(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0144444
(43) 공개일자 2021년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/02* (2017.01) *C12N 15/63* (2006.01)
*C12N 15/70* (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/02* (2013.01)
*C12N 15/635* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0061812
(22) 출원일자 2020년05월22일
심사청구일자 2020년05월22일

(71) 출원인
**인천대학교 산학협력단**
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
**박준태**
인천광역시 연수구 해송로 143 송도웰카운티1단지 101동 703호
**국명옥**
인천광역시 계양구 임학서로42번길 3 대동빌라 401호
(74) 대리인
**차준용**

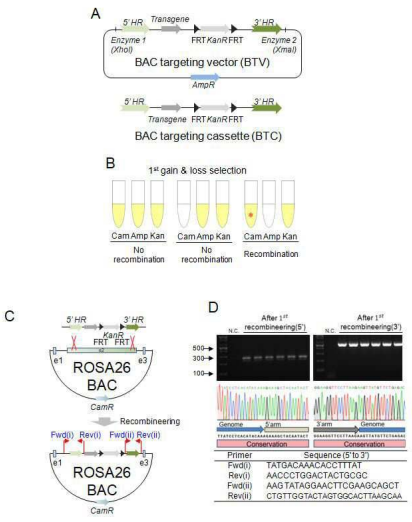
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **박테리아 인공 염색체 재조합 스크리닝 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 박테리아 인공 염색체 재조합 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로 이득 & 손실(gain & loss)이라는 새로운 스크리닝 방법을 이용하여 박테리아 인공 염색체(BAC) 재조합의 완료시간을 단축시키는 방법이다. 본 발명의 새로운 방법은 BAC 재조합을 완료하는데 13일(실험 일수 기준)이 소요되었지만 기존 방법은 약 4개월이 소요된다. 전반적으로, 본 발명자의 새로운 BAC 재조합 전략은 BAC 재조합 효율이 현저히 증가하고 재조합 기간이 단축됨에 따라 입증된 바와 같이 단백질 발현에 새로운 길을 제공할 수 있다. 새로 개발된 BAC 프로토콜을 사용하여 강력한 벡터 플랫폼 개발에 적용된다. 벡터 플랫폼에서의 공학은 일반적으로 포유동물 세포에서 재조합 단백질의 생산을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***C12N 15/70*** (2013.01)
***C12Q 1/686*** (2018.05)
*C12N 2800/108* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1345318195 |
| 과제번호 | 2018R1D1A1B07040293 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 개인기초연구(교육부)(R&D) |
| 연구과제명 | 자가포식작용 매개 대사과정 조절을 통한 노화 제어 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 인천대학교 |
| 연구기간 | 2018.06.01 ~ 2021.05.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

1) 관심 유전자(GOI)와 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트;및

제2항생제 내성 유전자를 포함하는 BAC 타겟 벡터로부터 상기 DNA 카세트를 분리하는 단계;

2) 제3항생제 내성 유전자를 포함하는 박테리아 인공 염색체(BAC)로 형질전환된 세포 내에서 상기 DNA 카세트와 박테리아 인공 염색체를 재조합하는 단계;

3) 제1항생제 및 제3항생제를 포함하는 배지 플레이트에서 상기 세포를 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계;

4) 상기 콜로니를 선별하여 제3항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계;

5) 상기 세포가 배양된 배양액을 제1항생제가 포함된 배지, 제2항생제가 포함된 배지 및 제3항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계;및

6) 제1항생제가 포함된 배지에 대하여 양성 및 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 4)에서, 플레이트 상에서 36 ~ 48 시간 배양된 세포 콜로니 중 직경이 1㎜ 이하인 콜로니를 선별하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

박테리아 인공 염색체(BAC)는 ROSA26 BAC이며, 상기 DNA 카세트는 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 5' 상동성 암은 서열번호 1의 염기서열로 표시되고, 상기 3' 상동성 암은 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 DNA 카세트는 제1항생제 내성 유전자 양 측면에 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열을 갖는 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 DNA 카세트는 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 5' 상동성 암(homologous arm); 관심 유전자(GOI); 양 측면에 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 포함하는 제1항생제 내성 유전자; 및 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 연결한 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

상기 세포는 L-아라비노스-유도성 *FLP* 유전자(flipase)를 포함하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서,

7) 상기 단계 6)에서 선택된 세포의 DNA 카세트에 포함된 제1항생제 내성 유전자를 플립-아웃(flip out)을 통하여 제거하는 단계;

8) 상기 세포를 제3항생제가 포함된 배지 플레이트에서 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계;

9) 상기 콜로니를 선별하여 제3항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계;

10) 상기 세포가 배양된 배양액을 제1항생제가 포함된 배지 및 제3항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계;및

11) 제1항생제가 포함된 배지에 대하여 음성 및 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 더 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 단계 7)에서 DNA 카세트에 포함된 제1항생제 내성 유전자를 제거하기 위한 플립-아웃(flip out)은 L-아라비노스에 의하여 유도되는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 10**

1) 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트를 분리하는 단계;

2) 상기 분리된 DNA 카세트를 제6항에서 선택된 세포에 주입하여 상기 세포 내에서 박테리아 인공 염색체(BAC)의 제3항생제 내성 유전자 내로 재조합하는 단계;

3) 제3항생제 및 제4항생제를 포함하는 배지 플레이트에서 상기 세포를 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계;

4) 상기 콜로니를 선별하여 제4항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계;

5) 상기 세포가 배양된 배양액을 제3항생제가 포함된 배지 및 제4항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계;및

6) 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 음성 및 제4항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트는 제3항생제 내성 유전자의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서,

상기 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트는 제4항생제 내성 유전자 양 측면에 트랜스포사제에 의해 인식 가능한 트랜스포존을 코딩하는 핵산 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 트랜스포존은 서열번호 15 및 서열번호 16의 염기서열을 갖는 Tol2 트랜스포존인 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

**청구항 14**

제10항에 있어서,

상기 단계 4)에서, 플레이트 상에서 36 ~ 48 시간 배양된 세포 콜로니 중 직경이 1mm 이하인 콜로니를 선별하는 것을 특징으로 하는 BAC 재조합 스크리닝 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 박테리아 인공 염색체 재조합 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로 이득 & 손실(gain & loss)이라는 새로운 스크리닝 방법을 이용하여 박테리아 인공 염색체(BAC) 재조합의 완료시간을 단축시키는 방법이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 생물 약제학적 단백질의 생산은 포유류 세포 배양이 생산에 널리 사용되는 방법인 생명 공학의 핵심 주제였다. 현재 포유동물 시스템에서 100개가 넘는 치료용 단백질이 생산되고 있으며 새로운 치료용 항체가 개발됨에 따라 그 수가 증가할 것으로 예상된다. 따라서, 지난 수십 년 동안 포유류 세포주에서 단백질 생산을 개선하기 위한 상당한 노력이 이루어졌다.

[0003] 플라스미드 기반 벡터를 이용한 유전자 발현은 단백질 생산에 가장 널리 사용되는 방법이다. 플라스미드-기반 벡터는 관심 유전자(GOI, gene-of-interest)의 발현을 유도하는 프로모터를 포함한다.

[0004] 그러나 이러한 벡터로부터의 발현은 통합 부위에서 주변 염색질에 의해 크게 영향을 받는다. 따라서, 벡터가 일단 "침묵 염색질(silent chromatin)" 영역에 통합되면, 발현은 시간이 지남에 따라 침묵하는 경향이 있다(positional chromatin effect).

[0005] 따라서, 염색질의 국소 효과를 피하고 플라스미드 기반 벡터의 효능을 향상시키기 위한 몇 가지 전략이 개발되었다. 가장 널리 사용되는 방법 중 하나는 전체 포유동물 유전자좌를 수용할 수 있는 박테리아 인공 염색체(BAC)를 사용하는 것이다. BAC는 F-인자(F-factor)로부터 유래되며, 모든 시스-작용 조절 요소(cis-acting regulatory element)를 고유 구성으로 함유하는 완전한 유전자를 수용할 수 있다.

[0006] BAC은 통합 부위에서 주변 염색질에 의해 최소한의 영향을 받으므로, 이들 벡터는 예상된 발현 패턴을 정확하게 전달할 수 있다. 그럼에도 불구하고, BAC 크기는 매우 크기 때문에, 표준 클로닝 절차(예를 들어, 제한 효소 분

해 또는 결찰)를 사용하여 변형을 수행할 수 없다. BAC 재조합은 DNA의 크기에 관계없이 정확하게 두 DNA 분자 간에 유전 정보를 교환할 수 있게 한다.

[0007] 그러나 BAC 재조합은 스크리닝 과정 동안 다수의 위양성 배경(false positive background) 콜로니로 인해 노동 집약적이고 시간 소모적이다. 따라서, BAC 재조합은 BAC이 단백질 생산을 위한 일상적인 발현 벡터로 적합하다고 간주하는 경험이 적은 연구자들에게 실질적인 장벽이 되었다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 Court, D. L., Swaminathan S., Yu D., Wilson H., Baker T., Bubunenko M., Sawitzke J., and Sharan S. K. (2003) Mini-lambda: a tractable system for chromosome and BAC engineering, Gene 315, 63-69.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] BAC 재조합의 효율이 매우 낮기 때문에 제한된 시간 내에 정확한 클론을 얻는 것이 매우 어렵다. 이러한 문제를 해결하기 위해 본 발명자는 백의 미리 정해진 영역에 관심 유전자를 효율적으로 통합할 수 있는 새로운 방법(이득 및 손실 선택 시스템)을 개발했다.

[0010] 기존의 BAC 재조합을 완료하기 위해서는 BAC DNA와 재조합 하려는 선형(linearized) DNA를 특정 박테리아에 형질주입하여 상동성 재조합(homologous recombination)을 유도한다. 그 다음 PCR, PCR 정제(purification), DNA 서열분석(sequencing)을 통하여 양성 세포(positive cell)를 확인함으로써 양성 세포를 선별하는 방법을 이용하였다.

[0011] PCR 스크리닝을 통하여 양성 세포를 찾아 내는 방법으로 PCR 스크리닝을 이용할 때 PCR은 낮은 정확도를 갖는다는 문제가 존재하여 BAC 재조합을 완료하는데 오랜 시간이 소모되었다. 또한 상동성 재조합이 일어날 확률도 낮기 때문에 확실한 선별방법이 필요하였다.

[0012] 본 발명은 이득 & 손실(gain & loss)이라는 새로운 스크리닝 방법을 이용하여 BAC 재조합 완료시간을 단축시키는 방법이다. 상동성 재조합이 완료된 콜로니(colony)를 가지고 실험에 사용되는 저항성에 대한 항생제 배지를 종류별로 준비하고 1개의 콜로니를 각 배지에 배양하게 되면 BAC이 가지고 있는 저항성에 대한 항생제 배지에서만 자라게 될 것이다. 각 배지에서 자라는 것으로 양성 세포를 선별함으로써 스크리닝 방법을 더 강화하는 것에 발명의 원리가 있다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면,

[0014] 1) 관심 유전자(GOI)와 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트; 및 제2항생제 내성 유전자를 포함하는 BAC 타겟 벡터로부터 상기 DNA 카세트를 분리하는 단계; 2) 제3항생제 내성 유전자를 포함하는 박테리아 인공 염색체(BAC)로 형질전환된 세포 내에서 상기 DNA 카세트와 박테리아 인공 염색체를 재조합하는 단계; 3) 제1항생제 및 제3항생제를 포함하는 배지 플레이트에서 상기 세포를 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계; 4) 상기 콜로니를 선별하여 제3항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계; 5) 상기 세포가 배양된 배양액을 제1항생제가 포함된 배지, 제2항생제가 포함된 배지 및 제3항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계; 및 6) 제1항생제가 포함된 배지에 대하여 양성 및 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] 상기 단계 4)에서 콜로니 선별은 제1항생제 및 제3항생제를 포함하는 배지 플레이트 상에서 36 ~ 48시간 배양된 세포 콜로니 중 직경이 평균 1㎜ 이하인 콜로니를 선별하것이 바람직하다.

