

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5599745号
(P5599745)

(45) 発行日 平成26年10月1日 (2014. 10. 1)

(24) 登録日 平成26年8月22日 (2014. 8. 22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 4 O B 40/08 (2006. 01)	C 4 O B 40/08
C 4 O B 40/10 (2006. 01)	C 4 O B 40/10
C O 7 K 16/00 (2006. 01)	C O 7 K 16/00

請求項の数 16 外国語出願 (全 145 頁)

(21) 出願番号	特願2011-44525 (P2011-44525)	(73) 特許権者	506065987
(22) 出願日	平成23年3月1日 (2011. 3. 1)		ダイアックス コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2001-577464 (P2001-577464) の分割		アメリカ合衆国、01803-2756
原出願日	平成13年4月17日 (2001. 4. 17)		マサチューセッツ州、バーリントン、55
(65) 公開番号	特開2011-135893 (P2011-135893A)	(74) 代理人	100078282
(43) 公開日	平成23年7月14日 (2011. 7. 14)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成23年3月1日 (2011. 3. 1)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/198, 069		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成12年4月17日 (2000. 4. 17)	(72) 発明者	ロバート シー、 ラドナー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 メリーランド 2185
前置審査			4, イジャムビル, グリーン パレ
			ー ロード 3827
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドの多種多様なファミリーのメンバーとしての、遺伝的パッケージの提示ライブラリーを構築する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして該ファミリーの少なくとも一部を集散的に提示する、遺伝的パッケージの収集物を含むライブラリーであって、該提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、以下：

(a) 式 S-X1-Y-X2-M-X3- のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 であって、ここで、X1、X2 および X3 は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W および Y からなる群より独立して選択される、重鎖 CDR1、ならびに

(b) 式 X4-I-X5-X6-S-G-G-X7-T-X8-Y-A-D-S-V-K-G- のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 であって、ここで、X4 および X5 は、Y、R、W、V、G および S からなる群より独立して選択され、X6 は、P および S からなる群より選択され、そして X7 および X8 は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W および Y からなる群より独立して選択される、重鎖 CDR2、

をコードする配列、ならびに

(c) 重鎖 CDR3 の多様性のコードする配列

を含む核酸配列によってコードされる、ライブラリー。

【請求項 2】

前記核酸配列が、VH 3-23のフレームワーク領域をコードする配列をさらに含む、請求項1に記載のライブラリー。

【請求項3】

前記遺伝的パッケージがM13ファージである、請求項1または2に記載のライブラリー。

【請求項4】

前記M13ファージが、抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項3に記載のライブラリー。

【請求項5】

前記M13ファージが、前記ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーの導入および切除を可能にする制限部位を含む、請求項3に記載のライブラリー。

10

【請求項6】

前記核酸配列がファージベクター中にある、請求項1～5のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項7】

前記ファージベクターが、抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項6に記載のライブラリー。

【請求項8】

前記抗生物質耐性遺伝子がアンピシリン耐性遺伝子である、請求項7に記載のライブラリー。

20

【請求項9】

前記ファージベクターが、調節可能なプロモーターを含む、請求項6に記載のライブラリー。

【請求項10】

前記DNA配列が、ファージミドベクター中にある、請求項1～5のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項11】

前記提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質が、M13 IIIの最終部分に対して短いリンカーを介して提示される、請求項1～10のいずれか一項に記載のライブラリー。

30

【請求項12】

前記提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質が、全長成熟IIIタンパク質に対して短いリンカーを介して提示される、請求項1～10のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項13】

前記提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質が、全長成熟VIIタンパク質に対して短いリンカーを介して提示される、請求項1～10のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項14】

前記重鎖CDR3の多様性が、天然のヒトCDR3の多様性を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のライブラリー。

40

【請求項15】

前記天然の多様性が、自己免疫患者から捕捉される、請求項14に記載のライブラリー。

【請求項16】

前記重鎖CDR3多様性が、合成多様性を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、そしてこのファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示する、遺伝的パッケージのライブラリーを構築することに関する。好ましい実施形態では、提示されるポリペプチドはヒト F a b である。

【0002】

より詳細には、本発明は、一本鎖核酸を選択された位置で切断する方法に関し、この切断された核酸は、本発明のライブラリーの遺伝的パッケージ上に提示されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を少なくとも部分的にコードする。好ましい実施形態では、この遺伝的パッケージは、糸状ファージまたはファージミドである。

10

【0003】

本発明はさらに、有用なペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を提示する遺伝的パッケージのライブラリーをスクリーニングする方法、ならびにこのようなスクリーニングによって同定されたペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質に関する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、そしてこのファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示する、遺伝的パッケージのライブラリーを調製することは現在、当該分野において一般的な方法である。多くの通常のライブラリーでは、提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、抗体に関連する。しばしば、これらは F a b または単鎖抗体である。

20

【0005】

一般に、提示されるべきファミリーのメンバーをコードする DNA は、クローニングされて遺伝的パッケージの表面に所望のメンバーを提示するように使用される前に増幅されなければならない。このような増幅は代表的に、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを利用する。

【0006】

このようなプライマーは、増幅されるべき DNA に対してネイティブな配列に対して相補的であり得るか、またはその DNA の 5' 末端もしくは 3' 末端に結合したオリゴヌクレオチドに対して相補的であり得る。増幅されるべき DNA に対してネイティブである配列に相補的であるプライマーは、提示されるべきファミリーのメンバーを偏らせるという点で不利である。ネイティブな DNA 中にこのプライマーに対して実質的に相補的である配列を含むメンバーのみが増幅される。そうでないメンバーはこのファミリーから存在しなくなる。増幅されるメンバーについては、プライマー領域内の何らかの多様性が抑制される。

30

【0007】

例えば、特許文献 1 では、使用されるプライマーは、抗体遺伝子の V_H 領域の 5' 末端に存在する。これは、ネイティブな DNA 中の、単一種内で「充分によく保存された」と呼ばれる配列領域にアニーリングする。このようなプライマーは、増幅されるメンバーを、この「保存された」領域を有するメンバーに偏らせる。この領域内の何らかの多様性は失われる。

40

【0008】

ヒトの抗体遺伝子が、V および J、または V、D および J の組合せ選択、続いて体細胞変異を含むプロセスを通して生じることが一般に受け入れられている。大部分の多様性は相補性決定領域 (CDR) に生じるが、多様性はまた、より保存されたフレームワーク領域 (FR) において生じ、そしてこの多様性の少なくともいくつかは、抗原 (Ag) に対する特異的結合を付与または増強する。その

50

結果、ライブラリーは、可能な限り多くのC D RおよびF R多様性を含むべきである。

【0009】

コードするペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の遺伝的パッケージ上での提示のために、増幅されたDNAをクローニングするために、DNAは、ベクターへの連結のために適切な末端を生じるように切断されなければならない。このような切断は一般に、プライマーに保有された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を用いてもたらされる。RNAの逆転写から生成されるDNAの5'末端にプライマーが存在する場合、このような制限処理は、増幅されたDNA中に有害な5'非翻訳領域を残す。これらの領域は、クローニングされた遺伝子の発現を妨害し、従って、これらによってコードされるペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の提示を妨害する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】欧州特許第368,684号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

20

本発明の目的は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、そしてこのファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示する、遺伝的パッケージのライブラリーを構築するための新規方法を提供することである。これらの方法は、増幅のために用いられるプライマーに相補的であるネイティブな配列を含むDNAには偏っていない。これらの方法はまた、発現に有害であり得る任意の配列が、クローニングおよび提示の前に、増幅されたDNAから除去されることを可能にする。

【0012】

本発明の別の目的は、一本鎖核酸配列を所望の位置で切断するための方法を提供することであり、この方法は、以下の工程を包含する：

30

(i) この核酸を一本鎖オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、このオリゴヌクレオチドは、切断が所望される領域においてこの核酸に機能的に相補的であり、そしてその核酸中の相補体とともに、制限処理の際に所望の位置での核酸の切断をもたらす制限エンドヌクレアーゼ認識部位を形成する配列を含む、工程；および

(ii) この核酸のみを、この核酸とこのオリゴヌクレオチドとの相補によって形成された認識部位で切断する工程；

接触工程および切断工程は、実質的に一本鎖形態の核酸を維持するに十分な温度で行われ、このオリゴヌクレオチドは、二本の鎖が会合し、その結果、選択された温度および所望の位置で切断が生じ得るのを可能にするに十分に大きな領域にわたってこの核酸に対して機能的に相補的であり、そして切断は、選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを用いて行われる。

40

【0013】

本発明のさらなる目的は、一本鎖核酸配列を所望の位置で切断するための代替的な方法を提供することであり、この方法は以下の工程を包含する：

(i) この核酸を部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、このオリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断が所望される領域においてこの核酸に機能的に相補的であり、そしてこのオリゴヌクレオチドの二本鎖領域は、I I-S型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、その切断部位は、この認識部位から既知の距離に位置する、工程；および

50

(i i) この核酸のみを、この核酸とこのオリゴヌクレオチドの一本鎖領域との相補によって形成された切断部位で切断する工程；

接触工程および切断工程は、実質的に一本鎖形態の核酸を維持するに十分な温度で行われ、このオリゴヌクレオチドは、二本の鎖が会合し、その結果、選択された温度および所望の位置で切断が生じ得るのを可能にするに十分に大きな領域にわたってこの核酸に対して機能的に相補的であり、そして切断は、選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを用いて行われる。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の目的は、DNAの多様なファミリーのメンバーを含み、そしてこのファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に含む、DNA分子を捕獲する方法を提供することである。一本鎖形態のこれらのDNA分子は、本発明の方法のうちの1つによって切断されている。この方法は、このファミリーの個々の一本鎖DNAメンバーを、部分的に二重鎖のDNA複合体に連結することを含む。この方法は以下の工程を包含する：

(i) 制限エンドヌクレアーゼで切断された一本鎖核酸配列を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、このオリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断後に残る領域においてこの核酸に対して機能的に相補的であり、このオリゴヌクレオチドの二本鎖領域は、切断後に残っている配列を、発現に適切なリーディングフレームに戻すために必要な任意の配列を含み、そしてこれらの配列の5'側に制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、工程；および

(i i) この部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド配列のみを、この部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの二本鎖領域内に含まれる制限エンドヌクレアーゼ認識部位で切断する工程。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の目的は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーを提示し、そしてこのファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示する、ライブラリーを、上記の方法およびDNAを用いて調製することである。

【 0 0 1 6 】

本発明の目的は、これらのライブラリーをスクリーニングして、有用なペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を同定し、そしてこれらの物質をヒトの治療において使用することである。たとえば、本発明は以下を提供する：

(項目1) 一本鎖核酸配列を所望の位置で切断するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 該核酸を、一本鎖オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、そして制限の際に該核酸の該所望の位置での切断を生じる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を、その補体を用いて該核酸中に形成する配列を含む、工程；および

(i i) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの相補性によって形成される該認識部位で、該核酸を単独で切断する工程；

を包含し、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、方法。

(項目2) 一本鎖核酸配列を所望の位置で切断するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 該核酸を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であ

って、該オリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断が所望される該領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、そして該オリゴヌクレオチドの二本鎖領域は、I I型-S制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、該切断部位は、該認識部位から既知の距離に位置する、工程；および

(i i) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの該一本鎖領域の相補性によって形成されるI I型-S切断部位で、該核酸を単独で切断する工程；
を包含し、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、方法。

10

(項目3) 遺伝的パッケージの表面上のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する方法であって、改善が、提示されるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の少なくとも一部が、
以下の工程：

(i) 核酸を、一本鎖オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、そして制限の際に該核酸の所望の位置での切断を生じる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を、その補体を用いて該核酸中に形成する配列を含む、工程；および

20

(i i) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの相補性によって形成される該認識部位で、該核酸を単独で切断する工程；
を包含する方法によって所望の位置で切断される該核酸によって、少なくとも一部がコードされることを特徴とし、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、方法。

30

(項目4) 遺伝的パッケージの表面上のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する方法であって、改善が、提示されるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質が、以下の工程：

(i) 該核酸を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、該オリゴヌクレオチドの該二本鎖領域は、I I型-S制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、該切断部位は、該認識部位から既知の距離に位置する、工程；および

40

(i i) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの該一本鎖領域の相補性によって形成されるI I型-S切断部位で、該核酸を単独で切断する工程；
によって所望の位置で切断される核酸を含むDNA配列によってコードされることを特徴とし、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、方法。

(項目5) 遺伝的パッケージの表面上のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多

50

種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する方法であって、
該方法は、以下の工程：

(i) 該多種多様なファミリーのメンバーの少なくとも一部をコードする核酸の収集物を調製する工程；

(i i) 該核酸を一本鎖にする工程；

(i i i) 以下の工程：

(a) 該核酸を、一本鎖オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、そして制限の際に該核酸の所望の位置での切断を生じる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を、その補体を用いて該核酸中に形成する配列を含む、工程；および

(b) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの相補性によって形成される該認識部位で、該核酸を単独で切断する工程；

を包含する方法によって、所望の位置で該一本鎖核酸を切断する工程であって、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分な大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、工程；ならびに

(i v) 該遺伝的パッケージの該表面上の該切断された核酸によって少なくとも一部がコードされるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の該ファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの該多様性の少なくとも一部を提示する工程、
を包含する、方法。

(項目6) 遺伝的パッケージの表面上のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する方法であって、
該方法は、以下の工程：

(i) 該多種多様なファミリーのメンバーの少なくとも一部をコードする核酸の収集物を調製する工程；

(i i) 該核酸を一本鎖にする工程；

(i i i) 以下の工程：

(a) 該核酸を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、該オリゴヌクレオチドの該二本鎖領域は、I I型-S制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、該切断部位は、該認識部位から既知の距離に位置する、工程；および

(b) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの該一本鎖領域の相補性によって形成されるI I型-S切断部位で、該核酸を単独で切断する工程；

を包含する方法によって、所望の位置で該一本鎖核酸を切断する工程であって、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分な大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である切断エンドヌクレアーゼを使用して、該制限が行われる、工程；ならびに；

(i v) 該遺伝的パッケージの該表面上の該切断された核酸によって少なくとも一部がコードされるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の該ファミリー

10

20

30

40

50

のメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する工程、
を包含する、方法。

(項目7) ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示する遺伝的パッケージの収集物を含に、そして集合的に、該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示するライブラリーであって、該ライブラリーは、項目3、4、5または6に記載の方法を使用して作製される、ライブラリー。

(項目8) ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該ファミリーの少なくとも一部を提示する遺伝的パッケージの収集物を含むライブラリーであって、該提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、以下の工程：

(i) 該核酸を、一本鎖オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、そして制限の際に該核酸の所望の位置での切断を生じる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を、その補体を用いて該核酸中に形成する配列を含む、工程；および

(ii) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの相補性によって形成される該認識部位で、該核酸を単独で切断する工程；

を包含する方法によって、所望の位置で一本鎖核酸配列を切断することによって生成される配列の少なくとも一部を含むDNA配列によってコードされ、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、ライブラリー。

(項目9) ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多種多様なファミリーのメンバーを提示し、そして集合的に、該提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の該ファミリーの多様性の少なくとも一部を提示する遺伝的パッケージの収集物を含むライブラリーであって、該提示されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、以下の工程：

(i) 該核酸を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断が所望される領域において該核酸に対して機能的に相補的であり、該オリゴヌクレオチドの該二本鎖領域は、II型-S制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、該切断部位は、該核酸の該切断が所望される該認識部位から既知の距離に位置する、工程；および

(ii) 該核酸および該オリゴヌクレオチドの該一本鎖領域の相補性によって形成されるII型-S切断部位で、該核酸を単独で切断する工程；

を包含する方法によって、所望の位置で一本鎖核酸配列を切断することによって生成される配列の少なくとも一部を含むDNA配列によってコードされ、該接触工程および該切断工程は、該核酸を実質的に一本鎖形態で維持するために十分な温度で行われ、該オリゴヌクレオチドは、切断が選択された該温度および該所望の位置で起こり得るように、該二本の鎖の会合を可能にするために十分大きな領域にわたって該核酸と機能的に相補的であり、そして該選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して、該切断が行われる、ライブラリー。

(項目10) 前記核酸が、免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする、項目1～9のいずれか1項に記載の方法。

(項目11) 前記免疫グロブリンが、Fabまたは単鎖Fvを含む、請求項10に記載の方法。

(項目12) 前記免疫グロブリンが、重鎖の少なくとも部分を含む、請求項10または11に記載の方法。

10

20

30

40

50

- (項目13) 前記重鎖の少なくとも一部がヒトである、項目12に記載の方法。
- (項目14) 前記免疫グロブリンが、FR1の少なくとも一部を含む、
項目10または11に記載の方法。
- (項目15) 前記FR1の少なくとも一部がヒトである、項目14に記載の方法。
- (項目16) 前記免疫グロブリンが、軽鎖の少なくとも一部を含む、請求項10または
11に記載の方法。
- (項目17) 前記軽鎖の少なくとも一部がヒトである、項目16に記載の方法。
- (項目18) 前記核酸配列の少なくとも一部が、少なくとも1つの自己免疫疾患および
／または癌に罹患した患者由来である、項目1～9のいずれか1項に記載の方法。
- (項目19) 前記自己免疫疾患が、狼瘡、エリテマトーデス、全身性硬化症、慢性関節
リウマチ、抗リン脂質症候群、または脈管炎からなる群から選択される、項目18に記載
の方法。 10
- (項目20) 前記核酸の少なくとも一部が、末梢血球、骨髄細胞、脾臓細胞またはリン
パ節細胞からなる群から単離される、項目18に記載の方法。
- (項目21) さらに、核酸の増幅工程を、工程(i)と工程(ii)との間、工程(i
i)と工程(iii)との間、または工程(iii)と工程(iv)との間に包含する、
項目5または6に記載の方法。
- (項目22) 前記増幅工程が、geneRACETMを使用する、請求項21に記載の
方法。
- (項目23) 前記温度が、45℃と75℃との間である、項目1～9のいずれか1項に
記載の方法。 20
- (項目24) 前記温度が、50℃と60℃との間である、項目23に記載の方法。
- (項目25) 前記温度が、55℃と60℃との間である、項目24に記載の方法。
- (項目26) 前記一本鎖オリゴヌクレオチドの長さが、17塩基と30塩基との間であ
る、項目1、3、5または8に記載の方法。
- (項目27) 前記一本鎖オリゴヌクレオチドの長さが、18塩基と24塩基との間であ
る、項目26に記載の方法。
- (項目28) 前記制限エンドヌクレアーゼが、MaeIII、Tsp451、HphI
、BsaJI、AluI、BlnI、DdeI、BglII、MslI、BsiEI、E
aeI、EagI、HaeIII、Bst4CI、HpyCH4III、HinfI、M
lyI、PleI、MnlI、HpyCH4V、BsmAI、BpmI、XmnI、また
はSacIからなる群から選択される、
項目1、3、5または8に記載の方法。 30
- (項目29) 前記制限エンドヌクレアーゼが、Bst4CI、TaaI、HpyCH4
III、BlnI、HpyCH4VまたはMslIを含む群から選択される、項目28に
記載の方法。
- (項目30) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記一本鎖領域の長さが、1
4塩基と22塩基との間である、項目2、4、6または9に記載の方法。
- (項目31) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記一本鎖領域の長さが、1
4塩基と17塩基との間である、項目30に記載の方法。 40
- (項目32) 前記オリゴヌクレオチドの前記一本鎖領域の長さが、18塩基と20塩基
との間である、項目31に記載の方法。
- (項目33) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記二本鎖領域の長さが、幹
およびそのパンドロームによって形成される10塩基対と14塩基対との間である、項
目2、4、6または9に記載の方法。
- (項目34) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドが、前記幹と前記パンドローム
との間に、3～8塩基のループを含む、項目33に記載の方法。
- (項目35) 前記II型-S制限エンドヌクレアーゼが、AarICAC、AceII
I、Bbr7I、BbvI、BbvII、Bce83I、BceAI、Bcefi、Bc
iVI、BfiI、BinI、BscAI、BseRI、BsmFI、BspMI、Ec 50

i I、E c o 5 7 I、F a u I、F o k I、G s u I、H g a I、H p h I、M b o I I、M l y I、M m e I、M n l I、P l e I、R l e A I、S f a N I、S s p D 5 I、S t h l 3 2 I、S t s I、T a q I I、T t h l l l I I、またはU b a P Iを含む群から選択される、請求項2、4、6または9に記載の方法。

