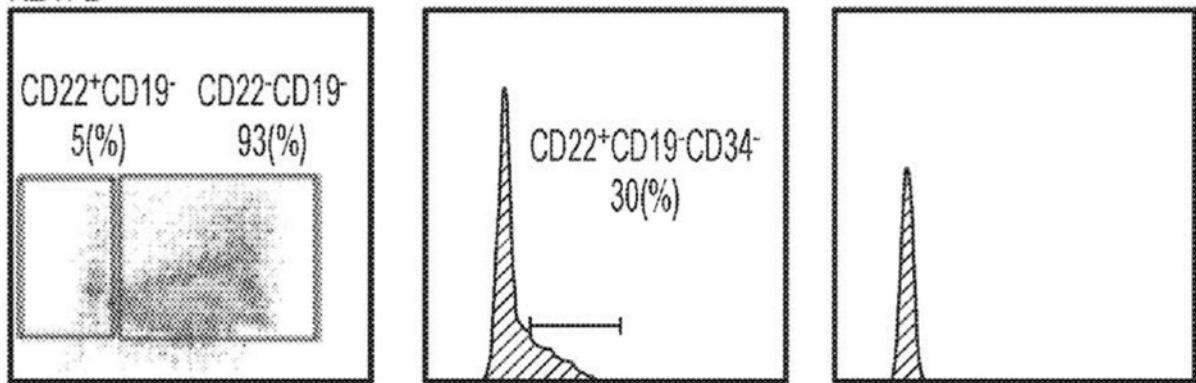
Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图75

对照

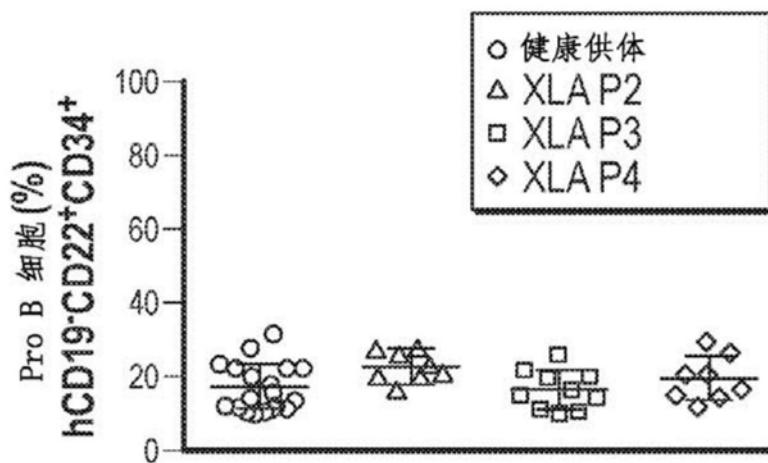


XLAP2



Pro B 细胞	CD22 ⁺	CD19 ⁻	CD34 ⁺	CD179a ⁻	IgM ⁻	CD10 ⁻
----------	-------------------	-------------------	-------------------	---------------------	------------------	-------------------

图76-1



XLA和健康组之间相当的Pro B细胞%

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)

Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图76-2

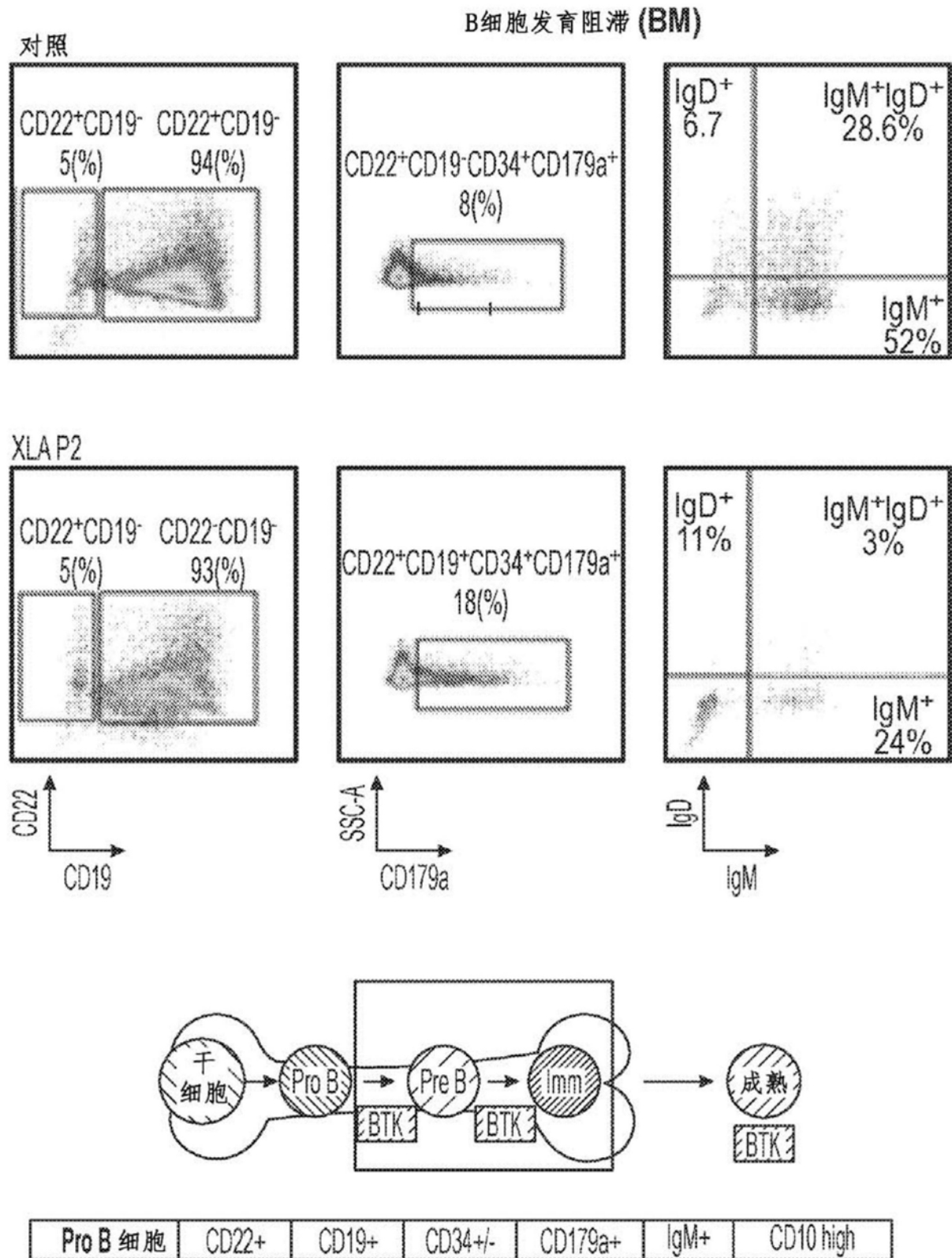
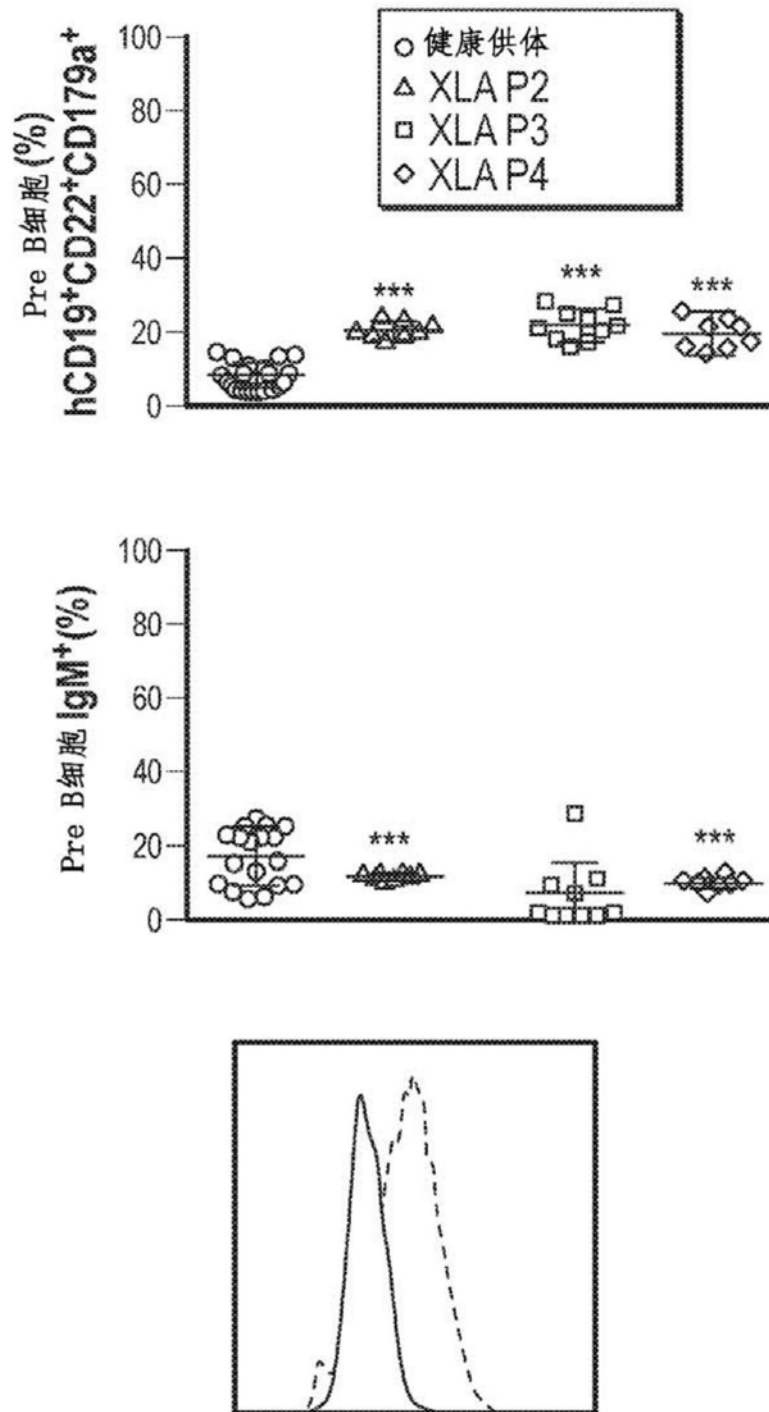


图77-1



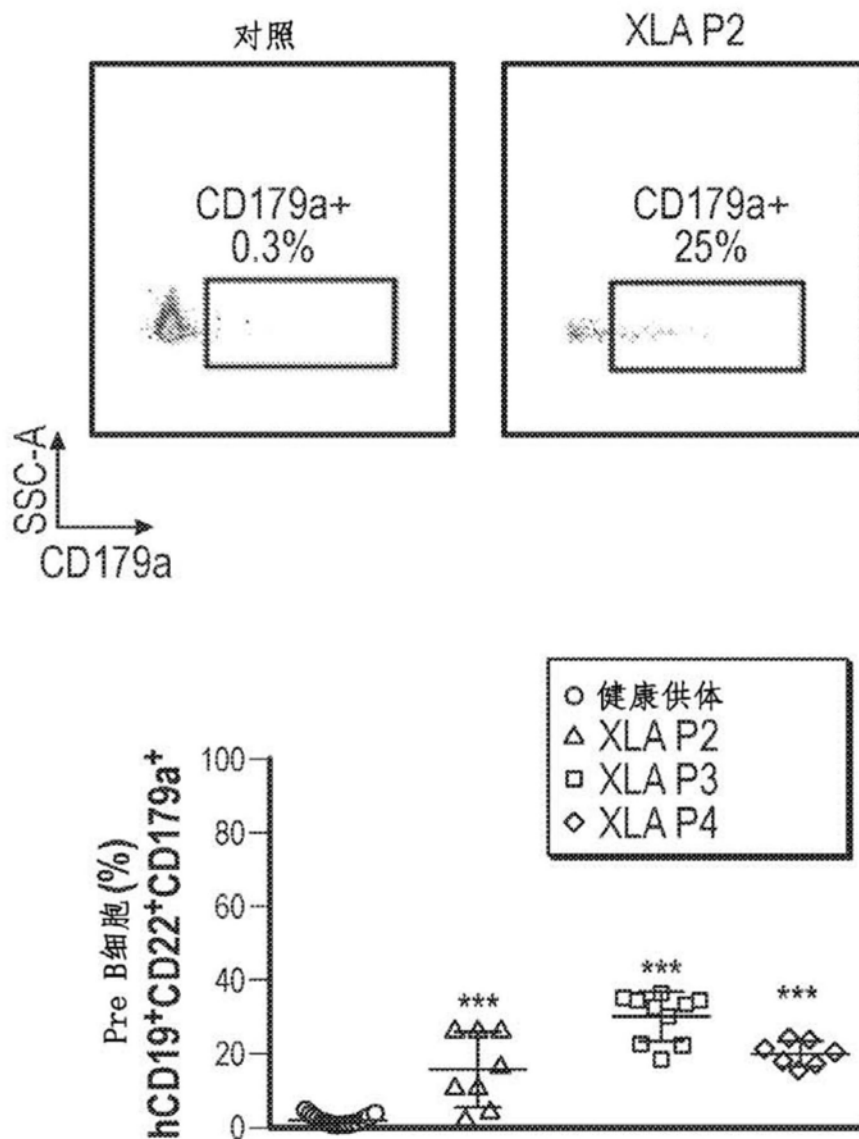
与健康对照相比，XLA具有显著较高的pre-B细胞%

n(HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)
Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图77-2

B细胞发育阻滞 (脾)

Pro B 细胞	CD22+	CD19+	CD34+/-	CD179a+	IgM+	CD10 high+
----------	-------	-------	---------	---------	------	------------



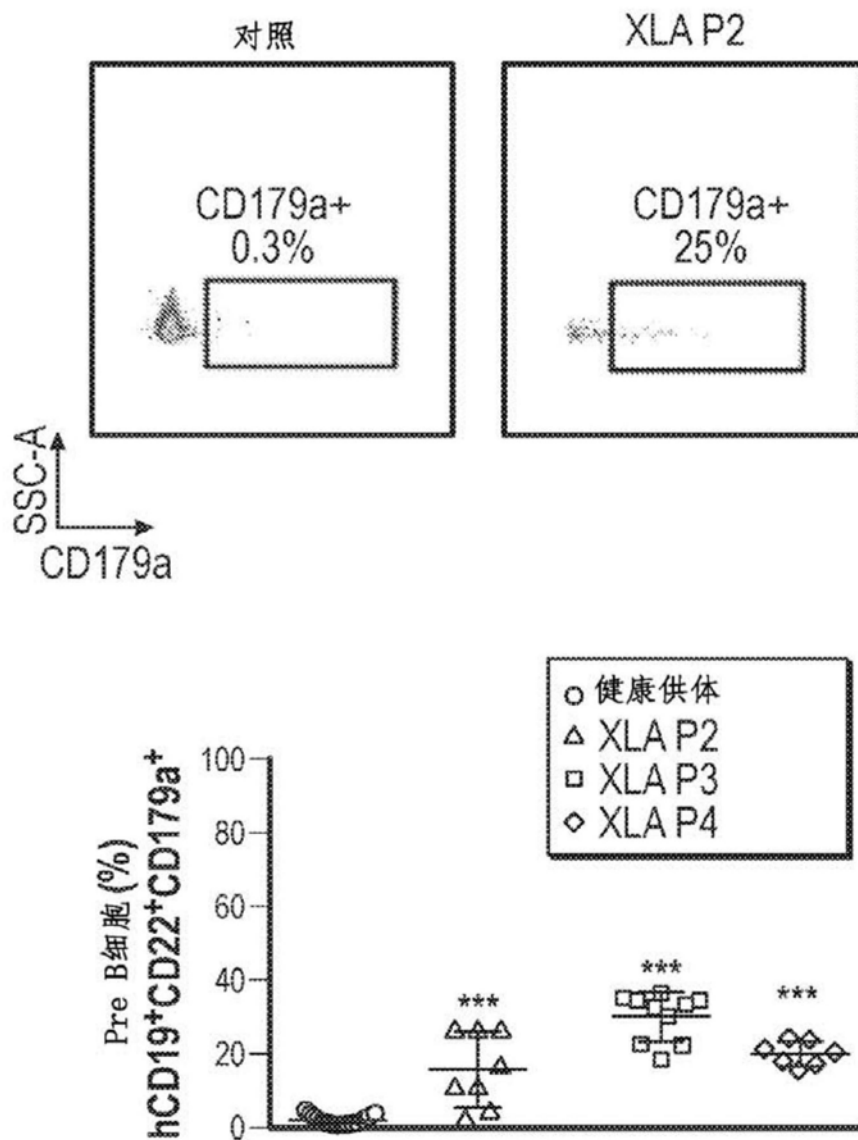
XLA B细胞发育阻滞于Pre B细胞阶段。Pre B细胞能够迁移至脾。

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)
Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图78

B细胞发育阻滞 (脾)

Pro B 细胞	CD22+	CD19+	CD34+/-	CD179a+	IgM+	CD10 high+
----------	-------	-------	---------	---------	------	------------



XLA B细胞发育阻滞于Pre B细胞阶段。Pre B细胞能够迁移至脾。

n (HD=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)
Stat: 单向ANOVA, 与HD相比