[0016] 상기 과정은 재조합 효율을 증가시키기 진행한 과정으로, 형질 주입 후 제1항생제 및 제3항생제를 포함하는 배지 플레이트 상에서 배양된 콜로니 중 상대적으로 작은 크기(직경 1㎜ 이하, 바람직하게는 0.1 ~ 1㎜)의 콜로니

를 선택하여 본 발명의 이득 & 손실 스크리닝을 진행하였을 때가 아무 조건 없이 무작위로 콜로니를 선택하였을 때보다 재조합 효율이 증가하였다.

[0017] 도 5B를 참조하면, 본 발명자는 콜로니를 선택할 때 상대적으로 작은 콜로니를 선택하였으며, 이 경우 양성 세포를 발견할 확률은 약 1.6배 증가하였다. 이때 콜로니의 직경은 평균 1mm 이하, 보다 바람직하게는 0.1 ~ 1mm 이며, 양성 세포를 발견할 확률은 47.92%이다.

[0018] BAC은 저복제수 플라스미드(low copy number plasmid)이고 BAC 재조합에 사용되는 벡터는 고복제수 플라스미드(high copy number plasmid)이다. 저복제수 플라스미드를 갖는 박테리아는 고복제수 플라스미드를 가지는 박테리아보다 성장이 더디다. 그래서 BAC 재조합 후 선별 과정에서 상대적으로 크기가 작은 콜로니(직경 1mm 이하, 바람직하게는 0.1 ~ 1mm)를 선택하여 본 발명의 이득 & 손실 스크리닝을 진행하면 재조합 효율이 상승하는 것을 확인할 수 있다.

[0019] 상기 박테리아 인공 염색체(BAC)는 ROSA26 BAC이며, 상기 DNA 카세트는 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 더 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 5' 상동성 암은 서열번호 1의 염기서열로 표시되고, 상기 3' 상동성 암은 서열번호 2의 염기서열로 표시된다.

[0020] 상기 DNA 카세트는 제1항생제 내성 유전자 양 측면에 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열을 갖는 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 더 포함한다.

[0021] 상기 DNA 카세트는 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 5' 상동성 암(homologous arm); 관심 유전자(GOI); 양 측면에 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 포함하는 제1항생제 내성 유전자; 및 ROSA26 BAC 유전자 엑손 2의 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0022] 상기 세포는 L-아라비노스-유도성 *FLP* 유전자(flipase)를 포함하며, 구체적으로 상기 세포는 SW105 균주이다.

[0023] 본 발명의 다른 실시 예에서, 7) 상기 단계 6)에서 선택된 세포의 DNA 카세트에 포함된 제1항생제 내성 유전자를 플립-아웃(flip out)을 통하여 제거하는 단계; 8) 상기 세포를 제3항생제가 포함된 배지 플레이트에서 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계; 9) 상기 콜로니를 선별하여 제3항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계; 10) 상기 세포가 배양된 배양액을 제1항생제가 포함된 배지 및 제3항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계; 및 11) 제1항생제가 포함된 배지에 대하여 음성 및 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 더 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법을 제공한다.

[0024] 상기 단계 7)에서 DNA 카세트에 포함된 제1항생제 내성 유전자를 제거하기 위한 플립-아웃(flip out)은 L-아라비노스에 의하여 유도될 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시 예에서, 1) 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트를 분리하는 단계; 2) 상기 분리된 DNA 카세트를 제6항에서 선택된 세포에 주입하여 상기 세포 내에서 박테리아 인공 염색체(BAC)의 제3항생제 내성 유전자 내로 재조합하는 단계; 3) 제3항생제 및 제4항생제를 포함하는 배지 플레이트에서 상기 세포를 배양하여 콜로니를 형성시키는 단계; 4) 상기 콜로니를 선별하여 제4항생제가 포함된 배지에서 세포를 배양하는 단계; 5) 상기 세포가 배양된 배양액을 제3항생제가 포함된 배지 및 제4항생제가 포함된 배지에 각각 접종하고 배양하는 단계; 및 6) 제3항생제가 포함된 배지에 대하여 음성 및 제4항생제가 포함된 배지에 대하여 양성인 세포를 선택하는 단계를 포함하는 BAC 재조합 스크리닝 방법을 제공한다.

[0026] 상기 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트는 제3항생제 내성 유전자의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 더 포함할 수 있으며, 상기 제4항생제 내성 유전자를 포함하는 DNA 카세트는 제4항생제 내성 유전자 양 측면에 트랜스포사제에 의해 인식 가능한 트랜스포존을 코딩하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 트랜스포존은 Tol2 트랜스포존이며, 서열번호 15(좌) 및 서열번호 16(우)의 염기서열을 갖는다.

[0027] 상기 단계 4)에서 마찬가지로, 콜로니 선별은 제3항생제 및 제4항생제를 포함하는 배지 플레이트 상에서 36 ~ 48시간 배양된 세포 콜로니 중 직경이 평균 1mm 이하인 콜로니를 선별하것이 바람직하다.

[0028] 상기 항생제 내성 유전자는 당업계에서 알려진 항생제 내성 유전자가 사용될 수 있으며, 구체적으로는 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 암피실린(ampicillin) 및 네오마이신(neomycin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 구체적으로 제1항생제 내성 유전자는 카나마이신(kanamycin)이고, 제2항생제 내성 유전자는 암피실린(ampicillin)이고, 제3항생제 내성 유전자는 클로람페니콜(chloramphenicol)이고, 제4항생제 내성 유전자는 암피실린(ampicillin)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나 제1항생제 내성 유전자, 제2항생제 내성 유전자 및 제3항생제 내성 유전자는 서로 동일하지 않아야

하며, 제3항생제 내성 유전자 및 제4항생제 내성 유전자는 서로 동일하지 않아야 한다.

## 발명의 효과

[0029] 본 발명은 이득 & 손실이라는 새로운 스크리닝 방법을 이용하여 BAC 재조합의 완료시간을 단축시키는 방법이다. 본 발명의 새로운 방법은 BAC 재조합을 완료하는데 13일(실험 일수 기준)이 소요되었지만 기존 방법은 약 4개월이 소요된다. 전반적으로, 본 발명자의 새로운 BAC 재조합 전략은 BAC 재조합 효율이 현저히 증가하고 재조합 기간이 단축됨에 따라 입증된 바와 같이 단백질 발현에 새로운 길을 제공할 수 있다. 새로 개발된 BAC 프로토콜을 사용하여 강력한 벡터 플랫폼 개발에 적용된다. 벡터 플랫폼에서의 공학은 일반적으로 포유동물 세포에서 재조합 단백질의 생산을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0030] 도 1A는 BAC 표적화 벡터(BTV, BAC targeting vector) 및 BAC 표적화 카세트(BTC, BAC targeting cassette)의 개요를 나타내는 도면이다.

도 1B는 재조합 클론을 식별하기 위한 1차 이득 및 손실 선택 시스템을 나타내는 도면이다, 빨간색 별표(*)는 재조합 양성 클론을 나타낸다.

도 1C 1차 재조합 방식 및 재조합 확인을 위한 콜로니 PCR 프라이머의 위치를 나타내는 도면이다.

도 1D는 콜로니 PCR 결과를 보여주는 아가로스젤 전기영동 사진이다. PCR 산물은 재조합 양성 클론에서만 증폭되었으며, 증폭된 PCR 생성물의 서열이 게놈-BTC 경계에서의 기준 서열과 비교하여 보존됨을 보여주는 크로마토그램 결과를 나타낸다.

도 2A는 플립파아제에 의한 플립-아웃을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2B는 재조합 클론을 식별하기 위한 2차 이득 및 손실 선택 시스템을 나타내는 도면이다, 빨간색 별표(*)는 플립-아웃 양성 클론을 나타낸다.

도 2C는 플립-아웃 방식 및 플립-아웃 반응을 확인하기 위한 콜로니 PCR 프라이머의 위치를 나타내는 도면이다.

도 2D는 콜로니 PCR 결과를 보여주는 아가로스젤 전기영동 사진이다. PCR 생성물은 플립-아웃 양성 클론에서만 증폭되었으며, 증폭된 PCR 생성물의 서열이 플립 아웃이 완료된 경계에서의 기준 서열과 비교하여 보존됨을 보여주는 크로마토 그램 결과를 나타낸다

도 3A는 캠 표적화 벡터(CTV, Cam targeting vector) 및 캠 표적화 카세트(CTC, Cam targeting cassette)의 개요를 나타내는 도면이다.

도 3B는 재조합 클론을 식별하기 위한 3차 이득 및 손실 선택 시스템을 나타내는 도면이다, 빨간색 별표(*)는 재조합 양성 클론을 나타낸다.

도 3C는 2차 재조합 방식 및 재조합 확인을 위한 콜로니 PCR 프라이머의 위치를 나타내는 도면이다.

도 3D는 콜로니 PCR 결과를 보여주는 아가로스젤 전기영동 사진이다. PCR 산물은 재조합 양성 클론에서만 증폭되었으며, 증폭된 PCR 생성물의 서열이 게놈-CTC 경계에서의 기준 서열과 비교하여 보존됨을 보여주는 크로마토그램 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 이득 및 손실 선택 시스템의 각 단계의 실험 절차를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 5A는 크기에 관계없이 선별된 콜로니를 사용한 이득 및 손실 선택 실험 결과를 나타낸 표이고, 도 5B는 상대적으로 작은 크기의 콜로니를 선택하여 얻은 이득 및 손실 선택 실험 결과를 나타낸 표이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0032] **실험예**

[0033] **1. 박테리아 균주 및 BAC 클론**

[0034] SW105 박테리아: Genotype F-*mcr*A △(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80d*lacZ* M15 △*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 △(*ara, leu*) 7649 *gal*U *gal*K *rsp*L *nup*G [ë*cI*857 (*cro-bio*A) <> *tet*] [(*cro-bio*A) <> *ara*C-PBAD*flpe*].

[0035] SW105 박테리아는 국립 암 연구소(National Cancer Institute)의 Copeland 연구소에서 제공 받았으며, BAC 클론(RP24-85L15)은 BACPAC 리소스 센터(미국 캘리포니아 주 오클랜드 소재 CHORI)에서 구입하였다.

[0037] **2. BAC 표적화 카세트(BTC) 및 클로람페니콜(Cam) 표적화 카세트(CTC)의 제조**

[0038] BAC 표적화 벡터(BTV) 벡터(Addgene, 카탈로그 번호 131589) 및 Cam 표적화 카세트(CTV)(Addgene, 카탈로그 번호 131590)는 Addgene로부터 이용 가능하다. BTV를 XhoI & XmaI와 함께 그리고 CTV를 BamHI & XhoI와 함께 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 절단된 DNA를 0.2% 아가로스젤에 넣었다. DNA 전기영동 장치(Bioand, cat. no. Mini-ES)를 이용하여 100V에서 30분 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, LED 트랜스 일루미네이터(Maestrogen, cat. no. SLB-01W) 하에서 BTC 및 CTC를 포함하는 DNA 밴드를 잘라내었다. 겔 추출 키트(Qiagen, cat. no. 28704)를 사용하여 DNA를 정제하였다. Nanodrop 분광 광도계(Denovix, cat. no. DS-11)를 사용하여 DNA 농도를 측정하고 DW를 사용하여 DNA를 8-10 ng/μl로 희석하였다.