(項目36) 前記I I型-S制限エンドヌクレアーゼが、F o k Iである、項目35に記載の方法。

(項目37) ベクターにクローニングするための一本鎖核酸を調製するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 制限エンドヌクレアーゼで切断された一本鎖核酸配列を、部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドの一本鎖領域は、切断の後に残る領域において該核酸と機能的に相補的であり、該オリゴヌクレオチドの該二本鎖領域は、発現のために切断後に残る配列を適切かつ本来のリーディングフレームに戻すのに必要とされる任意の配列を含み、そしてこれらの配列の制限エンドヌクレアーゼ認識部位5'を含む、工程；および

(i i) 該部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの該二本鎖領域内に含まれる該制限エンドヌクレアーゼ認識部位で、単独で該部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド配列を切断する工程、

を包含する、方法。

(項目38) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記一本鎖部分の長さが、2塩基と15塩基との間である、項目37に記載の方法。

(項目39) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記一本鎖部分の長さが、7塩基と10塩基との間である、項目38に記載の方法。

(項目40) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記二本鎖部分の長さが、12塩基対と100塩基対との間である、項目37に記載の方法。

(項目41) 前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの前記二本鎖部分の長さが、20塩基対と100塩基対との間である、項目40に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、V H配列に特異的なプライマーを用いることなくV H遺伝子を増幅するために用いられ得る種々の方法の模式図である。

【図2】図2は、V L配列を用いることなくV L遺伝子を増幅するために用いられ得る種々の方法の模式図である。

【図3】図3は、実施例2からの切断されたκ DNAのゲル分析を示す。

【図4】図4は、実施例2からの切断されたκ DNAのゲル分析を示す。

【図5】図5は、実施例2からの増幅されたκ DNAのゲル分析を示す。

【図6】図6は、実施例2からの、ゲル精製された増幅されたκ DNAを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

(用語)

この出願では、以下の用語および略号を用いる：

センス鎖：通常記載されるように、d s DNAの上の鎖(u p p e r s t r a n d)。センス鎖では、5'-A T G-3'はM e tをコードする。

【0019】

アンチセンス鎖：通常記載されるように、d s DNAの下鎖(l o w e r s t r a n d)。アンチセンス鎖では、3'-T A C-5'は、センス鎖におけるM e tコドンに対応する。

【0020】

正方向(f o r w a r d)プライマー：「正方向」プライマーは、センス鎖の一部に対して相補的であり、そして新たなアンチセンス鎖分子の合成を開始する。「正方向プライマー」および「下の鎖のプライマー」は等価である。

【0021】

逆方向 (backward) プライマー：「逆方向」プライマーは、アンチセンス鎖の一部に対して相補的であり、そして新たなセンス鎖分子の合成を開始する。「逆方向プライマー」および「上の鎖のプライマー」は等価である。

【0022】

塩基：塩基は、コドンおよび塩基による遺伝子内のそれらの位置として、ベクターまたは遺伝子のいずれかにおけるそれらの位置によって特定される。例えば、「89. 1」は、コドン89の最初の塩基であり、89. 2は、コドン89の二番目の塩基である。

【0023】

Sv：ストレプトアビジン。

【0024】

Ap：アンピシリン。

【0025】

ap^R：アンピシリン耐性を付与する遺伝子。

【0026】

RE：制限エンドヌクレアーゼ。

【0027】

URE：一般的な制限エンドヌクレアーゼ。

【0028】

機能的に相補的：2つの配列が、選択された条件下でアニールするように十分に相補的である。

【0029】

RE RS：制限エンドヌクレアーゼ認識部位。

【0030】

AA：アミノ酸。

【0031】

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応。

【0032】

GLG：生殖系列遺伝子。

【0033】

Ab：抗体：免疫グロブリン。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインに相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質をカバーする。この定義内の抗体のいくつかの例は、特に、免疫グロブリンアイソタイプならびに Fab、F(ab¹)₂、scfv、Fv、dAbおよびFdフラグメント。

【0034】

Fab：Abの軽鎖および重鎖の部分を含む二鎖分子。

【0035】

scFv：VH：：リンカー：：VLまたはVL：：リンカーVHのいずれかを含む単鎖Ab。

【0036】

w. t.：野生型。

【0037】

HC：重鎖。

【0038】

LC：軽鎖。

【0039】

VK：κ軽鎖の可変領域。

【0040】

VH：重鎖の可変領域。

10

20

30

40

50

【0041】

VL: λ 軽鎖の可変領域。

【0042】

本願において、参照される全ての参考文献は、参考として詳細に援用される。

【0043】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明の方法において有用である核酸配列（すなわち、本発明の遺伝子パッケージに関して示される、少なくとも一部の個々のペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質）は、天然に存在する配列、合成配列またはその組み合わせであり得る。これらは、mRNA、DNAまたはcDNAであり得る。好ましい実施形態において、核酸は抗体をコードする。最も好ましくは、これらはFabをコードする。

10

【0044】

本発明において有用な核酸は、天然に多様性であり、合成多様性は、これらの天然に多様性のメンバーに導入され得るか、またはこの多様性は、全体的に合成であり得る。例えば、合成多様性は、抗体遺伝子の1つ以上のCDRに導入される。

【0045】

合成多様性は、例えば、TRIM技術（米国特許第5,869,644号）の使用を介して作製され得る。TRIM技術は、変化される位置で、どのアミノ酸型が可能で、そしてどんな割合でかを正確に制御することが可能である。TRIM技術において、多様化されるコドンは、三ヌクレオチドの混合物を使用して合成される。これは、任意の組のアミノ酸型が、任意の位置に含まれるのを可能にする。

20

【0046】

多様化されたDNAを作製するために使用され得る別の代替法は、混合オリゴヌクレオチド合成である。TRIM技術を用いて、AlaおよびTrpが可能であり得る。混合オリゴヌクレオチド合成を用いて、AlaおよびTrpを含む混合物はまた、SerおよびGlyもまた必然的に含む。変性された位置において可能なアミノ酸型は、抗体の構造、または他のペプチド、ファミリーのポリペプチドまたはタンパク質、生殖系列遺伝子において観察された多様性、頻繁に観察される観察された体細胞変異、および変性の所望の領域および型を参照して選択される。

30

【0047】

本発明の好ましい実施形態において、ファミリーのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の少なくとも1つのCDRまたは他の領域の核酸配列は、mRNAからの逆転写によって生成されたcDNAである。より好ましくは、mRNAは、関連遺伝子の天然に多様性の組のメンバーを発現する末梢血液細胞、骨髄細胞、脾臓細胞またはリンパ節細胞（例えば、Bリンパ球細胞またはプラズマ細胞）から得られ得る。より好ましくは、mRNAは、抗体の多様なファミリーをコードする。最も好ましくは、mRNAは、少なくとも1つの自己免疫障害または癌に罹患する患者から得られる。好ましくは、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、慢性関節リウマチ、抗リン脂質症候群および脈管炎）の高い多様性を含むmRNAが使用される。

40

【0048】

本発明の好ましい実施形態において、cDNAは、逆転写を使用してmRNAから生成される。この好ましい実施形態において、mRNAは、細胞から分離され、標準的な方法を使用して分解され、その結果、全長（すなわち、キャップされた）mRNAのみが残る。次いで、キャップは除去され、そしてcDNAを生成するために逆転写が使用される。

50

【0049】

第1（アンチセンス）鎖の逆転写は、任意の適切なプライマーを用いて任意の様式で行なわれ得る。例えば、H J de Haardら、Journal of Biological Chemistry, 274（26）：18218-30（1999）を参照のこと。mRNAが抗体をコードする本発明の好ましい実施形態において、抗体遺伝子の定常領域に相補的なプライマーが使用され得る。これらのプライマーは有用である。なぜなら、これらは、抗体のサブクラスに対して偏りを生じないためである。別の実施例において、ポリdTプライマーが使用され得る（そして重鎖遺伝子に対して好ましくあり得る）。あるいは、プライマーに相補的な配列は、アンチセンス鎖の末端に付加され得る。

10

【0050】

本発明の1つの好ましい実施形態において、逆転写プライマーは、ビオチン化プライマーであり得、従って、cDNA産物がストレプトアビジン（Sv）ビーズに固定されるのを可能にする。固定化はまた、a）遊離アミノ基、b）チオール、c）カルボン酸、またはd）不溶性媒体の既知のパートナーに対して強力な結合を形成するように反応し得るDNAにおいて見出されない別の基、のうちの1つを用いて5'末端において標識されたプライマーを使用して行なわれ得る。例えば、遊離アミン（好ましくは、主にアミン）が、DNAプライマーの5'末端において提供される場合、このアミンは、標準的なアミド形成化学を使用して、ポリマービーズ上のカルボン酸と反応され得る。このような好ましい固定が、逆転写の間に使用される場合、上方鎖RNAは、固定の前または後に、周知の酵素（例えば、RNase HおよびRNase Aの組み合わせ）を使用して分解される。

20

【0051】

本発明において有用な核酸配列は、一般に、これらがコードするペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を表示するために使用される前に増幅される。増幅の前に、一本鎖DNAは、前に記載された方法のいずれかを使用して切断され得る。あるいは、一本鎖DNAは増幅され得、次いで、これらの方法のうちの1つを使用して切断される。

【0052】

核酸配列を増幅するための周知の方法のいずれかが、このような増幅のために使用され得る。多様性を最大化し、偏らせない方法が好ましい。核酸配列が、抗体遺伝子に由来する本発明の好ましい実施形態において、本発明は、好ましくは、重鎖および軽鎖遺伝子の定常領域中のプライマーならびにセンス鎖の5'末端に付加された合成配列に対するプライマーを利用する。このような合成配列におけるプライミングは、抗体遺伝子の可変領域内の配列の使用を回避する。これらの可変領域プライミング部位は、まれなサブクラスのいずれかであるか、またはプライミング部位において変異されたV遺伝子に対する偏りを生じる。この偏りは、プライマー領域内の多様性の抑制に部分的に起因し、そして多数の変異がプライマーに相補的な領域中に存在する場合のプライミングの欠如に部分的に起因する。本発明において開示された方法は、特定のV遺伝子型についての増幅された抗体遺伝子の集団を偏らせない利点を有する。

30

40

【0053】

合成配列は、DNA配列を共に連結させるために周知の種々の方法によってDNA鎖の5'末端に付加され得る。RTキャップ伸長Cap Extensionは、1つの好ましい方法である。

【0054】

RTキャップ伸長（Smart RCR^(TM)に由来する）において、短い重複（上方鎖プライマー（USP-GGG）における5'-...GGG-3'は、下方鎖における3'-CCC...5'を補完する）および逆転写酵素を

50

使用して、上方鎖プライマーの逆相補体が、下方鎖に付加される。

【0055】

本発明の好ましい実施形態において、上方鎖および下方鎖プライマーはまた、a) 遊離アミノ基、b) チオール、c) カルボン酸、またはd) 不溶性媒体の既知のパートナーに対して強力な結合を形成するように反応し得るDNAにおいて見出されない別の基、のうちの1つを用いて、5'末端においてビオチン化または標識され得る。次いで、これらは、増幅後の標識された鎖を固定するために使用され得る。固定されたDNAは、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。

【0056】

図1は、VH遺伝子の増幅の概略図を示す。図1、パネルAは、第1の下方鎖の3'UTRプライミング合成のポリdT領域に特異的なプライマーを示す。定常領域において結合するプライマーもまた、適切である。パネルBは、mRNAに相補的でない3つのCによって、その3'末端において伸長した下方鎖を示す。パネルCは、3'末端のCCCにハイブリダイズする3つのGGGにおける合成上方鎖プライマーのアニーリング、および合成プライマー配列の逆相補体による下方鎖を伸長する逆転写の伸長の結果を示す。パネルDは、パネルCの合成プライマーの5'末端を複製する5'ビオチン化合成上方鎖プライマーおよび定常ドメインの部分に相補的な下方鎖プライマーを使用するPCR増幅の結果を示す。パネルEは、5'ビオチン化上方鎖プライマーを使用することによって得られた固定二本鎖(ds)cDNAを示す。

【0057】

図2は、VL遺伝子の増幅のための同様の概略図を示す。図2、パネルAは、第1の下方鎖の3'末端プライミング合成の領域またはその近くの定常領域に特異的なプライマーを示す。ポリdT領域において結合するプライマーはまた、適切である。パネルBは、mRNAに相補的でない3つのCによって、その3'末端において伸長した下方鎖を示す。パネルCは、3'末端のCCCにハイブリダイズする3つのGGGにおける合成上方鎖プライマーのアニーリング、および合成プライマー配列の逆相補体による下方鎖を伸長する逆転写の伸長の結果を示す。パネルDは、パネルCの合成プライマーの5'末端を複製する5'ビオチン化合成上方鎖プライマーおよび定常ドメインの部分に相補的な下方鎖プライマーを使用するPCR増幅の結果を示す。下方鎖プライマーはまた、有用な制限エンドヌクレアーゼ部位(例えば、AscI)を含む。パネルEは、5'ビオチン化上方鎖プライマーを使用することによって得られた固定ds cDNAを示す。

【0058】

図1および2において、各V遺伝子は、5'非翻訳領域(UTR)および分泌シグナル(これには可変領域が続く、これには定常領域が続く、これには3'非翻訳領域(これは、代表的にはポリAで終わる)が続く)からなる。逆転写のための最初のプライマーは、定常領域または3'UTRのポリAセグメントに対して相補的であり得る。ヒト重鎖遺伝子については、15Tプライマーが好ましい。逆転写酵素は、新しく合成されたDNAの3'末端にいくつかのC残基を付加する。RTキャップ伸長は、この特徴を利用する。逆転写反応は、第1に、下方鎖プライマーのみと作動される。約1時間後、プライマーは、GGG(USP-GGG)で終了し、そして多くのRTaseが添加される。これは、下方鎖cDNAが、USP-GGGの逆相補体によって最終GGGまで伸長されることを引き起こす。付加された合成配列の部分に同一な1つのプライマーおよびセンス鎖の3'末端における既知の配列の領域に相補的な第2のプライマーを使用して、全てのV遺伝子は、それらのV遺伝子サブクラスに関わらず、増幅される。

【0059】

増幅後、本発明のDNAは、一本鎖とされる。例えば、この鎖は、ビオチン化プライマーを使用すること、ストレプトアビジン樹脂上のビオチン化産物を捕獲

することによって、DNAを変成することによって、および相補的な鎖を洗い流すことによって、分離され得る。捕獲されたDNAのどの末端が望まれているかに依存して、上方（センス）鎖または下方（アンチセンス）鎖のいずれかを固定することを選択する。

【0060】

これらのDNAによって（少なくとも部分的に）コードされるポリペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の表示を行なうために、遺伝子パッケージへのクローニングのための一本鎖増幅DNAを調製し、クローニングおよび発現のために適切な末端を提供するように操作されなければならない。詳細には、任意の5'非翻訳領域および最小のシグナル配列が除去され、そしてインフレームで、表示宿主において機能する適切なシグナル配列によって置換され得る。さらに、可変ドメイン（抗体遺伝子における）の部分は、除去され、そして合成多様性を含む合成セグメントによって置換される。他の遺伝子ファミリーの多様性は、同様に、合成多様性を用いて拡大され得る。

10

【0061】

本発明の方法に従って、クローニングのための一本鎖増幅DNAを操作するための2つの方法が存在する。第1の方法は、以下の工程：

(i) 核酸と一本鎖オリゴヌクレオチドとを接触させる工程であって、オリゴヌクレオチドが、切断が望ましい領域における核酸に機能的に相補的であり、そして制限が核酸の切断を所望の位置で生じる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を形成する核酸中にその相補体を有する配列を含む、工程；および

20

(ii) 核酸およびオリゴヌクレオチドの補完によって形成された認識部位のみで核酸を切断する工程；

を包含し、接触および切断工程は、実質的に一本鎖形態で核酸を維持するのに十分な温度で行なわれ、オリゴヌクレオチドは、切断が選択された温度および所望の位置で生じ得るように、2つの鎖が会合するのを可能にするのに十分に大きい領域にわたって核酸と機能的に相補的であり、そして切断は、選択された温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを使用して行なわれる。

【0062】

この第1の方法において、短いオリゴヌクレオチドを、1本鎖DNAにアニールさせ、現在の局所的なDNAの2本鎖領域内に形成される制限エンドヌクレアーゼ認識部位を切断し得る。特に、1本鎖DNAの実質的な画分の同じ位置に生じる認識部位は同一である。

30

【0063】

抗体遺伝子に関して、これは、生殖系列（germline）配列のカタログを用いてなされ得る。例えば、「<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>」を参照のこと。アップデートは、表題「Amino acid and nucleotide sequence alignments」の下でこのサイトから獲得され得る。他のファミリーに関して、類似の比較が存在し、そして切断のための適切な領域を選択するために、および多様性を維持するために用いられ得る。

40

【0064】

例えば、表195は、51の公知のヒトVH生殖系列遺伝子のFR3領域のDNA配列を示す。この領域において、この遺伝子は、表200に示される制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む。同じ部位で生殖系列遺伝子の大部分を切断する制限エンドヌクレアーゼは、種々の部位で切断するエンドヌクレアーゼ以上に好ましい。さらに、1本鎖DNA上で短いオリゴヌクレオチドが結合する領域（例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識部位のいずれかの側面の約10塩基）内に制限エンドヌクレアーゼのための1つのみの部位が存在することが好ましい。

50

【0065】

FR3における下流を切断する酵素もまた、より好ましい。なぜならば、それは、フレームワークにおける少数の変異を捕捉するからである。このことは、いくつかの場合、有利であり得る。しかし、フレームワークの変異が存在し、そして抗体結合を付与しそして増強することが周知である。本発明は、適切な制限部位の選択により、FR3の多様性の全てまたは一部を捕捉することを可能とする。従って、この方法はまた、広範囲の多様性を捕捉することを可能とする。

【0066】

最後に、本発明の方法において、約45℃と約75℃との間で活性な制限エンドヌクレアーゼが用いられる。好ましくは、50℃以上で活性な酵素、より好ましくは、約55℃で活性な酵素が用いられる。このような温度は、核酸配列が、実質的に1本鎖形態で切断されることを維持する。