图79

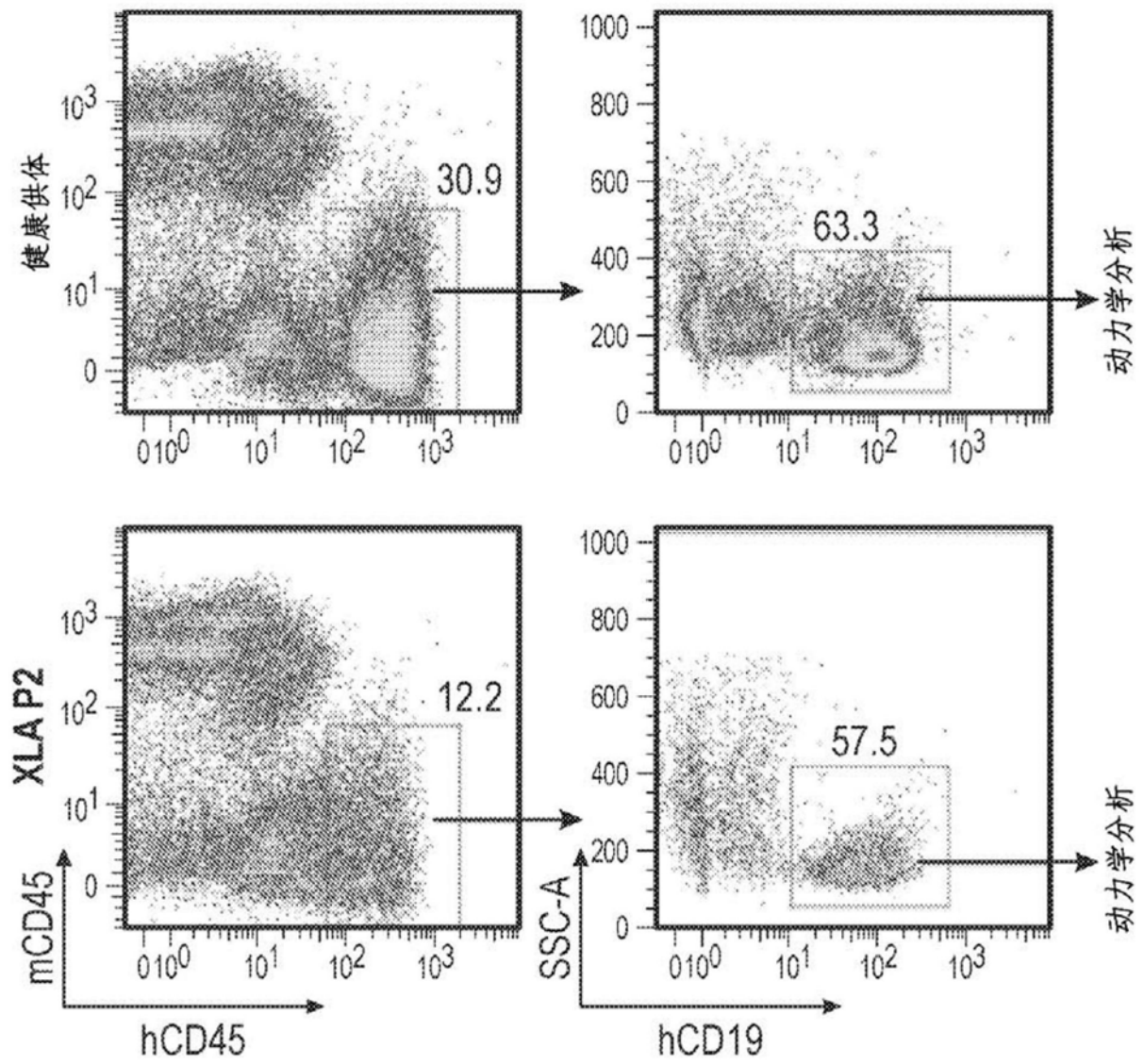


图80-1

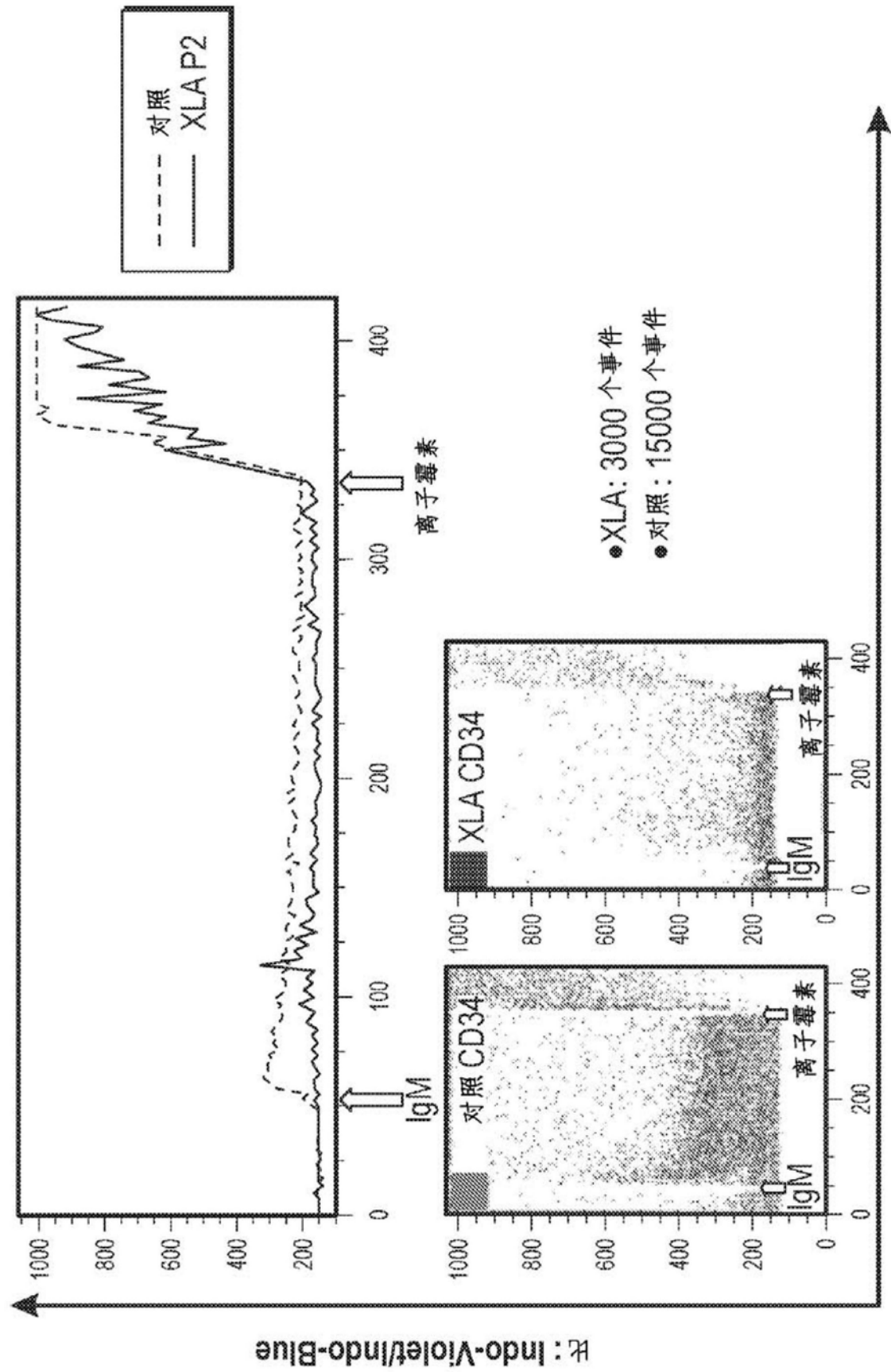
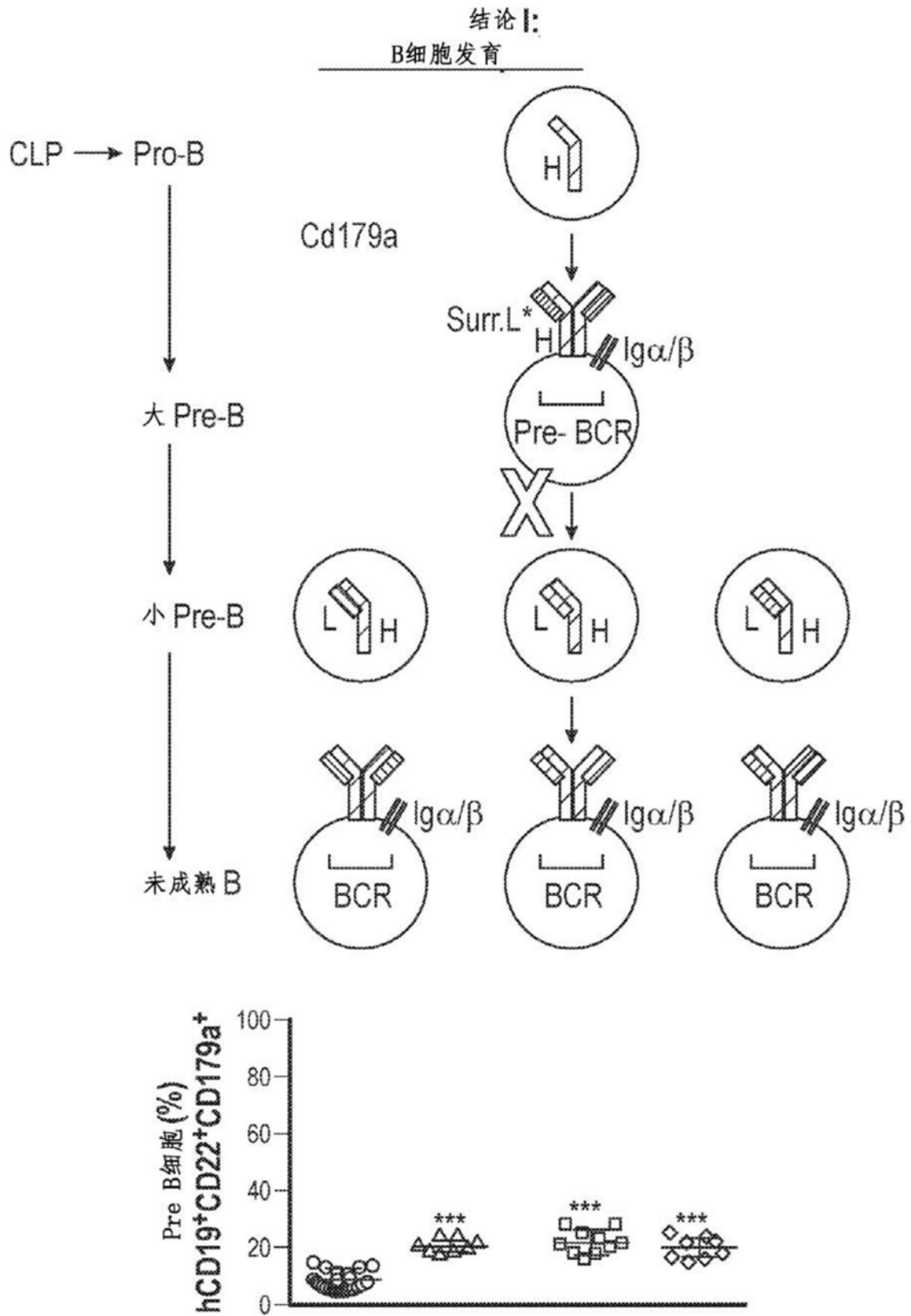


图80-2



XLA细胞具有阻滞在Pre B细胞的B细胞。

图81

结论I:

我们能否在NSG小鼠中再现XLA患者的B细胞表型?

- 脾中较低的B细胞数量和百分比。
- 在BM中B细胞发育停滞于pre B细胞阶段。
- Pre B细胞无法分化成成熟B细胞。
- 来自骨髓的未成熟B细胞也迁移至脾。
- XLA脾B细胞功能受损。

图82

干细胞的人慢病毒转导:

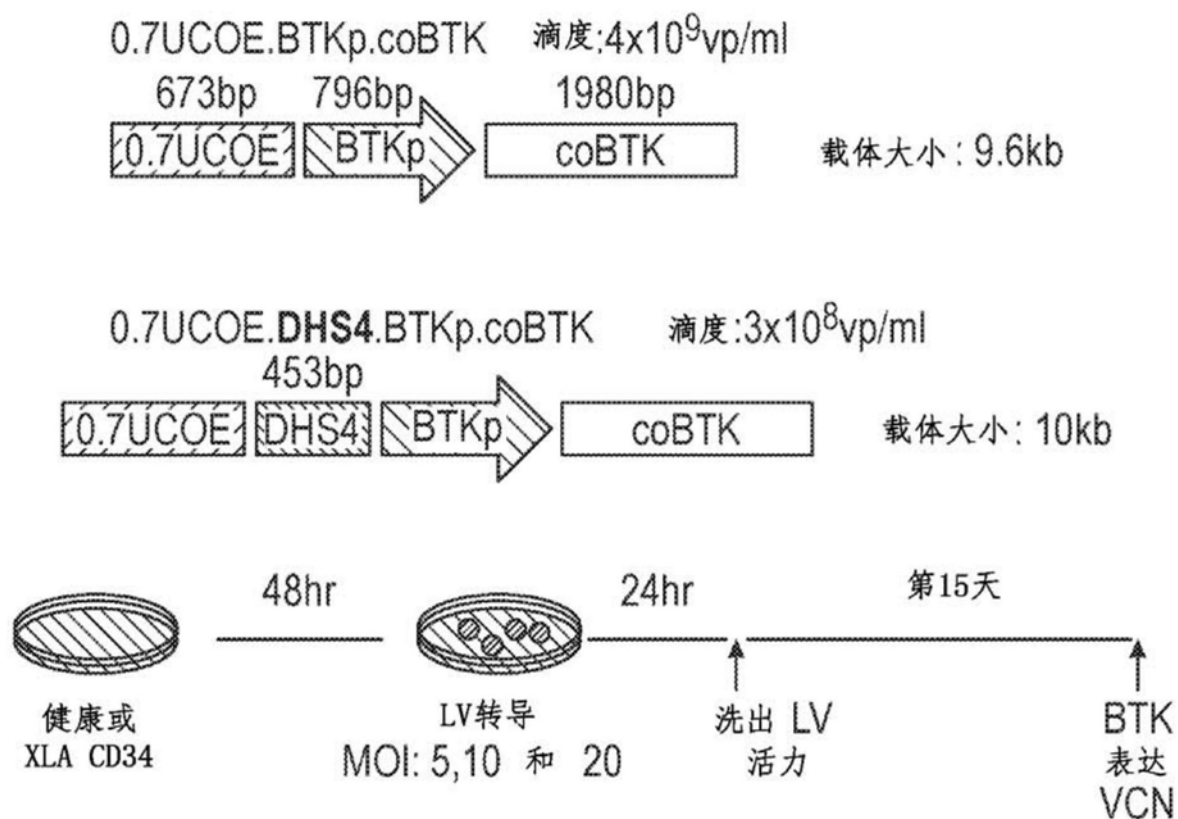


图83

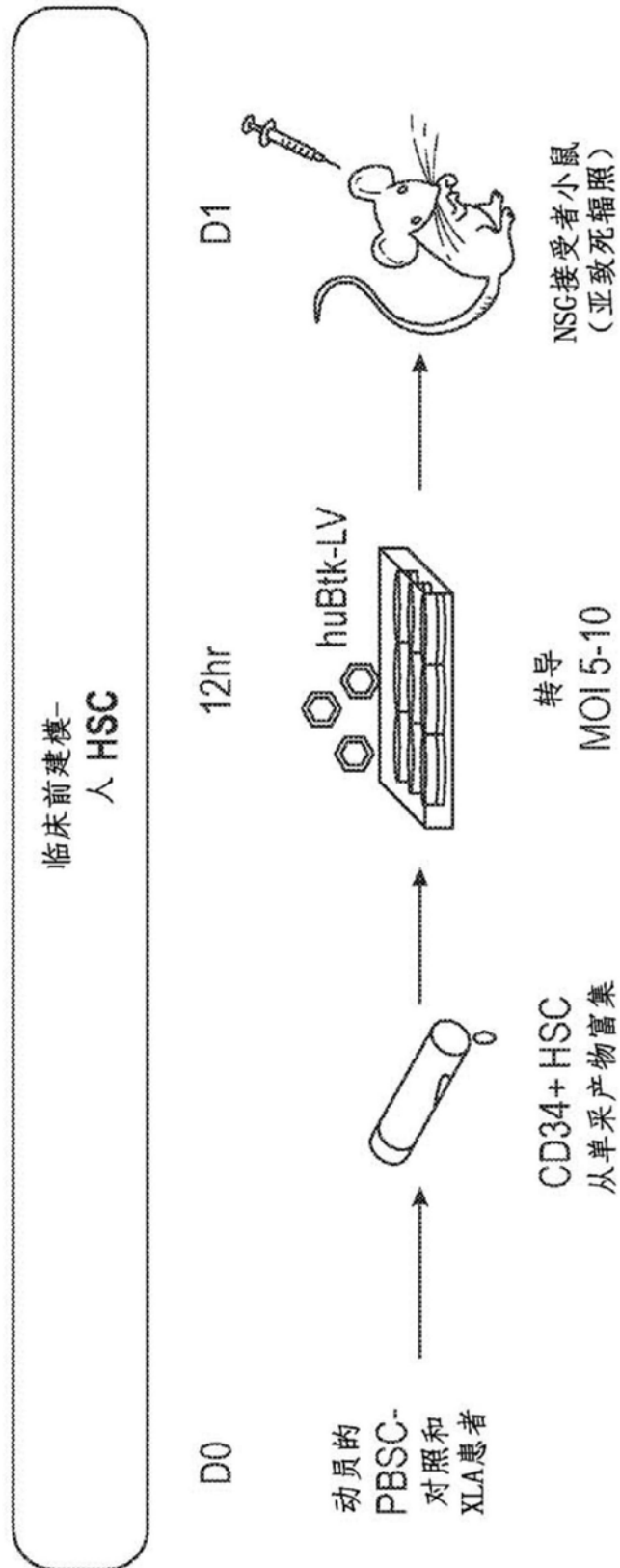
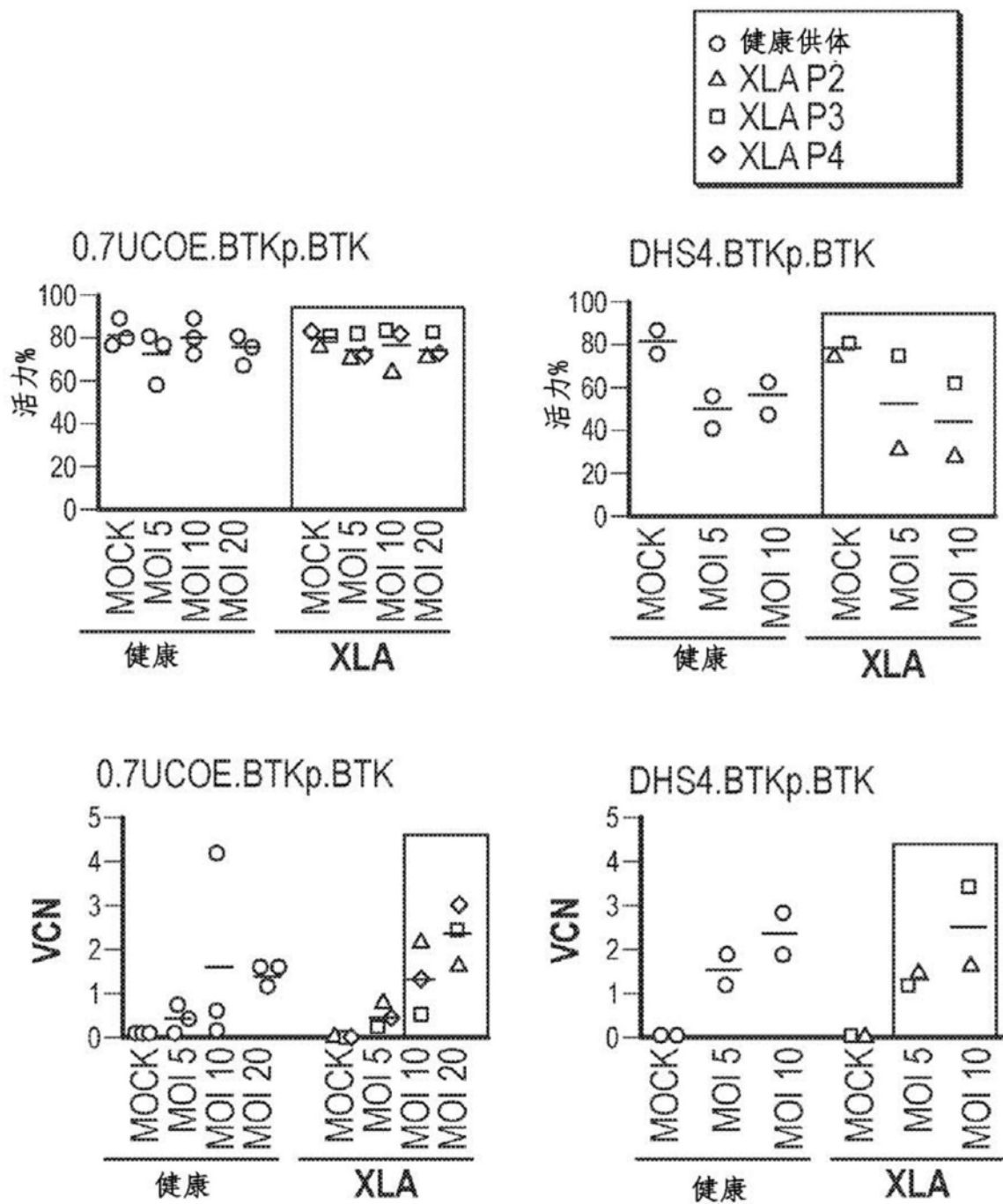


图84

干细胞的人慢病毒转导：



与DHS4相比，0.7UCOE.BTKp.BTK的活力为70%
MOI为10和20时临床上相关的VCN 1-2

图85

XLA P2在D15的BTK表达

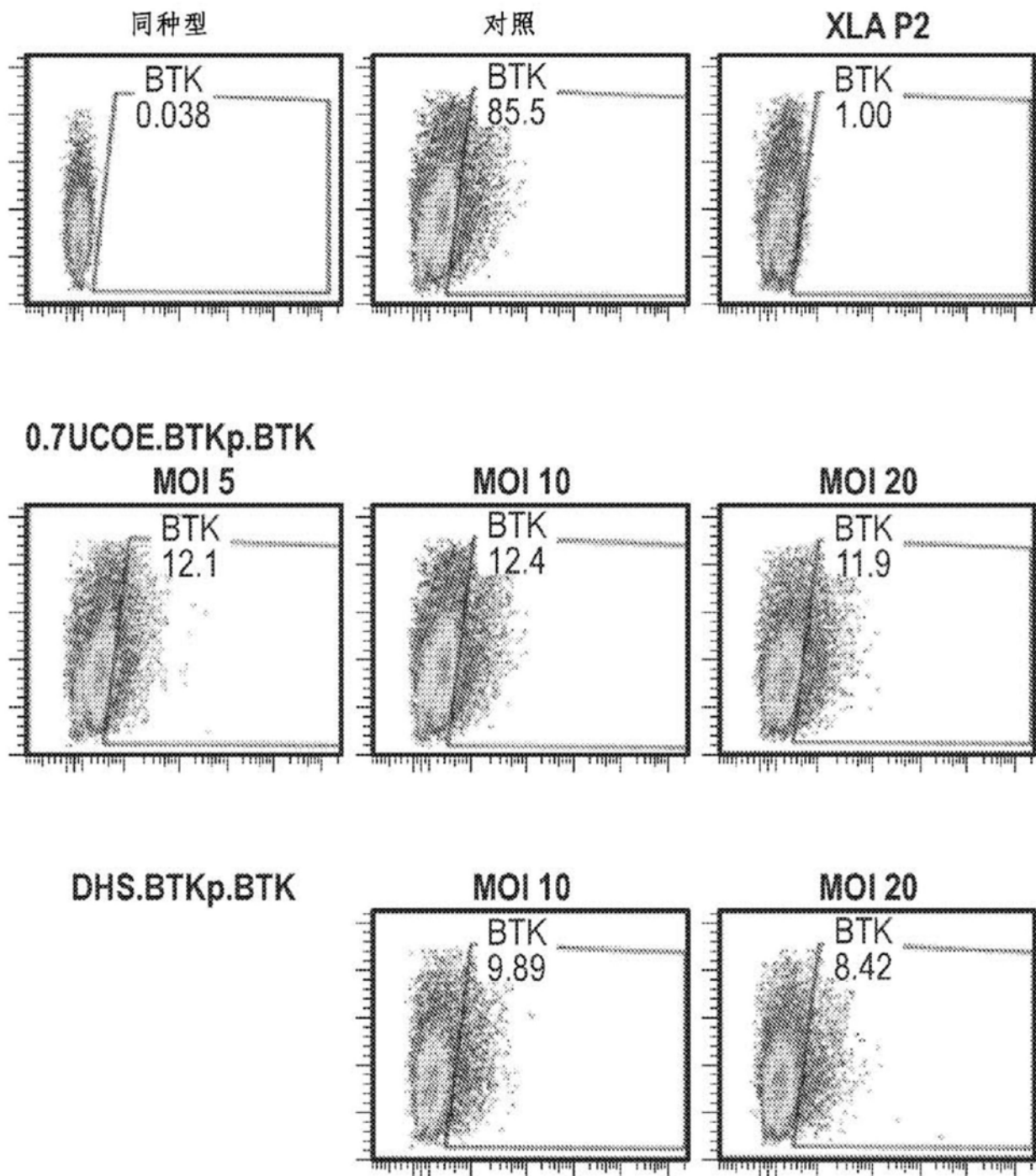
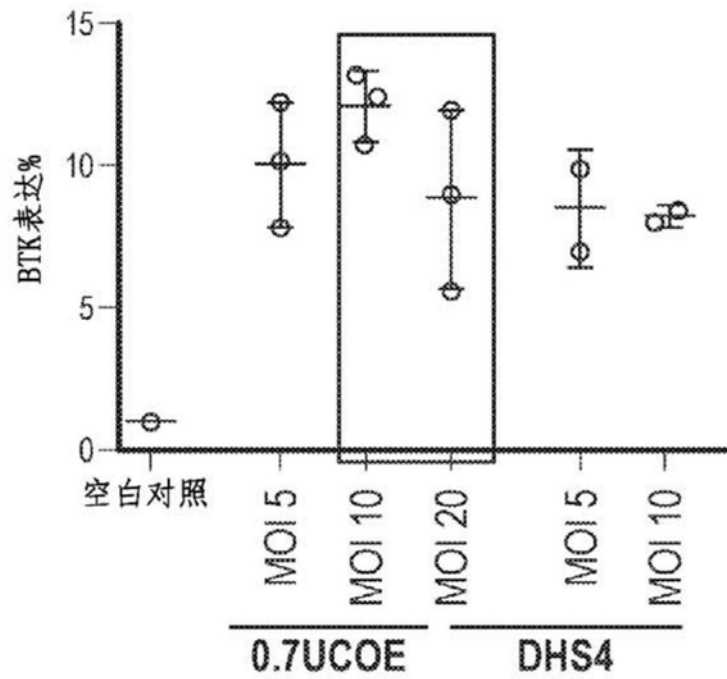


图86-1



与DHS4相比，0.7UCOE.BTKpBTK在非选择性环境中引起较高的BTK表达

图86-2

结论 II:

我们是否能够在体内用XLA干细胞慢病毒转导挽救B细胞发育?