[0040] **3. 절차 개요**

[0041] **1) 제1단계에서, 원하는 BAC을 확정하고 및 BAC을 함유한 SW105 박테리아를 제조하였다.**

[0042] LB 플레이트에서 SW105 세포의 단일 콜로니를 분리하고, 항생제 없이 5ml LB에 접종하고 진탕(250 rpm)하면서 32℃에서 밤새 배양한다. 다음날, 배양액 5ml를 항생제 없이 500ml의 LB 배지로 희석한다. UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 600 nm에서 OD(optimal density)가 0.4(약 2.5 ~ 3시간)에 도달할 때까지 진탕(250 rpm)하면서 32℃에서 배양한다.

[0043] 2개의 250ml 사전 냉각 원심 분리 튜브로 배양액을 옮기고, 각 튜브에서 상청액을 제거하기 위해 4℃, 4,500Xg에서 10분 동안 원심분리 하고, 25ml의 차가운 증류수(DW)로 펠렛을 재현탁한다. 재현탁된 세포를 위와 동일한 조건으로 원심분리 하고 재현탁한다. 재현탁된 세포 1ml를 미리 냉각된 1.5ml 에펜도르프 튜브에 분취하고 4℃, 500Xg에서 1분 동안 원심분리 한다.

[0044] 세포에 800-900 ng의 BAC DNA(8-9 ng/μl 농도에서 총 100 μl BAC DNA)를 첨가하고 1ml 피펫을 사용하여 펠렛을 부드럽게 재현탁한다. 2mm 간격 큐벳에 세포를 옮기고, 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50μF 및 100Ω 저항을 가한다. 1ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15ml 원뿔형 튜브로 옮기고, 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 추가한다. 250rpm에서 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. Cam(12.5 μg/ml)을 포함하는 LB 플레이트에 세포를 접종하고 32℃에서 36시간 동안 플레이트 상에서 배양한다.

[0046] **2) 제2단계에서, 1차 재조합은 BTC를 미리 결정된 BAC 영역으로 도입하기 위해 수행되었다.**

[0047] BAC에 주입하고자 하는 목적 단백질을 FRT-KanR-FRT 카세트 옆에 클로닝하고, BAC 클론을 주형으로 사용하여 5' HR 및 3' HR을 PCR을 통하여 증폭시킨다.

[0048] 증폭된 5' HR 및 3' HR의 서열은 아래와 같다.

[0049] [서열번호 1] 5' homology region

[0050] AAAGGGAAAATGCCAATGCTCTGTCTAGGGGTTGGATAAGCCAGTATAATAAATGAAAATGGGGCTAAAATGAGTGTTCTAAAATACCTTTTGATAAGGCTG
CAGAAGGAGCGGGAGAAATGGATATGAAGTACTGGGCTCTTTAAAAATGATTAAAATTCTGCTTACATAGTCTAACTCGCGACACTGTAATTTCATACTGTA
GTAAGGATCTCAAGCAGGAGAGTATAAAACTCGGGTGAGCATGTCTTTAATCTACCTCGATGGAAAATACTCCGAGGCGGATCACAAGCAATAATAACCTGT
AGTTTTGCTGCATAAAACCCCAGATGACTACCTATCCTCCCATTTTCCTTATTTGCCCCTATTAAAAAACTTCCCGACAAAACCGAAAATCTGTGGGAAGTC
TTGTCCCTCCAATTTTACACCTGTTCAATTCCCCTGCAGGACAACGCCCACACACCAGGTTAGCC

[0051] [서열번호 2] 3' homology region

[0052] CTAGAAAGACTGGAGTTGCAGATCACGAGGGAAGAGGGGGAAGGGATTCTCCCAGGCCCAGGGCGGTCCTCAGAAGCCAGGAGGCAGCAGAGAACTCCCAGA
AAGGTATTGCAACACTCCCCTCCCCCCTCCGGAGAAGGGTGCGGCCTTCTCCCCGCCTACTCCACTGCAGCTCCCTTACTGATAACAACTCAGAGCGACTTT

GGGAGAGCAAGTGCTTCCTGCCTCCAAAACAGCCCAACTGAGCCCTCGCTCCTTCCCTCCACTCCCCGGAGTGCGCGATGGAGGTCTGGCTCAGCACGCCCC
TCTTGAGGCAACTCAAGTCGGAAACGTGCTTGCACCCGCCCCGCAGCCGCTCAGCCCTACTGCCCGTCCCCGCCCCCAGCGCGCGCTTCCTGCCACGTTGCG
CAGGGGCGCGCGGCCAGACTCTGCGGCGCGGGGCCGAGGGGAGGGCCGGAACCTGGGAGCGCCTCCTCGCCGCCCCCG

[0053] 그 다음 상기 5' HR 및 3' HR을 BTV에 In-Fusion 클로닝한다. 37℃에서 4시간 동안 XhoI 및 XmaI를 첨가하여 상동성 암(homology arms)을 포함하는 BTV를 배양하고, 절단된 DNA를 0.2% 아가로스젤에 넣고, DNA 전기영동 장치에서 100V에서 30분 동안 젤을 전기영동한다. 젤 추출 키트를 사용하여 DNA를 정제하십시오. Nanodrop 분광광도계를 사용하여 DNA 농도를 측정하고 DW를 사용하여 DNA를 8-10 ng/μl로 희석한다.

[0054] 열 충격 유도성 재조합 효소(heat-shock inducible recombinase)의 발현을 유도하기 위해, 배양 플라스크를 42℃ 진탕 수조로 옮긴다. 200rpm에서 20분 동안 진탕하고 배양 플라스크를 10분 동안 얼음 위에 놓는다. 2개의 250ml 사전 냉각 원심 분리 튜브로 배양물을 옮깁니다. 상등액을 제거하기 위해 4℃, 4,500Xg에서 10분 동안 원심분리 한 후 차가운 DW 25ml로 세포를 재현탁하고, 한번 더 세척한다.

[0055] 1ml 피펫을 사용하여 상청액을 따라 내고 4℃에서 1분 동안 4,500Xg에서 회전시키고, 세포에 800-900 ng의 BTC(8-9 ng/μl 농도에서 총 100μl BTC)를 첨가하고 1ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 큐벳을 전기 천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50μF 및 100Ω 저항을 가한다. 1ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15ml 원뿔형 튜브로 옮기고, 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 추가한다. 250rpm에서 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. Cam 및 Kan을 포함하는 LB 플레이트에 세포를 접종하고 32℃에서 36시간 동안 플레이트 상에서 배양한다.

[0056] Cam(12.5 μg/ml)이 포함된 50 lb LB에 48개 콜로니를 각각 접종하고, 진탕하면서(250 rpm) 32℃에서 1시간 동안 배양한다. Cam 배양액(12.5 μg/ml)이 포함된 1ml LB 배지, Kan(30 μg/ml)e이 포함된 1ml LB 배지 및 Amp(30 μg/ml)가 포함된 1ml LB 배지에 세포 배양액 10 μl를 추가한다. 진탕하면서(250 rpm) 32℃에서 밤새 배양한다.

[0057] 재조합 양성 클론을 선택하고(도 1B의 빨간색 별표), 콜로니 PCR 반응을 수행하여 올바른 재조합을 확인하였다.

[0059] **3) 제3단계에서, 선택 마커인 카나마이신 내성(*KanR*) 유전자를 제거하기 위해 플립-아웃을 수행하였다.**

[0060] Cam(빨간색 별표, 도 1B) 튜브로부터 0.1ml 배양액을 12.5μg/ml Cam을 포함하는 10ml LB에 접종한다. $OD_{600}$이 0.4(약 2.5 ~ 3시간)에 도달할 때까지 진탕(250rpm)하면서 32℃에서 배양하고, 멸균된 10% L-아라비노스 용액 0.4ml를 첨가하고 32℃에서 2시간 동안 계속 진탕시킨다. 12.5μg/ml Cam을 포함하는 LB로 세포를 1:10으로 희석하고 1시간 동안 32℃에서 계속 진탕한다. 세포를 $1:10^5$로 희석하고 100 ㎕의 희석된 세포를 Cam(12.5μg/ml)을 포함하는 LB 플레이트에 플레이팅한다. 32℃에서 24시간 동안 플레이트를 배양한다. Cam(12.5 μg/ml)을 포함하는 50μl LB에 16 콜로니를 각각 접종하고, 250rpm에서 진탕하면서 32℃에서 1시간 동안 배양한다. 10μl의 세포 배양물을 Cam(12.5 μg ml)을 포함하는 1ml LB로, Kan(30 μg/ml)을 포함하는 1ml LB로 옮긴다(도 3B). 진탕하면서(250 rpm) 32℃1에서 밤새 인큐베이션한다. 플립형 포지티브 클론을 선택하고(빨간색 별표, 도 2B). 정확한 플립 아웃을 확인하기 위해 콜로니 PCR을 수행한다.

[0062] **4) 제4단계에서, CTC를 주입하기 위해 2차 재조합이 수행되었다.**

[0063] 7℃에서 4시간 동안 BamHI 및 XhoI와 함께 CTV를 배양하고, 절단된 DNA를 0.2 % 아가로스젤에 넣는다. DNA 전기영동 장치에서 100V에서 30분 동안 젤을 작동시킨다. 젤 추출 키트를 사용하여 DNA 샘플을 정제하고, Nanodrop 분광 광도계를 사용하여 DNA 농도를 측정하고 DW를 사용하여 DNA를 8-10 ng/μl로 희석한다.

[0064] 1ml 피펫을 사용하여 상청액을 따라 내고 4℃에서 1분 동안 4,500Xg에서 회전시킨다. 200 μl 피펫을 사용하여 상청액을 버린다. 세포에 800-900 ng의 CTC(8-9 ng/μl 농도에서 총 100μl CTC)를 첨가하고 1ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 2mm 간격 큐벳에 세포를 옮깁니다. 큐벳을 전기 천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50μF 및 100Ω 저항을 가한다. 1ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15 ml 원뿔형 튜브로 옮기고, 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 추가한다. 250rpm에서 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. Amp를 포함하는 LB 플레이트에 세포를 접종하고 32℃에서 36시간 동안 플레이트 상에서 배양한다. Amp(30μg/ml)이 포함된 50 lb LB에 48개 콜로니를 각각 접종하고, 진탕하면서

(250 rpm) 32℃에서 1시간 동안 배양한다. Cam(12.5 μg/ml)이 포함된 1ml LB 배지, Amp(30μg/ml)rk 포함된 1ml LB 배지에 세포 배양액 10μl를 추가한다. 진탕하면서(250 rpm) 32℃에서 밤새 배양한다.

[0065] 재조합 양성 클론을 선택하고(빨간색 별표, 도 3B), 콜로니 PCR 반응을 수행하여 올바른 재조합을 확인하였다.

[0067] **5) 최종 단계에서, BAC DNA의 증폭 및 정제과정(maxi-preparation)을 수행하였다.**

[0069] **실시예**

[0070] **1. 1차 이득 & 손실 스크리닝 시스템**

[0071] 박테리아 파지-인코딩된 재조합 효소(bacterial phage-encoded recombinase)에 기초한 것을 포함하여 2개의 상이한 BAC 재조합 시스템이 널리 사용된다; 하나는 Rac 파지의 RecET을 공급하기 위하여 에피좀 플라스미드(episomal plasmid)를 사용하고, 다른 하나는 람다-레드 재조합 효소(lamda-red recombinase)의 발현을 제어하기 위하여 온도에 민감한 람다 리프레서(lamda repressor)를 이용한다. 람다-레드 재조합 효소는 RecET 시스템보다 적어도 50 ~ 100배 더 효율적인 것으로 보인다. 따라서 본 발명에서는 람다-레드 재조합 효소에 기초한 방법론이 선택되었다.