【0067】

表200に示される、単一の位置で重鎖FR3生殖系列遺伝子の多くを切断する酵素として、以下が挙げられる：MaeIII(24@4)、Tsp45I(21@4)、HphI(44@5)、BsaJI(23@65)、AluI(23@47)、BlpI(21@48)、DdeI(29@58)、BglII(10@61)、MslI(44@72)、BsiEI(23@74)、EaeI(23@74)、EagI(23@74)、HaeIII(25@75)、Bst4CI(51@86)、HpyCH4III(51@86)、HinfI(38@2)、MlyI(18@2)、PleI(18@2)、MnlI(31@67)、HpyCH4V(21@44)、BsmAI(16@11)、BpmI(19@12)、XmnI(12@30)、およびSacI(11@51)(使用される表記は、例えば、BsmAIが、FR3の塩基11で開始する制限エンドヌクレアーゼ認識部位で16のFR3生殖系列遺伝子を切断することを意味する)。

【0068】

FR3におけるヒト重鎖の切断について、好ましい制限エンドヌクレアーゼは、以下のようなものである：Bst4CI(またはTaaIもしくはHpyCH4III)、BlpI、HpyCH4V、およびMslI。ACNGT(Bst4CI、TaaI、およびHpyCH4IIIのための制限エンドヌクレアーゼ認識部位)は、全てのヒトFR3生殖系列遺伝子において一致する部位に見出されるため、これらの酵素の1つは、重鎖CDR3の多様性の捕捉のために最も好ましい。BlpIおよびHpyCH4Vは相補的である。BlpIは、VH1およびVH4ファミリーのほとんどのメンバーを切断し、HpyCH4Vは、VH3、VH5、VH6、およびVH7のファミリーのほとんどのメンバーを切断する。両方の酵素ともVH2を切断しないが、これは非常に小さいファミリーであり、3つのメンバーを含むのみである。従って、これらの酵素はまた、本発明の方法の好ましい実施形態において用いられ得る。

【0069】

制限エンドヌクレアーゼHpyCH4III、Bst4CI、およびTaaIは全て、5'-ACnGT-3'を認識し、そしてnの後の上方のストランドDNAおよびnに相補的な塩基の前の下方ストランドDNAを切断する。これは、ヒト重鎖上でのこの方法のために最も好ましい制限エンドヌクレアーゼ認識部位である。なぜならば、それは、全ての生殖系列遺伝子において見出されるからである。さらに、制限エンドヌクレアーゼ認識領域(ACnGT)は、表206に示されるような、チロシンコドン(tay)およびそれに続くシステインコドン(tgy)の第2および第3の塩基に適合する。これらのコドン(特に、成熟抗体遺伝子におけるシステイン)は、高度に保存されている。

【0070】

表250Eは、長さ22塩基（長さ20の最後の1つを除く）の別個のオリゴヌクレオチドを示す。表255Cは、1617の実際の重鎖抗体遺伝子の分析を示す。これらの中で、1511つはこの部位を有し、そして4つの不適合内で候補オリゴヌクレオチドの1つに適合する。8つのオリゴヌクレオチドが、ほとんどの適合の原因であり、表250F. 1. に示す。8つのオリゴヌクレオチドは非常に類似しており、その結果、満足のいく切断が、温度、pH、塩分などを調整することにより、1つのみのオリゴヌクレオチド（例えば、H43. 77. 97. 1-02#1）を用いて達成されるようである。1つまたは2つのオリゴヌクレオチドは、生殖系列遺伝子配列がごくわずかしかならない場合であっても、そして特に切断される制限エンドヌクレアーゼ認識領域付近でごくわずかしかならない場合、同様に満足し得る。表255Dは、8つの選択されたオリゴヌクレオチドのみを用いた、1617の実際の重鎖抗体遺伝子の反復分析を示す。これは、1463つの配列が、4つの不適合内で少なくとも1つのオリゴヌクレオチドで適合すること、および期待するような部位を有することを示す。7つの配列のみが、この領域内に第2のHpyCH4III制限エンドヌクレアーゼ認識領域を有する。

【0071】

適切な制限エンドヌクレアーゼ認識部位を選択する別の説明は、ヒト重鎖のFR1における切断に関する。FR1における切断は、重鎖のCDRの多様性全体の捕捉を可能にする。

【0072】

ヒト重鎖FR1についての生殖系列遺伝子を表217に示す。表220は、ヒト生殖系列遺伝子FR1において見出される制限エンドヌクレアーゼ認識部位を示す。好まし部位は、BsgI (GTGCAG; 39@4)、BsoFI (Gcngc; 43@6, 11@9, 2@3, 1@12)、TseI (Gcwg c; 43@6, 11@9, 2@3, 1@12)、MspAII (CMGckg; 46@7, 2@1)、PvuII (CAGctg; 46@7, 2@1)、AluI (AGct; 48@82@2)、DdeI (Ctnag; 22@52, 9@48)、HphI (tcacc; 22@80)、BssKI (Nccngg; 35@39, 2@40)、BsaJI (Ccnngg; 32@40, 2@41)、BstNI (CCwg g; 33@40)、ScriFI (CCngg; 35@40, 2@41)、EcoO109I (RGgnc cy; 22@46, 11@43)、Sau96I (Ggnc c; 23@47, 11@44)、AvaII (Ggwcc; 23@47, 4@44)、PpuMI (RGgwcc y; 22@46, 4@43)、BsmFI (gtccc; 20@48)、HinfI (Gantc; 34@16, 21@56, 21@77)、TfiI (21@77)、MlyI (GAGTC; 34@16)、MlyI (gactc; 21@56)、およびAlwNI (CAGnnnc t g; 22@68)である。より好ましい部位は、MspAIおよびPvuIIである。MspAIおよびPvuIIは、7~12での46つの部位および1~6での2つの部位を有する。両方の部位での切断を回避するために、1~6での部位を完全に覆わないオリゴヌクレオチドが用いられる。従って、DNAは、その部位で切断されない。本発明者らは、PvuII部位を超えて3、4、または5塩基延びるDNAが効果的に切断され得ることを示した。

【0073】

適切な制限エンドヌクレアーゼ認識部位を選択する別の説明は、ヒトκ軽鎖のFR1における切断に関する。表300は、ヒトκFR1生殖系列を示し、そして表302は、一致する部位で実質的に多くのヒトκFR1生殖系列遺伝子において見出される制限エンドヌクレアーゼ認識部位を示す。列挙される制限エンドヌクレアーゼ認識部位の中で、BsmAIおよびPflFIが最も好ましい酵素である。BsmAI部位は、40の生殖系列遺伝子の中の35において塩基18

10

20

30

40

50

にて見出される。P f l F I 部位は、40の生殖系列遺伝子の中の35において塩基12にて見出される。

【0074】

適切な制限エンドヌクレアーゼ認識部位を選択する別の例は、ヒトλ軽鎖のFR1における切断に関する。表400は、31の公知のヒトλFR1生殖系列遺伝子配列を示す。表405は、ヒトλFR1生殖系列遺伝子において見出される制限エンドヌクレアーゼ認識部位を示す。H i n f I および D d e I が、FR1におけるヒトλ鎖を切断するための最も好ましい制限エンドヌクレアーゼである。

【0075】

10

切断のための1つかまたは複数の適切な部位が選択された後に、1つ以上の短いオリゴヌクレオチドが、1つかまたは組み合わせて、選択された認識部位を機能的に補うために調製される。このオリゴヌクレオチドはまた、増幅された遺伝子の大部分において認識部位に隣接する配列を含む。この隣接配列は、この配列が、選択された部位に特異的な制限エンドヌクレアーゼにより切断されるのに十分に、1本鎖DNAにアニールすることを可能にする。

【0076】

このオリゴヌクレオチドの実際の長さおよび配列は、認識部位ならびに接触および切断のために用いられる状態に依存する。この長さは、オリゴヌクレオチドが、2つのストランドが結合し、その結果、選択された温度および所望の位置のみでの切断が生じるのに十分大きな領域にわたって、1本鎖DNAに機能的に相補性であるために十分でなければならない。

20

【0077】

代表的に、本発明の好ましい方法のオリゴヌクレオチドは、約17～約30ヌクレオチド長である。約17塩基未満では、アニーリングが弱すぎ、そして30塩基より上では、特異性の喪失が存在し得る。好ましい長さは、18～24塩基である。

【0078】

この長さのオリゴヌクレオチドは、生殖系列遺伝子の同一の相補体である必要はない。むしろ、生じる数個の不適合が寛容され得る。しかし、好ましくは、1～3の不適合のみが許容される。このような不適合は、1本鎖DNAに対するこのオリゴヌクレオチドのアニーリングに逆に影響しない。従って、この2つのDNAは、機能的に相補性であると呼ばれる。

30

【0079】

クローニングのために本発明の増幅した1本鎖DNAを操作するための第2の方法は、以下の工程を包含する：

(i) 核酸と部分的に2本鎖のオリゴヌクレオチドを接触される工程であって、このオリゴヌクレオチドの1本鎖領域が、切断が所望される領域においてこの核酸に機能的に相補的であり、そしてこのオリゴヌクレオチドの2本鎖領域が、I I - S型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し、それらの切断部位が、認識部位から既知の距離で配置される、工程；および

40

(i i) 核酸とオリゴヌクレオチドの1本鎖領域との補完により形成される切断部位のみでこの核酸を切断する工程。

接触工程および切断工程は、この核酸を実質的に1本鎖形態で維持するために十分な温度にて実施され、オリゴヌクレオチドは、2つのストランドが結合し、その結果、選択された温度および所望の位置で切断が生じ得るのに十分に大きな領域にわたってこの核酸に対して機能的に相補性であり、そして切断は、選択された温度で活性な制限エンドヌクレアーゼを用いて実施される。

【0080】

この第2の方法は、ユニバーサル制限エンドヌクレアーゼ（「URE」）を用

50

いる。UREは、部分的に2本鎖オリゴヌクレオチドである。1本鎖部分またはUREの重複は、1本鎖DNAにおいて切断されるためにこの配列に対して機能的に相補性であるDNAアダプターからなる。2本鎖部分は、I I-S型制限エンドヌクレアーゼ認識部位でからなる。

【0081】

本発明のURE方法は、特異的かつ正確であり、そして相補領域においていくつか（例えば、1～3）の不適合を寛容し得る（すなわち、それはその領域に対して機能的に相補性である）。さらに、UREが用いられる条件が調整され、その結果、増幅されるほとんどの遺伝子が切断され、それらの遺伝子から生成されるライブラリー中の偏りを減少させ得る。

10

【0082】

1本鎖DNAアダプターの配列またはUREの重複部分は、代表的に、約14～22塩基からなる。しかし、より長いまたはより短いアダプターが用いられ得る。大きさは、アダプターが1本鎖DNAの機能的な相補体と結合する能力、ならびにI I-S型酵素を用いてこのDNAを切断するために用いられる温度にてUREと1本鎖DNAを接触させるために用いられる温度に依存する。アダプターは、2つのストランドが結合し、その結果、選択された温度および所望の位置で切断が生じ得るのに十分に大きな領域にわたって1本鎖DNAに対して機能的に相補性でなければならない。本発明者らは、14～17塩基長、より好ましくは18～20塩基長の1本鎖部分または重複部分を好む。

20

【0083】

UREを用いて切断のために選択される部位は、好ましくは、増幅されたDNAのファミリーにおいて実質的に保存される部位である。本発明の第1の切断方法と比較する場合、これらの部位は、エンドヌクレアーゼ認識部位である必要がない。しかし、第1の方法のように、選択される部位は、ネイティブのDNAに存在するというよりも合成性であり得る。このような部位は、公知の抗体または遺伝子の他のファミリーの配列に関する参照により選択され得る。例えば、多くの生殖系列遺伝子の配列は、<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>にて報告されている。例えば、1つの好ましい部位は、FR3の末端付近（コドン89～コドン93の第2の塩基）で生じる。CDR3は、コドン95で開始する。

30

【0084】

79のヒト重鎖遺伝子の配列もまた、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entre2/nucleotide.html>にて利用可能である。このサイトは、本発明の方法に従うURE切断のための適切な配列を同定するために用いられ得る。例えば、表8Bを参照のこと。

【0085】

最も好ましくは、1つ以上の配列が、これらのサイトまたは他の利用可能な配列情報を用いて同定される。これらの配列は、共に、増幅されたDNAの実質的な画分に存在する。例えば、複数の配列が、生殖系列遺伝子における公知の多様性または頻度の高い体細胞変異を可能にするために用いられ得る。合成性の変性配列もまた、用いられ得る。好ましくは、2～3の不適合のみを有する試験された遺伝子の少なくとも65%において生じる配列が、選択される。

40

【0086】

次いで、URE1本鎖アダプターまたは重複は、選択される領域に相補性であるように作製される。UREを使用する条件は、経験的に決定される。これらの条件は、2～3の不適合のみを有する機能的に相補性の配列を含むDNAの切断を可能にするが、このような配列を欠くDNAの切断を可能にしない。

【0087】

上記のように、UREの二本鎖部分として、I I-S型エンドヌクレアーゼ認

50

識部位が挙げられる。一本鎖DNAを実質的にその形態で保持し、そして一本鎖DNAが所望される部位で切断されるのを可能にするために、UREの一本鎖DNAアダプター部分が十分な長さでアニーリングすることを可能にするのに必要な温度で活性な任意のII-S型酵素が使用され得る。

【0088】

本発明のURE方法での使用のための好ましいII-S型酵素は、一本鎖DNAの非対称的な切断を提供する。とりわけ、表800にこれらの酵素を列挙する。もっとも好ましいII-S型酵素が、FokIである。

【0089】

好ましいFokIを含むUREが使用される場合、切断を起こすためのいくつかの条件を使用することが好ましい：

1) 酵素を活性化するための標的DNA全体のUREの発現が存在するべきである。標的DNAに対して等モル量しか存在しないUREは、ssDNAの少ない切断を生じる。なぜなら、利用可能な活性な酵素の量は限られているからである。

【0090】

2) アクチベーターを使用してFokI酵素の一部を活性化し、切断を生じることなく二量体化させ得る。適切なアクチベーターの例を、表510に示す。

【0091】

3) 切断の制限は、45℃～75℃の間の温度、好ましくは50℃より高い温度、そして最も好ましくは55℃より高い温度で実施される。

【0092】

先行技術で使用されているUREは、14の塩基の一本鎖セグメント、10の塩基のステム（FokI部位を含む）、それに続く10塩基のステムのパリンドロームを含んだ。このようなUREを本発明の本方法で使用し得るが、本発明の好ましいUREはまた、セグメントを含むFokI制限エンドヌクレアーゼ認識部位の間の3～8塩基（1つのループ）のセグメントも含む。好ましい実施形態において、ステム（FokI部位を含む）およびそのパリンドロームはまた、10塩基よりも長い。好ましくは、これらは、10～14塩基長である。これらの「ロリポップ（lollipop）」UREアダプターの例を表5に示す。

【0093】

UREを使用して、一本鎖DNAを切断する1つの例としては、ヒト重鎖のFR3領域が挙げられる。表508は、示されるURE認識配列を有する840の全長成熟ヒト重鎖の分析を示す。大部分（718/840=0.85）は、5つのURE（VHS881-1.1、VHS881-1.2、VHS881-2.1、VHS881-4.1、およびVHS881-9.1）を使用して、2以下のミスマッチを認識される。これらのそれぞれは、生殖系列の遺伝子に相補的な20塩基のアダプター配列、FokI部位を含む10塩基のステムセグメント、5つの塩基ループ、および第一のステムセグメントの逆の相補体を有する。これらのアダプターを、単独でまたは組合せて一本鎖アンチセンス重鎖DNAにアニーリングし、そして例えば、アクチベーターFOKIactの存在下でFokIを用いて処理することによって、指示された位置でアンチセンス鎖の切断を生じる。

【0094】

UREを使用して一本鎖DNAを切断する別の例としては、ヒトκ軽鎖のFR1領域が挙げられる。表512は、4つの示された19塩基のプロープ配列による一致についての182の全長ヒトκ鎖の分析を示す。96%の配列は、2以下のミスマッチを有するプロープの1つと一致する。表512に示されるUREアダプターは、κ鎖のセンス鎖の切断のためである。従って、アダプター配列は、生殖系列の遺伝子配列の逆の相補体である。UREは、10塩基のステム、5塩

10

20

30

40

50

基のループ、ステムの逆の相補体およびその相補配列から構成される。ループは、ここではT T G T Tを示すが、他の配列が使用され得る。その機能は、ロリポップ単量体の形成が二量体化よりも好まれるように、ステムのパリンドロームを妨げることである。表5 1 2はまた、センス鎖が切断される場所を示している。

【0095】

U R Eを使用して一本鎖D N Aを切断する別の例としては、ヒトλ 軽鎖が挙げられる。表5 1 5は、4つの示された19塩基のプローブを一致させるための128のヒトλ 軽鎖の分析を示している。3以下のミスマッチを有し、128のうちの88（69%）の鎖がプローブの1つと一致する。表5 1 5はまた、これらのプローブに対応するU R Eアダプターを示している。これらのアダプターを、λ 鎖の上側の鎖s s D N Aにアニーリングし、そしてF O K I a c tの存在下、45℃またはそれより高い温度で、F o k Iで処理することによって、これらの鎖の特異的かつ正確な切断が生じる。

【0096】

第一の方法の短いオリゴヌクレオチド配列および第二の方法のU R Eが、一本鎖D N Aと接触する条件下で、経験的に決定され得る。この条件は、一本鎖D N Aが、実質的に一本鎖の形態で保持されるようでなければならない。より詳細には、これらの条件は、一本鎖D N Aが、ループを形成しないような条件でなければならない。このループは、それが関係するオリゴヌクレオチド配列もしくはU R Eを妨害し得るか、または選択的制限エンドヌクレアーゼによってループ自身が切断の部位を提供し得る。

【0097】

短いオリゴヌクレオチド（第一の方法）およびU R E（第二の方法）の効率および特異性は、U R Eアダプター／オリゴヌクレオチドならびに基質D N Aの濃度、温度、p H、金属イオン濃度、イオン強度、カオトロープ（c h a o t r o p e）（例えば、尿素およびホルムアミド）の濃度、制限エンドヌクレアーゼ（例えば、F o k I）の濃度、および消化の時間を制御することによって調整され得る。これらの条件は、以下を有する合成オリゴヌクレオチドを用いて最適化され得る：1）標的生殖系列遺伝子配列、2）成熟標的遺伝子配列、または3）幾分関連する非標的配列。目標は、標的配列のほとんどを切断しかつ非標的の最小量を切断することである。

【0098】

本発明の好ましい実施形態において、一本鎖D N Aは、45℃～75℃の間の温度を使用して、実質的に一本鎖D N Aの形態で維持される。より好ましくは、50℃～60℃の間であり、最も好ましくは55℃～60℃の間の温度が使用される。これらの温度は、D N AがオリゴヌクレオチドまたはU R Eと接触する場合、および本発明の方法を使用してD N Aを切断する場合の両方で使用される。