- 经0.7UCOE.BTKp.BTK和0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTK以MOI 10转导的XLA干细胞产生临床上相关的病毒拷贝1-2

体内实验：比较0.7UCOE.BTKp.BTK和0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTK的B细胞重建和发育

图87

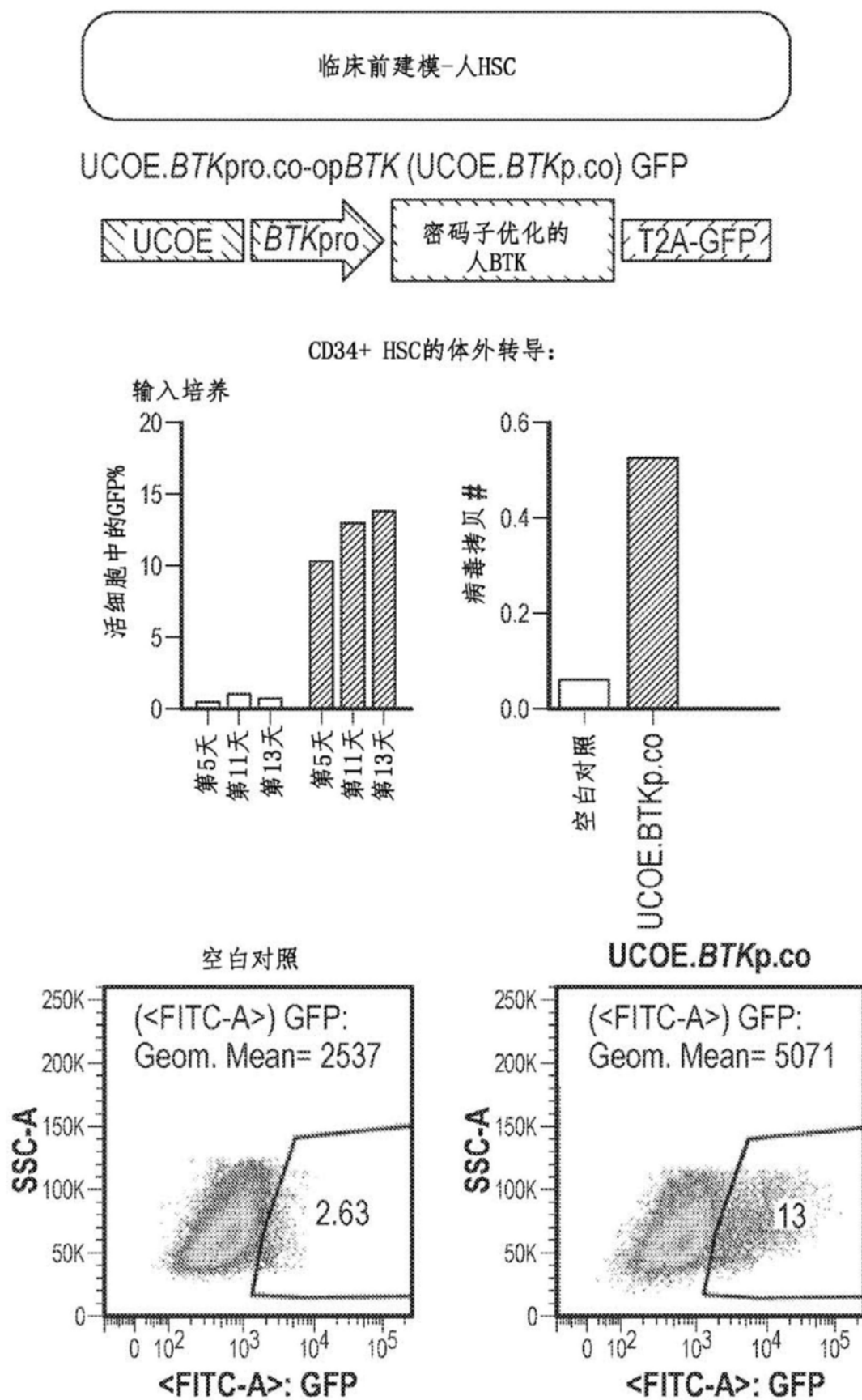


图88

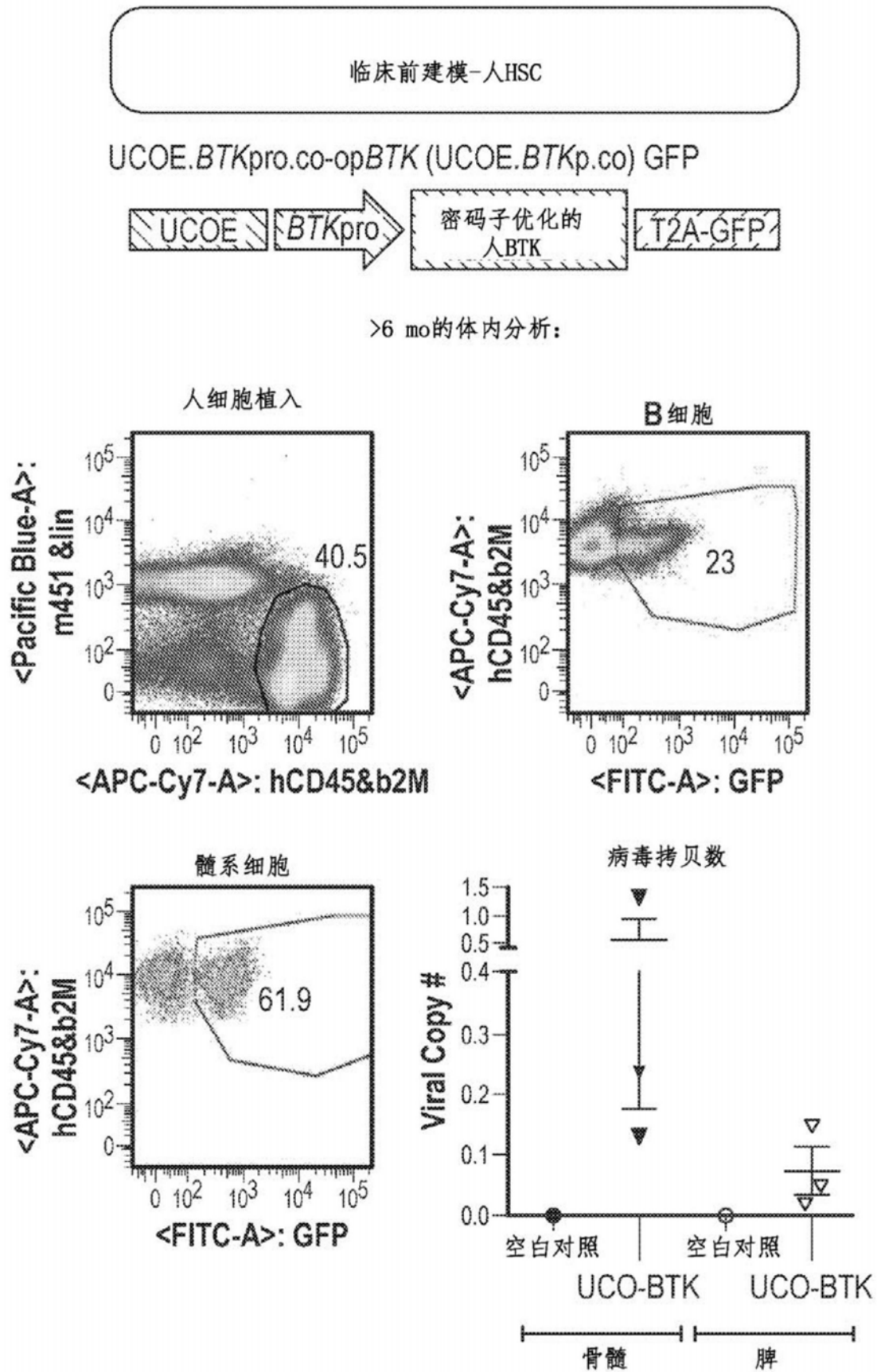


图89

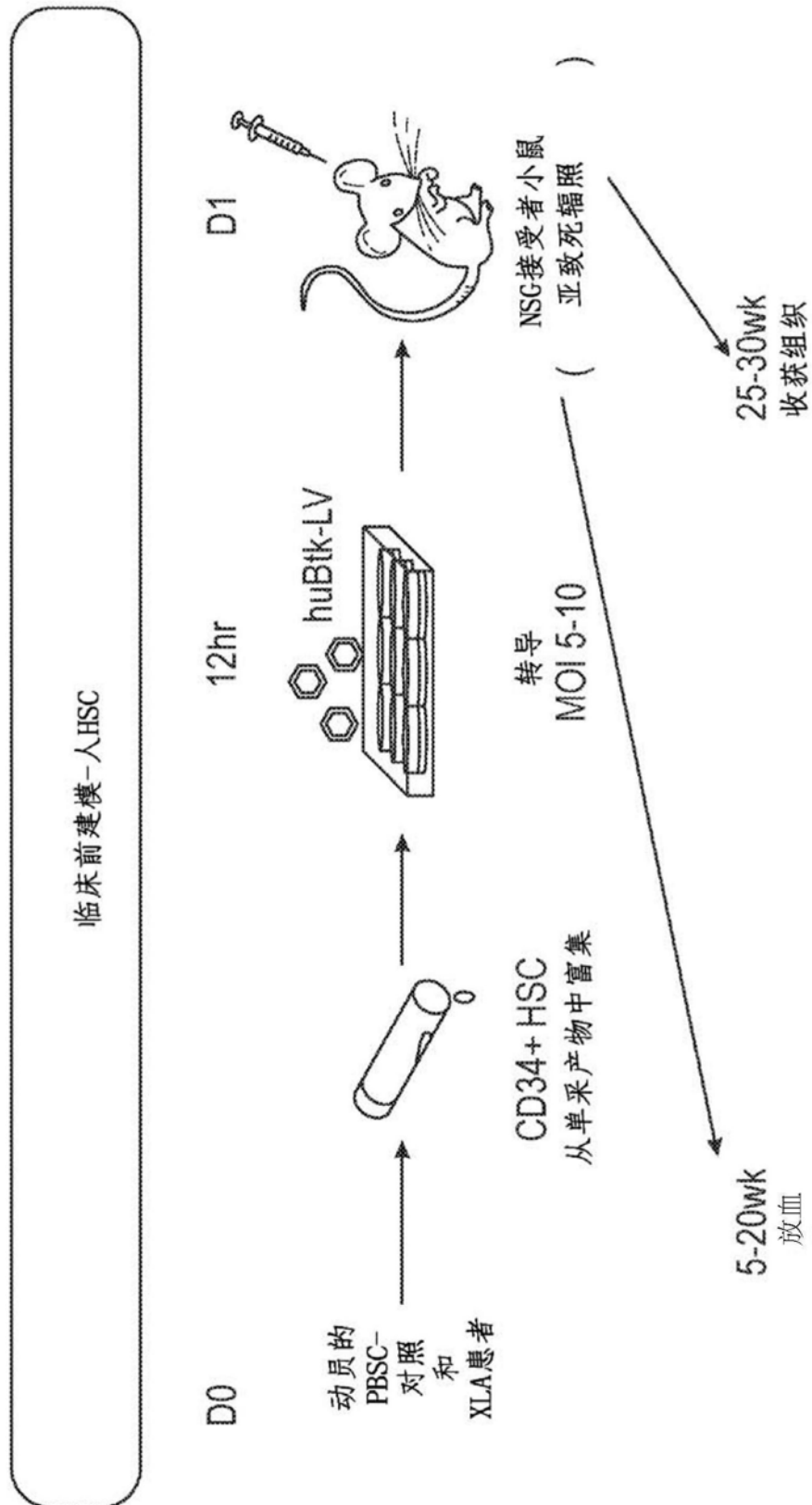


图90

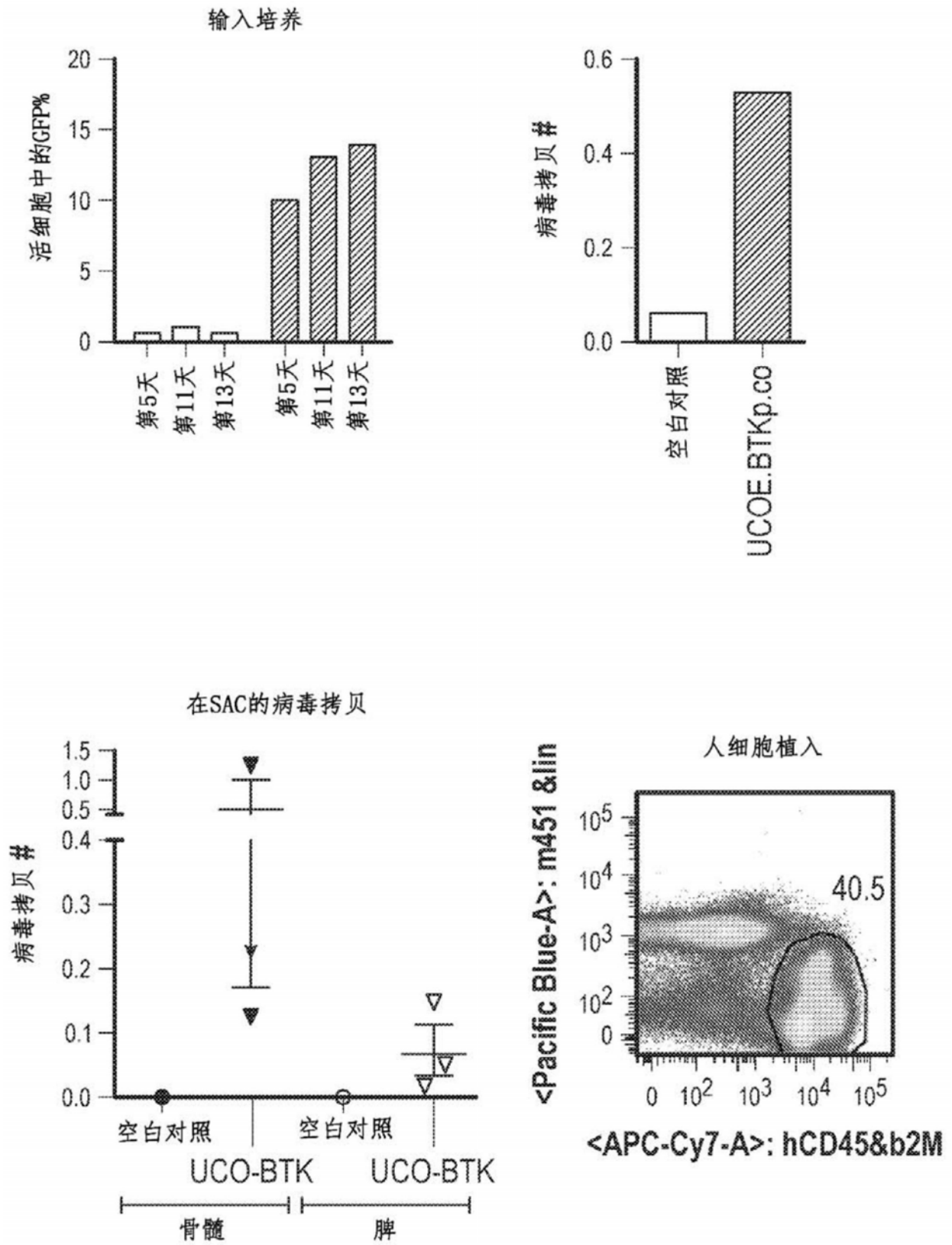


图91-1

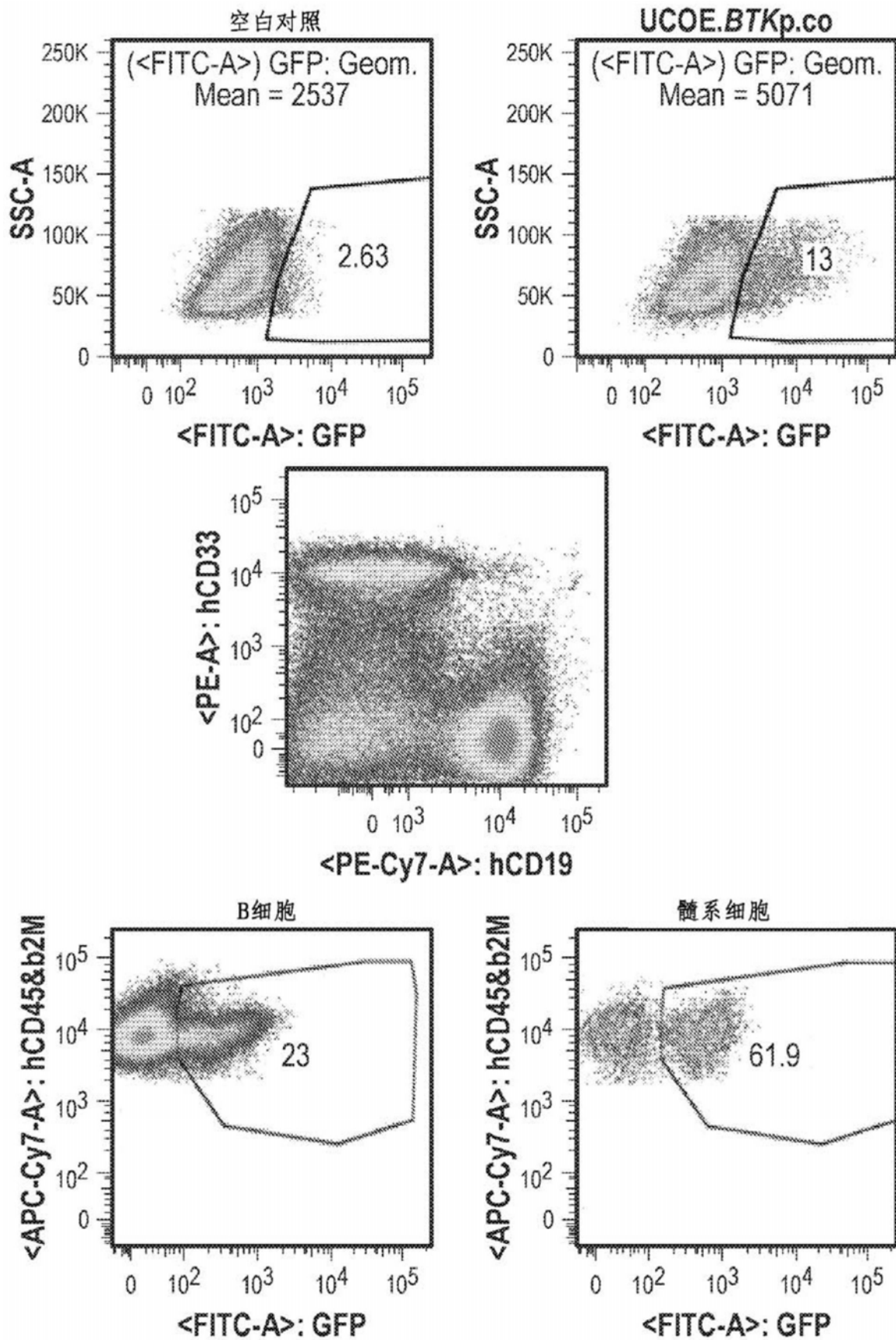


图91-2

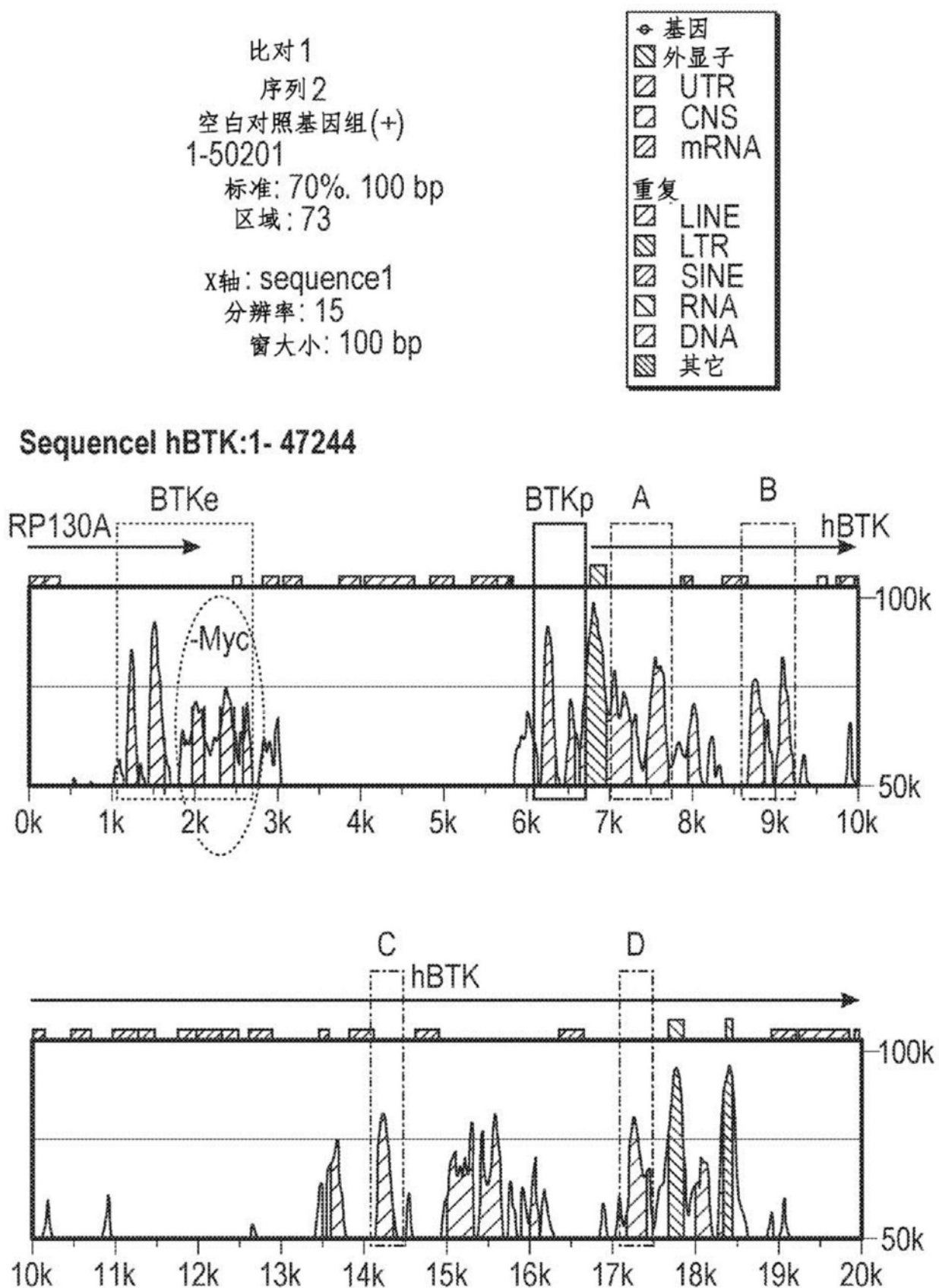


图92-1

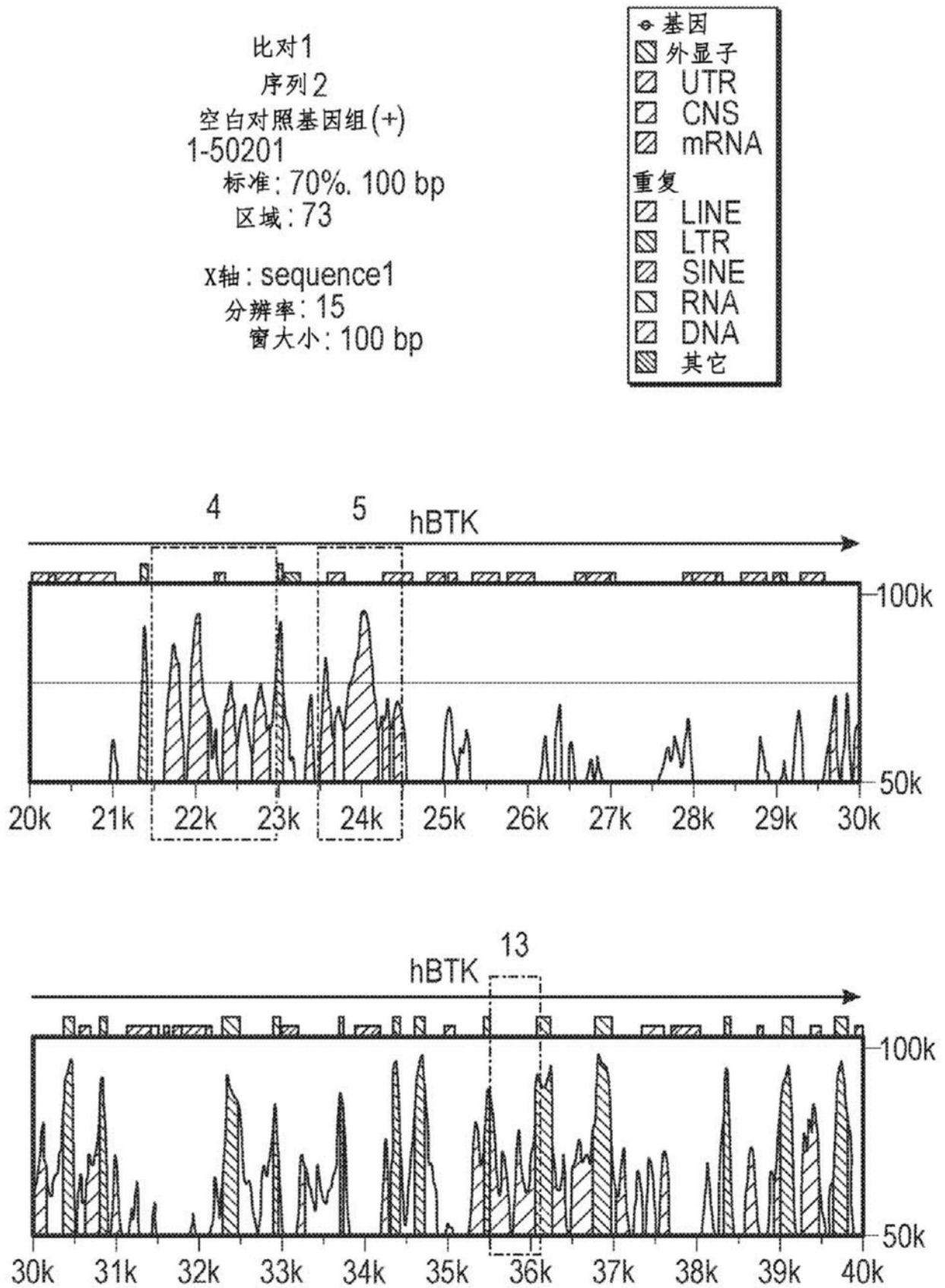


图92-2

设置1: 测试内含子4、5、13 (CONTIG=全部3种)

测试 1:

	BTKp	GFP	pRRL BTKp.GFP
4	BTKp	GFP	pRRL INT4.BTKp.GFP
5	BTKp	GFP	pRRL INT5.BTKp.GFP
13	BTKp	GFP	pRRL INT13.BTKp.GFP
1kb	BTKp	GFP	pRRL 1kb.BTKp.GFP
CONTIG	BTKp	GFP	pRRL CONTIG.BTKp.GFP
3kb	BTKp	GFP	pRRL 3kb.BTKp.GFP
511NOO	BTKp	GFP	pRRL revCONTIG.BTKp.GFP

注: “1kb” 和 “3kb” 是非保守内含子1序列, 用以控制增强子大小。

测试 2:

		BTKp	GFP	pRRL BTKp.GFP
	4-5	BTKp	GFP	pRRL INT4-5*.BTKp.GFP
UCOE	4-5	BTKp	GFP	pRRL 0.7UCOE.IE.BTKp.GFP
	CONTIG	BTKp	GFP	pRRL CONTIG.BTKp.GFP

* INTA-5元件又称“IE”

测试 3 (小鼠中):

	UCOE	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.BTKp.coBTK
	4-5	BTKp	BTK	pRRL IE.BTKp.coBTK