[0072] SW105 박테리아 균주는 람다-레드 재조합 효소 시스템을 포함하도록 유전적으로 변형되었다. 여기에는 재조합 과정에서 결정적인 역할을 하는 람다-레드 재조합 효소(*exo, bet* 및 *gam*)를 인코딩하는 PL 오페론(PL operon)을 포함한다. 상기 PL 오페론은 온도에 민감한 라다 리프레서(cI857)의 엄격한 통제하에 있다. 30~34℃ 범위의 저온에서 cI857은 활성화되고 오퍼레이터 사이트(operator site)에 결합하여 재조합 유전자의 전사를 방지한다. 42℃로의 열 상향 변이(thermal upshift)는 cI857의 활성을 가역적으로 억제하여 재조합 유전자의 전사를 활성화시킨다.

[0073] 첫 번째 재조합을 위하여, GOI(luciferase gene) 및 카나마이신 내성 유전자(*KanR*)를 포함하는 BAC 표적화 벡터(BTV, BAC targeting vector, Addgene ID: 131589)에 5' 상동성 영역(HR, homology region) 및 3' HR을 도입하였다(도 1A).

[0074] BAC 표적화 카세트(BTC, BAC targeting cassette, 서열번호 3)를 정제하기 위해, 5' HR(서열번호 1) 및 3' HR(서열번호 2)을 포함하는 BTV를 적절한 XhoI 및 XmaI로 절단하였다(도 1A).

[0075] BTC에는 두 개의 측면 FRT 부위가 있는 *KanR*이 포함되어 있기 때문에 42℃에서 짧은 열 충격 후 BAC 클론과 BTC를 재조합하면 이중 항생제 내성 유전자인 카나마이신 내성 유전자(BTC의 *KanR*) 및 클로람페니콜 내성 유전자(BAC의 *CamR*)를 갖는 양성 클론이 생성된다.

[0076] 1차 재조합 후, Cam 및 Kan을 함유하는 LB 플레이트를 사용하여 후보 클론을 선별하였다. 32℃에서 48시간 배양 후 후보 콜로니의 수가 [표 1]에 요약되어 있다.

*표 1*

[0077]

| 항생제의 농도 | 플레이트 번호 | 콜로니 수 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 실험 그룹 | | | DW group |
| | | #1 | #2 | #3 | |
| Cam 12.5 μg/ml<br>Kan 20 μg/ml | 1 | 1510 | 1672 | 1672 | 0 |
| | 2 | 2455 | 1537 | 1457 | |
| | 3 | 1403 | 1214 | 1591 | |
| Cam 12.5 μg/ml<br>Kan 25 μg/ml | 1 | 1915 | 1295 | 1618 | 0 |
| | 2 | 1672 | 998 | 1187 | |
| | 3 | 1430 | 1349 | 1457 | |
| Cam 12.5 μg/ml<br>Kan 30 μg/ml | 1 | 1726 | 2562 | 1861 | 0 |
| | 2 | 1672 | 1403 | 1295 | |
| | 3 | 863 | 1295 | 998 | |

[0078] 슈퍼 코일 형태의 BTV는 제한 효소로 효율적으로 절단될 수 없으므로, 절단되지 않은 BTV는 정제된 BTC에 포함될 수 있다. 이러한 BTV 오염은 3종류의 항생제 내성 유전자인 암피실린 내성 유전자(BTV의 *AmpR*), 카나마이신

내성 유전자(BTC의 *KanR*) 및 클로람페니콜 내성 유전자(BAC의 *CamR*)를 포함하는 비-재조합 클론이 형성된다. 상기 클론이 원하는 재조합으로 유래하는지 또는 절단되지 않은 BTV 오염으로부터 유래하는지를 구별하기 위해, 제1이득 및 손실 스크리닝 시스템이 적용되었다(도 1B). 플레이트 상의 후보 클론을 제1이득 및 손실 스크리닝 시스템에 접종하고 24시간 동안 배양하였다(도 1B). 이 시스템은 세 가지 가능한 경우를 나타낸다(도 1B).

[0079] 1) 사례 1: Cam에 양성, Amp에 양성, Kan에 양성(재조합되지 않음)

[0080] 2) 사례 2: Cam에 음성, Amp에 양성, Kan에 양성(재조합되지 않음)

[0081] 3) 사례 3: Cam에 양성, Amp에 음성, Kan에 양성(재조합됨)

[0082] 사례 3은 첫 번째 재조합에 성공한 경우에만 발생한다. 사례 3을 얻는 평균 효율은 31.94%였다(표 2).

표 2

[0083]

| | 실험 그룹 | | |
|---|---|---|---|
| | #1 | #2 | #3 |
| 접종 콜로니 수 | 48 | 48 | 48 |
| 양성 콜로니 수 | 18 | 14 | 14 |
| 재조합 효율 (%) | 37.50 | 29.17 | 29.17 |
| 재조합 효율의 평균 ± S.D (%) | 31.94 ± 3.93 | | |

[0084] 정확한 재조합을 확인하기 위해, 사례 3의 모든 클론에 대해 콜로니 PCR을 수행하였다. Fwd(i) 및 Rev(ii) 프라이머는 BAC 벡터에 위치하고, Rev(i) 및 Fwd(ii)는 BTC에 위치한다(도 1C 및 표 3).

표 3

[0085]

| 프라이머 | 서열 (5' to 3') |
|---|---|
| Fwd(i) (서열번호 4) | TATGACAAACACCTTTAT |
| Rev(i) (서열번호 5) | AACCCTGGACTACTGCGC |
| Fwd(ii) (서열번호 6) | AAG TATAGGAACTTCGAAGCAGCT |
| Rev(ii) (서열번호 7) | CTGTTGGTACTAGTGGCACTTAAGCAA |

[0086] 재조합이 발생하지 않은 경우 상기 PCR에 의하여 관련 유전자는 증폭되지 않는다. 그러나 재조합이 발생한 경우 5' 재조합 영역 및 3' 재조합 영역의 PCR 산물은 각각 약 280bp 및 500bp의 밴드가 나타난다(도 1D). PCR 후, 재조합 서열을 확인하기 위해 DNA 서열 분석을 수행하였다. 모든 양성 클론은 제1이득 및 손실 스크리닝 시스템의 100% 정확성을 나타내는 재조합 서열을 나타내는 것으로 밝혀졌다(도 1D).

[0087] 이를 종합하면, 상기 결과는 세포를 스크리닝 시스템에 간단히 접종함으로써 100% 정확도로 양성 클론을 시각적으로 확인할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0089] **2. 2차 이득 & 손실 스크리닝 시스템**

[0090] 1차 재조합 동안, *KanR*의 도입을 통해 성공적인 재조합이 수행되었다. 그러나 후속 실험에서는 *KanR*을 삭제해야 한다. SW105 균주는 내인성(endogenous) L-아라비노스-유도성 *FLP* 유전자(flipase)를 보유한다. *KanR*은 양 측면에 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT, 서열번호 8(5'FRT) 및 서열번호 9(3'FRT))을 포함하고 있어, L-아라비노스의 존재하에 유도된 FLP 유전자는 *KanR*을 결실시킬 것이다(도 2A). *FLP* 유도 후, Cam을 포함하는 LB 플레이트를 사용하여 후보 클론을 선별 하였다.

[0091] 32℃에서 48시간 배양 후 후보 콜로니 수는 [표 4]에 요약되어 있다.

표 4

[0093]

| 항생제의 농도 | 플레이트 번호 | 콜로니 수 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 실험 그룹 | | |
| | | #1 | #2 | #3 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Cam 12.5 μg/mL | 1 | 970 | 749 | 1805 |
| | 2 | 806 | 854 | 2150 |
| | 3 | 595 | 1114 | 2035 |

[0094] 클론이 플립-아웃 양성(flip-out positive) 또는 플립-아웃 음성(flip-out negative)에서 파생되는지 여부를 구별하기 위해 2차 이득 및 손실 스크리닝 시스템이 사용되었다(도 2B). 플레이트상의 양성 클론을 제2이득 및 손실 스크리닝 시스템에 접종하고 24시간 동안 배양하였다(도 2B). 이 시스템은 두 가지 가능한 경우를 나타낸다(도 2B).

[0095] 1) 사례 1: Cam에 대해 양성, Kan에 대해 양성 (플립-아웃되지 않음)

[0096] 2) 사례 2: Cam에 대해 양성, Kan에 대해 음성 (플립-아웃됨)

[0097] 사례 2는 플립 아웃이 성공한 경우에만 발생한다. 사례 2를 얻는 평균 효율은 100%이다(표 5).

표 5

[0098]

| | 콜로니 수 | | |
|---|---|---|---|
| | 실험 그룹 | | |
| | #1 | #2 | #3 |
| 접종 콜로니 수 | 48 | 48 | 48 |
| 양성 콜로니 수 | 48 | 48 | 48 |
| 플립-아웃 효율 (%) | 100 | 100 | 100 |
| 플립-아웃 효율의 평균 ± S.D (%) | 100 | | |

[0099] 정확한 플립-아웃을 확인하기 위해, 사례 2의 모든 클론에 대해 콜로니 PCR을 수행하였다. 2개의 프라이머는 2개의 FRT 부위 외부에 위치한다(도 2C 및 표 6).

표 6

[0100]

| 프라이머 | 서열 (5' to 3') |
|---|---|
| Fwd(iii) (서열번호 10) | TGGTCCATATGAATATCC |
| Rev(iii) (서열번호 11) | AAGAATTCAGCGATTGTG |

[0101] 플립 아웃이 발생되지 않은 PCR 산물은 2kb 이상이어야 한다. 그러나 플립 아웃이 발생한 경우 PCR 산물은 약 100bp이어야 한다(도 2D). PCR 후, DNA 시퀀싱을 수행하여 플립-아웃 영역을 확인하였다. 모든 양성 클론은 2차 이득 및 손실 스크리닝 시스템의 100% 정확성을 나타내는 재조합 서열을 나타내는 것으로 밝혀졌다(도 2D).

[0102] 종합하면, 이 결과는 제2스크리닝 시스템의 정확도가 100%라는 것을 의미한다.

[0104] **3. 3차 이득 & 손실 스크리닝 시스템**

[0105] 게놈으로 BAC 구축물의 통합을 용이하게 하기 위해, Tol2 트랜스포손 시스템이 사용되었다. Tol2 트랜스포손 시스템은 germ lineage에서 최고 속도의 게놈 통합을 생성하여 원하는 단백질의 생산을 증가시킨다. *CamR*은 BAC 클론의 백본(backbone) 벡터 상에 위치하고 Tol2 트랜스포손 시스템을 도입하기 위한 표적이 된다.

[0106] Cam 표적화 벡터(CTV, Cam targeting vector, 서열번호 12)는 5' CamR HR(서열번호 13) 및 3' CamR HR(서열번호 14), 반전된 좌/우 Tol2 트랜스포손(서열번호 15(좌) 및 서열번호 16(우)), 이득 및 손실 스크리닝을 위한 *AmpR* 및 포유동물 선별 마커를 위한 네오마이신 내성 유전자(*NeoR*)를 포함한다(도 3A). 클로람페니콜 표적화 카세트(CTC, chloramphenicol targeting cassette)를 정제하기 위해, CTV를 BamHI 및 XhoI로 절단하였다(도 3A).