【0099】

本発明の2つの切断方法は、いくつかの利点を有する。第一の方法は、一本鎖D N Aのファミリーの個々のメンバーを、1つの実質的に保存されたエンドヌクレアーゼ認識部位で単独に切断することを可能にする。この方法はまた、逆転写または増幅プライマーに構築されるエンドヌクレアーゼ認識部位を必要としない。ファミリー中の任意のネイティブな部位または合成部位が使用され得る。

【0100】

第二の方法は、これらの利点の両方を有する。さらに、U R Eの方法は、一本鎖D N Aが、天然に存在するか、または合成で構築されたエンドヌクレアーゼ認識部位を有さない位置で切断されることを可能にする。

【0101】

最も重要なことは、両方の切断方法が、多様性を最大にするように5'および3'プライマーの使用を可能にし、次いでクローニングおよびディスプレイの前

10

20

30

40

50

に所望でないか、または有害な配列を除去するような切断を可能にする。

【0102】

増幅されたDNAを、本発明の方法の1つを使用して切断した後、このDNAはクローニングのために調製される。これは、部分的に二重鎖の合成DNAアダプター（この末端配列は、特定の切断部位に基づいており、増幅されたDNAは、この部位で切断される）を使用することによってなされる。

【0103】

合成DNAは、切断された一本鎖DNAに連結される場合、DNAが、所望のペプチド、ポリペプチドまたは遺伝子パッケージの表面タンパク質をディスプレイするように正確なリーディングフレームに発現されることを可能にするように設計される。好ましくは、アダプターの二本鎖部分は、ペプチド、ポリペプチドまたは切断部位までのタンパク質のファミリーのアミノ酸配列の特徴をコードするいくつかのコドン配列を含む。ヒト重鎖について、好ましくは、3〜23のフレームワークのアミノ酸を使用して、切断されたDNAの発現に必要な配列を提供する。

10

【0104】

好ましくは、アダプターの二本鎖部分は、約12〜100塩基長である。より好ましくは、約20〜100塩基が使用される。アダプターの二本鎖領域はまた、好ましくは、DNAを適切なディスプレイベクター（または多様性を保存するために使用されるレシピエントベクター）にクローニングするために有用な少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識部位を含む。このエンドヌクレアーゼ制限部位は、DNA配列を伸長するために使用される生殖系列遺伝子配列に対してネイティブであり得る。これはまた、ネイティブな生殖系列遺伝子配列に対して縮重した配列を使用して構築され得る。または、これは全合成であり得る。

20

【0105】

アダプターの一本鎖部分は、一本鎖DNAにおける切断領域に相補的である。このオーバーラップは、約2塩基〜約15塩基までであり得る。オーバーラップがより長くなるにつれて、連結がより効率的になるようである。オーバーラップについて好ましい長さは、7〜10である。これは、領域における多様性が捕捉され得るようにこの領域のいくつかのミスマッチを可能にする。

30

【0106】

一本鎖領域または部分的二重鎖のアダプターのオーバーラップが有利である。なぜなら、これは、DNAが選択された部位で切断されることを可能にするが、捕捉される他のフラグメントは切断されないからである。このようなフラグメントは、適切な抗体に折り畳まれず、そして非特異的粘着性であるらしい遺伝子コード配列を有するライブラリーを汚染する。

【0107】

本発明の方法における部分的二重鎖のアダプターの使用の1つの例示としては、このようなアダプターを上記のように、5'-ACnGT-3'において、HpyCH4III、Bst4CIまたはTaaIを使用して切断されるヒトFR3領域に連結する工程を包含する。

40

【0108】

表250F. 2は、切断された下側の鎖であるDNAに連結するためにアダプターの二本鎖部分の下側の鎖を示している。HpyCH4III部位は、右（表206に示されるような）に対して非常に遠いので、AflIII部位およびXbaI部位を含む配列が、付加され得る。部分的に二重鎖のアダプターのこの下側の鎖部分（H43. XAExt）は、XbaIおよびAflIII部位の両方を組込む。アダプターの二重鎖部分の上側の鎖は、いずれの部位も有さない（H43. XAExtのXbaIおよびAflIII部位に逆のセグメントにおける計画されたミスマッチのため）が、H43. XAExtに非常に強固アニーリングする

50

。H 4 3 A E x t は、A f l I I 部位のみを含み、そして上側鎖H 4 3 . A B r 1 およびH 4 3 . A B r 2 (これは、A f l I I 部位を破壊するために意図的な変更を有する)とともに使用される。

【0109】

連結後に、所望の捕獲されたDNAは、さらにPCR増幅され得、所望である場合、好ましい実施形態において、抗体遺伝子の下流の定常領域に対するプライマー、およびアダプターの二本鎖領域の部分に対するプライマーを使用する。これらのプライマーはまた、増幅されたDNAのクローニングに使用するための制限エンドヌクレアーゼ部位を保有する。

【0110】

部分的な二本鎖アダプターの一本鎖増幅DNAへの連結、およびおそらく増幅の後、複合体DNAは、選択された5'側および3'側エンドヌクレアーゼ認識部位で切断される。

【0111】

クローニングに有用な切断部位は、カセットが挿入されるファージまたはファージミドおよび抗体遺伝子におけるその利用可能な部位に依存する。表1は、75のヒト軽鎖についての制限エンドヌクレアーゼのデータを提供する。表2は、79のヒト重鎖についての対応するデータを示す。各表において、エンドヌクレアーゼは、切断の頻度が増す順番で並べられている。これらの表において、N c h は、酵素によって切断される鎖の数であり、N s は、部位の数(いくつかの鎖は1より多い部位を有する)である。

【0112】

この分析から、S f i I、N o t I、A f l I I、A p a L I およびA s c I が非常に適切である。S f i I およびN o t I は、好ましくは、重鎖ディスプレイセグメントを挿入するためのp C E S 1 において使用される。A p a L I およびA s c I は、好ましくは、軽鎖ディスプレイセグメントを挿入するためにp C E S 1 において使用される。

【0113】

B s t E I I 部位は、生殖系列J H 遺伝子の97%に生じる。再配列されたV 遺伝子において、重鎖遺伝子の54/79(68%)のみが、B s t E I I 部位を含み、そしてこれらの7/61が、2つの部位を含む。従って、47/79(59%)が、1つのB s t E I I 部位を含む。B s t E I I を使用することの代替策は、J H 末端でのU R E を介する切断、およびC H 1 の部分をコードする合成オリゴヌクレオチドへの連結である。

【0114】

本発明の方法を使用するDNA配列のファミリーを調製する1つの例として、ヒトCDR3多様性を捕捉することが挙げられる。上記のように、種々の自己免疫の患者からのmRNAは、cDNAへ逆転写される。mRNAが分解された後、cDNAを固定化し、そして短いオリゴヌクレオチドを使用してcDNA上流のCDR3を切断する。次いで、部分的に二重鎖の合成DNAアダプターは、DNAにアニーリングされ、そしてこのDNAは、アダプターに対するプライマーおよび定常領域(FR4の後)に対するプライマーを使用して増幅される。次いで、DNAはB s t E I I (FR4中)および部分的二本鎖アダプター(例えば、X b a I およびA f l I I (FR3中))に適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して切断される。次いで、DNAは合成VH骨格(例えば、3~23)に連結される。

【0115】

U R E 方法を使用して切断された一本鎖DNAを調製する1つの例として、ヒトκ鎖が挙げられる。この鎖のセンス鎖の切断部位は、表512に示される。オリゴヌクレオチドk a p e x t U R E は、オリゴヌクレオチド(k a B R 0 1 U

10

20

30

40

50

R、k a B R 0 2 U R、k a B R 0 3 U R、およびk a B R 0 4 U R) にアニーリングされて部分的二重鎖DNAを形成する。次いで、このDNAは、切断された可溶性のκ鎖に連結される。次いで、連結産物は、プライマーk a p e x t U R E P C RおよびC K F o r e A s c (これは、Cκ末端後のA s c I部位に挿入する) を使用して増幅される。次いで、この産物は、A p a L IおよびA s c Iを用いて切断され、そして同様にレシピエントベクターを切断するために連結される。

【0116】

別の例としては、表515に示される切断が挙げられる。切断後、エクステンダー (e x t e n d e r) (O N _ L a m E x 1 3 3) オリゴヌクレオチドおよび4つのブリッジ (b r i d g e) オリゴヌクレオチド (O N _ L a m B 1 - 1 3 3、O N _ L a m B 2 - 1 3 3、O N _ L a m B 3 - 1 3 3およびO N _ L a m B 4 - 1 3 3) は、アニーリングされて部分的二重鎖DNAを形成する。このDNAは、切断されたλ鎖センス鎖に連結される。連結後、DNAは、O N _ L a m 1 3 3 P C Rおよびλ定常ドメインに特異的な前進プライマー (例えば、C L 2 F o r e A s cまたはC L 7 F o r e A s c (表130)) を用いて増幅される。

10

【0117】

ヒト重鎖において、F R 4のほとんど全ての遺伝子は、ヒト重鎖V遺伝子の非常に大きな画分中の定常位置で生じるB s t E I I部位で切断され得る (下流、すなわち、C D R 3のセンス鎖の3'末端へ向かって)。次いで、C D R 3の多様性のみが捕捉される場合、F R 3中の部位が、C D R 2およびC D R 3の多様性が所望される場合、F R 2中の部位が、またはC D Rの多様性全てが所望される場合、F R 1中の部位が必要である。これらの部位は、好ましくは、部分的二重鎖のアダプターの一部として挿入される。

20

【0118】

本発明の好ましいプロセスは、軽鎖または重鎖のいずれかのクローニングを可能にする部位を有するレシピエントベクターを提供することである。このようなベクターは、周知であり、当該分野で広く使用される。本発明に従った好ましいファージ提示ベクターは、ファージM A L I A 3である。これは、遺伝子I I Iにおいて提示する。ファージM A L I A 3の配列を、表120A (注釈付) および表120B (要約) に示す。

30

【0119】

軽鎖または重鎖の選択された領域をコードするDNAを、軽鎖または重鎖のいずれかを非常に稀にしか切断しないエンドヌクレアーゼを使用してベクターに移入し得る。例えば、軽鎖は、A p a L IおよびA s c Iによって捕捉される。重鎖遺伝子は、好ましくは、S f i I、N c o I、X b a I、A f l I I、B s t E I I、A p a IおよびN o t I部位を有するレシピエントベクターにクローニングされる。軽鎖は、好ましくは、A p a L I - A s c Iフラグメントとしてライブラリー中に移される。重鎖は、好ましくは、S f i I - N o t Iフラグメントとしてライブラリーに移される。

40

【0120】

最も好ましくは、この提示は、M 1 3ファージの誘導体の表面上に有される。最も好ましいベクターは、M 1 3の全ての遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、および提示カセットを含む。好ましいベクターは、遺伝子の多様なファミリーのメンバーの導入および切除を可能にする制限部位をカセットとして提供される。好ましいベクターは、ファージを増幅させるために使用される増殖条件下での再編成に対して安定である。

【0121】

本発明の別の実施形態において、本発明の方法によって捕捉される多様性は、

50

III タンパク質上にペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を提示するファスミドベクター（例えば、pCES1）において提示され得る。このようなベクターはまた、他のベクターまたはファージを使用する引き続く提示のための多様性を保存するために使用され得る。

【0122】

別の実施形態において、提示の様式は、3つの可能性のあるアンカードメインに対する短いリンカーを介し得る。M13 III（「IIIスタンプ」）の最終部分である1つのアンカードメイン、全長III成熟タンパク質である第二のアンカー、およびM13 VII成熟タンパク質である第三のアンカー。

【0123】

IIIスタンプフラグメントは、ファージに構築するためのM13 IIIを十分に含むが、感染性の媒介に関するドメインを含まない。野生型のIIIおよびVIIタンパク質が存在することから、このファージは、抗体遺伝子を除去しないようであるが、非常に低い増殖の利点のみを受けるこれらのセグメントを欠失する。各々のアンカードメインのために、このDNAは野生型のAA配列をコードするが、非常に高い程度で野生型のDNA配列とは異なる。これは、提示アンカーと野生型遺伝子（これもまた存在する）との間の相同組換えの可能性を非常に減少させる。

【0124】

最も好ましくは、本発明は、抗生物質耐性遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子）および提示カセットを保有する完全なファージを使用する。野生型iiiおよびviii遺伝子が存在することから、野生型タンパク質もまた存在する。この提示カセットは、調節可能なプロモーター（例えば、P_{LacZ}）から転写される。調節可能なプロモーターの使用は、対応する野生型コートタンパク質に対する融合提示遺伝子の比を制御することを可能にする。この比は、ファージ（またはファスミド）粒子当たりの提示融合の平均コピー数を決定する。

【0125】

本発明の別の局面は、糸状ファージ上にペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質（および特にFab）を提示する方法である。最も好ましい実施形態において、この方法は、FABを提示し、以下を包含する：

a) 以下のエレメントをコードするDNAの断片の送達を捕捉するカセットを得る工程：

P_{reg} :: RBS1 :: SS1 :: VL :: CL :: 停止 :: RBS2 :: SS2 :: VH :: CH1 :: リンカー :: アンカー :: 停止 ::、

ここで、P_{reg}は、調節可能なプロモーターであり、PBS1は、第一のリボソーム結合部位であり、SS1は、宿主株において作動可能なシグナル配列であり、VLは、軽鎖可変領域の種々のセットのメンバーであり、CLは、軽鎖定常領域であり、停止は、1以上の停止コドンであり、PBS2は、第二のリボソーム結合部位であり、SS2は、宿主株において作動可能な第二のシグナル配列であり、VHは、重鎖可変領域の種々のセットのメンバーであり、CH1は、抗体重鎖の第一の定常領域であり、リンカーは、1～約50残基のアミノ酸の配列であり、アンカーは、糸状ファージ粒子に構築されるタンパク質であり、そして停止は、1以上の停止コドンの第二の例である；ならびに

b) ファージの生存性を最大化し、そしてこのカセットまたはその部分の欠失の可能性を最小化するためにファージゲノム内にカセットを配置する工程。

【0126】

上記の好ましいカセット中のアンカータンパク質をコードするDNAは、同じ（または密接に関連する）アミノ酸配列（ファージのコートタンパク質の1つに見出されるような）をコードするが、別個のDNA配列を有するように設計される。これは、野生型遺伝子との望まない相同組換えを防止する。さらに、このカ

10

20

30

40

50

セットは、遺伝子間領域に配置されるべきである。提示カセットの配置および方向は、ファージの挙動に影響し得る。

【0127】

本発明の1つの実施形態において、転写ターミネーターは、上記の提示カセットの第二の停止（例えば、T r p）の後に配置され得る。これは、提示カセットとファージ抗体提示ベクター（P A D V）中の他の遺伝子との間の相互作用を減少させる。

【0128】

本発明の方法の別の実施形態において、このファージまたはファージミドは、F a b以外のタンパク質を、他のタンパク質遺伝子で置換することによって、上記のF a b部分を提示し得る。

10

【0129】

種々の宿主を、本発明の提示ファージまたはファージミドの増殖のために使用し得る。このような宿主は、当該分野で周知である。好ましい実施形態において、F a bが提示される場合、好ましい宿主は30℃で増殖し、そしてR e c A⁻（望まない遺伝子組み換えを減少させるため）およびE n d A⁻（R F DNAの回収を容易化するため）であり得る。エレクトロポレーションによって容易に形質転換される宿主株もまた好ましい。

【0130】

X L 1-B l u e M R F ' は、これらの好ましさのほとんどを満足させるが、30℃ではあまり増殖しない。X L 1-B l u e M R F ' は、38℃でゆっくりと増殖し、従って、許容可能な宿主である。T G - 1 はまた、中間宿主としてより好ましいが、R e c A⁺およびE n d A⁺である。X L 1-B l u e M R F ' は、ライブラリーの最終構築の前の多様性を蓄積するために使用される中間宿主としてより好ましい。

20

【0131】

提示後、本発明のライブラリーを、周知かつ慣用的に使用される技術を使用してスクリーニングし得る。次いで、選択されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を、疾患を処置するために使用し得る。一般に、治療または薬学的組成物における使用のためのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を、選択されるライブラリーのメンバーから所望のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを単離することによって生成する。次いで、このDNAを、慣用的な方法において使用して、適切な宿主細胞、好ましくは、哺乳動物細胞（例えば、C H O細胞）においてコードされるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を生成する。単離後、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を、単独でか、または疾患を処置するための治療において薬学的に受容可能な組成物と共に使用する。

30

【実施例】

【0132】

（実施例）

40

（実施例1：B s m A Iを用いるκ鎖の捕捉）

ヒトκ鎖mRNAのレパートリーを、種々の自己免疫疾患を有する患者の集団から単離した総RNAまたはポリ（A⁺）RNAを仔ウシ腸ホスファターゼで処理して、例えば、リボソームRNA、フラグメント化mRNA、tRNAおよびゲノムDNAを有する全ての分子から5'-リン酸を除去することによって調製した。全長のmRNA（保護的7-メチルキャップ構造を含む）は、影響されない。次いで、RNAを、タバコ酸ピロホスファターゼで処理して、5'-リン酸基を残して全長のmRNAからキャップ構造を除去する。

【0133】

全長のmRNAを、5'末端でアダプターによって改変し、次いで、逆転写し

50

、そしてGenerACETM方法およびキット（Invitrogen）を使用して増幅した。アダプターに相補的な5'ビオチン化プライマー、および構築物の領域の一部に相補的な3'プライマーを使用した。

【0134】

上方の鎖の5'末端にビオチンを結合した約2マイクログラム（μg）のヒトκ鎖（Igκ）遺伝子RACE材料を、200マイクロリットル（μL）のSeradyne磁気ビーズ上に固定した。下方の鎖を、2アリコートの200μLの0.1M NaOH（pH13）で、第一のアリコートについて3分間、次いで第二のアリコートについて30秒間、DNAを洗浄することによって除去した。これらのビーズを、200μLの10mM Tris（pH7.5）100mM

10

NaClで中和した。表525に示した短いオリゴヌクレオチドを、100μLのNEB緩衝液2（50mM NaCl、10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM ジチオトレイトール pH7.9）中に40倍モル過剰に、乾燥ビーズに添加した。この混合物を、95℃で5分間インキュベートし、次いで、30分かけて55℃まで冷却した。過剰なオリゴヌクレオチドを、NEB緩衝液3（100mM NaCl、50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM ジチオトレイトール pH7.9）で2回洗浄して除去した。10単位のBsmAI（NEB）を、NEB緩衝液3に添加し、そして55℃で1時間インキュベートした。切断された下流のDNAを、収集し、そしてQiagen PCR精製カラムで精製した（図3および図4）。

20

【0135】

部分的に二本鎖のアダプターを、表525に示したオリゴヌクレオチドを使用して調製した。このアダプターを、1000単位のT4 DNAリガーゼ（NEB）と共に100倍モル過剰に一本鎖DNAに添加し、そして16℃で一晩インキュベートした。過剰なオリゴヌクレオチドを、Qiagen PCR精製カラムで除去した。この連結材料を、表525に示したプライマーkapPCRt1およびkapforを使用するPCRによって、表530に示したプログラムで10サイクル増幅した。

【0136】

可溶性PCR産物を、ゲルで泳動し、そして予測されるような約700nのバンドを示した（図5および図6）。このDNAを、酵素ApaLIおよびAscIで切断し、ゲル精製し、そして同様に切断したベクターpCES1に連結した。正確なサイズの挿入物の存在を、図15に示したように、いくつかのクローンでPCRによってチェックした。