UCOE	4-5	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK

图92-3

设置2：测试内含子1（4个片段：A、B、C和D）

	BTKp	GFP	pRRL BTKp.GFP
4-5	BTKp	GFP	pRRL IE.BTKp.GFP
INT1: ABCD	BTKp	GFP	pRRL ABCD.BTKp.GFP
DCBA	BTKp	GFP	pRRL DCBA.BTKp.GFP
AB	BTKp	GFP	pRRL AB.BTKp.GFP
A	BTKp	GFP	pRRL A.BTKp.GFP
B	BTKp	GFP	pRRL B.BTKp.GFP

设置3：测试上游增强子

	UCOE	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.BTKp.coBTK
UCOE	AB	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.AB.BTKp.coBTK
	AB	BTKp	BTK	pRRL AB.BTKp.coBTK
BTKe	AB	BTKp	BTK	pRRL BTKe.AB.BTKp.coBTK
	BTKe	BTKp	BTK	pRRL BTKe.BTKp.coBTK
	BTKe	BTKp	BTK	pRRL BTKeΔMyc.BTKp.coBTK

图92-4

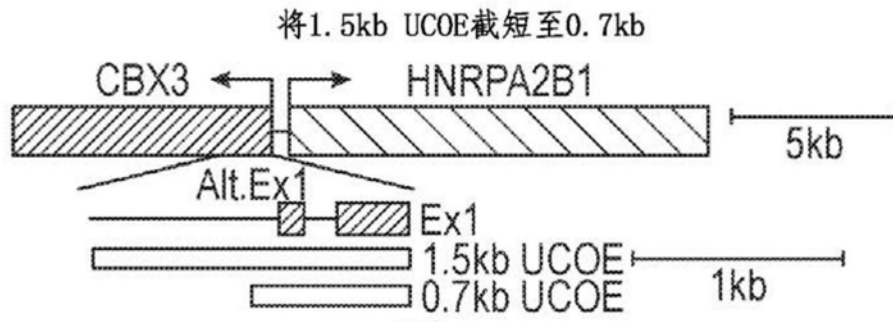


图93A

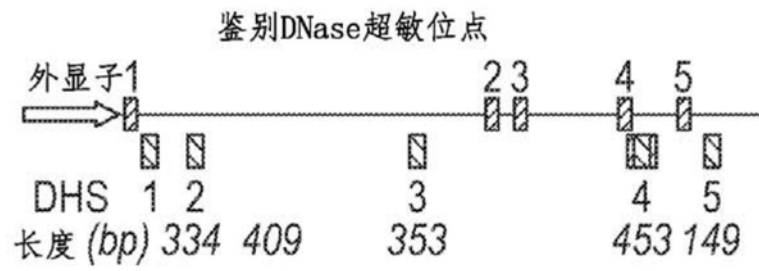


图93B

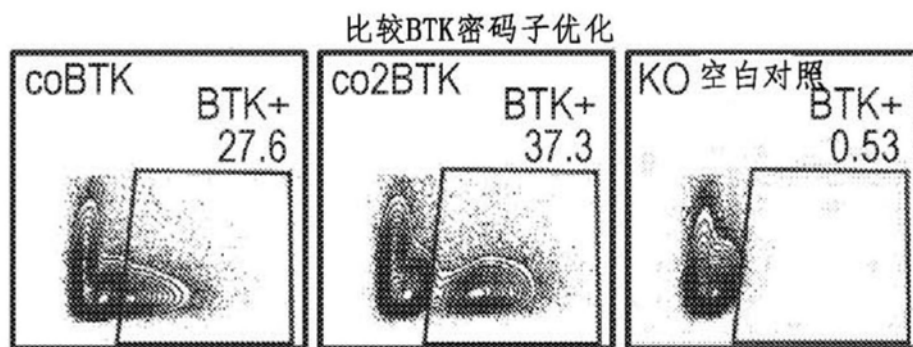


图93C

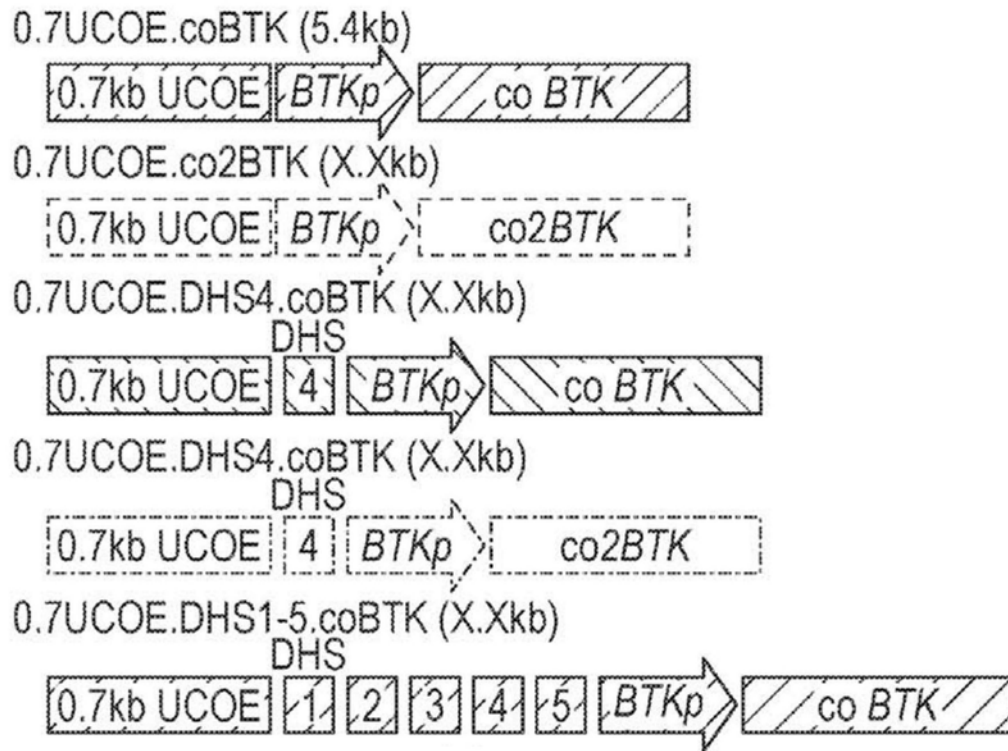
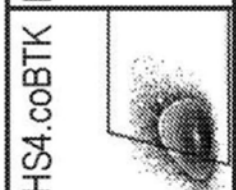
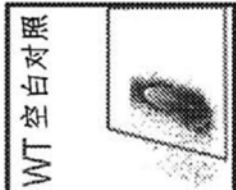
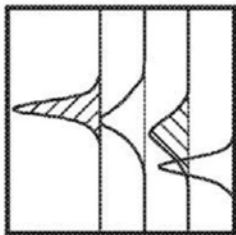


图93D



BTK

图94A

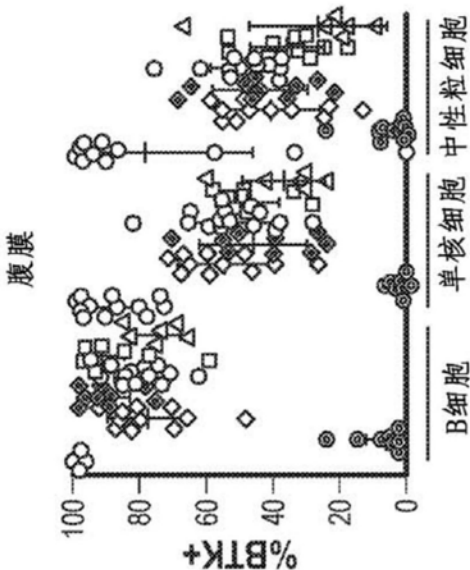


图94D

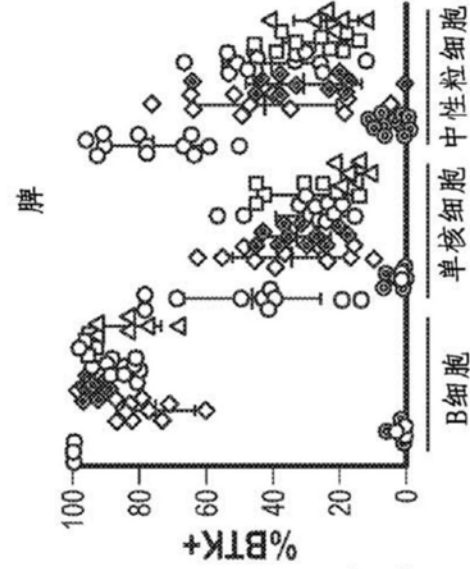


图94C

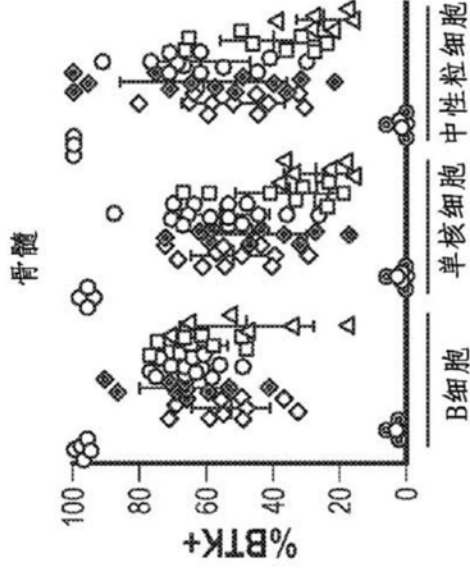
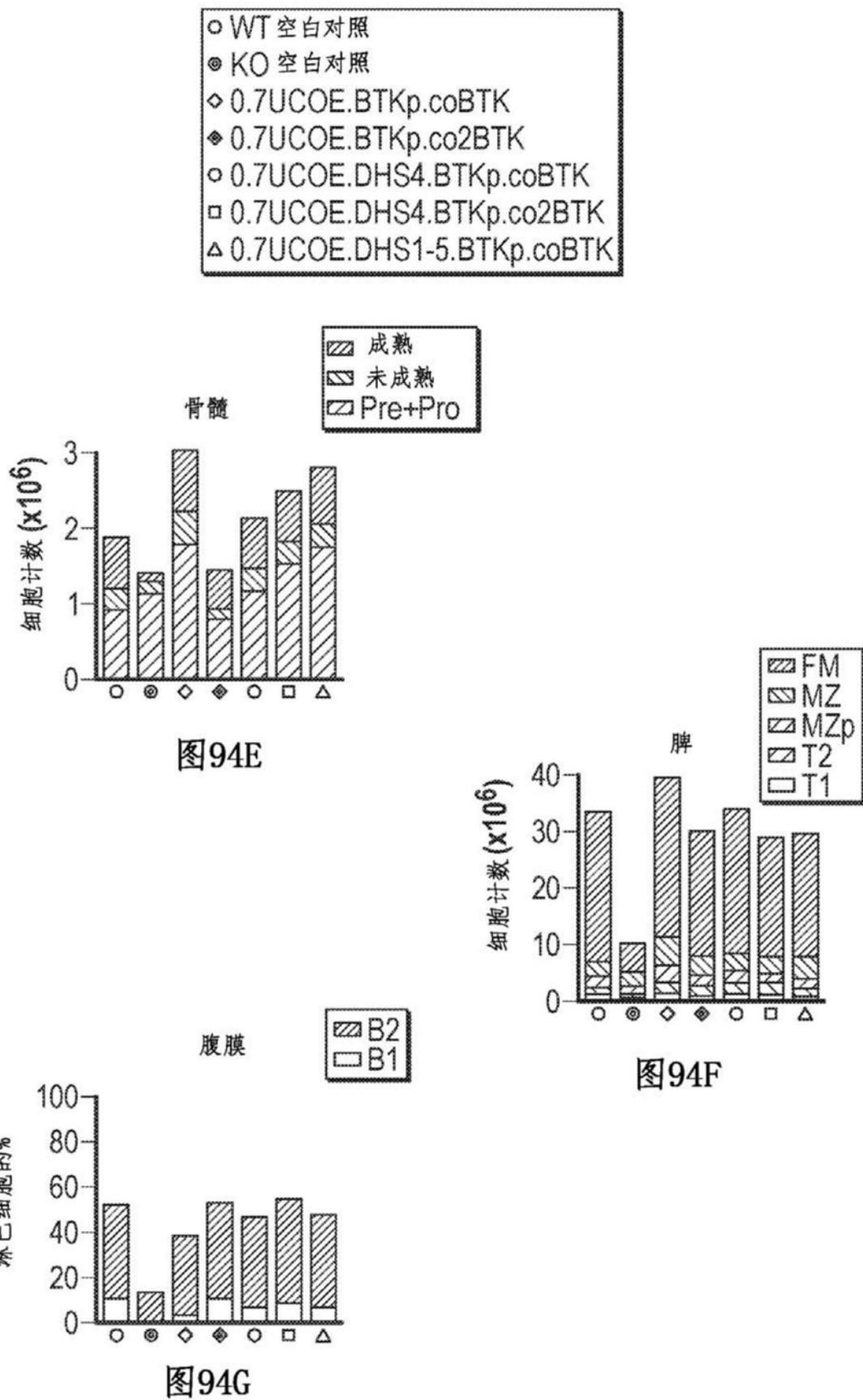