[0107] 두 번째 재조합은 *CamR*을 대상으로 하는 것이므로, 플립-아웃 양성 클론과 CTC의 재조합은 *CamR*을 잃을 것이지만 (CTC로부터) *AmpR*을 얻게 된다. 2차 재조합 후, Amp를 포함하는 LB 플레이트를 사용하여 후보 클론을 구별하였다. 32℃에서 48시간 배양 후 후보 콜로니 수는 [표 7]에 요약되어 있다.

표 7

[0108]

| 항생제의 농도 | 플레이트 번호 | 콜로니 수 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 실험 그룹 | | | DW group |
| | | #1 | #2 | #3 | |
| Amp 20 μg/ml | 1 | 324 | 432 | 243 | 0 |
| | 2 | 351 | 378 | 324 | |
| | 3 | 486 | 297 | 378 | |
| Amp 30 μg/ml | 1 | 162 | 405 | 351 | 0 |
| | 2 | 162 | 108 | 189 | |
| | 3 | 324 | 135 | 378 | |
| Amp 40 μg/ml | 1 | 243 | 81 | 189 | 0 |
| | 2 | 243 | 108 | 81 | |
| | 3 | 135 | 135 | 243 | |

[0109] 슈퍼 코일 형태의 CTV는 제한 효소로 효율적으로 절단될 수 없으므로, 절단되지 않은 CTV는 정제된 CTC에 포함될 수 있다. CTV 오염은 이중 재조합 내성 유전자, (CTV의) *AmpR* 및 (BAC의) *CamR*을 포함하는 비재조합 클론을 초래한다. 클론이 원하는 재조합으로부터 유래하는지 또는 절단되지 않은 CTV로부터의 오염으로부터 유래되는지를 구별하기 위해, 제3의 이득 및 손실 선택 시스템이 사용되었다. 플레이트 상의 후보 클론을 3차 이득 및 손실 선택 시스템에 접종하고 24시간 동안 배양하였다(도 3B).

[0110] 이 시스템은 세 가지 가능한 경우를 나타낸다(도 3B).

[0111] 1) 사례 1: Cam에 양성, Amp에 음성(재조합되지 않음)

[0112] 2) 사례 2: Cam에 양성, Amp에 양성(재조합되지 않음)

[0113] 3) 사례 3: Cam에 음성, Amp에 양성(재조합됨)

[0114] 사례 3은 2차 재조합에 성공한 경우에만 발생한다. 사례 3을 얻는 평균 효율은 75.69%였다(표 8).

표 8

[0115]

| | 콜로니 수 | | |
|---|---|---|---|
| | 실험 그룹 | | |
| | #1 | #2 | #3 |
| 접종 콜로니 수 | 48 | 48 | 48 |
| 양성 콜로니 수 | 37 | 36 | 36 |
| 재조합 효율 (%) | 77.08 | 75.00 | 75.00 |
| 재조합 효율의 평균 ± S.D (%) | 75.69 ± 1.20 | | |

[0116] 정확한 재조합을 확인하기 위해, 사례 3의 모든 클론에 대해 콜로니 PCR을 수행하였다. Fwd(iv) 및 Rev(v) 프라이머는 BAC 벡터에, Rev(iv) 및 Fwd(v) 프라이머는 CTC에 위치한다(도 3C 및 표 9).

표 9

[0117]

| 프라이머 | 서열 (5' to 3') |
|---|---|
| Fwd(iv) (서열번호 17) | TAACCGATTTTGCCAGGT |
| Rev(iv) (서열번호 18) | AGAGGTGTATTAGTCTTG |
| Fwd(v) (서열번호 19) | TGGGGACTTTCCACACCT |
| Rev(v) (서열번호 20) | GGTGTCCCTGTTGATACC |

[0118] 재조합이 발생하지 않은 경우 상기 PCR에 의하여 관련 유전자는 증폭되지 않는다. 그러나 재조합이 발생한 경우 5' 재조합 영역 및 3' 재조합 영역의 PCR 산물은 각각 약 400bp 및 390bp의 밴드가 나타난다(도 3D). PCR 후, 재조합 서열을 확인하기 위해 DNA 서열 분석을 수행하였다. 모든 양성 클론은 제3이득 및 손실 스크리닝 시스템의 100% 정확성을 나타내는 재조합 서열을 나타내는 것으로 밝혀졌다(도 3D).

[0119] 이 결과를 종합하면 제3스크리닝 시스템의 정확도가 100%라는 것을 나타낸다.

[0121] **결과 검토**

[0122] BAC는 최대 350kb를 수용할 수 있으며, 이는 유전자 발현을 제어하는 *?*모든 인자(factor)를 갖는 전체 진핵생물 유전자좌(whole eukaryotic locus)를 포함할 수 있다. 그것은 숙주 세포 게놈의 통합 부위에 의해 영향을 받지 않는 자체 염색질(chromatin) 환경을 보유한다. BAC 재조합은 BAC의 미리 결정된 영역에 GOI(gene-of-interest)의 통합을 허용한다. 따라서, 상기 재조합된 GOI는 게놈 통합 부위에 의해 발휘되는 위치 효과에 더욱 저항적이다. BAC 재조합을 위해, 표적 카세트는 상동성 영역(HR, homologous region)을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하는 PCR 증폭 또는 기존 벡터에 HR의 통합에 의해 제조된다. 그러나 PCR 주형 또는 비절단 표적화 벡터로부터 유도된 위양성(false positive) 배경에 의해 두 방법 모두 방해가 된다. 본 발명자는 세포의 간단한 접종으로 24시간 이내에 양성 클론을 시각적으로 나타내는 새로운 전략을 발견했다. 이 전략은 특정 항생제가 존재하는 배지에서 세포가 생존할 수 있는지 여부를 기반으로 한다. 더욱이, 특정 항생제를 포함하는 배지에서 생존 또는 비생존의 조합은 이것이 실제 재조합인지 또는 위양성 배경인지를 알 수 있다. 본 발명자는 BAC 재조합 동안 양성 클론을 확인할 때 새로운 이득 및 손실 스크리닝 체계가 100% 정확도를 가능하게 한다는 것을 증명하였다.

[0123] BAC 재조합은 표적화 벡터 구축, 1차 재조합, 플립 아웃 및 2차 재조합을 포함하는 단계로 구성된다. 시간이 오래 걸리는 절차는 BAC 재조합을 시작하는 연구자들에게 주요 장애물이었다. BAC 재조합 기간을 줄이기 위해 100% 정확도의 스크리닝 절차가 개발되었다. 미확인 클론에서 양성 클론을 식별하기 위해 수행된 불필요한 단계를 사전에 방지한다. 본 발명은 또한 재조합 기간을 단축하는 새로운 전략으로 향상된 재조합 효율을 제공한다. BAC 재조합은 상동성 서열을 갖는 선형 DNA 분자의 효율적인 재조합을 매개하므로, 긴 HR은 매우 효율적인 재조합을 가능하게 한다.

[0124] 긴 HR의 중요성은 짧은 HR(약 50bp)의 표적 카세트가 긴 HR(200-500bp)의 표적 카세트보다 재조합에 덜 효율적이라는 결과에 의해 강조된다. 따라서 긴 HR을 도입할 수 있는 다목적 새로운 리소스(예를 들어 BTV 및 CTV)를 구축하였다. 1차 및 2차 BAC 재조합의 효율은 각각 31.94% 및 75.69%인 반면 HR이 짧은 기존 BAC 재조합의 효율은 1% 미만이었다. 이 개선된 재조합 효율은 13일 이내에 모든 절차를 완료함으로써 재조합 진행을 촉진시켰다(도 4).

[0125] 재조합은 HR 측면에 존재하는 선형 DNA 분자의 효율적인 재조합을 매개하는 상동성 재조합 시스템에 기초한 유전자 및 분자 생물학 기술이다. HR을 사용한 표적화 벡터를 제한 효소에 의해 선형화하고 BAC 재조합 단계에서 후속 사용을 위해 정제하였다. 절단되지 않은 표적화 벡터와 같은 오염 물질이 재조합 단계로 전달되지 않도록 주의해야 한다. 본 발명자는 2차 BAC 재조합의 효율이 1차 BAC 재조합의 효율보다 2배 더 높다는 것을 발견했다. 이러한 현상은 1차 BAC 재조합 단계에서 비절단 형태의 BTV가 완전히 제거되지 않았기 때문에 주로 발생하는 것으로 추정된다. 장기(Long-term) DNA 분해(digestion)는 완전한 분해에 중요하지만, DNA 메틸화에 의해 효소 활성이 차단되면 불완전 분해가 발생할 수 있다. 따라서, 선형 DNA와 비절단 원형 DNA를 구별하기 위해 몇 가지 접근법이 제안되었다. 그 중에서도 선형 DNA 조각이 빠르게 움직이고 절단되지 않은 원형 DNA가 가장 느린 움직임을 나타내기 때문에 낮은 비율의 아가로스젤이 가장 널리 사용되었다.

[0126] 별도의 실험에서, 우리는 선형화 BTC를 절단되지 않은 BTC와 구별하기 위해 낮은 비율의 아가로스젤(0.2%)을 사용했다. BTC 준비 과정에서 BTV가 완전히 제거되었을 때, 1차 BAC 재조합에서의 재조합 효율은 59%로 증가했다(표 10).

*표 10*

[0127]

| | 콜로니 수 | |
|---|---|---|
| | 실험 그룹 | |
| | #1 | #2 |
| 접종 콜로니 수 | 48 | 48 |
| 양성 콜로니 수 | 31 | 26 |
| 재조합 효율 (%) | 64.58 | 54.17 |
| 재조합 효율의 평균 ± S.D (%) | 59.38 ± 5.21 | |

[0128] 플라스미드는 높은 카피 수 플라스미드, 낮은 카피 수 플라스미드로 구성된다. 높은 카피 수 플라스미드는 재조합에 사용된 플라스미드이고, 낮은 카피 수 플라스미드는 BAC이다. 카피 수가 많은 플라스미드를 갖는 박테리아는 카피 수가 적은 플라스미드를 갖는 박테리아보다 비교적 빠르게 성장한다.

[0129] 추가 실험에서, 우리는 이득 및 손실 선택을 위해 콜로니를 선택할 때 상대적으로 작은 콜로니를 선택했다. 선택된 콜로니의 직경은 0.1 ~ 1㎜이다. 결과적으로 양성 세포를 발견할 확률은 약 1.6배 증가했다(도 5B).