30

【0137】

表500は、この手順によって捕捉されたκ軽鎖のDNA配列を示す。表501は、この手順によって捕捉された第二の配列を示す。最も近い架橋配列は、配列5'-agccacc-3'に相補的であったが、捕捉された配列は5'-Tgccacc-3'と読め、これは、重複領域中にいくつかのミスマッチを寛容したことを示す。

40

【0138】

（実施例2：V-3-23 VHフレームワークにおける合成CDR1およびCDR2の多様性の構築）

合成相補性決定基領域（CDR）1および2の多様性を、二段階のプロセスで3-23 VHフレームワークにおいて構築した：第一に、3-23 VHフレームワークを含むベクターを構築し、次いで、合成CDR1および2を、構築してこのベクター中にクローニングした。

【0139】

V3-23フレームワークの構築のために、重複する8つのオリゴおよび2つのPCRプライマー（表600に示した長いオリゴヌクレオチド：TOPFR1

50

A、BOTFR1B、BOTFR2、BOTFR3、F06、BOTFR4、ON-v g C1、およびON-v g C2ならびにプライマー：SFPRMTおよびBOTPCRPRIM)を、V323 VHのGenbankの配列に基づいて設計した。この設計は、表600に示されるような、各々のフレームワークにおける少なくとも1つの有用な制限部位を取り込んだ。表600において、合成された断片を太字として示し、重複する領域に下線を付し、そして各末端でのPCRプライマー領域に下線を付した。これら8つのオリゴの混合物を、20μlのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)反応中の2.5μMの最終濃度で組み合わせた。このPCR混合物は、200μM dNTP、2.5mM MgCl₂、0.02U Pfu TurboTM DNAポリメラーゼ、1U Qiagen HotStart Taq DNAポリメラーゼ、および1×Qiagen PCR緩衝液を含んだ。このPCRプログラムは、94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で30秒の10サイクルからなった。次いで、100μl PCR反応における最初のPCRからの10倍希釈の2.5μlを使用して、構築されたV3-23 DNA配列を増幅した。このPCR反応は、200μM dNTP、2.5mM MgCl₂、0.02U Pfu TurboTM DNAポリメラーゼ、1U Qiagen HotStart Taq DNAポリメラーゼ、1×Qiagen PCR緩衝液、および1μMの濃度での2つの外側のプライマー(SFPRMTおよびBOTPCRPRIM)を含んだ。このPCRプログラムは、94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で60秒の23サイクルからなった。このV3-23 VH DNA配列を、設計し、そしてSfiIおよびBstEII制限エンドヌクレアーゼ部位を使用してpCES1(ファスミドベクター)にクローニングした(本明細書中で記載した全ての制限酵素は、New England Biolabs、Beverly、MAによって供給され、そして製造業者の指示通りに使用した)。

【0140】

CDR1/CDR2多様性のクローニング前に、スタッパー(stuffer)配列(表610および表620に示す)を、pCES1に導入してCDR1/CDR2配列(BspEI制限酵素部位とXbaI制限酵素部位との間の900塩基)およびCDR3配列(AflIIとBstEIIとの間の358塩基)を置換した。新規のベクターは、pCES5であり、そしてその配列を、表620に与える。CDRの代わりにスタッパーを有することは、親配列がライブラリーにおいて過剰に提示される危険性を回避する。このCDR1-2スタッパーは、BglII、Bsu36I、BclI、XcmI、MluI、PvuII、HpaIおよびHincIIについての制限部位、ベクターpCES5内に独自である、強調された領域を含む。CDR3を置換するこのスタッパーは、独自の制限エンドヌクレアーゼ部位、RsrIIを含む。このスタッパー配列は、E.coliのペニシリン遺伝子由来のフラグメントである。

【0141】

CDR1およびCDR2多様性の構築のために、CDR1/2および隣接領域をコードする4つの重複オリゴヌクレオチド(表600および表630に示したON-v g C1、ON_Br12、ON_CD2Xba、およびON-v g C2)を設計した。これら4つのオリゴの混合物を、40μl PCR反応物中2.5μMの最終濃度で組み合わせた。4つのオリゴのうち2つは、CDR1およびCDR2に位置する、変化させた配列を含んだ。このPCR混合物は、200μM dNTP、2.5U Pwo DNAポリメラーゼ(Roche)、および2mM MgSO₄を含む1×Pwo PCR緩衝液を含んだ。このPCRプログラムは、94℃で30秒、60℃で30秒、および72℃で60秒の10サイクルからなった。これは、100μl PCR反応物中の2.5μlの混合物を使用して、増幅されたCDR1/2 DNA配列を構築した。このPCR反応物

10

20

30

40

50

は、 $200\text{ }\mu\text{M}$ dNTP、 2.5 U Pwo DNAポリメラーゼ、 2 mM MgSO_4 を含む $1\times\text{Pwo}$ PCR緩衝液、および $1\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で2つの外側のプライマーを含んだ。このPCRプログラムは、 94°C で30秒、 60°C で30秒、および 72°C で60秒の10サイクルからなった。これらの変化された配列を、消化し、そしてCDR1/2スタッファーの代わりにV3-23フレームワーク中にクローニングした。

【0142】

本発明者らは、約 7×10^7 の独立形質転換体を得た。この多様性に、本発明者らは、ドナー集団または合成DNAのいずれかからCDR3多様性をクローニングし得る。

10

【0143】

上記は、本発明の原理を例示するのみであり、そして本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者によって種々の改変がなされ得ることが理解される。

【0144】

【表 1 - 1】

表 1: 75ヒト重鎖鎖の切断

酵素	認識基	Nch	Ns	部位の計画位置
AfeI	AGCgct	0	0	
AzIII	Cttaag	0	0	HC FR3
AgeI	ACCGgt	0	0	
AsoI	GGGgggca	0	0	LC後
BglII	Agatct	0	0	
BsiWI	Cgtacg	0	0	
BspDI	ATcgat	0	0	
BssHII	Gcgcg	0	0	
BstBI	TTcgaa	0	0	
DraIII	CACNNNgtg	0	0	
EagI	Cggcgg	0	0	
FseI	GGCCGGcc	0	0	
FspI	TGCgca	0	0	
HpaI	GTTaac	0	0	
MfeI	Caattg	0	0	HC FR1
MluI	Acgctg	0	0	
NcoI	Caatgg	0	0	重鎖シグナル
NheI	Gctagc	0	0	HC/アンカー リンカー
NotI	CGCGcgca	0	0	HC後のリンカーにおける
NruI	TCGcga	0	0	
PacI	TTAATtaa	0	0	
PmeI	GTTTaaac	0	0	
PmlI	CACgtg	0	0	
PvuI	CGATcg	0	0	
SacII	CCGCGg	0	0	
SalI	Gtcgac	0	0	
SfiI	GGCCNNNNggcc	0	0	重鎖シグナル
SgfI	GCGATcg	0	0	
SnaBI	TACgta	0	0	
StuI	AGGcct	0	0	
XbaI	Tctaga	0	0	HC FR3
AatII	GACGTC	1	1	
AclI	AACgtt	1	1	
AseI	ATtaat	1	1	
BsmI	GAATGCN	1	1	
BspEI	Tccgga	1	1	HC FR1
BstXI	CCANNNNntgg	1	1	HC FR2
DrdI	GACNNNNnngtc	1	1	
HindIII	Aagctt	1	1	
PciI	Acattg	1	1	
SapI	gaagagc	1	1	
ScaI	AGTact	1	1	
SexAI	Accwgtt	1	1	
SpeI	Actagt	1	1	
TliI	Ctcgag	1	1	
XhoI	Ctcgag	1	1	
BcgI	cganmmnnntgc	2	2	
BlpI	GCTnagc	2	2	
BssSI	Ctcgtg	2	2	
BstAPI	GCANNNNntgc	2	2	
EspI	GCTnagc	2	2	
KasI	Gcgccc	2	2	
PflMI	CCANNNNntgg	2	2	
XmnI	GAANNnttc	2	2	

【表 1 - 2】

(表 1 続き①)

ApaLI	Gtgcac	3	3	LC シグナル配列
NaeI	GCCggc	3	3	
NgoMI	Gccggc	3	3	
PvuII	CAGctg	3	3	
RsrII	CGGwccg	3	3	
BsrBI	GAGcgg	4	4	
BsrDI	GCAATGNNn	4	4	
Est217I	GTAtac	4	4	
EcoRI	Gaattc	4	4	
SphI	GCAATGc	4	4	
SspI	AATatt	4	4	
AccI	GTmkac	5	5	
BclI	Tgatca	5	5	
BsmBI	Nnnnnngagacg	5	5	
BsrGI	Tgtaca	5	5	
DraI	TTTaaa	6	6	
NdeI	CATatg	6	6	HC FR4
SwaI	ATTaaat	6	6	
BamHI	Ggatoc	7	7	
SacI	GAGCTc	7	7	
BclVI	GTATCCNNNNNN	8	8	
BsaBI	GATNNnnatc	8	8	
NsiI	ATGCat	8	8	
Bsp120I	Gggccc	9	9	CH1
ApaI	GGGCCc	9	9	CH1
PspOoMI	Gggccc	9	9	
BspHI	Tcatga	9	11	
EcoRV	GATatc	9	9	
AhdI	GACNNNNngtc	11	11	
BbsI	GAGAC	11	14	
PsiI	TTAtaa	12	12	
BsaI	GGTCTCnnnnn	13	15	
XmaI	Cccggg	13	14	
AvaI	Cycgig	14	16	
BglI	GCCNNNNnggc	14	17	
AlwNI	CAGNNNctg	16	16	
BspMI	ACCTGC	17	19	
XcmI	CCANNNNNNnnntgg	17	26	HC FR4
BstEII	Ggttaacc	19	22	
Sse8387I	CCTGCAGg	20	20	
AvrII	Cctagg	22	22	
HincII	GTYrac	22	22	
BsgI	GTGCAG	27	29	
MscI	TGGcca	30	34	
BseRI	NNnnnnnnnnctcctc	32	35	
Bsu36I	CCtnagg	35	37	
PstI	CTGCAG	35	40	
EciI	nnnnnnnnntccgcc	38	40	
FpuMI	RGgwccy	41	50	
StyI	Cwwgg	44	73	
EcoO109I	RGgnccy	46	70	
Acc65I	Ggtacc	50	51	
KpnI	GGTACc	50	51	
BpmI	ctccag	53	82	
AvaII	Ggwcc	71	124	

*切断は最終の大文字塩基の後、上鎖において生じる。
 パリンドローム配列を切断するREについて、低鎖は対称
 部位で切断される。

【表 2 - 1】

表 2: 79 ヒト重複の切込み

酵素	配列	Nch	Ns	部位の位置
AfeI	AGCgct	0	0	
AflII	Cttaaag	0	0	HC FR3
AseI	GGGgggccc	0	0	LC後
BsiWI	Cgtacg	0	0	
BspDI	ATcgat	0	0	
BssHII	Gcgcgc	0	0	
FseI	GGCCGGGcc	0	0	
HpaI	GTTaac	0	0	
MbaI	Gctaga	0	0	HC リンカー
NotI	GCggggccc	0	0	リンカーにおける、HC/アンカー
NruI	TCGcga	0	0	
NsiI	ATGCAT	0	0	
PacI	TTAATcaa	0	0	
PciI	Acatgt	0	0	
PmeI	GTTTaaac	0	0	
PvuI	CGATcg	0	0	
RsrII	CGgwcgc	0	0	
SapI	gaagagc	0	0	
SfiI	GGCCNNNNngggcc	0	0	HC シグナル配列
SgtI	GCGATcgc	0	0	
SwaI	ATTTaaat	0	0	
AclI	AAcgtt	1	1	
AgeI	Accggt	1	1	
AseI	ATtaat	1	1	
AvrII	Cctagg	1	1	
BamI	GAATGCN	1	1	
BarBI	GAGcgg	1	1	
BsrDI	GCAATGNNn	1	1	
DraI	TTTaaa	1	1	
FspI	TGCgca	1	1	
HindIII	Aagctt	1	1	
MfeI	Caattg	1	1	HC FR1
NaeI	GCCggc	1	1	
NotI	Gccggc	1	1	
SpeI	Actagt	1	1	
Acc65I	Ggtacc	2	2	
BstBI	TTcgaa	2	2	
KpnI	GGTACc	2	2	
MluI	Acgcgt	2	2	
NcoI	Coatgg	2	2	HCシグナル並びにおける
NdeI	CAtatg	2	2	HC FR4
PmlI	CACgtg	2	2	
XcmI	CCANNNNNNnnntgg	2	2	
BcgI	cgannnnnnntgc	3	3	
BclI	Tgatca	3	3	
BglI	GCCNNNNNnggc	3	3	
BsaBI	GATNNnnatc	3	3	
BsrGI	Tgtaca	3	3	
SnaBI	TACgta	3	3	
Sse8387I	CCTGCagg	3	3	

【表 2 - 2】

(表 2 続き ①)

ApaLI	Gtgcac	4	4	LC シグナル / FR1
BspHI	Tcatga	4	4	
BssSI	Ctcgtg	4	4	
FsiI	TTATAA	4	5	
SphI	GCATGc	4	4	
AhdI	GACNNNngtc	5	5	
BspEI	Tccgga	5	5	HC FR1
MscI	TGGcca	5	5	
SacI	GAGCTc	5	5	
ScaI	AGTact	5	5	
SexAI	Accwgt	5	6	
SspI	AAATatt	5	5	
TliI	Ctcgag	5	5	
XhoI	Ctcgag	5	5	
BbsI	GAAGAC	7	8	
BstAPI	GCANNNNatgc	7	8	
BstZ17I	GTAtac	7	7	
EcoRV	GATatc	7	7	
EcoRI	Gaattc	8	8	
BliI	GCtnagc	9	9	
Bsu36I	CCtnagg	9	9	
DraIII	CACNNNgtg	9	9	
EspI	GCtnagc	9	9	
StuI	AGGcct	9	13	
XbaI	Tctaga	9	9	HC FR3
Bsp120I	Gggccc	10	11	CH1
ApaI	GggCCc	10	11	CH1
PspOmi	Gggccc	10	11	
BciVI	GTATCCNNNNNN	11	11	
SalI	Gtcgac	11	12	
DrdI	GACNNNNngtc	12	12	
KasI	Ggcgcc	12	12	
XmaI	Cccggg	12	14	
BglII	Agatct	14	14	
HincII	GTYrac	16	18	
BamHI	Ggatcc	17	17	
PflMI	CCANNNNntgg	17	18	
BsmBI	NNnnnngagacg	18	21	
BstXI	CCANNNNntgg	18	19	HC FR2
XnuI	GAANNnttc	18	18	
SacII	CCGCgg	19	19	
PstI	CTGCAG	20	24	
PvuII	CAGctg	20	22	
AvaI	Cycgrg	21	24	
EagI	Cggccg	21	22	
AatII	GACGtc	22	22	
BspMI	ACCTGC	27	33	
AccI	GTmkac	30	43	
StyI	Ccwggg	36	49	
AlwNI	CAGNNNctg	38	44	
BsaI	GGTCTCnnnn	38	44	
PpuMI	RGgwccy	43	46	
BglI	GTGCAG	44	54	
BseRI	NNnnnnnnnctcctc	48	60	
EciI	nnnnnnnnntcgcgc	52	57	
BstEII	Ggtnaccc	54	61	HC FR4, 47/79は1つを有する
EcoO109I	RGgnccy	54	86	
BpmI	ctccag	60	121	
AvaII	Ggwcc	71	140	

【表 3 - 1】

表5: 「一般的制限酵素」としての FokI の使用

FokI - dsDNA に対して 切断の表示部位

切断部位

5'-cacGGATGtg-----nnnnnnnn|nnnnnnn-3' (SEQ ID NO:15)
 3'-gtgCCTACac-----nnnnnnnnnnn|nnn-5' (SEQ ID NO:16)
 RECOG
 FokI の NIion

場合I

5'---gtg|tatt-actgtgc..Substrate....-3' (SEQ ID NO:17)
 3'-cac-ataa|tgcacacg-
 gtGTAGGcac\
 5'- caCATCCgtg/ (SEQ ID NO:18)

場合II

5'---gtgtatt|agac-tgc..Substrate....-3' (SEQ ID NO:19)
 |---cacataa-tctg|acg-5'
 /gtgCCTACac
 \cacGGATGtg-3' (SEQ ID NO:20)

場合III (場合Iを 180度回転させた)

/gtgCCTACac-5'
 \cacGGATGtg-
 gtgtctt|acag-tcc-3' Adapter (SEQ ID NO:21)
 3'---cacagaa-tgtc|agg..substrate....-5' (SEQ ID NO:22)

場合IV (場合IIを 180度回転させた)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

(表 5 参照①)

3'-gtGTAGGcac\ (SEQ ID NO:23)
 5'-gag|tctc-actgagc
 3'-...ctc-agag|tgactcg...-5' (SEQ ID NO:24)
 基質

10

23表5のFokIアダプター

FokI-dsDNAに2111 切断表示部位

場合I

草 11, ループ 5, 草 11, 認識 17

5'-...catgtg|tatt-actgtgc.. 基質-3'
 3'-gtacac-ataa|tgacacg-
 5'-gtGTAGGcacG T
 5'-caCATCCgtgc C
 TTT

場合II

草 10, ループ 5, 草 10, 認識 18

5'-...gtgtatt|agac-tgctgcc. 基質-3'
 3'-cacataa-tctg|acgacgg-5'
 TgtgCCTACag
 C cacGGATGtg-3'
 TTT

20

場合III (場合Iを180度回転させた)

草 11, ループ 5, 草 11, 認識 0

TgtgCCTACac-5'
 G AcacGGATGtg-
 TTT
 gtgtatt|acag-tccattctg-3' Adapter
 3'-...cacagaa-tgtc|aggtaagac...substrate....-5'

場合IV (場合IIを180度回転させた)

草 11, ループ 5, 草 11, 認識 17

3'-gtGTAGGcacG T
 5'-atcgag|tctc-actgagc
 Substrate 3'-...tagctc-agag|tgactcg...-5'
 TTT

30

40

【表 3 - 3】

(表 5 続き②)

BseRI

| 切断部位

5'-cacGAGGAGnnnnnnnnnn|nnnn-3'

3'-gtgctcctcnnnnnnnn|nnnnn-5'

RECOG

BseRIのNIlen

幹 11, ループ 5, 幹 11, 認識 19

3'-.....gaacat|cg-ttaagccagta.....5'

T-TTCTGAGGAGTCcttgta-gc|aatcgggtcat-3'

C GCTGAGGAGTC

T cgactcctcag-5'