图94B



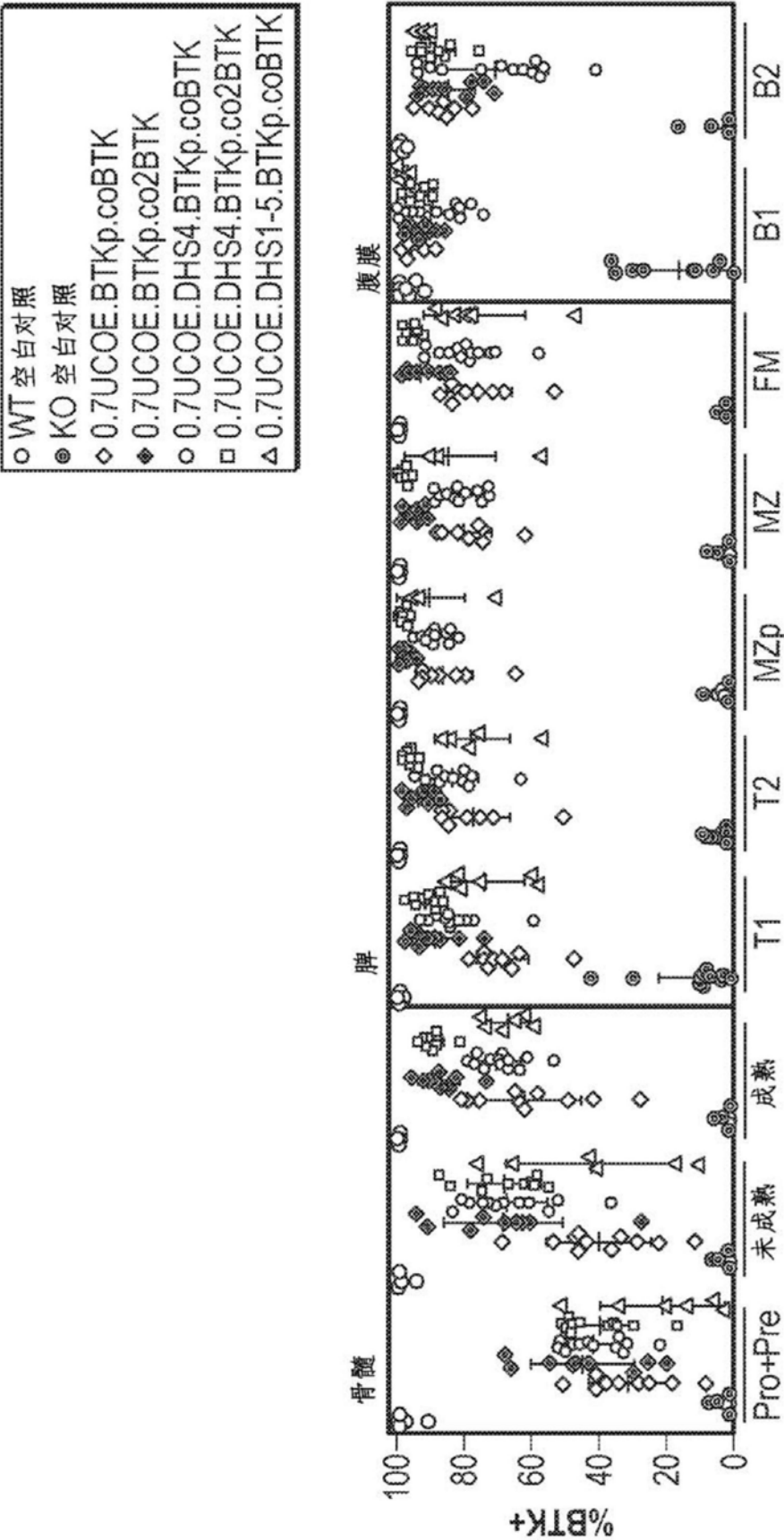


图94H

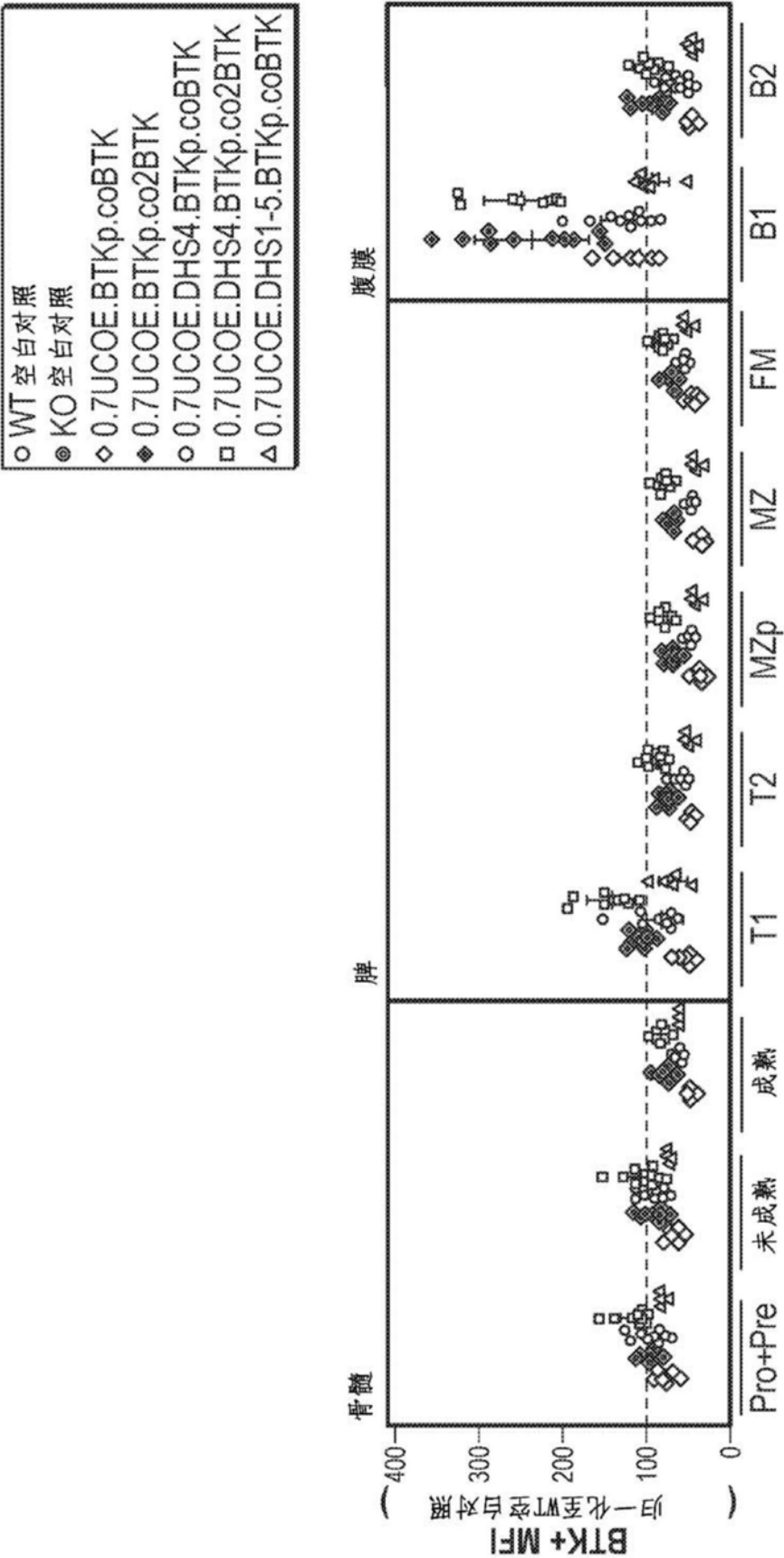


图94I

- WT 空白对照
- KO 空白对照
- ◇ 0.7UCOE.BTKp.coBTK
- ◆ 0.7UCOE.BTKp.co2BTK
- 0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK
- 0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2BTK
- △ 0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTK

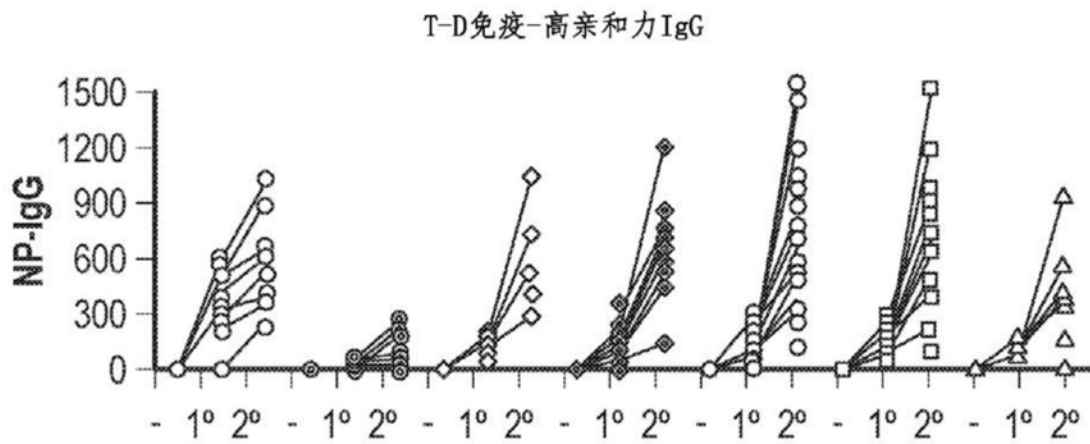


图95A

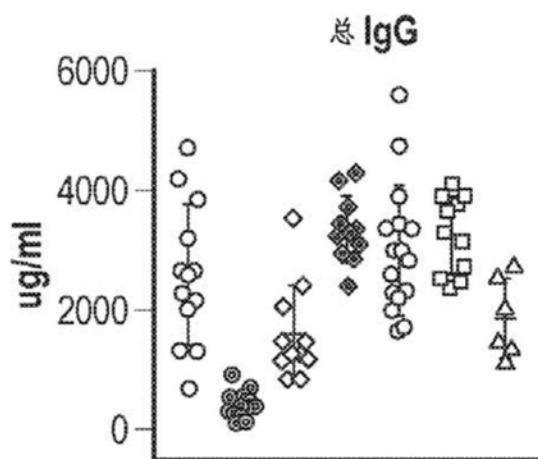


图95B

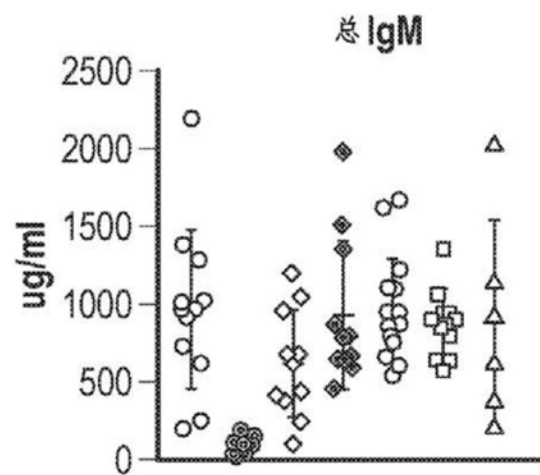


图95C

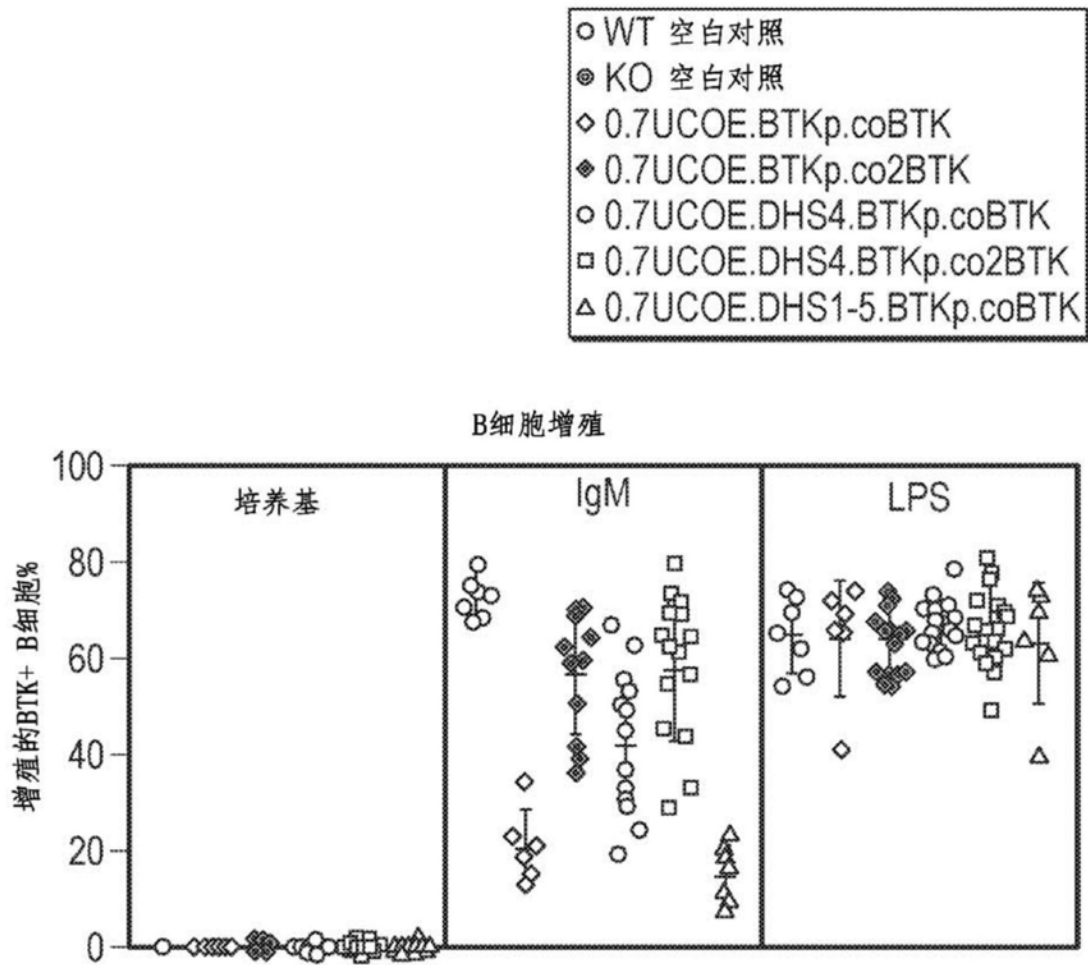


图95D

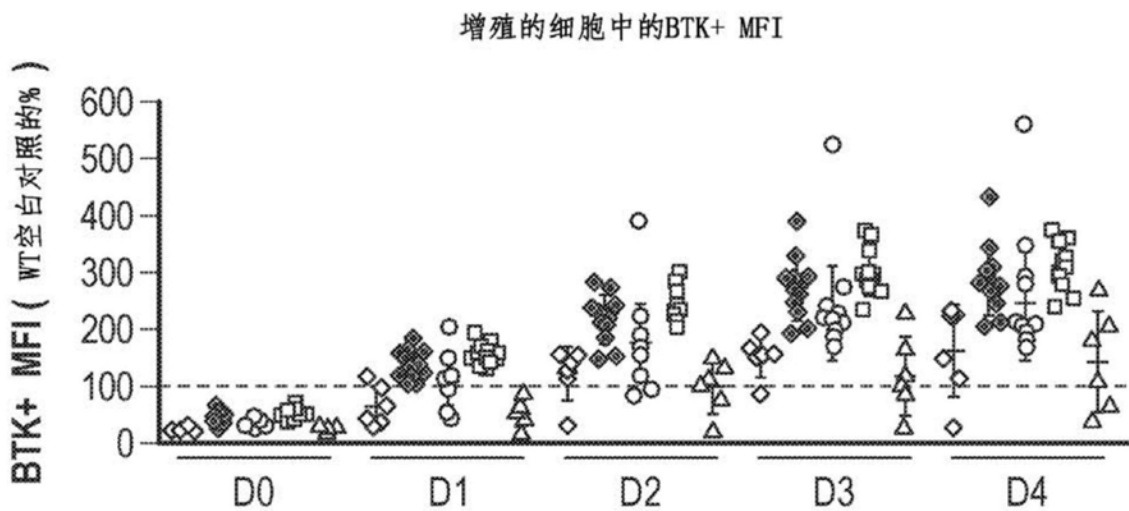


图95E

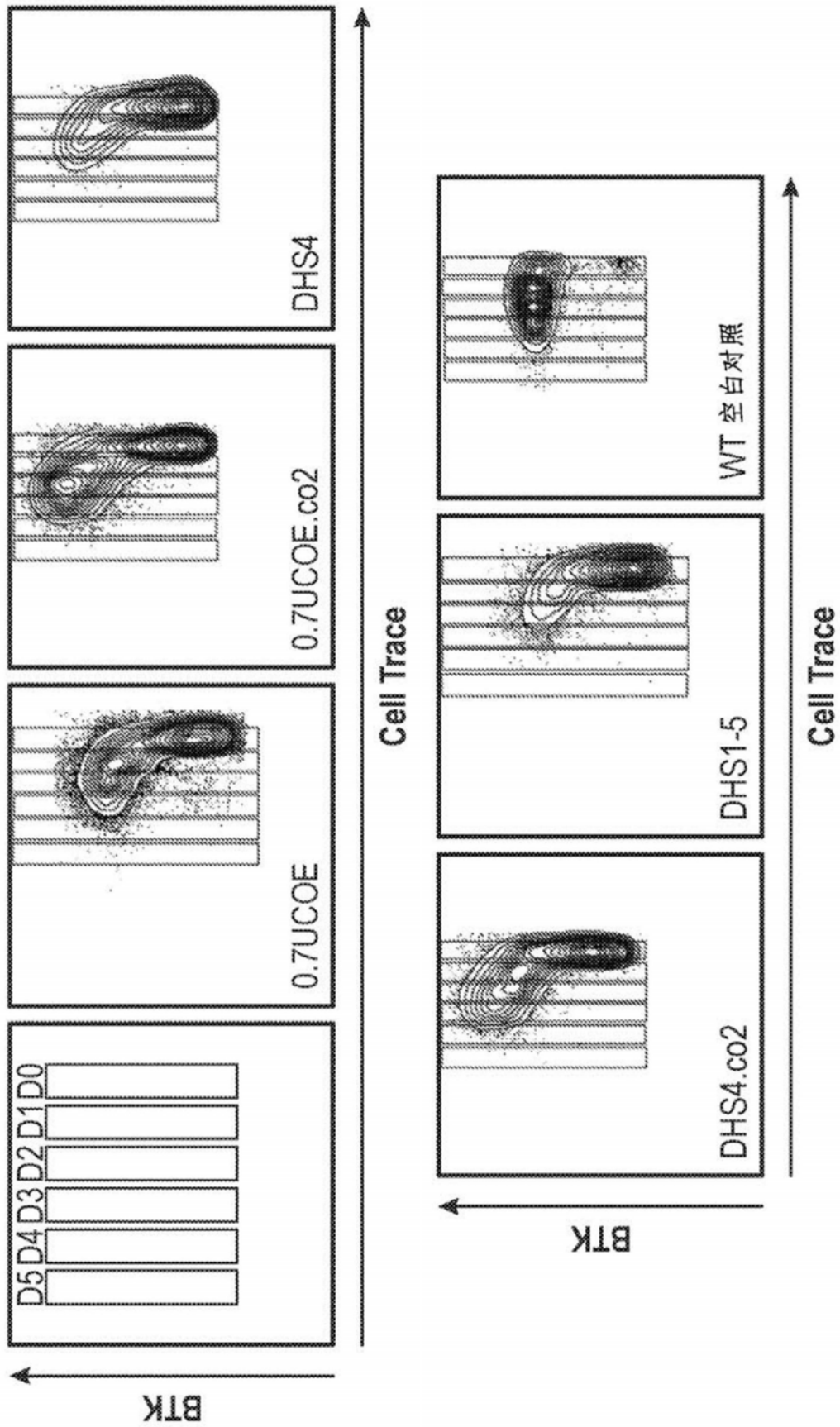


图95F

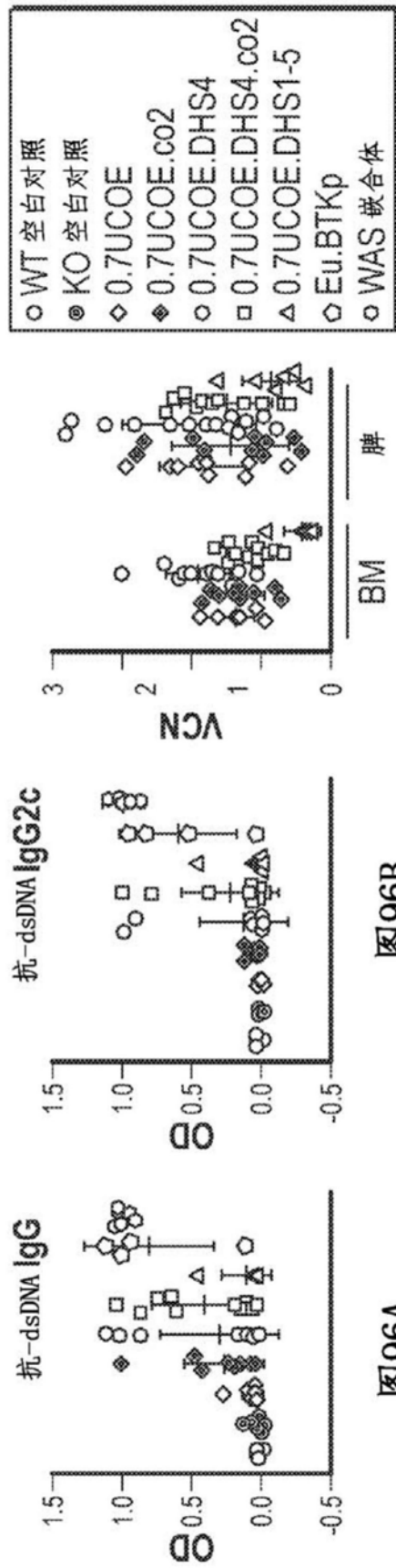


图 96C

图 96B

图 96A

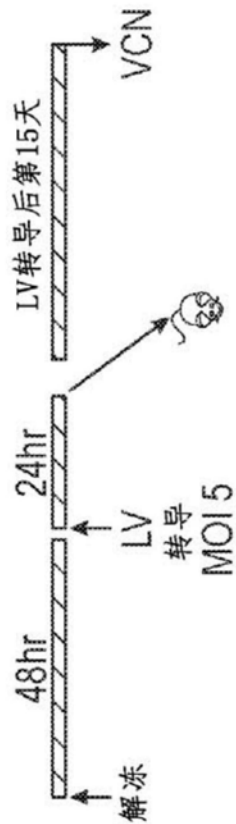
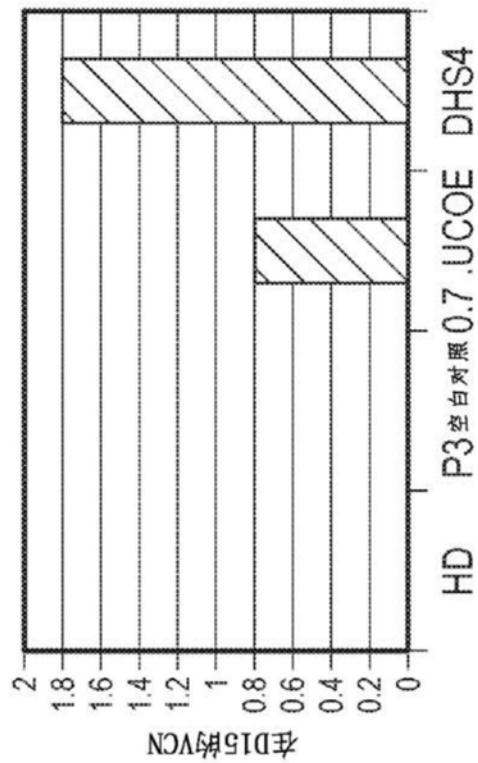