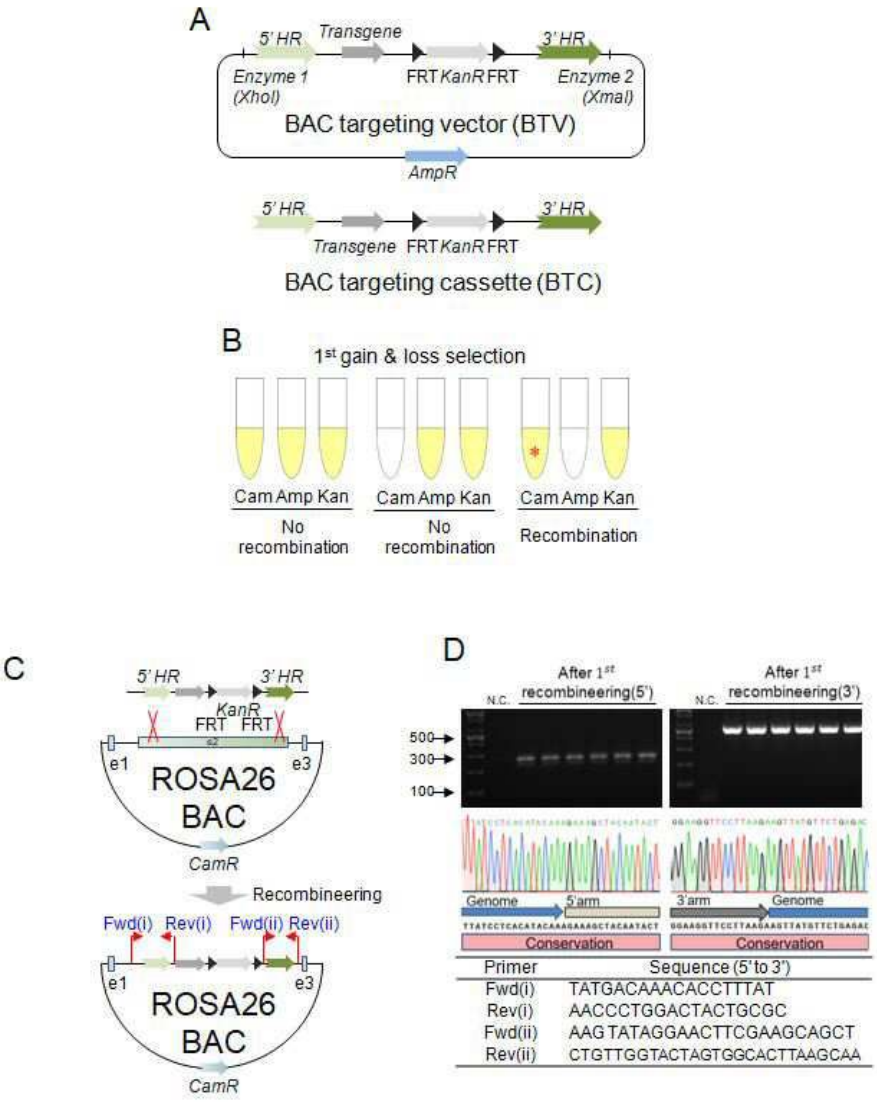
[0130] 따라서, 비절단 표적 벡터로부터의 오염을 감소시키기 위한 전략이 재조합 효율을 증가시킬 것으로 예상될 수 있다고 제안한다. 낮은 비율의 아가로스젤을 사용하는 것이 선택 사항일 수 있지만 오염을 줄이는 데는 여러 가지 옵션이 있음을 알고 있다.

[0131] 요약하면 BAC 재조합의 성공을 시각적으로 쉽게 확인하고 전체 처리 시간을 2주(13일) 미만으로 단축할 수 있는 새로운 전략을 개발했다.

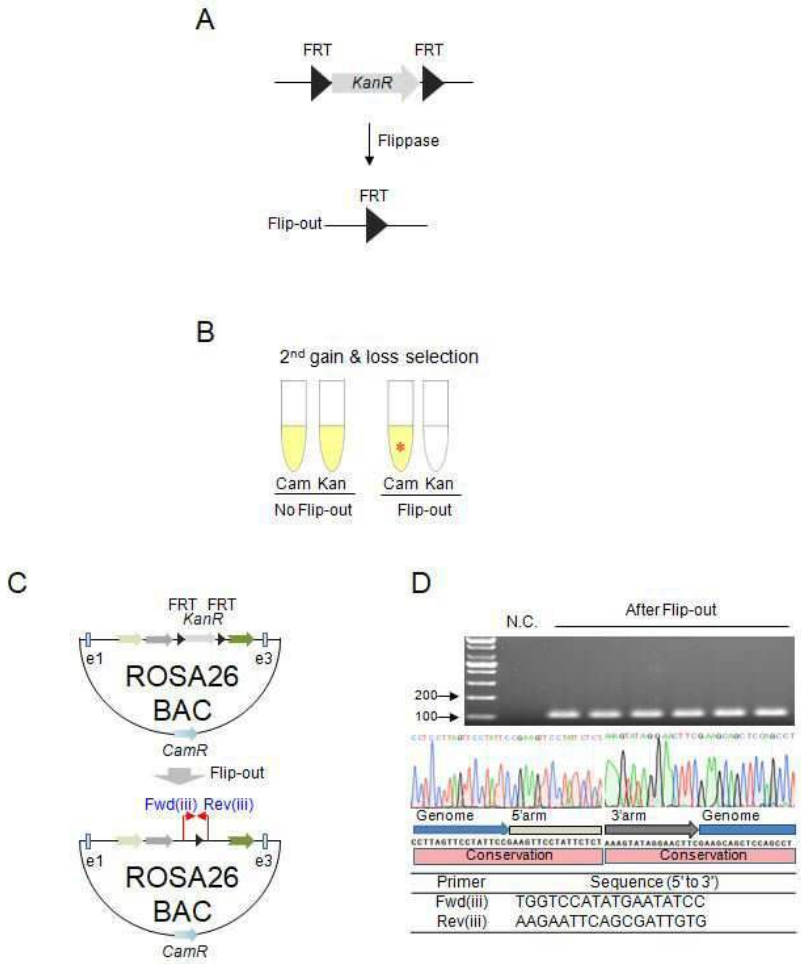
[0132] 이 새로운 시스템은 BAC 재조합을 위한 현재의 방법론에서 상당한 개선을 제공할 것이며, 생물 약제학적 단백질 발현 및 다양한 형질 전환 동물을 위한 다른 큰 벡터 응용을 포함하여 다른 분야의 많은 연구자들에게 광범위하게 관심을 가질 수 있다.

도면

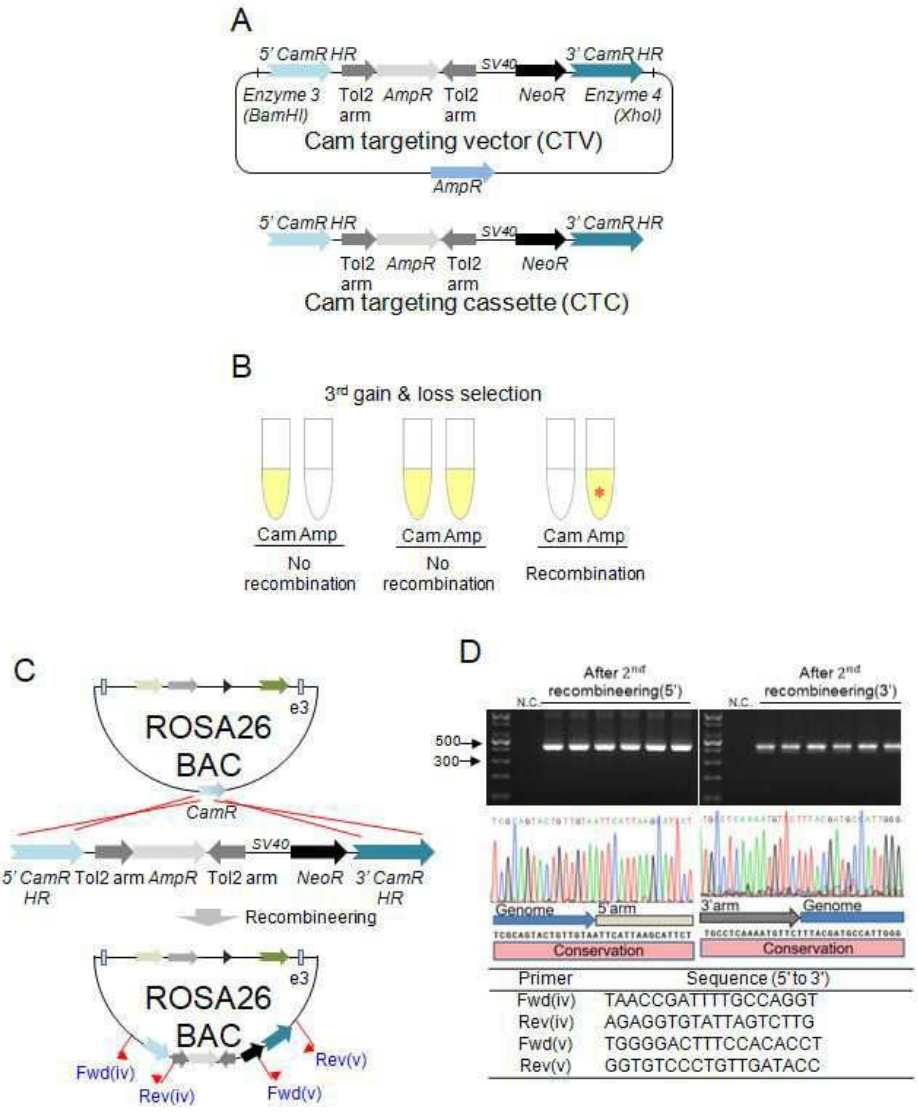
도면1


A
5' HR
Transgene
3' HR
Enzyme 1
(XhoI)
FRT KanR FRT
Enzyme 2
(XmaI)
BAC targeting vector (BTV)
AmpR
5' HR
3' HR
Transgene FRT KanR FRT
BAC targeting cassette (BTC)
B
1st gain & loss selection
Cam Amp Kan
No recombination
Cam Amp Kan
No recombination
Cam Amp Kan
Recombination
C
5' HR
3' HR
KanR
FRT FRT
e1
e3
ROSA26 BAC
CamR
Recombineering
Fwd(i) Rev(i) Fwd(ii) Rev(ii)
e1
e3
ROSA26 BAC
CamR
D
After 1st recombineering(5')
After 1st recombineering(3')
N.C.
N.C.
500
300
100
Genome
5'arm
3'arm
Genome
Conservation
Conservation
Primer
Sequence (5' to 3')
Fwd(i)
TATGACAAACACCTTTAT
Rev(i)
AACCCTGGACTACTGCGC
Fwd(ii)
AAG TATAGGAACTTCGAAGCAGCT
Rev(ii)
CTGTTGGTACTAGTGGCACTTAAGCAA

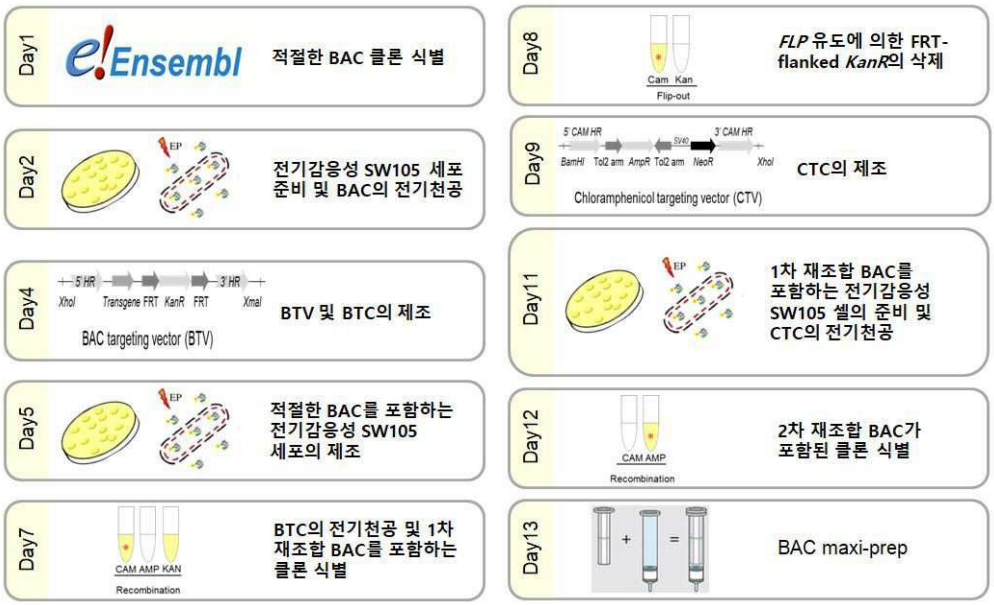
도면2


A
FRT
KanR
FRT
Flippase
FRT
Flip-out
B
2nd gain & loss selection
Cam Kan
No Flip-out
Cam Kan
Flip-out
C
FRT FRT
KanR
e1
e3
ROSA26
BAC
CamR
Flip-out
Fwd(iii) Rev(iii)
e1
e3
ROSA26
BAC
CamR
D
N.C.
After Flip-out
200
100
Genome
5'arm
3'arm
Genome
Conservation
Conservation
Primer
Sequence (5' to 3')
Fwd(iii)
TGGTCCATATGAATATCC
Rev(iii)
AAGAATTCAGCGATTGTG