TT

上記基質を切断するための、BseRIについての
アダプター

10

【 0 1 5 1】

【表 4 - 1】

表 8: 79 ヒト HLC における URE FR3 アダプターへの一致

A. サンプリングされた重鎖産物のリスト

AF008566	af103343	HSA235676	HSU92452	HSZ93860
AF035043	AF103367	HSA235675	HSU94412	HSZ93863
AF103026	AF103368	HSA235674	HSU94415	MCOMFRAA
af103033	AF103369	HSA235673	HSU94416	MCOMERVA
AF103061	AF103370	HSA240559	HSU94417	S82745
AF103072	af103371	HSCB201	HSU94418	S82764
af103078	AF103372	HSIGGVHC	HSU96389	S83240
AF103099	AF158381	HSU44791	HSU96391	SABVH369
AF103102	E05213	HSU44793	HSU96392	SADEIGVH
AF103103	E05886	HSU82771	HSU96395	SAH2IGVH
AF103174	E05887	HSU82949	HSZ93849	SDA3IGVH
AF103186	HSA235661	HSU82950	HSZ93850	SIGVHTTD
af103187	HSA235664	HSU82952	HSZ93851	SUK4IGVH
AF103195	HSA235660	HSU82961	HSZ93853	
af103277	HSA235659	HSU86522	HSZ93855	
af103286	HSA235678	HSU86523	HSZ93857	
AF103309	HSA235677			

表 8B. 重鎖可変ドメインの塩基 89.1~93.2 の全ての異なる GLG の試験

Id	Nb	0	1	2	3	4	Seq	ID NO:
1	38	15	11	10	0	2	Seq1 gtgtattactgtgc	25
2	19	7	6	4	2	0	Seq2 gtAtattactgtgc	26
3	1	0	0	1	0	0	Seq3 gtgtattactgtAA	27
4	7	1	5	1	0	0	Seq4 gtgtattactgtAc	28
5	0	0	0	0	0	0	Seq5 Ttgtattactgtgc	29
6	0	0	0	0	0	0	Seq6 TtgtatCactgtgc	30
7	3	1	0	1	1	0	Seq7 ACAattactgtgc	31
8	2	0	2	0	0	0	Seq8 ACgtattactgtgc	32
9	9	2	2	4	1	0	Seq9 ATgtattactgtgc	33
総数		26	26	21	4	2		
累積		26	52	73	77	79		

【0 1 5 2】

10

20

30

40

【表 4 - 2】

(表 8 続き ①)

表 8C、FIR3重鎖における最も重要なLIRE認識配列

1	VHSzy1	GTGtattactgtgc	(ON_SHC103)	(SEQ ID NO:25)
2	VHSzy2	GTAtattactgtgc	(ON_SHC323)	(SEQ ID NO:26)
3	VHSzy4	GTGtattactgtac	(ON_SHC349)	(SEQ ID NO:28)
4	VHSzy9	ATGtattactgtgc	(ON_SHC5a)	(SEQ ID NO:33)

10

表 8D、4つのプローブを用いる79ヒトHC V遺伝子の試験

自己列数 79
塩基数 29143

ミスマッチ数

Id	Best	0	1	2	3	4	5	
1	39	15	11	10	1	2	0	Seq1 gtgtattactgtgc (SEQ ID NO:25)
2	22	7	6	5	3	0	1	Seq2 gtAtattactgtgc (SEQ ID NO:26)
3	7	1	5	1	0	0	0	Seq4 gtgtattactgtAc (SEQ ID NO:28)
4	11	2	4	4	1	0	0	Seq9 ATgtattactgtgc (SEQ ID NO:33)
群		25	26	20	5	2		
累積		25	51	71	76	78		

20

配列 2、4および9との5つのミスマッチを有する配列；最良2としてスコア化される。

最良は、同定されたアダプターが最も有用である配列の数である。

表の残りは、どれだけ配列がアダプターに一致するかを示す。

例えば、2つのミスマッチを伴ってVHSzy1 (Id=1) に一致する11の配列が存在し、他の全てのアダプターについてよくない。このサンプルにおいて、4つのアダプターの1つの2塩基で90%が該当する。

30

40

【表 5】

表 130: ヒトAb遺伝子の増幅のためのPCRプライマー

(HuIgMFOR) 5'-tgg aag agg cac gtt ctt ttc ttt-3'

! (HuIgMFOREtop) 5'-aaa gaa aag aac gtg cct ctt cca-3' = 逆転写体

(HuChFOR) 5'-aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt-3'

(HuCL2FOR) 5'-tga aca ttc tgt agg ggc cac tg-3'

(HuCL7FOR) 5'-aga gca ttc tgc agg ggc cac tg-3'

! Kappa

(CKForeAsc) 5'-acc gcc tcc acc ggg cgc gcc tta tta aca ctc tcc cct gtt-
gaa gct ctt-3'

(CL2ForeAsc) 5'-acc gcc tcc acc ggg cgc gcc tta tta tga aca ttc tgt-
agg ggc cac tg-3'

(CL7ForeAsc) 5'-acc gcc tcc acc ggg cgc gcc tta tta aga gca ttc tgc-
agg ggc cac tg-3'

【0154】

【表 6 - 1】

表 195: KLGLG FR3 配列

VH1

66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
agg	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	atc	agc	aca	gcc	tac	atg
81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
gag	ctg	agc	agg	ctg	aga	tct	gac	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt
93	94	95												

gcg aga ga ! 1-02# 1

aga gtc acc att acc agg gac aca tcc gcg agc aca gcc tac atg

gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt

gcg aga ga ! 1-03# 2

aga gtc acc atg acc agg aac acc tcc ata agc aca gcc tac atg

gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt

gcg aga gg ! 1-08# 3

aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac atg

gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt

gcg aga ga ! 1-18# 4

aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc tac atg

gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt

gca aca ga ! 1-24# 5

aga gtc acc att acc agg gac agg tct atg agc aca gcc tac atg

gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt

gca aga ta ! 1-45# 6

aga gtc acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca gtc tac atg

gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt

gcg aga ga ! 1-46# 7

10

20

30

40

【0 1 5 5】

【表 6 - 2】

(表)95 糸巻①)

aga gtc acc att acc agg gac atg tcc aca agc aca gcc tac atg
 gag ctg agc agc ctg aga tcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg gca ga ! 1-58# 8

aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac atg
 gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 1-69# 9

aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac atg
 gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 1-e# 10

aga gtc acc ata acc gcg gac acg tct aca gac aca gcc tac atg
 gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gca aca ga ! 1-f# 11

! VH2

agg ctg acc atc acc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg gtc ctt
 aca atg acc aac atg gac cct gtg gac aca gcc aca tat tac tgt
 gca cac aga c! 2-03# 12

agg ctg acc atc tcc aag gac acc tcc aaa agc cag gtg gtc ctt
 acc atg acc aac atg gac cct gtg gac aca gcc aca tat tac tgt
 gca cgg ata c! 2-26# 13

agg ctg acc atc tcc aag gac acc tcc aaa aac cag gtg gtc ctt
 aca atg acc aac atg gac cct gtg gac aca gcc acg tat tac tgt
 gca cgg ata c! 2-70# 14

! VH3

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-07# 15

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg
 caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt
 gca aaa gat a! 3-09#16

cga ttc acc atc tcc agg gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-11# 17

cga ttc acc atc tcc aga gaa aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt
 caa atg aac agc ctg aga gcc ggg gac acg gct gtg tat tac tgt
 gca aga ga ! 3-13# 18

aga ttc acc atc tca aga gat gat tca aaa aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtg tat tac tgt
 acc aca ga ! 3-15# 19

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg

10

20

30

40

【0 1 5 6】

【表 6 - 3】

(表)95系統②)

caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gcc ttg tat cac tgt
 gcg aga ga ! 3-20# 20
 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-21# 21
 cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac tgt
 gcg aaa ga ! 3-23# 22
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aaa ga ! 3-30# 23
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3303# 24
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aaa ga ! 3305# 25
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-33# 26
 cga ttc acc atc tcc aga gac aac agc aaa aac tcc ctg tat ctg
 caa atg aac agt ctg aga act gag gac acc gcc ttg tat tac tgt
 gca aaa gat a ! 3-43#27
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tat ctg
 caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-48# 28
 aga ttc acc atc tca aga gat ggt tcc aaa agc atc gcc tat ctg
 caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtg tat tac tgt
 act aga ga ! 3-49# 29
 cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctt
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-53# 30
 aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctt
 caa atg ggc agc ctg aga gct gag gac atg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-64# 31
 aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctt
 caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 3-66# 32
 aga ttc acc atc tca aga gat gat tca aag aac tca ctg tat ctg

10

20

30

40

【0 1 5 7】

【表 6 - 4】

(表 195 系統 ③)

caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
gct aga ga ! 3-72# 33
agg ttc acc atc tcc aga gat gat tca aag aac acg gcg tat ctg
caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
act aga ca ! 3-73# 34
cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg ctg tat ctg
caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
gca aga ga ! 3-74# 35
aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg cat ctt
caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt
aag aaa ga ! 3-d# 36

1 VR4

cga gtc acc ata tca gta gac aag tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcg aga ga ! 4-04# 37
cga gtc acc atg tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gcc gtg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcg aga aa ! 4-28# 38
cga gtt acc ata tca gta gac acg tct aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg act gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcg aga ga ! 4301# 39
cga gtc acc ata tca gta gac agg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcc aga ga ! 4302# 40
cga gtt acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg act gcc gca gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcc aga ga ! 4304# 41
cga gtt acc ata tca gta gac acg tct aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg act gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcg aga ga ! 4-31# 42
cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt
gcg aga ga ! 4-34# 43
cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac tgt
gcg aga ca ! 4-39# 44
cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
gcg aga ga ! 4-59# 45

10

20

30

40

【0 1 5 8】

【表 6 - 5】

(表195続き④)

cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
 aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 4-61# 46

cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg
 aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 4-b# 47

! VH5

cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac ctg
 cag tgg agc agc ctg aag gcc tcc gac acc gcc atg tat tac tgt
 gcg aga ca ! 5-51# 48

cac gtc acc atc tca gct gac aag tcc atc agc act gcc tac ctg
 cag tgg agc agc ctg aag gcc tcc gac acc gcc atg tat tac tgt
 gcg aga ! 5-a# 49

! VH6

cga ata acc atc aac cca gac aca tcc aag aac cag ttc tcc ctg
 cag ctg aac tct gtg act ccc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
 gca aga ga ! 6-1# 50

! VH7

cgg ttt gtc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat ctg
 cag atc tgc agc cta aag gct gag gac act gcc gtg tat tac tgt
 gcg aga ga ! 74.1# 51

10

20

30

40

【0 1 5 9】

【表 7 - 1】

表 250: FR3 のヒト重鎖の切断 および変換のために使用される
 REaptors, Extenders, および Bridges

※: 実際のヒト HC 遺伝子の HpyCH4V 7bp-7
 !! ヒト HC の FC3 中の HpyCH4V, 塩基 35~56; TGCA # 10 位置を有するもののみ
 TGCA; 10,

RE 番号:	長さ 4 の TGCA は 10 で予測される
1	6-1 agttctccctgcagctgaactc
2	3-11, 3-07, 3-21, 3-72, 3-48 cactgtatctgcgaatgaacag
3	3-09, 3-43, 3-20 ccctgtatctgcgaatgaacag
4	5-51 ccgcctacctgcagtgagcag
5	3-15, 3-30, 3-30.5, 3-30.3, 3-74, 3-23, 3-33 cgtgtatctgcgaatgaacag
6	7-4.1 cggcctatctgcagatctgcag
7	3-73 cggcgtatctgcgaatgaacag
8	5-a ctgcctacctgcagtgagcag
9	3-49 tcgcctatctgcgaatgaacag

10

【 0 1 6 0 】

【表 7-2】

(表 250 系 250 系 ①)

B: HpyCH4V REadaptors, Extenders, ~~and~~ Bridges

B.1 REadaptors

! H₂C下鎖の切断

! 100mM NaCl についての TmKeller, セロソルムアクト

! 100mM NaCl についての Edapter

		T _m [°]	T _m [°]
(ON_HCFR36-1)	5'-agttctccctGCAGctgaactc-3'	68.0	64.5
(ON_HCFR36-1A)	5'-ttctccctGCAGctgaactc-3'	62.0	62.5
(ON_HCFR36-1B)	5'-ttctccctGCAGctgaac-3'	56.0	59.9
(ON_HCFR33-15)	5'-cgctgtatcTGCAaatgaacag-3'	64.0	60.8
(ON_HCFR33-15A)	5'-ctgtatcTGCAaatgaacag-3'	56.0	56.3
(ON_HCFR33-15B)	5'-ctgtatcTGCAaatgaac-3'	50.0	53.1
(ON_HCFR33-11)	5'-cactgtatcTGCAaatgaacag-3'	62.0	58.9
(ON_HCFR35-51)	5'-ccgcctaccTGCAgtggagcag-3'	74.0	70.1

B.2 本前記した C/D3 がクロン化されるべき合成 3-23 産伝子のセグメント

```

!
! XbaI...
! D323* cgCttcacTaag tct aga gac aac tct aag aat act ctC taC
! scab..... designed gene 3-23 gene.....
!
! HpyCH4V
! .. .. AflII...
! Ttg aag atg aac agc Tta agG . . .
! .....
```

B.3 Extender および Bridges

! Extender (底鎖):

(ON_HCHpyEx01) 5'-cAagTAGAgAgTATTcTTAgAgTTgTcTcTAGAcTTAgTgAAgag-3'

! ON_HCHpyEx01 は以下の逆転写本である。

! 5'-cgCttcacTaag tct aga gac aac tct aag aat act ctC taC Ttg -3'

! Bridges (先端鎖) 9塩基オーバーラップ

```

!
! (ON_HCHpyBr016-1) 5'-cgCttcacTaag tct aga gac aac tct aag-
! aat act ctC taC Ttg CAgtgaac-3' {3'末端にはブロックされる}
```

! 3-15 et al. + 3-11

```

!
! (ON_HCHpyBr023-15) 5'-cgCttcacTaag tct aga gac aac tct aag-
! aat act ctC taC Ttg CAaatgaac-3' {3'末端にはブロックされる}
```

! 5-51

```

!
! (ON_HCHpyBr045-51) 5'-cgCttcacTaag tct aga gac aac tct aag-
! aat act ctC taC Ttg CAgtggagc-3' {3'末端にはブロックされる}
```

! PCR プライマー (先端鎖)

(ON_HCHpyPCR) 5'-cgCttcacTaag tct aga gac-3'

【 0 1 6 2 】

C:	KTHC GLG 由来の BIP I フォート	
1	1-58, 1-03, 1-08, 1-69, 1-24, 1-45, 1-46, 1-E, 1-a	acatgggGCTGAGcagccctgag
2		1-02 acatgggGCTGAGcaggctgag
3		1-18 acatgggagctgaggagccctgag
4		5-51, 5-a acctgcagtgyagcagccctgaa
5		3-15, 3-73, 3-49, 3-72 atctgcaaatgaacagccctgaa
6	3303, 3-33, 3-07, 3-11, 3-30, 3-21, 3-23, 3305, 3-48	atctgcaaatgaacagccctgag
7		3-20, 3-74, 3-09, 3-43 atctgcaaatgaacagctctgag
8		74.1 atctgcagatctcgagccctaaa
9		3-66, 3-13, 3-53, 3-d atcttcaaatgaacagccctgag
10		3-64 atcttcaaatgggagccctgag
11	4301, 4-28, 4302, 4-04, 4304, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59, 4-61, 4-b	ccctgaaGCTGAGCctctgtgac
12		6-1 ccctgcagctgaactctgtgac
13		2-70, 2-05 tccttaccaatgaccaacatgga
14		2-26 tccttaacctgacccaatgga

D.1 REadaptors

D2 補捉されたCDR3がクローンされるべき合成 3-23 塩基子のセグメント

D.3 Extender 及び Bridges

! Bridges

！ 依銀はここで切斷される

! Extender

(BlpF3Ext) 5' -

TcAgcTgcAAgTAcAAAGTATTTTAcTgTTATcTcTAgAcTgAgTgAAgcg-3'

! B1pF3Ext は以下の逆補体である:

1 5'-cgCttcacTcag tct aga gat aaC AGT aaA aaT acT TtG taC Ttg caG Ctg a-3'

(BlpF3PCR) 5'-cgCttcacTcag tct aga gat aaC-3'

【表 7 - 4】

(表 250 系亮ミ③)

E: HpyCH4III 異なる G/LG 配列の周囲部位, 塩基 77~98		
1	102#1, 118#4, 146#7, 169#9, 1e#10, 311#17, 353#30, 404#37, 4301	ccgtgtattactgtgcgagaga
2	103#2, 307#15, 321#21, 3303#24, 333#26, 348#28, 364#31, 366#32	ctgtgtattactgtgcgagaga
3	108#3	ccgtgtattactgtgcgagagg
4	124#5, 12#11	ccgtgtattactgtgcacagaga
5	145#6	ccatgtattactgtgcagagata
6	158#8	ccgtgtattactgtgcggcaga
7	205#12	ccacatattactgtgcacacag
8	226#13	ccacatattactgtgcacaggat
9	270#14	ccacgtattactgtgcacaggat
10	309#16, 343#27	ccattgtattactgtgcacacaga
11	313#18, 374#35, 61#50	ctgtgtattactgtgcacagaga
12	315#19	ccgtgtattactgtgcacacaga
13	320#20	ccattgtattactgtgcagagaga
14	323#22	ccgtgtattactgtgcacagaga
15	330#23, 3305#25	ctgtgtattactgtgcacacaga
16	349#29	ccgtgtattactgtgtactagaga
17	372#33	ccgtgtattactgtgtactagaga
18	373#34	ccgtgtattactgtgtactagaga
19	3d#36	ctgtgtattactgtgtacacagaga
20	428#38	ccgtgtattactgtgcgagagaa
21	4302#40, 4304#41	ccgtgtattactgtgcacagaga
22	439#44	ctgtgtattactgtgcgagagaca
23	551#48	ccatgtattactgtgcgagagaca
24	5a#49	ccatgtattactgtgcgagaga

【0 1 6 3】

【表 7 - 5】

(表 250 続き④)

F: EpyCH4III REaptors, Extenders, Bridges

F.1 REaptors

! FR3 (塩基 77~97) 中の HC (低) の切断についての ON
 ! EpyCH4III, Bst4CI, または TaaI を用いた切断について
 ! 切断は、塩基 88 より前の低塩基にある

		77	78	88	88	88	99	99	9		
		78	90	234	567	890	123	456	7	T _m [°]	T _m [°]
(H43.77.97.1-02#1)	5'-cc	gtg	tat	tAC	TGT	gcg	aga	g-3'		64	62.6
(H43.77.97.1-03#2)	5'-cc	gtg	tat	tAC	TGT	gcg	aga	g-3'		62	60.6
(H43.77.97.108#3)	5'-cc	gtg	tat	tAC	TGT	gcg	aga	g-3'		64	62.6
(H43.77.97.323#22)	5'-cc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	g-3'		60	58.7
(H43.77.97.330#23)	5'-cc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	g-3'		60	58.7
(H43.77.97.439#44)	5'-cc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	g-3'		62	60.6
(H43.77.97.551#48)	5'-cc	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	g-3'		62	60.6
(H43.77.97.5a#49)	5'-cc	gtg	tat	tAC	TGT	gcg	aga	g-3'		58	58.3

F.2 Extender および Bridges

! 架橋中の XbaI および AflII は示される。

(H43.XABr1) 5'-gggtgtagtga-
 |TCT|AGT|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgt|gcg|aga-3'
 (H43.XABr2) 5'-gggtgtagtga-
 |TCT|AGT|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgt|gcg|aaa-3'
 (H43.XAExt) 5'-ATAGTAGAcTgcAgTgTccTcAgcccTTAAgcTgTTcATcTgcAAgTAGA-
 gAgTATTcTTAgAgTTgTcTcTAGATcAcTAcAcc-3'
 (H43.XAExt) は以下の逆補体である:
 ! 5'-gggtgtagtga-
 ! |TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 ! |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|-3'