图97

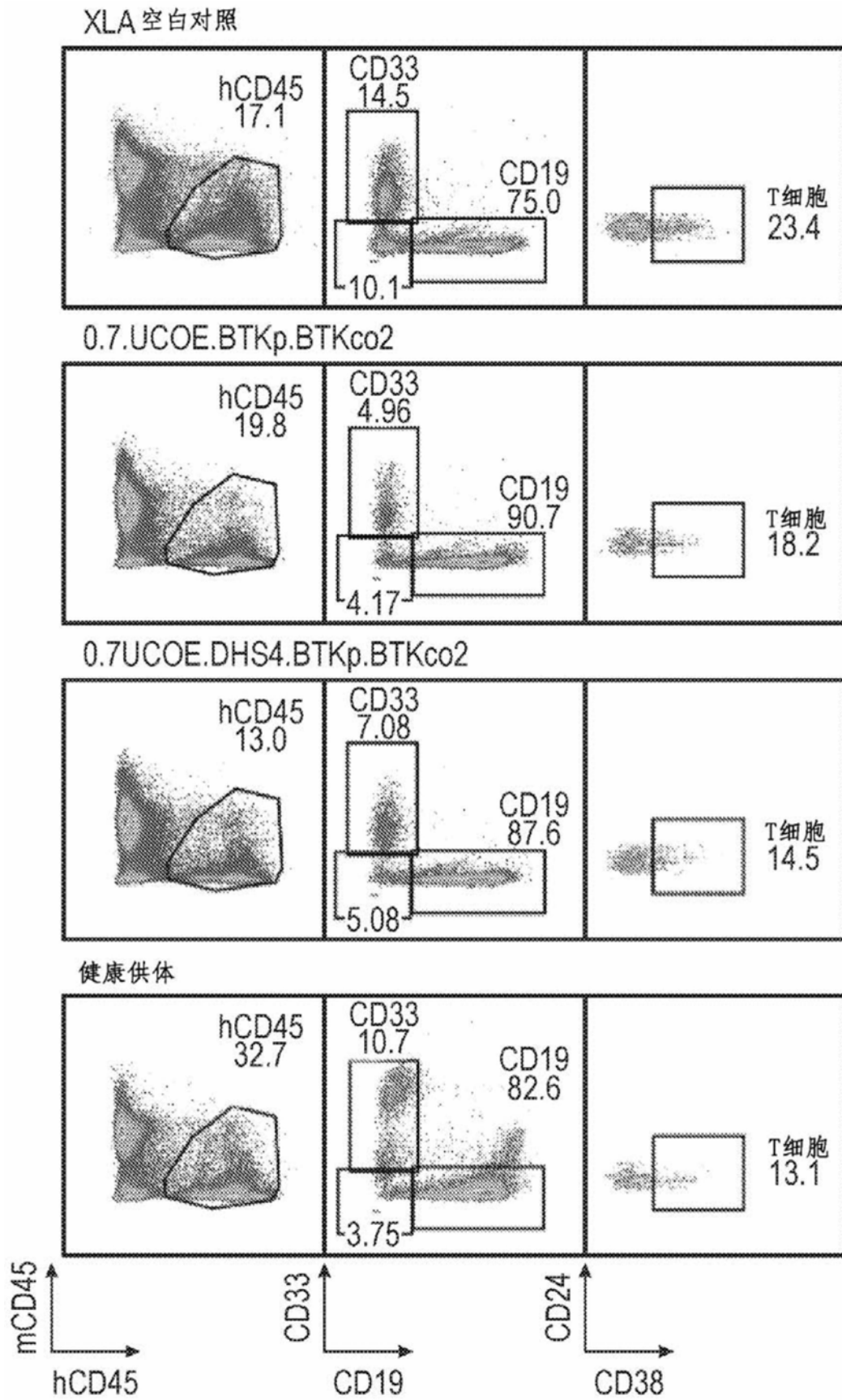


图98A

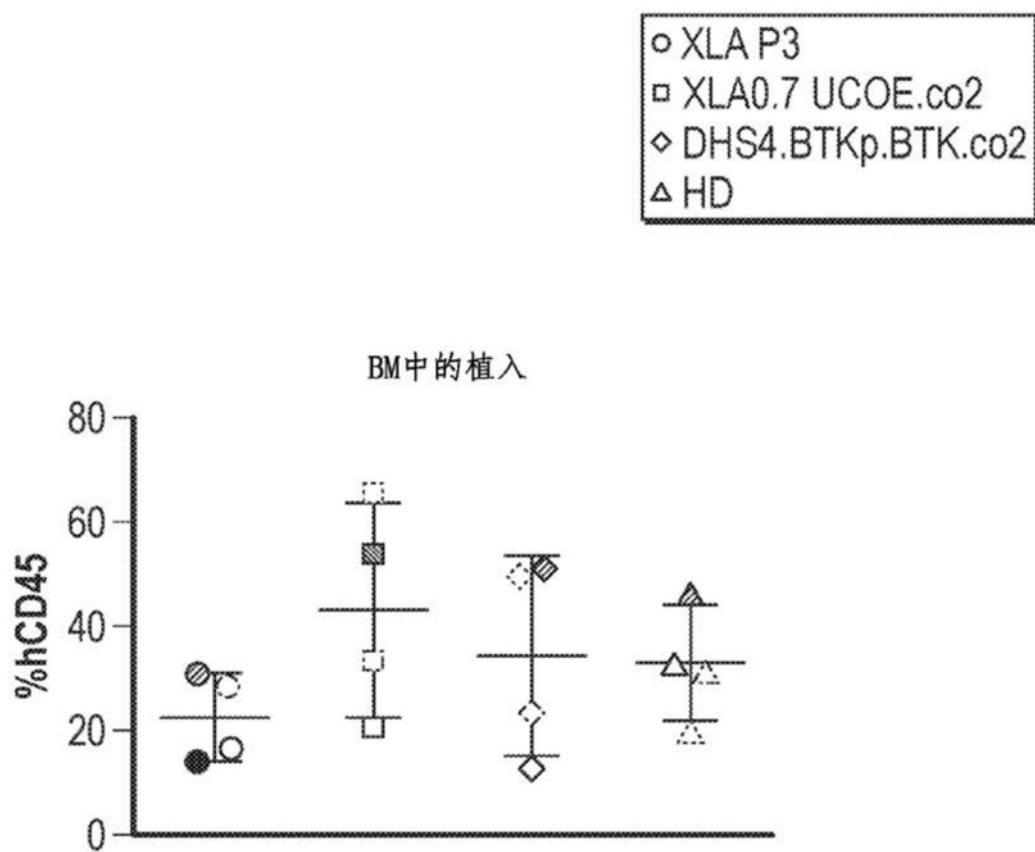


图98B

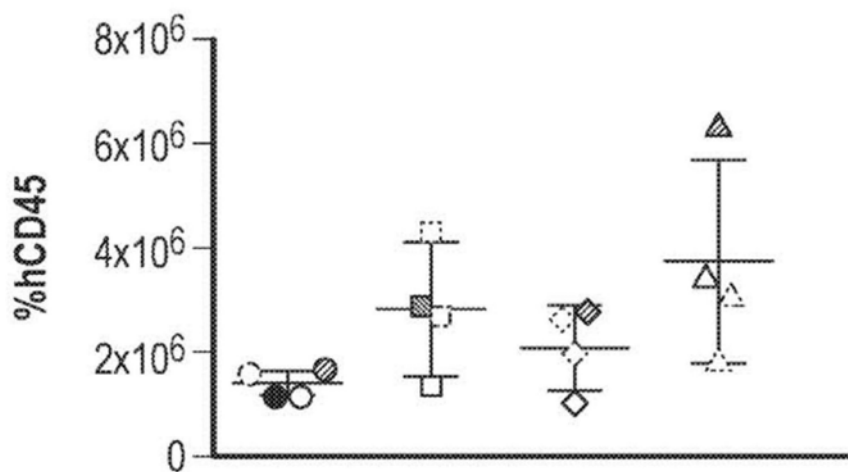


图98C

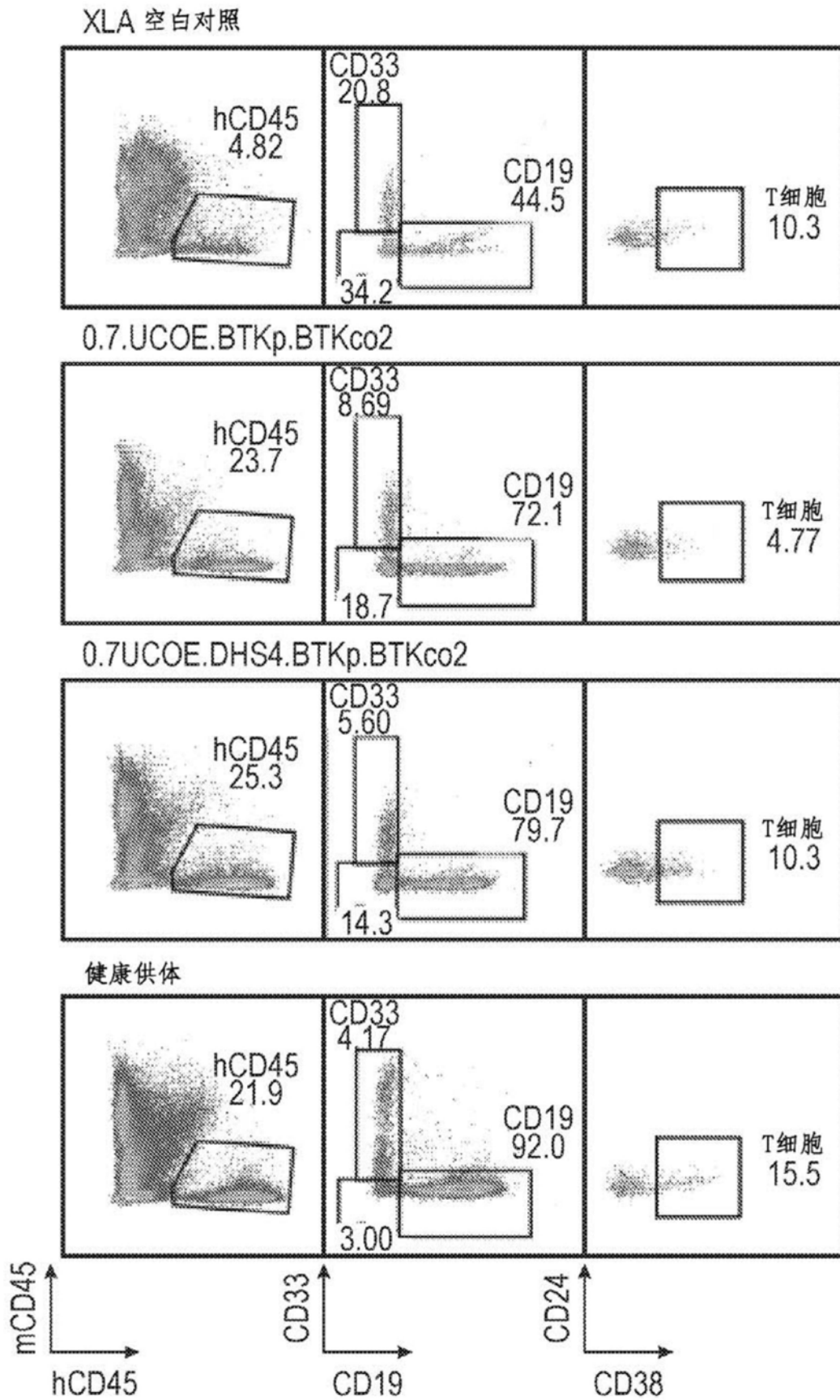


图99A

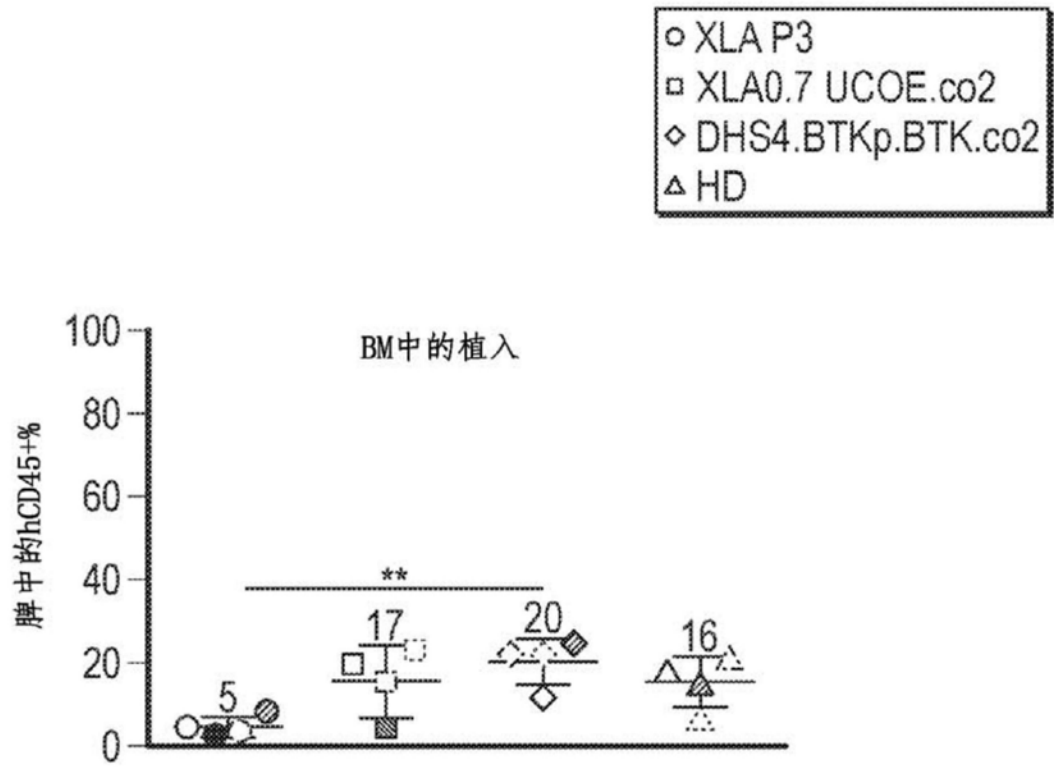


图99B

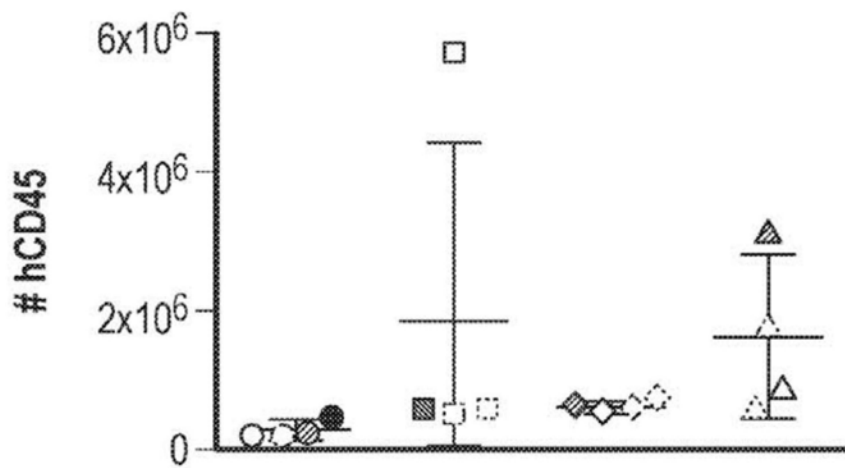


图99C

○ XLA P3
 □ XLA 0.7 UCOE.co2
 ◇ DHS4.BTKp.BTK.co2
 △ HD

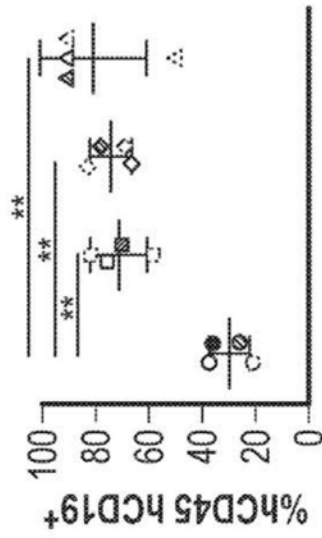


图100A

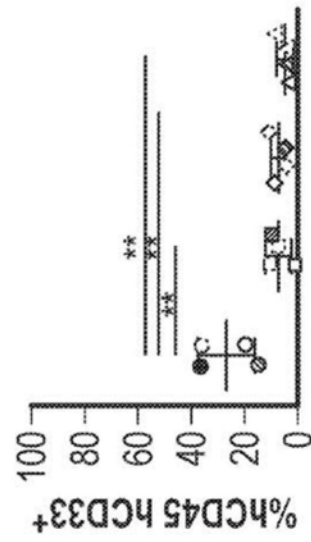


图100B

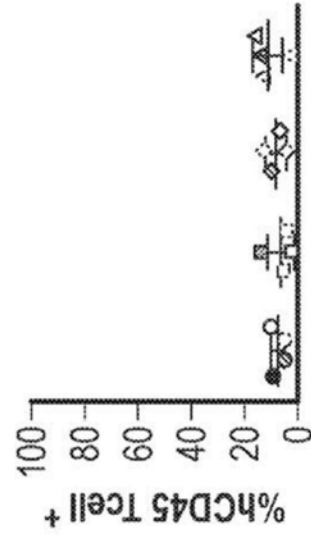


图100C

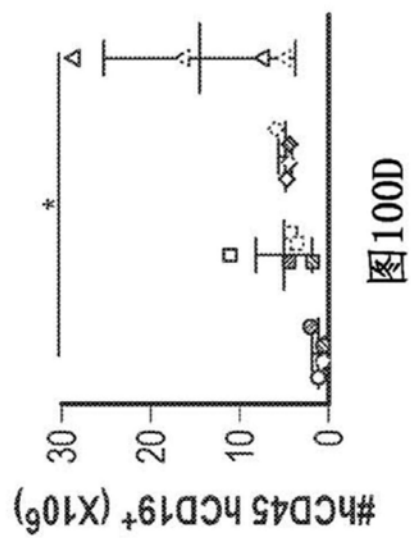


图100D

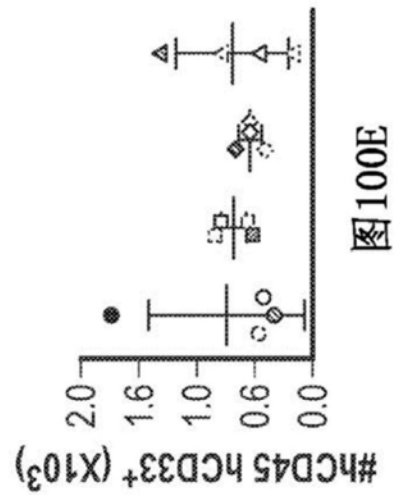


图100E

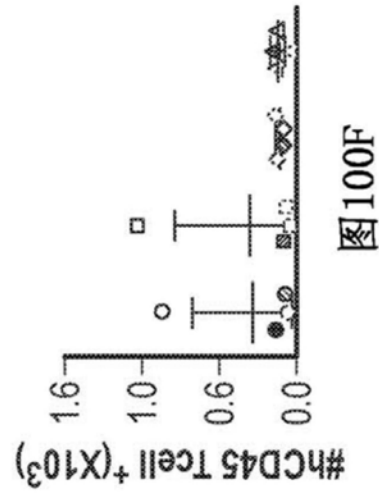