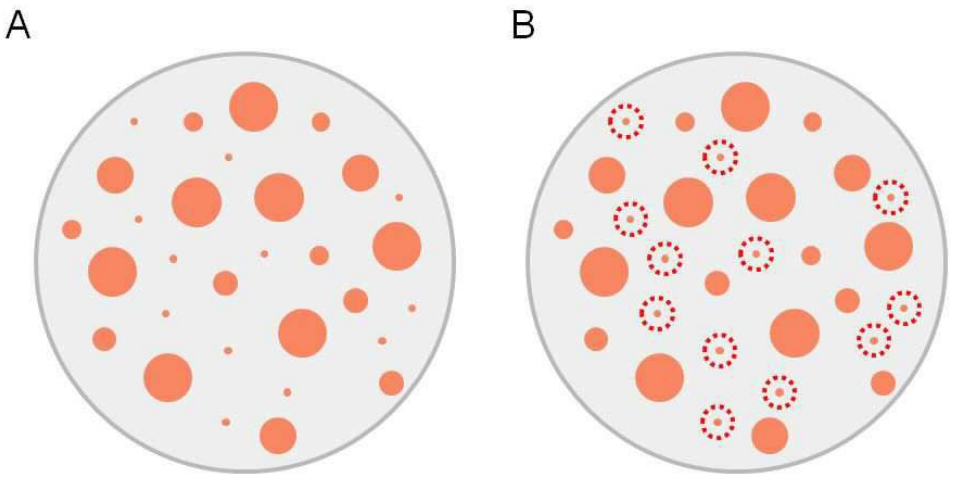
도면3


A
5' CamR HR
SV40
3' CamR HR
Enzyme 3 (BamHI)
Tol2 arm
AmpR
Tol2 arm
NeoR
Enzyme 4 (XhoI)
Cam targeting vector (CTV)
AmpR
5' CamR HR
SV40
3' CamR HR
Tol2 arm
AmpR
Tol2 arm
NeoR
Cam targeting cassette (CTC)
B
3rd gain & loss selection
Cam Amp
No recombination
Cam Amp
No recombination
Cam Amp
Recombination
C
ROSA26 BAC
e3
CamR
SV40
5' CamR HR
Tol2 arm
AmpR
Tol2 arm
NeoR
3' CamR HR
Recombineering
ROSA26 BAC
e3
Fwd(iv)
Rev(iv)
Rev(v)
Fwd(v)
D
After 2nd recombineering(5')
After 2nd recombineering(3')
N.C.
N.C.
500
300
Genome
5' arm
3' arm
Genome
Conservation
Conservation
Primer
Sequence (5'to 3')
Fwd(iv)
TAACCGATTTTGCCAGGT
Rev(iv)
AGAGGTGTATTAGTCTTG
Fwd(v)
TGGGGACTTTCCACACCT
Rev(v)
GGTGTCCCTGTTGATACC

도면4




도면5




| | Colony Number Experiment Group | | |
|---|---|---|---|
| | #1 | #2 | #3 |
| Number of inoculating colony | 16 | 16 | 16 |
| Number of positive colony | 6 | 4 | 4 |
| Flip-out efficiency (%) | 37.50 | 25.00 | 25.00 |
| Means ± S.D of recombineering efficiency (%) | 29.17 ± 5.89 | | |

| | Colony Number Experiment Group | | |
|---|---|---|---|
| | #1 | #2 | #3 |
| Number of inoculating colony | 16 | 16 | 16 |
| Number of positive colony | 6 | 7 | 10 |
| Flip-out efficiency (%) | 37.50 | 43.75 | 62.50 |
| Means ± S.D of recombineering efficiency (%) | 47.92 ±10.62 | | |

서 열 목 록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> SCREENING METHOD OF BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOMES RECOMBINEERING

<130> P20-0000

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5'homology region

<400> 1

aaagggaaaa tgccaatgct ctgtctaggg gttggataag ccagtataat aaatgaaaat 60

ggggctaaaa tgagtgttct aaaatacctt ttgataaggc tgcagaagga gcgggagaaa 120

tggatatgaa gtactgggct ctttaaaaat gattaaaatt ctgcttacat agtctaactc 180

gcgacactgt aatttcatac tgtagtaagg atctcaagca ggagagtata aaactcgggt 240

gagcatgtct ttaatctacc tcgatggaaa atactccgag gcggatcaca agcaataata 300

acctgtagtt ttgctgcata aaaccccaga tgactaccta tcctcccatt ttccttattt 360

gcccctatta aaaaacttcc cgacaaaacc gaaaatctgt gggaagtctt gtccctccaa 420

ttttacacct gttcaattcc cctgcaggac aacgcccaca caccaggtta gcc 473

<210> 2

<211> 486

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3'homology region

<400> 2

ctagaaagac tggagttgca gatcacgagg gaagaggggg aagggattct cccaggccca 60

gggcggtcct cagaagccag gaggcagcag agaactccca gaaaggtatt gcaacactcc 120

cctccccccc ccggagaagg gtgcggcctt ctccccgcct actccactgc agctcccctta 180

ctgataacaa ctcagagcga ctttgggaga gcaagtgctt cctgcctcca aaacagccca 240

actgagccct cgctccttcc ctccactccc cggagtgcgc gatggaggtc tggctcagca 300

cgcccctctt gaggcaactc aagtcggaaa cgtgcttgca cccgccccgc agccgctcag 360

ccctactgcc cgtccccgcc cccagcgcgc gcttcctgcc acgttgcgca ggggcgcgcg 420

gccagactct gcggcgcggg gccgagggga gggccggaac ctgggagcgc ctcctcgccg 480

cccccg 486

<210> 3

<211> 7568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAC targeting cassette

<400> 3

ccccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 60

agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 120

tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 180

agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 240

atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 300

ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt 360

cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 420

caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 480

attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 540

agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt 600

aagcgttaat attttgttaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa 660

ccaataggcc gaaatcggca aaatcccttа taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 720

gagtgttgtt ccagtttgga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 780

agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag 840

ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt 900

tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg 960

agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc 1020

cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 1080

ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 1140

tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 1200

ggccagtgag cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctac cggtgcccgg 1260

gaaagggaaa atgccaatgc tctgtctagg ggttggataa gccagtataa taaatgaaaa 1320

tggggctaaa atgagtgttc taaaatacct tttgataagg ctgcagaagg agcgggagaa 1380

atggatatga agtactgggc tctttaaaaa tgattaaaat tctgcttaca tagtctaact 1440

cgcgacactg taatttcata ctgtagtaag gatctcaagc aggagagtat aaaactcggg 1500

tgagcatgtc tttaatctac ctcgatggaa aatactccga ggcggatcac aagcaataat 1560

aacctgtagt tttgctgcat aaaaccccag atgactacct atcctcccat tttccttatt 1620

tgcccctatt aaaaaacttc ccgacaaaac cgaaaatctg tgggaagtct tgtccctcca 1680

attttacacc tgttcaattc ccctgcagga caacgcccac acaccaggtt agcctttaag 1740

cctgggatcc tagggcgcag tagtccaggg tttccttgat gatgtcatac ttatcctgtc 1800

cctttttttt ccacagctcg cggttgagga caaactcttc gcggtctttc cagtgccacc 1860

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt ttagaggtgt ccagtgtatg 1920

gaagacgcca aaaacataaa gaaaggcccg gcgccattct atccgctgga agatggaacc 1980

gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgccc tggttcctgg aacaattgct 2040

tttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga aatgtccgtt 2100

cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat cgtcgtatgc 2160

agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg gtgttgggcg cgttatttat cggagttgca 2220

gttgcgcccg cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg 2280

cagcctaccg tggtgttcgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa 2340

aagctcccaa tcatccaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt 2400

cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacctcccg gttttaatga atacgatttt 2460

gtgccagagt ccttcgatag ggacaagaca attgcactga tcatgaactc ctctggatct 2520

actggtctgc ctaaaggtgt cgctctgcct catagaactg cctgcgtgag attctcgcat 2580

gccagagatc ctatttttgg caatcaaatc attccggata ctgcgatttt aagtgttgtt 2640

ccattccatc acggttttgg aatgtttact acactcggat atttgatatg tggatttcga 2700

gtcgtcttaa tgtatagatt tgaagaagag ctgtttctga ggagccttca ggattacaag 2760

attcaaagtg cgctgctggt gccaacccta ttctccttct tcgccaaaag cactctgatt 2820

gacaaatacg atttatctaa tttacacgaa attgcttctg gtggcgctcc cctctctaag 2880

gaagtcgggg aagcggttgc caagaggttc catctgccag gtatcaggca aggatatggg 2940

ctcactgaga ctacatcagc tattctgatt acacccgagg gggatgataa accgggcgcg 3000

gtcggtaaag ttgttccatt ttttgaagcg aaggttgtgg atctggatac cgggaaaacg 3060

ctgggcgtta atcaaagagg cgaactgtgt gtgagaggtc ctatgattat gtccggttat 3120

gtaaacaatc cggaagcgac caacgccttg attgacaagg atggatggct acattctgga 3180

gacatagctt actgggacga agacgaacac ttcttcatcg ttgaccgcct gaagtctctg 3240

attaagtaca aaggctatca ggtggctccc gctgaattgg aatccatctt gctccaacac 3300

cccaacatct tcgacgcagg tgtcgcaggt cttcccgacg atgacgccgg tgaacttccc 3360

gccgccgttg ttgttttgga gcacggaaag acgatgacgg aaaaagagat cgtggattac 3420

gtcgccagtc aagtaacaac cgcgaaaaag ttgcgcggag gagttgtgtt tgtggacgaa 3480

gtaccgaaag gtcttaccgg aaaactcgac gcaagaaaaa tcagagagat cctcataaag 3540

gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ttctaggagc tctatacgcg tctcaagctt 3600

actgctagcg ttctagagtc ggggcggccg gccgcttcga gcagacatga taagatacat 3660

tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 3720

ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa 3780

caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa 3840

gtaaaacctc tacaaatgtg gtatggctga ttatgatcct ctagatcaac tagtccatgg 3900

aattcagcaa cattgcctta catggtccat atgaatatcc tccttagttc ctattccgaa 3960

gttcctattc tctagaaagt ataggaactt cagagcgctt ttgaagctgg ggtgggcgaa 4020

gaactccagc atgagatccc cgcgctggag gatcatccag ccggcgtccc ggaaaacgat 4080

tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg atggcaggtt 4140

gggcgtcgct tggtcggtca tttcgaaccc cagagtcccg ctcagaagaa ctcgtcaaga 4200

aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag cacgaggaag 4260

cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca gcaatatcac gggtagccaa cgctatgtcc 4320