(H43.XAPCR) 5'-gggtgtagtga|TCT|AGA|gac|aac-3'
 ! 架橋中の XbaI および AflII は示される。
 (H43.ABr1) 5'-gggtgtagtga-
 |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgt|gcg|aga-3'
 (H43.ABr2) 5'-gggtgtagtga-
 |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgt|gcg|aaa-3'
 (H43.AExt) 5'-ATAGTAGAcTgcAgTgTccTcAgcccTTAAgcTgTTcATcTgcAAgTAGA-
 Acc-3'
 ! (H43.AExt) は、次の逆補体である: 5'-gggtgtagtga-
 ! |aac|agC|TTT|AGG|ggt|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|-3'
 (H43.APCR) 5'-gggtgtagtga|aac|agC|TTT|AGG|ggt|g-3'

【0164】

表 510

25 (FOK)act) 5'-caccacacgagc tttgt cagcagatg-3'

(VHE881) 5'-aattagtagac tgcaggtgac tcaagccctta agcgtttcat ctgcagatag-
 agagtattct tagagttgtc tctagactta ctgaagcg-3'

1 VHE881 は、以下の ON の座標をで あること に 留意 の こ と

[AC] 5'-cgcttcactaag-

30 Scab.....
 .表 206 にお ける よう な 含 成 3-23
 |TCT|AGN|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 XbaI...
 |aac|agc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|GCN|gtc|tac|tat|t-3'

35 |...
 |TCT|AGN|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 |aac|agc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|GCN|gtc|tac|tat|tgc|gag|ag-3'

(VHE881) 5'-cgcttcactaag-

(VHE881) |TCT|AGN|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|-
 |aac|agc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|GCN|gtc|tac|tat|tgc|gag|ag-3'

(VHE881) 5'-cgcttcactaag|TCT|AGN|gac|aac -3'

10

20

30

40

【表 9 - 1】

表 600: 示される変化したコドンを含む V3-23 VH フレムワーク

	17	18	19	20	21	22	
	A	Q	P	A	N	A	
5'-	gtg	tgt	caa	cgt	gac	gac	atg gaa 29
3'-	gac	aga	ctt	gc	cgg	gtc	ggc cgg tac cgg
Scab.....	Sfil.....						
	NcoI....						
	FR1 (DP47/V3-23)						
	23	24	25	26	27	28	29 30
	E	V	Q	L	L	E	S G
	gaa ggt CAA TGG tta gag tct ggt						53
	ctt caa ggt aac aat ctc aga cca						
	MfeI						
	FR1						
	31	32	33	34	35	36	37 38 39 40 41 42 43 44 45
	G	G	L	V	Q	P	G G S L R L S C A
	ggc ggt ctt gtt gag cgt ggt ggt tot tta cgt ctt tct tgc ggt						98
	ccg cca gaa caa gtc gga cca cca aga aat gca gaa aga aac cga						
	変化する部位 -->						
	FR1						
	46	47	48	49	50	51	52 53 54 55 56 57 58 59 60
	A	S	G	F	T	F	S S Y A M S W V R
	ggt TCC GGA ttg act tto tot tca TAC Gat atg tot tgg gtt cgc						143
	loga agg cct aag tga aag aga agc atg cga tac aga aac caa gag						
	BspEI						BstXI.
	変化する部位 -->						
	FR2						
	61	62	63	64	65	66	67 68 69 70 71 72 73 74 75
	Q	A	P	G	K	G	L E W V S A I S G
	CAA ggt cgt GGT aaa ggt ttg gac tgg ggt tot ggt atc tot ggt						188
	ggt cga gga cca ttt cca aac ctc acc caa aga cga tag aga cca						
	...BstXI						
	FR2						
	76	77	78	79	80	81	82 83 84 85 86 87 88 89 90
	S	G	G	S	T	Y	Y A D S V K G R F
	tot ggt gga agt aat tac tat ggt gac tcc ggt aaa ggt cgc ttc						233
	aga cca cgt cca tga atg ata cga ctg agg caa ttt cca gag aag						
	FR3						
	91	92	93	94	95	96	97 98 99 100 101 102 103 104 105
	T	I	S	R	D	N	S K N T L Y L Q M
	act atc TCT AGA gac aac tct aag aat act ctc tac ttg cag atg						278
	tga tag aga tot ctg ttg aga tto tta tga gag atg aac gtc tac						
	XbaI						
	FR3						
	106	107	108	109	110	111	112 113 114 115 116 117 118 119 120
	N	S	L	R	A	S	D T A V Y Y C A K
	aac agc TTA AGg ggt gag gag ACT CCA Gtc tao tat tgc ggt aaa						323
	ttg tag aat tcc cga ctc ctg tga cgt cag atg ata acg cga ttt						
	AflII						FstI
	FR3						
	121	122	123	124	125	126	127 128 129 130 131 132 133 134 135
	D	Y	E	G	T	G	Y A F D I W G Q G
	gac tat gaa ggt aat ggt tat ggt tto gac ATA TGA ggt gaa ggt						368
	ctg ata ctt cca tga cca ata cga aag ctg tat aac cca ggt cca						
	NdeI						
	FR4						
	136	137	138	139	140	141	142
	T	M	V	T	V	S	S
	act atg GTC ACC gtc tct agt-						389
	tga tao cag tgg cag aga tca-						
	BstEII						
	FR4						
	143	144	145	146	147	148	149 150 151 152
	A	S	T	K	G	P	S V F P
	gcc tcc acc aaG GGC CCa tcg GTC TTC ccc-3'						419
	ogv agg tga tto cgg ggt agg cag aag ggt-5'						
	BspI20I.						AbsI...(2/2)
	Apal....						

【0166】

【表 9 - 2】

(表 600 系 表 ①)

(SEPRMET) 5'-ctg tct gaa cG GCC cag ccG-3'
 (TOPFRLA) 5'-ctg tct gaa cG GCC cag ccG GCC atg gcc-
 gaa|gtt|CAA|TTG|tta|gag|tct|ggt|-
 |ggc|ggt|ctt|gtt|cag|cct|ggt|ggt|tct|tta-3'
 (BOTFRLB) 3'-caa|gtc|gga|cca|cca|aga|aat|gca|gaa|aga|acg|cga|-
 |cga|agg|cct|aag|tga|aag-5' | 表 600 系 表 ①
 (BOTFRL2) 3'-aac|caa|gog|-
 |gtt|cga|gga|cca|ttt|cca|aac|cta|aac|caa|aga|-5' | bottom strand
 (BOTFRL3) 3'-a|cga|ctg|agg|caa|ttt|cca|gog|aag|-
 |tga|tag|aga|tct|ctg|ttg|aga|tto|tta|tga|gag|atg|aac|gtc|tac|-
 |ttg|tgg|aat|taa|cca|cga|cta|ctg|tga-5'
 (F05) 5'-gc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgc|gct|aaa|-
 |gac|tat|gaa|ggt|act|ggt|tat|gct|ttc|gac|ATA|TgG|ggt|c-3'
 (BOTFRL4) 3'-cga|aag|ctg|tat|aac|cca|gtt|cca|-
 |tga|tac|cag|tgg|cag|aga|taa-
 cgg|agg|tgg|tto|ccg|ggt|aga|cag|aag|ggg-5' | bottom strand
 (BOTFRCPRM) 3'-gg|tto|ccg|ggt|aga|cag|aag|ggg-5'
 CDR1 diversity
 (ON-vgC1) 5'-|ggt|TCC|GGA|tto|act|tto|tct|<1>|TAC|<1>|atg|<1>|-
 CDR1.....6859
 |tgg|gtt|ccG|CAA|ggt|cct|GG-3'
 <1> は以下の等置混合を意味する: {ADEFHGHIKLMNPQRSTVWY}; no C
 (これは配列ではない)
 CDR2 多様性
 (ON-vgC2) 5'-ggg|ttg|gag|tgg|gtt|tct|<2>|atc|<2>|<3>|-
 CDR2.....
 |tct|ggt|ggc|<1>|act|<1>|tat|gct|gac|tcc|gtt|aaa|gg-3'
 CDR2.....
 <1> は以下の等置混合を意味する: {ADEFHGHIKLMNPQRSTVWY}; no C
 <2> は以下の等置混合を意味する: {YRWVGS}; no ACDEFHGHIKLMNPQT
 <3> は以下の等置混合を意味する: {PS}; no ACDEFHGHIKLMNPQRTVWY

【表 10】

表 800 (まじい)

以下の酵素のリストは、以下から獲得した。

<http://rebase.neb.com/cgi-bin/asvmlist>.

発明者は、a) 認識して切断する酵素、b) 認識する両端で切断する酵素、
または c) 認識部位と最も近い切断部位との間の 2 塩基より少ない塩基を
有するこそ、を除く。

REBASE Enzymes
04/13/2001

10

非対称の認識部位を伴う II 型制限酵素

酵素	認識部位	イソ制限酵素	供体先
AarI	CACCTGCNNNN [^] NNNN	-	Y
AceIII	CAGCTCNNNNNNNN [^] NNNN	-	-
Bbr7I	GAAGACNNNNNNNN [^] NNNN	-	-
BbvI	GCAGCNNNNNNNN [^] NNNN	-	Y
BbvII	GAAGACNN [^] NNNN	-	-
Bce83I	CTTGAGNNNNNNNNNNNNNN [^] NN	-	-
BceAI	ACGGCNNNNNNNNNNNN [^] NN	-	Y
BceFI	ACGGCNNNNNNNNNNNN [^] N	-	-
BciVI	GTATCCNNNN [^] N	BfuI	Y
BfiI	ACTGGGNNNN [^] N	BmrI	Y
BinI	GGATCNNNN [^] N	-	-
BscAI	GCATCNNNN [^] NN	-	-
BseRI	GAGGAGNNNNNNNN [^] NN	-	Y
BsmFI	GGGACNNNNNNNNNN [^] NNNN	BspLU11III	Y
BspMI	ACCTGCNNNN [^] NNNN	Acc36I	Y
EciI	GGCGGANNNNNNNNNN [^] NN	-	Y
Eco57I	CTGAAGNNNNNNNNNNNNNN [^] NN	BspKT5I	Y
FauI	CCCGCNNNN [^] NN	BstFZ438I	Y
FokI	GGATGNNNNNNNNNN [^] NNNN	BstPZ418I	Y
GsuI	CTGGAGNNNNNNNNNNNNNN [^] NN	-	Y
HgaI	GACGCNNNN [^] NNNN	-	Y
HphI	GGTGANNNNNN [^] N	AsuHPI	Y
MboII	GAAGANNNNNN [^] N	-	Y
MlyI	GAGTCNNNN [^] N	SchI	Y
MmeI	TCCRACNNNNNNNNNNNNNN [^] NN	-	-
MnlI	CCTCNNNNNN [^] N	-	Y
PleI	GAGTCNNNN [^] N	PpsI	Y
RleAI	CCCACANNNNNNNNNN [^] NN	-	-
SfaNI	GCATCNNNN [^] NNNN	BspST5I	Y
SspD5I	GGTGANNNNNN [^] N	-	-
Sth132I	CCCGNNNN [^] NNNN	-	-
StsI	GGATGNNNNNNNNNN [^] NNNN	-	-
TaqII	GACCGANNNNNNNNNN [^] NN, CACCCANNNNNNNNNN [^] NN	-	-
Tth111III	CAARCAANNNNNNNN [^] NN	-	-
UbaPI	CGAACG	-	-

20

30

記号 ^ は、上鎖の切断を意味し、_ は、定差の切断を意味する。上鎖および低鎖が同じ所で切断される場合、^ のみを表す。

40

【0168】

【表 1 1 - 1】

表 120: MALIA3, 記載される

MALIA3 9532 塩基

```

1 aat gct act act att agt aga att gat gcc acc ttt tca gct cgc gcc
!   引継ぎ塩基子
49 cca aat gaa aat ata gct aaa cag gtt att gac cat ttg cga aat gta
97 tct aat ggt caa act aaa tct act cgt tog cag aat tgg gaa tca act
145 gtt aca tgg aat gaa act tcc aga cac cgt act tta gtt gca tat tta
193 aaa cat gtt gag cta cag cac cag att cag caa tta agc tct aag cca
241 tcc gca aaa atg acc tct tat caa aag gag caa tta aag gta ctc tct
289 aat cct gac ctg ttg gag ttt gct tcc ggt ctg gtt cgc ttt gaa gct
337 cga att aaa acg cga tat ttg aag tct ttc ggg ctt cct ctt aat ctt
385 ttt gat gca atc cgc ttt gct tct gac tat aat agt cag ggt aaa gac
433 ctg att ttt gat tta tgg tca ttc tgg ttt tct gaa ctg ttt aaa gca
481 ttt gag ggg gat tca ATG aat att tat gac gat tcc gca gta ttg gac
!   RBS?..... 開始塩基子 X , 引継ぎ塩基子
529 gct atc cag tct aaa cat ttt act att acc ccc tct ggc aaa act tct
577 ttt gca aaa gcc tct cgc tat ttt ggt ttt tat cgt cgt ctg gta aac
625 gag ggt tat gat agt gtt gct ctt act atg cct cgt aat tcc ttt tgg
673 cgt tat gta tct gca tta gtt gaa tgt ggt att cct aaa tct caa ctg
721 atg aat ctt tct acc tgt aat aat gtt gtt cgg tta gtt cgt ttt att
769 aac gta gat ttt tct tcc caa cgt cct gac tgg tat aat gag cca gtt
817 ctt aaa atc gca TAA
!   End X & II
832 ggtaattca ca
!
!   M1           E5           Q10           T15
843 ATG att aaa gtt gaa att aaa cca tct caa gcc caa ttt act act cgt
!   Start gene V
!
!   S17           S20           P25           E30
891 tct ggt gtt tct cgt cag ggc aag cct tat tca ctg aat gag cag ctt
!
!   V35           E40           V45
939 tgt tcc gtt gat ttg ggt aat gaa tat ccg gtt ctt gtc aag att act
!
!   D50           A55           L60
987 ctt gat gaa ggt cag cca gcc tat gcg cct ggt cTG TAC Acc gtt cat
!   BsrGI...

```

10

20

30

40

【0 1 6 9】

【表 1 1 - 2】

(表 120 続き ①)

```

!           L65           V70           S75           R80
1035 ctg tcc tct ttc aaa gtt ggt cag ttc ggt tcc att atg att gac cgt
!
!           P85      K871は VC 終わる
1083 ctg cgc ctc gtt ccg gct aag TAA C
!
1108 ATG gag cag gtc gcg gat ttc gac aca att tat cag gcg atg
!      開始遺伝子 VII
!
1150 ata caa atc tcc gtt gta ctt tgt ttc gcg ctt ggt ata atc
!
!           VII 及び IX 重複
!           ..... S2 V3 L4 V5           S10
1192 gct ggg ggt caa aga TGA gt gtt tta gtg tat tct ttc gcc tct ttc gtt
!           End VII
!           |start IX
!           L13      W15           G20           T25           E29
1242 tta ggt tgg tgc ctt cgt agt ggc att acg tat ttt acc cgt tta atg gaa
!
1293 act tcc tc
!
!           .... stop of IX, IX and VIII overlap by four bases
1301 ATG aaa aag tct tta gtc ctc aaa gcc tct gta gcc gtt gct acc ctc
!      VIII の 開始シグナル配列
!
1349 gtt ccg atg ctg tct ttc gct gct gag ggt gac gat ccc gca aaa gcg
!           成熟 VIII ---->
1397 gcc ttt aac tcc ctg caa gcc tca gcg acc gaa tat atc ggt tat gcg
1445 tgg gcg atg gtt gtt gtc att
1466 gtc gcc gca act atc ggt atc aag ctg ttt aag
1499 aaa ttc acc tcg aaa gca ! 1515
!           ..... -35 ..
!
1517      agc tga taacccgat acaattaaag gctccctttg
!           ..... -10 ...
!
1552 gagcccttttt ttttGGAGAt ttt ! S.D. 下流
!
!           <----- III シグナル配列 ----->

```

10

20

30

40

【0 1 7 0】

【表 1 1 - 3】

(表120 解説②)

```

|           M K K L L F A I P L V
1575 caac GTG aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt ! 1611
|
|           V P F Y S H S A Q
1612 gtt cct ttc tat tct cac aGT gCA Cag tCT
|
|                               ApaII...
|
1642      GTC GTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT GGG GCC CCA GGG CAG
      AGG GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGG AGC AGC TCC AAC ATC GGG GCA
|
|           BstEII...
1729      GGT TAT GAT GTA CAC TGG TAC CAG CAG CTT CCA GGA ACA GCC CCC AAA
1777      CTC CTC ATC TAT GGT AAC AGC AAT CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA
1825      TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC ACT
1870      GGG CTC CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT
1900      TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC CTG AGT
1930      GGC CTT TAT GTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC
|
|                               BstEII...
1969      CTA GGT CAG CCC AAG GCC AAC CCC ACT GTC ACT
2002      CTG TTC CCG CCC TCC TCT GAG GAG CTC CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTA
2050      GTG TGT CTG ATC AGT GAC TTC TAC CCG GGA GCT GTG ACA GTG GCC TGG
2098      AAG GCA GAT AGC AGC CCC GTC AAG GCG GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC
2146      TCC AAA CAA AGC AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAT CTG AGC CTG
2194      ACG CCT GAG CAG TGG AAG TCC CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG
2242      CAT GAA GGG AGC ACC GTG GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA
2290      TAA TAA ACCG CCTCCACCGG GCGCGCCCAAT TCTATTTCAA GGAGACAGTC ATA
|
|                               AscI.....
|
|
|           PstI シグナル ----->
|           M K Y L L P T A A A G L L L L
2343      ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC
|
|           16 17 18 19 20      21 22
|           A A Q P A      M A
2388      gcG GCC cag ccG GCC atg gcc
|
|           SfiI.....
|           NgoMI... (1/2)
|           NcoI.....
|

```

10

20

30

40

【0 1 7 1】

【表 1 1 - 4】

(表 120 続き ③)

```

!                                     FR1(DP47/V3-23)-----
!                                     23 24 25 26 27 28 29 30
!                                     E  V  Q  L  L  E  S  G
!
2409                                gaa|gtt|CAA|TTG|tta|gag|tct|ggt|
!                                     | MfeI  |
!
!
! -----FR1-----
!    31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
!    G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A
!
2433 |ggc|ggt|ctt|gtt|cag|cct|ggt|ggt|tct|tta|cgt|ctt|tct|tgc|gct|
!
! -----FR1----->|...CDR1.....|-----FR2-----
!    46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
!    A  S  G  F  T  F  S  S  Y  A  M  S  W  V  R
!
2478 |gct|TCC|GGA|ttc|act|ttc|tct|tcg|TAC|Gct|atg|tct|tgg|gtt|cgc|
!          | BspEI |          | BsiWI|          | BstXI.
!
!
! -----FR2----->|...CDR2.....
!    61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
!    Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  A  I  S  G
!
2523 |CAa|gct|cct|GGT|aaa|ggt|ttg|gag|tgg|gtt|tct|gct|atc|tct|ggt|
!    ...BstXI      |
!
!
! .....CDR2.....|-----FR3-----
!    76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
!    S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F
!
2568 |tct|ggt|ggc|agt|act|tac|tat|gct|gac|tcc|gtt|aaa|ggt|cgc|tcc|
!
!
! -----FR3-----
!    91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
!    T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M
!
2613 |act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|
!          | XbaI  |
!
!
! -----FR3----->|
!    106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
!    N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
!
2658 |aac|agc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|GCA|Gtc|tac|tat|tgc|gct|aaa|