图100F

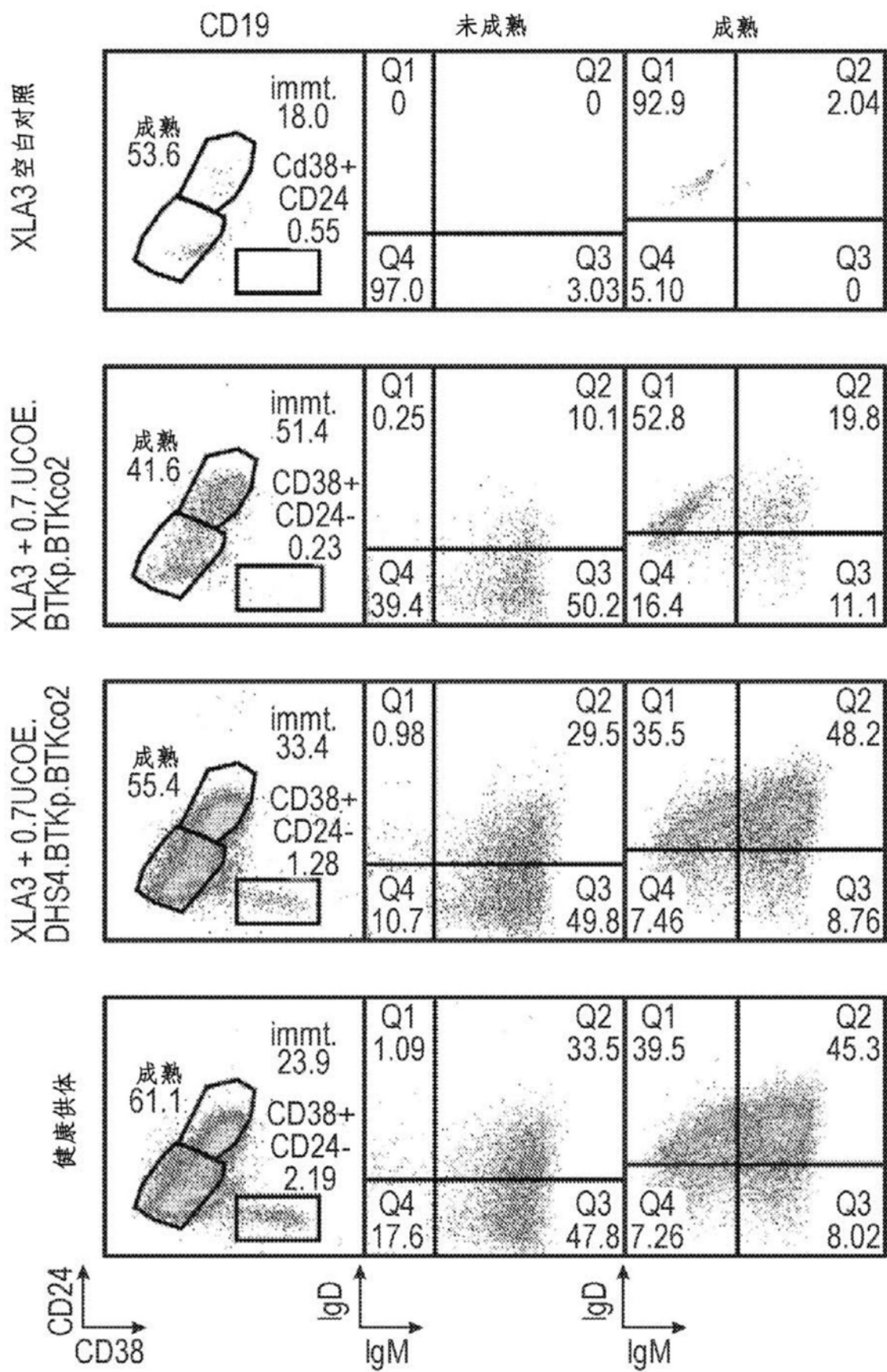


图101-1

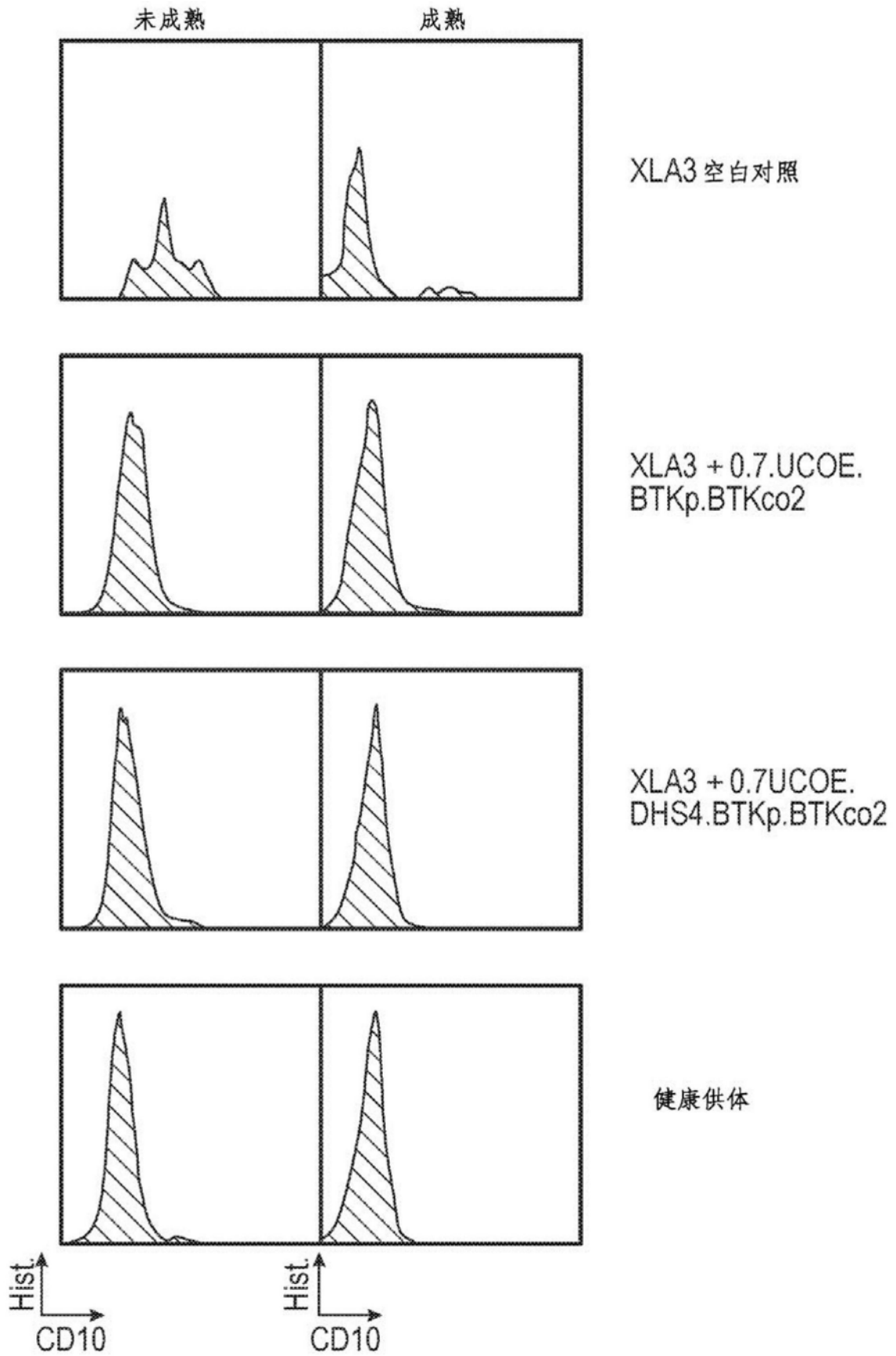


图101-2

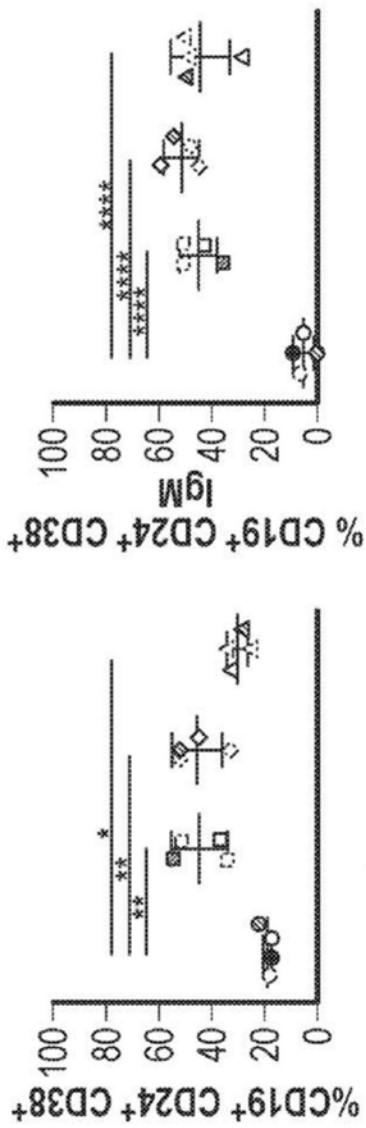


图102A

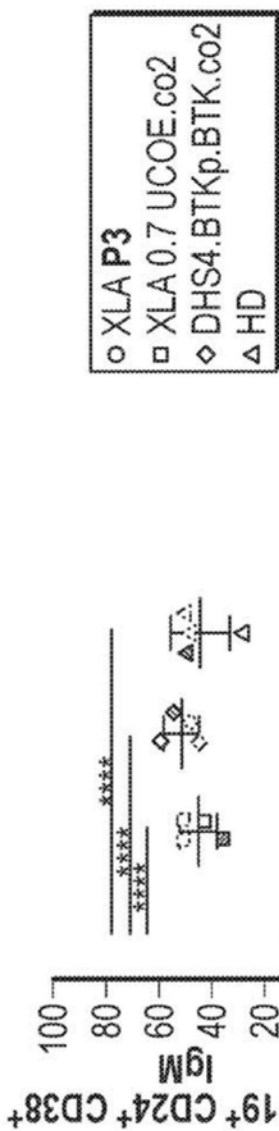


图102B

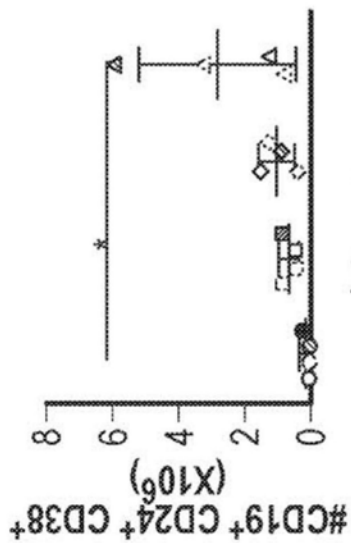


图102C

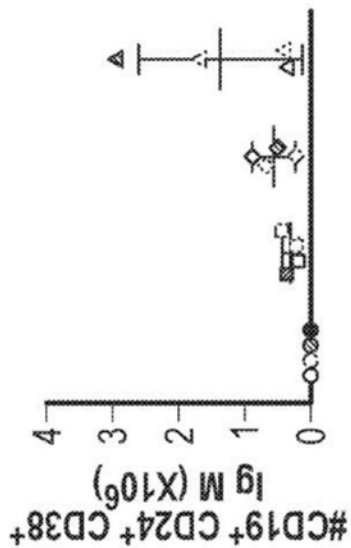


图102D

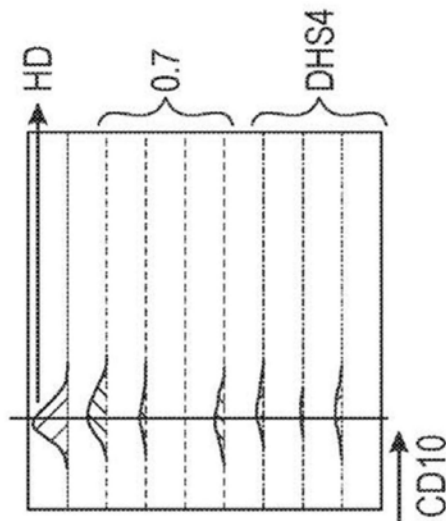
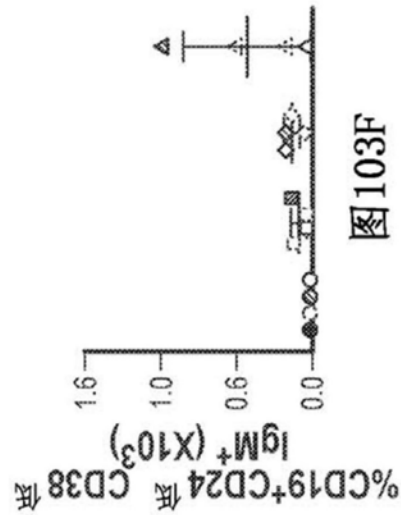
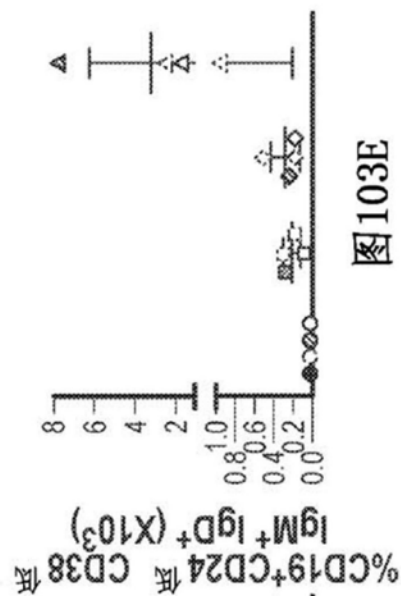
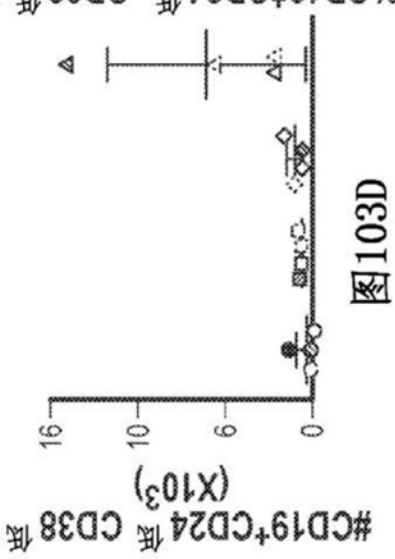
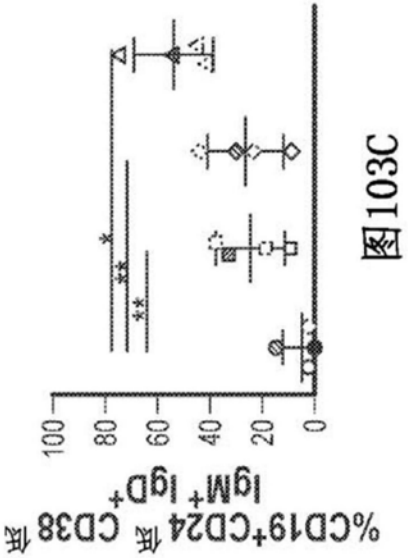
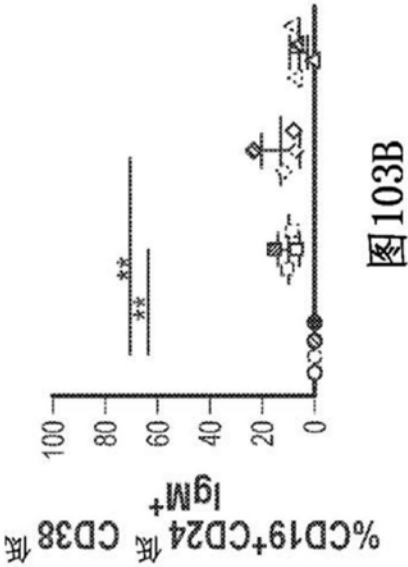
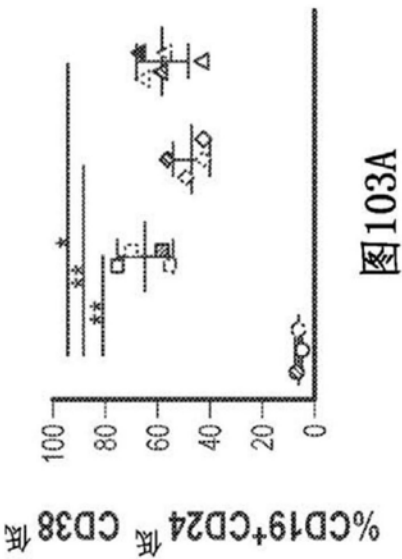
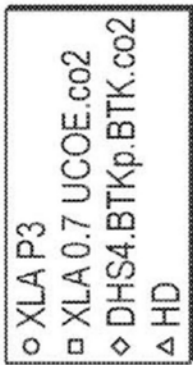