tgatagcggt ccgccacacc cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt 4380

tccaccatga tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc ctcgccgtcg 4440

ggcatgcgcg ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg atgctcttcg 4500

tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg ctcgatgcga 4560

tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa gcgtatgcag ccgccgcatt 4620

gcatcagcca tgatggatac tttctcggca ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc 4680

cccggcactt cgcccaatag cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagcaca 4740

gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc gtcctgcagt 4800

tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac 4860

agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat 4920

agcctctcca cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgttc aatcatgcga 4980

aacgatcctc atcctgtctc ttgatcagat cttgatcccc tgcgccatca gatccttggc 5040

ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag ggcttcccaa ccttaccaga gggcgcccca 5100

gctggcaatt ccggttcgct tgctgtccat aaaaccgccc agtctagcta tcgccatgta 5160

agcccactgc aagctacctg ctttctcttt gcgcttgcgt tttcccttgt ccagatagcc 5220

cagtagctga cattcatccg gggtcagcac cgtttctgcg gactggcttt ctacgtgttc 5280
cgcttccttt agcagccctt gcgccctgag tgcttgcggc agcgtggggg atcttgaagt 5340
tcctattccg aagttcctat tctctagaaa gtataggaac ttcgaagcag ctccagccta 5400
cacaatcgct gaattctttc ctaaggctag aaagactgga gttgcagatc acgagggaag 5460
agggggaagg gattctccca ggcccagggc ggtcctcaga agccaggagg cagcagagaa 5520
ctcccagaaa ggtattgcaa cactcccctc ccccctccgg agaagggtgc ggccttctcc 5580
ccgcctactc cactgcagct cccttactga taacaactca gagcgacttt gggagagcaa 5640

gtgcttcctg cctccaaaac agcccaactg agccctcgct ccttccctcc actccccgga 5700
gtgcgcgatg gaggtctggc tcagcacgcc cctcttgagg caactcaagt cggaaacgtg 5760
cttgcacccg ccccgcagcc gctcagccct actgcccgtc cccgccccca gcgcgcgctt 5820
cctgccacgt tgcgcagggg cgcgcggcca gactctgcgg cgcggggccg aggggagggc 5880
cggaacctgg gagcgcctcc tcgccgcccc cgctcgaggg ggggcccggt accggcctta 5940
agggccggtc cgtgtaccca gcttttgttc cctttagtga gggttaattg cgcgcttggc 6000
gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa 6060

catacgagcc gggagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac 6120
attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca 6180
ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc 6240
ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc 6300
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 6360
aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 6420
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 6480

gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 6540
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 6600
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 6660
ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 6720
tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 6780
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg 6840
ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 6900

aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt 6960

ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 7020

tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt 7080

atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 7140

aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat 7200

ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac 7260

tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg 7320

ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag 7380

tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt 7440

aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt 7500

gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt 7560

tacatgat 7568

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fwd(i)

<400> 4

tatgacaaac acctttat 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev(i)

<400> 5

aaccctggac tactgcgc 18

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fwd(ii)

<400> 6

aagtatagga acttcgaagc agct 24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev(ii)

<400> 7

ctgttggtac tagtggcact taagcaa 27

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' flippase recognition target

<400> 8

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc 34

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' flippase recognition target

<400> 9

gaagttccta ttccgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttc 48

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fwd(iii)

<400> 10

tggtccatat gaatatcc 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev(iii)

<400> 11

aagaattcag cgattgtg 18

<210> 12

<211> 7781

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cam targeting vector

<400> 12

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60

acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120

tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180

ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagctat 240

ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtaccgag ctcggatcca 300

ctagagaaca ttttgaggca tttcagtcag ttgctcaatg tacctataac cagaccgttc 360

agctggatat tacggccttt ttaaagaccg taaagaaaaa taagactagg tgtgtcagtt 420

agggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa 480

ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag 540

catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccca tcccgcccct 600

aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc 660

agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctttttgg 720

aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata tccattttcg gatctgatca 780

agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc 840

ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc 900

tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga 960

cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac 1020

gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct 1080

gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa 1140

agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc 1200

attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct 1260

tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc 1320

caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg 1380

cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct 1440

gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct 1500

tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca 1560

gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa 1620

atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc 1680

tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc 1740

ggggatctca tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt 1800

tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct 1860

agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttactagt aacggccgcc agtgtgctgg 1920

aattcgccct tgcgaagata cggccacggg tgctcttgat cctgtggctg attttggact 1980

gtgctgctcg cagctgctga tgaatcacat acttcctcca ttttcttcca ctgattgact 2040

gttataattt ccctaatttc caggtcaagg tgctgtgcat tgtggtaata gatgtgacat 2100

gacgtcactt ccaaaggacc aatgaacatg tctgaccaat ttcatataat gtgaaaacga 2160

ttttcatagg cagaataaat aacatttaaa ttaaactggg catcagcgca attcaattgg 2220

tttggtaata gcaagggaaa atagaatgaa gtgatctcca aaaaataagt actttttgac 2280

tgtaaataaa attgtaagga gtaaaaagta ctttttttc taaaaaaatg taattaagta 2340

aaagtaaaag tattgatttt taattgtact caagtaaagt aaaaatcccc aaaaataata 2400

cttaagtaca gtaatcaagt aaaattactc aagtacttta cacctctggt tcttgacccc 2460

ctaccttcat tgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 2520

gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 2580

tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt 2640

tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 2700

gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 2760

acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat 2820

tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga 2880

gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 2940

tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 3000

accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 3060

ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt 3120

agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 3180

gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 3240

ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg 3300

tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 3360

ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 3420

gattaagcat tggtaactgt cagaccaacc catatccact ctgttccaca caggtcagag 3480

gtttgtccag gagttcttga cagaggtgta aaaagtactc aaaaatttta ctcaagtgaa 3540

agtacaagta cttagggaaa attttactca attaaaagta aaagtatctg gctagaatct 3600

tacttgagta aaagtaaaaa agtactccat taaaattgta cttgagtatt aaggaagtaa 3660

aagtaaaagc aagaaagaaa actagagatt cttgtttaag cttttaatct caaaaaacat 3720

taaatgaaat gcatacaagg ttttatcctg ctttagaact gtttgtattt aattatcaaa 3780

ctataagaca gacaatctaa tgccagtaca cgctactcaa agttgtaaaa cctcagattt 3840

aacttcagta gaagctgatt ctcaaaattg ttagtgtcaa gcctagctct tttggggctg 3900

aaaagcaatc ctgcagtgct gaaaagcctc tcacaggcag ccgatgcggg aagaggtgta 3960

ttagtcttga tagagaggct gcaaatagca ggaaacgtga gcagagactc cctggtgtct 4020

gaaacacagg ccagatggga agggcgaatt ctgcagatat caaatattat acgcaaggcg 4080

acaaggtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcatcatgc cgtttgtgat ggcttccatg 4140

tcggcagaat gcttaatgaa tatatccatc acactggcgg ccgctcgagc atgcatctag 4200

agggcccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgtcg ttttacaacg 4260

tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atccccctttt 4320

cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 4380

cctgaatggc gaatggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 4440

acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc 4500

ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct 4560

ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat 4620

ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 4680

acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc 4740

tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg 4800

atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaattcagg gcgcaagggc tgctaaagga 4860

agcggaacac gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct 4920

actgggctat ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg 4980

ggcttacatg gcgatagcta gactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc 5040

cagctggggc gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaactgg atggctttct 5100

tgccgccaag gatctgatgg cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat 5160

cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga 5220
ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc 5280
ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga 5340
atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg 5400
cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc 5460
cggggcagga tctcctgtca tcccaccttg ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg 5520
atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga 5580

aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc 5640
tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca 5700
tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 5760
tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 5820
atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg 5880
accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc 5940
gccttcttga cgagttcttc tgaattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg 6000

tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac 6060
gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact 6120
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat 6180
gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga 6240
gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac 6300
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat 6360
gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac 6420

cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct 6480
gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac 6540
gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga 6600
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg 6660
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact 6720
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac 6780
tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta 6840

actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt 6900

taaaaggatc taggtgaaga tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 6960

gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 7020

ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt 7080

ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc 7140

gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 7200

tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 7260

cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 7320

gtcgggctga acgggggttt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga 7380

actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 7440

ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 7500

gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 7560

atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 7620

tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 7680

tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg 7740

aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa g 7781

<210> 13

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' CamR HR

<400> 13

agaacatttt gaggcatttc agtcagttgc tcaatgtacc tataaccaga ccgttcagct 60

ggatattacg gccttttaa agaccgtaaa 90

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> 3' CamR HR

<400> 14

aaatattata cgcaaggcga caaggtgctg atgccgctgg cgattcaggt tcatcatgcc 60

gtttgtgatg gcttccatgt cggcagaatg cttaatgaat 100

<210> 15

<211> 539

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Left Tol2 transposon

<400> 15

tgcgaagata cggccacggg tgctcttgat cctgtggctg attttggact gtgctgctcg 60

cagctgctga tgaatcacat acttcctcca ttttcttcca ctgattgact gttataattt 120

ccctaatttc caggtcaagg tgctgtgcat tgtggtaata gatgtgacat gacgtcactt 180

ccaaaggacc aatgaacatg tctgaccaat ttcatataat gtgaaaacga ttttcatagg 240

cagaataaat aacatttaaa ttaaactggg catcagcgca attcaattgg tttggtaata 300

gcaagggaaa atagaatgaa gtgatctcca aaaaataagt acttttgac tgtaaataaa 360

attgtaagga gtaaaaagta ctttttttc taaaaaaatg taattaagta aaagtaaaag 420

tattgatttt taattgtact caagtaaagt aaaaatcccc aaaaataata cttaagtaca 480

gtaatcaagt aaaattactc aagtacttta cacctctggt tcttgacccc ctaccttca 539

<210> 16

<211> 592

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Right Tol2 transposon

<400> 16

acccatatcc actctgttcc acacaggtca gaggtttgtc caggagttct tgacagaggt 60

gtaaaaagta ctcaaaaatt ttactcaagt gaaagtacaa gtacttaggg aaaattttac 120

tcaattaaaa gtaaaagtat ctggctagaa tcttacttga gtaaaagtaa aaaagtactc 180

cattaaaatt gtacttgagt attaaggaag taaaagtaaa agcaagaaag aaaactagag 240

attcttgttt aagcttttaa tctcaaaaaa cattaaatga aatgcataca aggttttatc 300

ctgctttaga actgtttgta tttaattatc aaactataag acagacaatc taatgccagt 360

acacgctact caaagttgta aaacctcaga tttaacttca gtagaagctg attctcaaaa 420

ttgttagtgt caagcctagc tcttttgggg ctgaaaagca atcctgcagt gctgaaaagc 480

ctctcacagg cagccgatgc gggaagaggt gtattagtct tgatagagag gctgcaaata 540

gcaggaaacg tgagcagaga ctccctggtg tctgaaacac aggccagatg gg 592

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fwd(iv)

<400> 17

taaccgattt tgccaggt 18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev(iv)

<400> 18

agaggtgtat tagtcttg 18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fwd(v)

<400> 19

tggggacttt ccacacct 18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev(v)

<400> 20

ggtgtccctg ttgatacc 18