图102E



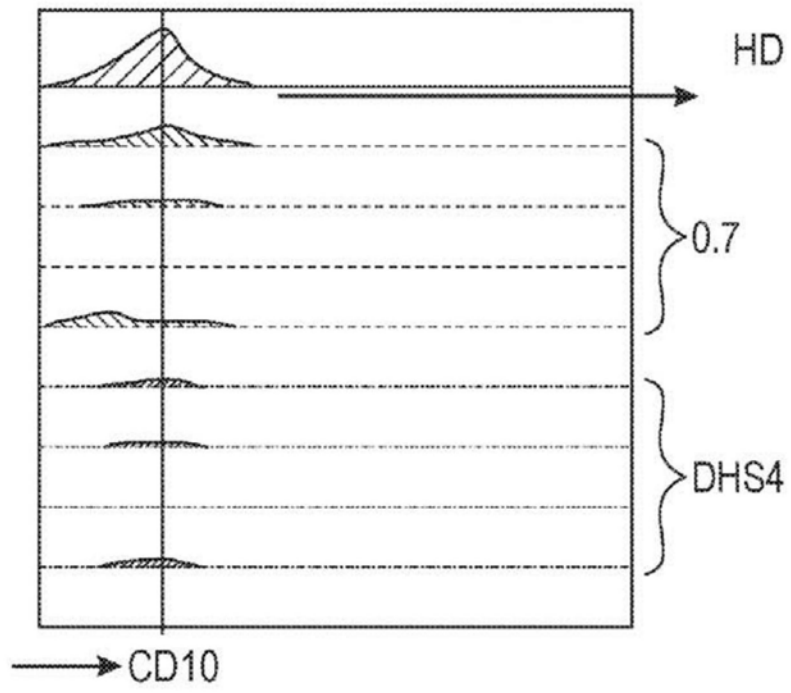


图103G

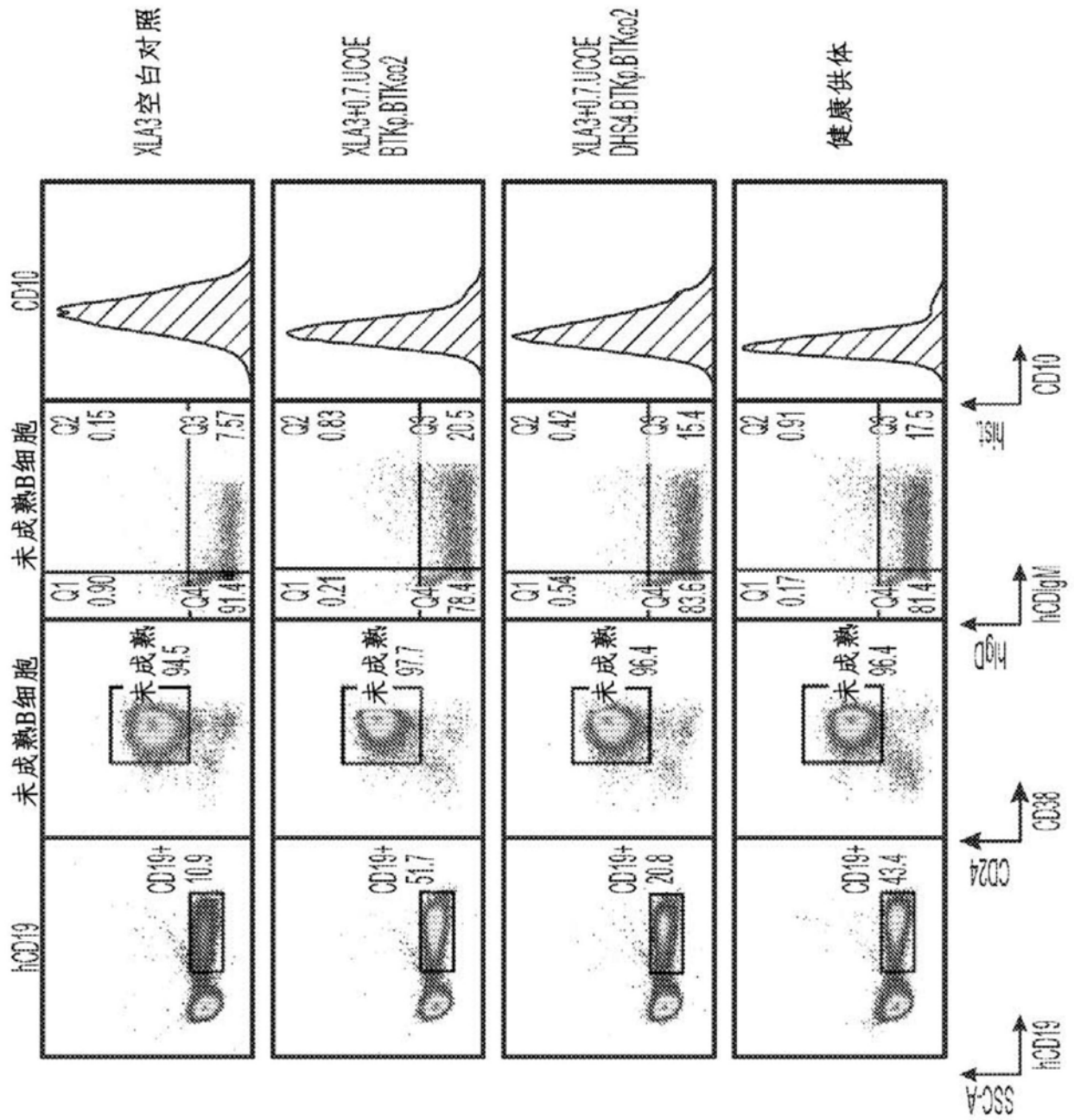


图104

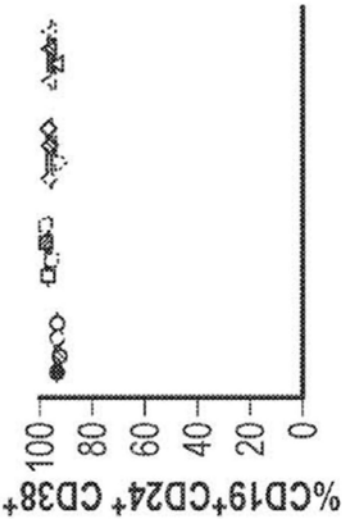


图105A

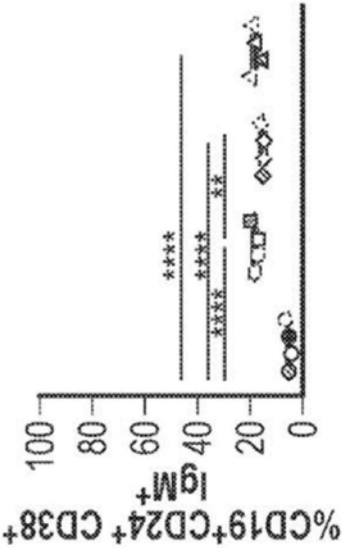


图105B

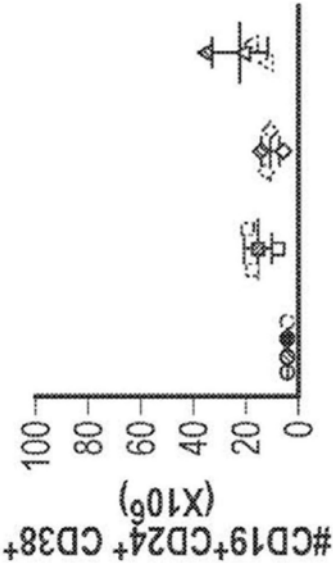


图105C

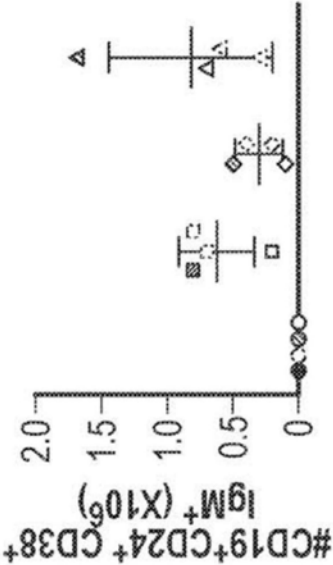


图105D

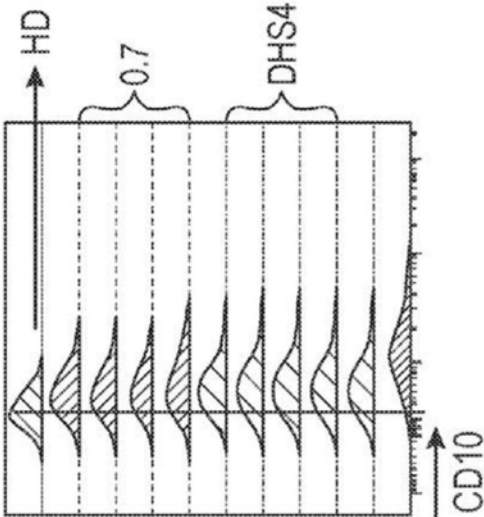


图105E



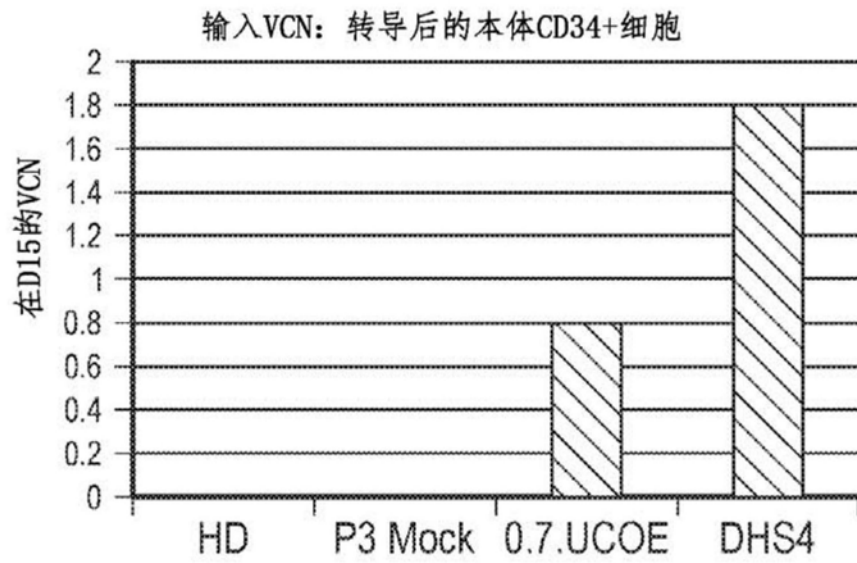
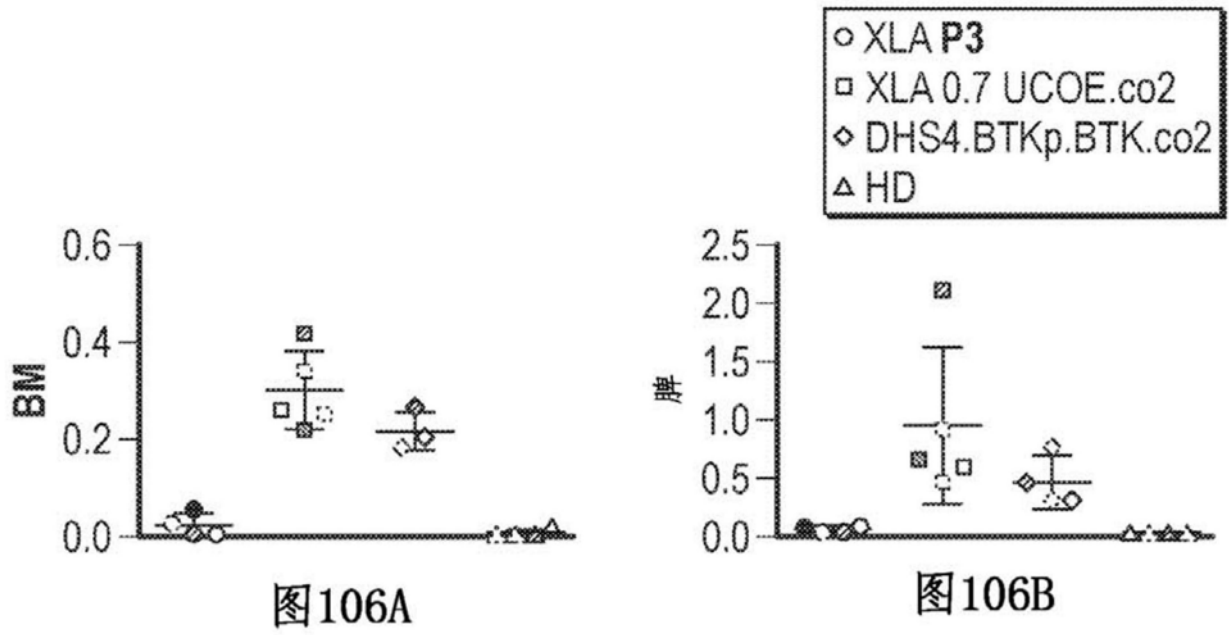


图106C

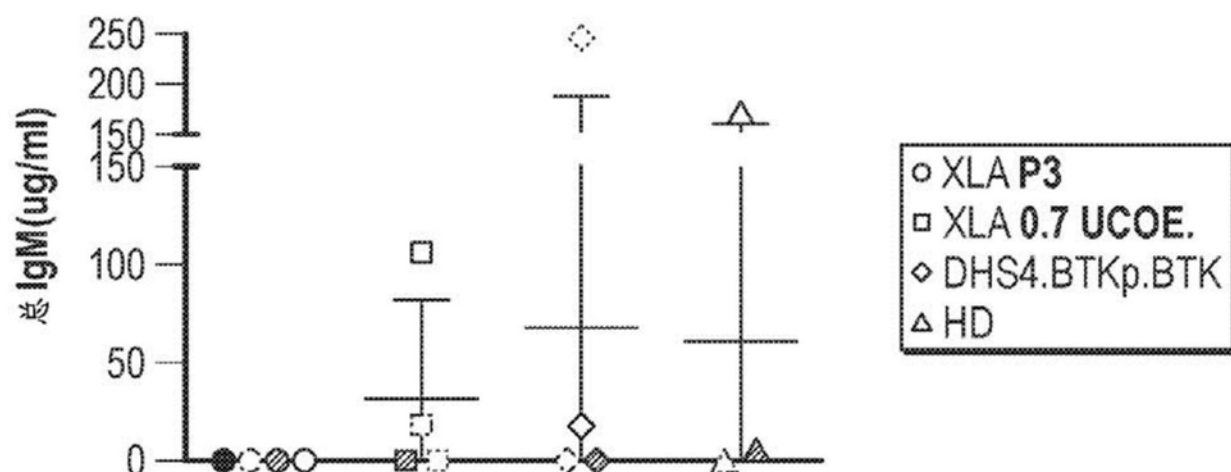


图107

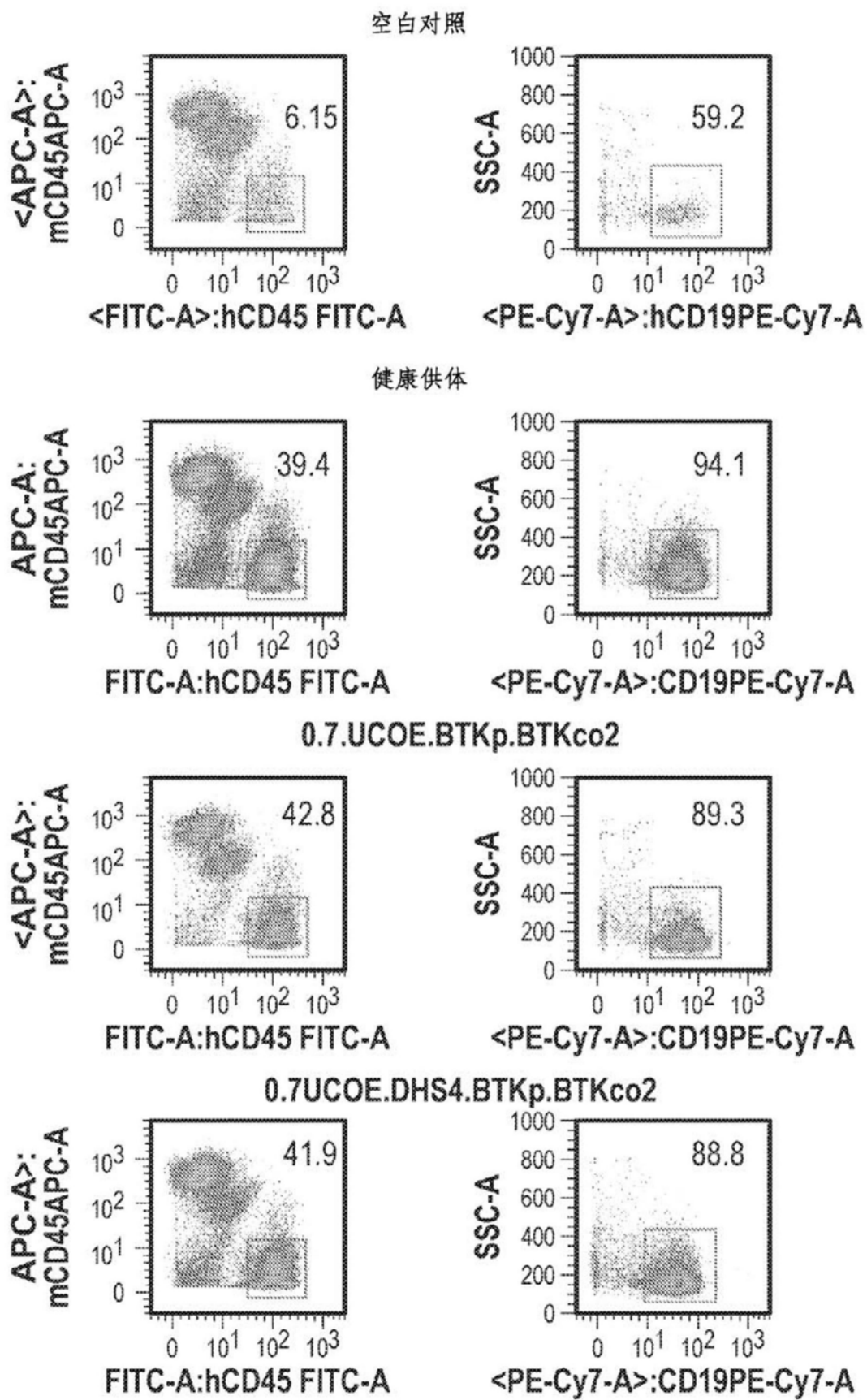


图108A

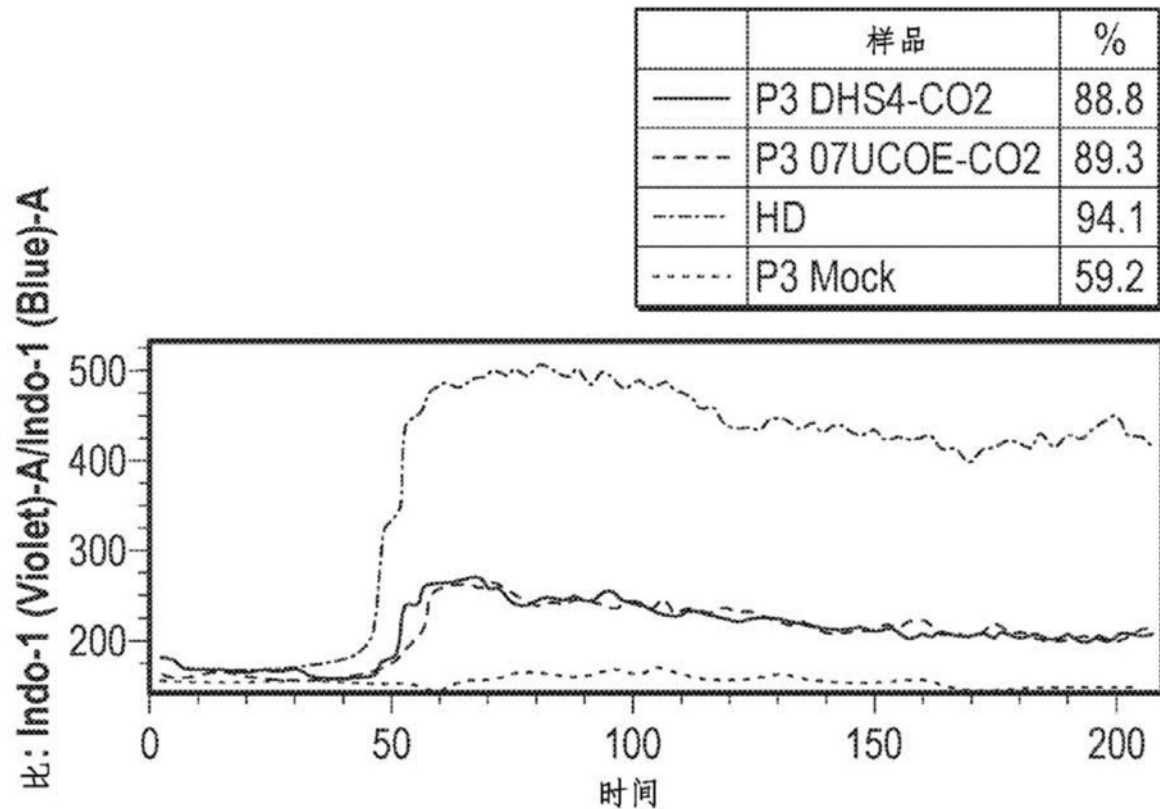


图108B

方法：B细胞分化方案

3步浆细胞分化培养系统：

起始细胞：来自NSG接受者脾的 0.5×10^6 细胞

整个过程的基础培养基：IMDM+10% FBS+BME以及下列细胞因子：

(I阶段；7天) MegaCD40L(100 ng/mL) + CpG ODN 2006 (1 μ g/mL) + IL-2 (50 ng/mL) + IL-10 (50 ng/ml) + IL-15 (10 ng/mL)

(II阶段；3天) IL-2 (50 ng/mL) + IL-6 (50 ng/mL) + IL-10 (50 ng/ml) + IL-15 (10 ng/mL)

III阶段；4天) IL-6 (50 ng/mL) + IL-15 (10 ng/mL) + IFN- α 2B (100 U/mL)

注：在第1天后将培养体积加倍并在此后将细胞密度维持在 1×10^6 细胞/mL (或每两天将培养体积加倍)；在切换细胞因子前用PBS洗涤 (特别是在第I步和第II步之间)。

图109

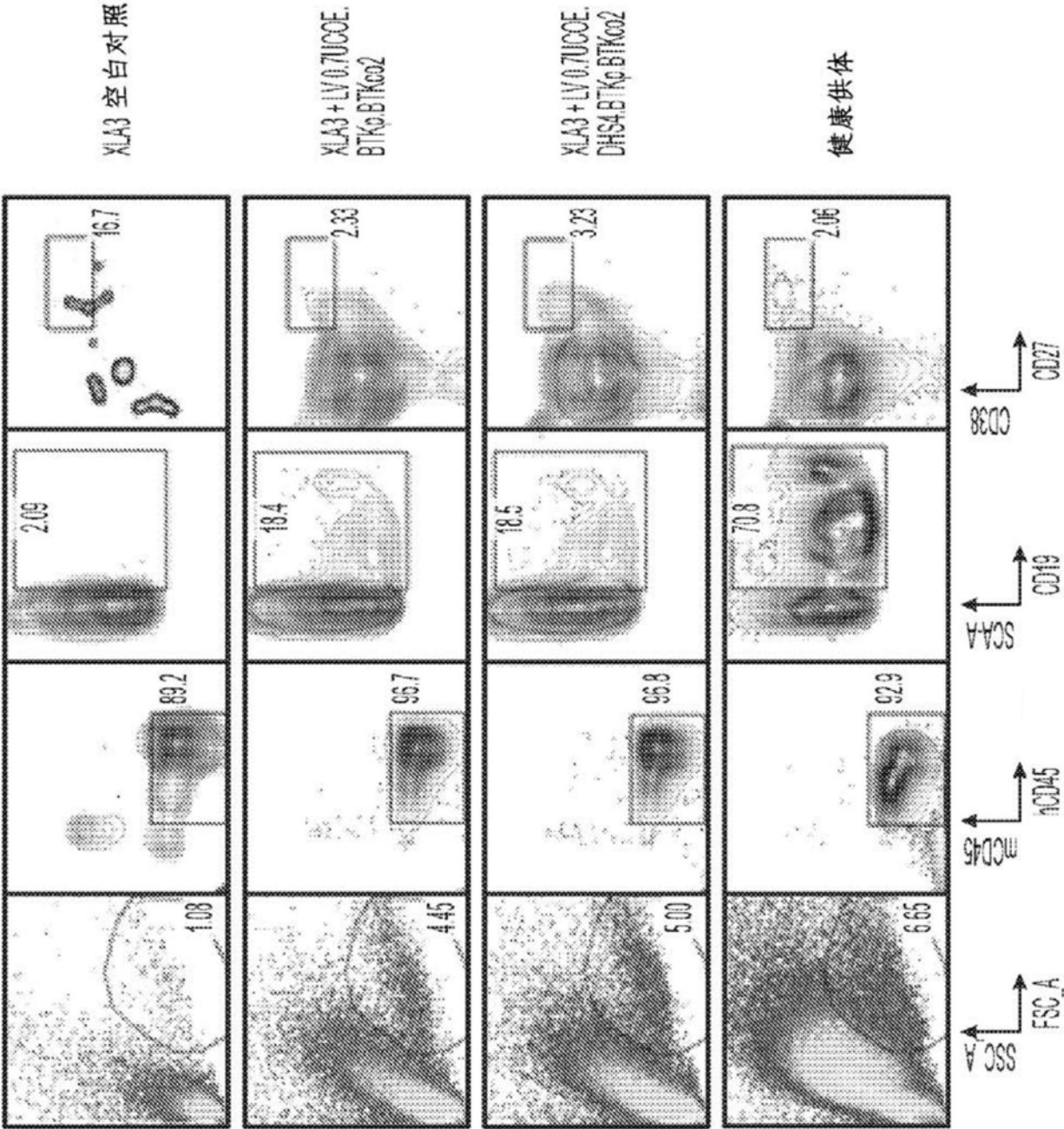


图110

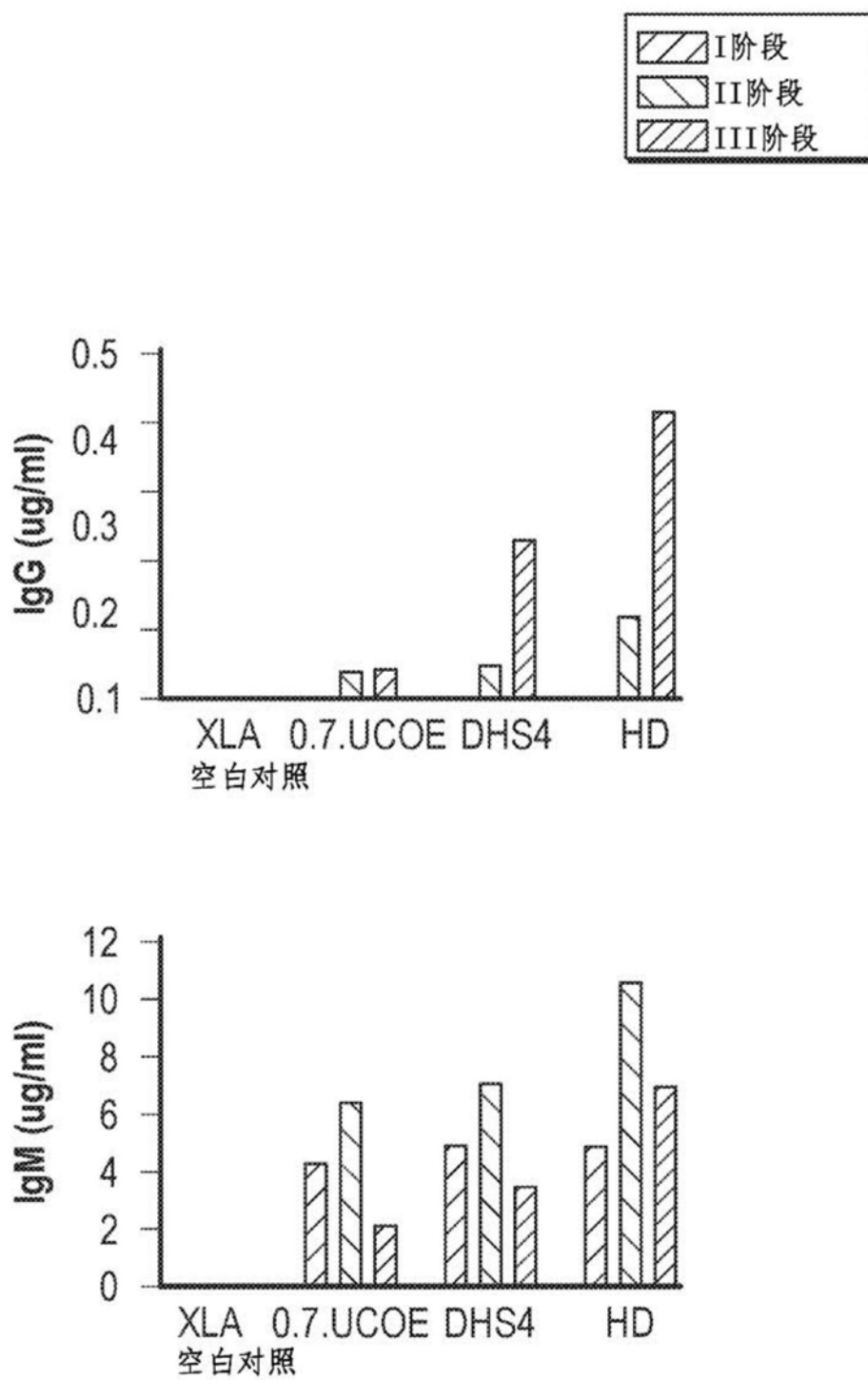


图111