```

10

20

30

40

【0 1 7 2】

【表 1 1 - 5】

(表120 続き④)

```

!           |AFLIII |           | PstI |
!
!           .....CDR3.....|-----FR4-----
!           121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
!           D   Y   E   G   T   G   Y   A   F   D   I   W   G   Q   G
! 2703 |gac|tat|gaa|ggt|act|ggt|tat|gct|ttc|gaC|ATA|TGg|ggt|caa|ggt|
!                                     | NdeI | (1/4)
!
!           -----FR4----->|
!           136 137 138 139 140 141 142
!           T   M   V   T   V   S   S
! 2748 |act|atG|GTC|ACC|gtc|tct|agt
!           | BstEII |
! BstEII 前カ方、PV323は、記載されたことを7余いて、PCES1と同じである。
! BstEII 部位は、軽鎖において生じたり、最終のタンパク質において特異ては
! ないようである。
!
!           143 144 145 146 147 148 149 150 151 152
!           A   S   T   K   G   F   S   V   F   P
! 2769 gcc tcc acc aag GGC CcA tCG GTC TTC ccc
!                                     Bsp120I.   BbsI... (2/2)
!                                     ApaI....
!
!           153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167
!           L   A   P   S   S   K   S   T   S   G   G   T   A   A   L
! 2799 ctg gca ccC TCC TCc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg
!           BseRI... (2/2)
!
!           168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182
!           G   C   L   V   K   D   Y   F   F   E   F   V   T   V   S
! 2844 ggc tgc ctg GTC AAG GAC TAC TTC CCC gaA CCG GTg acg gtg tCG
!                                     AgeI....
!
!           183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197
!           W   N   S   G   A   L   T   S   G   V   H   T   F   F   A
! 2889 tgg aac tca GGC GCC ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccg gct
!           KsaI... (1/4)
!
!           198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212

```

10

20

30

40

【0 1 7 3】

【表 1 1 - 6】

(表 120, 続き⑤)

```

!       V L Q S S G L Y S L S S V V T
2934   gtc cta cag tCt agc GGa ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc
!       (Bsu36I...)(ノwクアウト)
!
!       213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227
!       V P S S S L G T Q T Y I C N V
2979   gtg ccC tCt tct agc tTG Ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg
!       (BstXI.....)N.B.          BstXIはBpmI 部位
!                                     の破壊
!
!       228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242
!       N H K P S N T K V D K K V E P
3024   aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc
!
!       243 244 245
!       K S C A A A H H H H H H S A
3069   aaa tct tgt GCG GCC GCT cat cac cac cat cat cac tct gct
!       NotI.....
!
!       E Q K L I S E E D L N G A A
3111   gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggt gcc gca
!
!       D I N D D R M A S G A
3153   GAT ATC aac gat gat cgt atg gct AGC ggc gcc
!       REK 切断部位 ..... NheI... KsaI...
!       EcoRV..
!
!       ドメイン 1 -----
!       A E T V E S C L A
3183   gct gaa act gtt gaa agt tgt tta gca
!
!       K P H T E I S F
3210   aaa ccc cat aca gaa aat tca ttt
!
!       T N V W K D D K T
3234   aCT AAC GTC TGG AAA GAC GAC AAA ACT
!
!       L D R Y A N Y E G C L W N A T G V

```

10

20

30

40

【0 1 7 4】

【表 1 1 - 7】

(表120 続き⑥)

```

3261 tta gat cgt tac gct aac tat gag ggt tgt ctg tgg AAT Gct aca ggc gtt
!
! BsmI_____
!
! V V C T G D E T Q C Y G T W V P I
3312 gta gtt tgt act ggt GAC GAA ACT CAG TGT TAC GGT ACA TGG GTT cct att
!
! G L A I P E N
3363 ggg ctt gct atc cct gaa aat
!
! L1 : リンカー -----
! E G G G S E G G G S
3384 gag ggt ggt ggc tct gag ggt ggc ggt tct
!
! E G G G S E G G G T
3414 gag ggt ggc ggt tct gag ggt ggc ggt act
!
! ドメイン 2 -----
3444 aaa cct cct gag tac ggt gat aca cct att ccg ggc tat act tat atc aac
3495 cct ctc gac ggc act tat ccg cct ggt act gag caa aac ccc gct aat cct
3546 aat cct tct ctt GAG GAG tct cag cct ctt aat act ttc atg ttt cag aat
!
! BseRI_____
3597 aat agg ttc cga aat agg cag ggg gca tta act gtt tat acg ggc act
3645 gtt act caa ggc act gac ccc gtt aaa act tat tac cag tac act cct
3693 gta tca tca aaa gcc atg tat gac gct tac tgg aac ggt aaa ttc AGA
!
! AlwNI
3741 GAC TGC gct ttc cat tct ggc ttt aat gaa gat cca ttc gtt tgt gaa
!
! AlwNI
3789 tat caa ggc caa tgg tct gac ctg cct caa cct cct gtc aat gct
!
3834 ggc ggc ggc tct
!
! 開始 L2 -----
3846 ggt ggt ggt tct
3858 ggt ggc ggc tct
3870 gag ggt ggt ggc tct gag ggt ggc ggt tct
3900 gag ggt ggc ggc tct gag gga ggc ggt tcc
3930 ggt ggt ggc tct ggt ! end L2
!
! ドメイン 3 -----
! S G D F D Y E K M A N A N K G A

```

10

20

30

40

【0 1 7 5】

【表 1 1 - 8】

(表)20 系(系4)

3945 tcc ggt gat ttt gat tat gaa aag atg gca aac gct aat aag ggg gct
 !
 ! M T E N A D E N A L Q S D A K G
 3993 atg acc gaa aat gcc gat gaa aac gcg cta cag tct gac gct aaa ggc
 !
 ! K L D S V A T D Y G A A I D G F
 4041 aaa ctt gat tct gtc gct act gat tac ggt gct gct atc gat ggt_ttc
 !
 ! I G D V S G L A N G N G A T G D
 4089 att ggt gac gtt tcc ggc ctt gct aat ggt aat ggt gct act ggt gat
 !
 ! F A G S N S Q M A Q V G D G D N
 4137 ttt gct ggc tct aat tcc caa atg gct caa gtc ggt gac ggt gat aat
 !
 ! S P L M N N F R Q Y L P S L P Q
 4185 tca cct tta atg aat aat ttc cgt caa tat tta cct tcc ctc cct caa
 !
 ! S V E C R P F V F S A G K P Y E
 4233 tgg gtt gaa tgt cgc cct ttt gtc ttt agc gct ggt aaa cca tat gaa
 !
 ! F S I D C D K I N L F R
 4281 ttt tct att gat tgt gac aaa ata aac tta ttc cgt
 ! 終了ドメイン3
 !
 ! G V F A F L L Y V A T F M Y V F140
 4317 ggt gtc ttt gcg ttt ctt tta tat gtt gcc acc ttt atg tat gta ttt
 ! 開始ドメイン3
 !
 ! S T F A N I L
 4365 tct acg ttt gct aac ata ctg
 !
 ! R N K E S
 4386 cgt aat aag gag tct TAA ! 川の停止
 ! 細胞内アンカー
 !
 ! M1 P2 V L L5 G I P L L10 L R F L G15
 4404 tc ATG cca gtt ctt ttg ggt att ccg tta tta ttg cgt ttc ctc ggt
 ! 開始 VI
 !

10

20

30

40

【0 1 7 6】

【表 1 1 - 9】

(表 120 続き ⑧)

4451 ttc ctt ctg gta act ttg ttc ggc tat ctg ctt act ttt ctt aaa aag
 4499 ggc ttc ggt aag ata gct att gct att tca ttg ttt ctt gct ctt att
 4547 att ggg ctt aac tca att ctt gtg ggt tat ctc tct gat att agc gct
 4595 caa tta ccc tct gac ttt gtt cag ggt gtt cag tta att ctc ccg tct
 4643 aat gcg ctt ccc tgt ttt tat gtt att ctc tct gta aag gct gct att
 4691 ttc att ttt gac gtt aaa caa aaa atc gtt tct tat ttg gat tgg gat

10

! M1 A2 V3 F5 L10 G13
 4739 aaa TAA t ATG gct gtt tat ttt gta act ggc aaa tta ggc tct gga
 ! 終了 VI 開始位置子 I

! 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 ! K T L V S V G K I Q D K I V A
 4785 aag acg ctc gtt agc gtt ggt aag att cag gat aaa att gta gct

! 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43
 ! G C K I A T N L D L R L Q N L
 4830 ggg tgc aaa ata gca act aat ctt gat tta agg ctt caa aac ctc

20

! 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58
 ! P Q V G R F A K T P R V L R I
 4875 ccg caa gtc ggg agg ttc gct aaa acg cct cgc gtt ctt aga ata

! 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73
 ! P D K P S I S D L L A I G R G
 4920 ccg gat aag cct tct ata tct gat ttg ctt gct att ggg cgc ggt

! 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88
 ! N D S Y D E N K N G L L V L D
 4965 aat gat tcc tac gat gaa aat aaa aac ggc ttg ctt gtt ctc gat

! 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103
 ! E C G T W F N T R S W N D K E
 5010 gag tgc ggt act tgg ttt aat acc cgt tct tgg aat gat aag gaa

30

! 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118
 ! R Q P I I D W F L R A R K L G
 5055 aga cag ccg att att gat tgg ttt cta cat gct cgt aaa tta gga

40

【0 1 7 7】

【表 1 1 - 1 0】

(表 120 系 9)

```

!      119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133
!      W D I I F L V Q D L S I V D K
!      5100 tgg gat att att ttt ctt gtt cag gac tta tct att gtt gat aaa
!
!      134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
!      Q A R S A L A E H V V Y C R R
!      5145 cag gcg cgt tct gca tta gct gaa cat gtt gtt tat tgt cgt cgt
!
!      149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163
!      L D R I T L P F V G T L Y S L
!      5190 ctg gac aga att act tta cct ttt gtc ggt act tta tat tct ctt
!
!      164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178
!      I T G S K M P L P K L H V G V
!      5235 att act ggc tgg aaa atg cct ctg cct aaa tta cat gtt ggc gtt
!
!      179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193
!      V K Y G D S Q L S P T V E R W
!      5280 gtt aaa tat ggc gat tct caa tta agc cct act gtt gag cgt tgg
!
!      194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208
!      L Y T G K N L Y N A Y D T K Q
!      5325 ctt tat act ggt aag aat ttg tat aac gca tat gat act aaa cag
!
!      209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223
!      A F S S N Y D S G V Y S Y L T
!      5370 gct ttt tct agt aat tat gat tcc ggt gtt tat tct tat tta acg
!
!      224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238
!      F Y L S H G R Y F K P L N L G
!      5415 cct tat tta tca cac ggt cgg tat ttc aaa cca tta aat tta ggt
!
!      239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253
!      Q K M K L T K I Y L K K F S R
!      5460 cag aag atg aaa tta act aaa ata tat ttg aaa aag ttt tct cgc
!
!      254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268
!      V L C L A I G F A S A F T Y S
!      5505 gtt ctt tgt ctt gcg att gga ttt gca tca gca ttt aca tat agt

```

10

20

30

40

【0 1 7 8】

【表 1 1 - 1 1】

(表 120 迄まで⑩)

```

!
!      269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283
!      Y I T Q P K P E V K K V V S Q
! 5550 tat ata acc caa cct aag ccg gag gtt aaa aag gta gtc tct cag
!
!      284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298
!      T Y D F D K F T I D S S Q R L
! 5595 acc tat gat ttt gat aaa ttc act att gac tct tct cag cgt ctt
!
!      299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313
!      N L S Y R Y V F K D S K G K L
! 5640 aat cta agc tat cgc tat gtt ttc aag gat tct aag gga aaa TTA
!                                     PacI
!
!      314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328
!      I N S D D L Q K Q G Y S L T Y
! 5685 ATT AAT agc gac gat tta cag aag caa ggt tat tca ctc aca tat
!      PacI
!
!      329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343
!      I I D L C T V S I K K G N S N E
!      iv                                     M1 K
! 5730 att gat tta tgt act gtt tcc att aaa aaa ggt aat tca aAT Gaa
!                                     開始 IV
!
!      344 345 346 347 348 349
!      I I V K C N .1の終了
!      iv L3 L N5 V I7 N F.V10
! 5775 att gtt aaa tgt aat TAA T TTT GTT
! 引き続きIV.....
! 5800 ttc ttg atg ttt gtt tca tca tct tct ttt gct cag gta att gaa atg
! 5848 aat aat tgg cct ctg cgc gat ttt gta act tgg tat tca aag caa tca
! 5896 ggc gaa tcc gtt att gtt tct ccc gat gta aaa ggt act gtt act gta
! 5944 tat tca tct gac gtt aaa cct gaa aat cta cgc aat ttc ttt att tct
! 5992 gtt tta cgt gct aat aat ttt gat atg gtt ggt tca att cct tcc ata
! 6040 att cag aag tat aat cca aac aat cag gat tat att gat gaa ttg cca
! 6088 tca tct gat aat cag gaa tat gat gat aat tcc gct cct tct ggt ggt
! 6136 ttc ttt gtt ccg caa aat gat aat gtt act caa act ttt aaa att aat
! 6184 aac gtt ccg gca aag gat tta ata cga gtt gtc gaa ttg ttt gta aag

```

10

20

30

40

【0 1 7 9】

【表 1 1 - 1 2】

(表 120 続き①)

6232 tct aat act tct aaa tcc tca aat gta tta tct att gac ggc tct aat
 6280 cta tta gtt gtt TCI gca cct aaa gat att tta gat aac ctt cct caa
 ! 除去された ApalI
 6328 ttc ctt tct act gtt gat ttg cca act gac cag ata ttg att gag ggt
 6376 ttg ata ttt gag gtt cag caa ggt gat gct tta gat ttt tca ttt gct
 6424 gct ggc tct cag cgt ggc act gtt gca ggc ggt gtt aat act gac cgc
 6472 ctc acc tct gtt tta tct tct gct ggt ggt tcc ggt att ttt aat
 6520 ggc gat gtt tta ggc cta tca gtt cgc gca tta aag act aat agc cat
 6568 tca aaa ata ttg tct gtg cca cgt att ctt acg ctt tca ggt cag aag
 6616 ggt tct atc tct gtt GGC CAG aat gtc cct ttt att act ggt cgt gtg
 ! MscI
 6664 act ggt gaa tct gcc aat gta aat aat cca ttt cag acg att gag cgt
 6712 caa aat gta ggt att tcc atg agc gtt ttt cct gtt gca atg gct ggc
 6760 ggt aat att gtt ctg gat att acc agc aag gcc gat agt ttg agt tct
 6808 tct act cag gca agt gat gtt att act aat caa aga agt att gct aca
 6856 acg gtt aat ttg cgt gat gga cag act ctt tta ctc ggt ggc ctc act
 6904 gat tat aaa aac act tct caa gat tct ggc gta ccg ttc ctg tct aaa
 6952 atc cct tta atc ggc ctc ctg ttt agc tcc cgc tct gat tcc aac gag
 7000 gaa agc acg tta tac gtg ctc gtc aaa gca acc ata gta cgc gcc ctg
 7048 TAG cggcgccatt
 ! 終了 IV
 7060 aagcggcgcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgacggct acaattgccg gcgccttagc
 7120 gcccgctcct ttgcgtttct tcccttcctt tctcgccacg ttcGCCGGCT ttcctcgta
 ! NgoMI
 7180 agctctaaat cgggggctcc cttaggggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgacct
 7240 caaaaaactt gatttgggtg atggttCAGC TAGTGggcca tcgcctgat agacggtttt
 ! DraIII
 7300 tcgccccttg ACCTTGAGT Ccaggttctt taatagtga ctcttggtcc aaactggaac
 ! DrdI
 7360 aacactcaac cctatctcgg gctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcgga
 7420 accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa
 7480 ctctctcagg gccaggggt gaagggcaat CAGCTGttgc cCGTCTCact ggtgaaaaga
 ! FvuII. BsmBI.
 7540 aaaacccccc tGGATCC AAGCTT
 ! BamHI HindIII (1/2)
 ! 係有 bla 遺伝子の挿入
 7563 gcagggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaacc
 7600 ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatGTATCC gctcatgaga caataaccct
 ! BclVI

10

20

30

40

【0 1 8 0】

【表 1 1 - 1 3】

(表 120 免脱き 12)

7660 gataaatgct tcaataatat tgaaaaAGGA AGAgT
 ! RBS.?,...
 ! 開始 b1a 遺伝子
 7695 ATG agt att caa cat ttc cgt gtc gcc ctt att ccc ttt ttt gcg gca ttt
 7746 tgc ctt cct gtt ttt gct cac cca gaa acg ctg gtg aaa gta aaa gat gct
 7797 gaa gat cag ttg ggC gCA CGA Gtg ggt tac atc gaa ctg gat ctc aac agc
 ! BssSI...
 ! 除去された ApaLI
 7848 ggt aag atc ctt gag agt ttt cgc ccc gaa gaa cgt ttt cca atg atg agc
 7899 act ttt aaa gtt ctg cta tgt cat aca cta tta tcc cgt att gac gcc ggg
 7950 caa gaG CAA CTC GGT CGc cgg gcg cgg tat tct cag aat gac ttg gtt gAG
 ! BcgI
 ScaI
 8001 TAC Tca cca gtc aca gaa aag cat ctt acg gat ggc atg aca gta aga gaa
 ! ScaI
 8052 tta tgc agt gct gcc ata acc atg agt gat aac act gcg gcc aac tta ctt
 8103 ctg aca aCG ATC Gga gga ccg aag gag cta acc gct ttt ttg cac aac atg
 ! PvuI
 8154 ggg gat cat gta act cgc ctt gat cgt tgg gaa ccg gag ctg aat gaa gcc
 8205 ata cca aac gac gag cgt gac acc acg atg cct gta gca atg cca aca acg
 8256 tTG CGC Aaa cta tta act ggc gaa cta ctt act cta gct tcc cgg caa caa
 ! FspI...
 !
 8307 tta ata gac tgg atg gag gcg gat aaa gtt gca gga cca ctt ctg cgc tgc
 8358 GCC ctt ccG Gct ggc tgg ttt att gct gat aaa tct gga gcc ggt gag cgt
 ! BglI
 8409 gGG TCT Cgc ggt atc att gca gca ctg ggg cca gat ggt aag ccc tcc cgt
 ! BsaI
 8460 atc gta gtt atc tac acG ACg ggg aGT Cag gca act atg gat gaa cga aat
 ! AhdI
 8511 aga cag atc gct gag ata ggt gcc tca ctg att aag cat tgg TAA ctgt
 ! stop
 8560 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa
 8620 ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt
 8680 cgttccactg tacgtaagac cccc
 8704 AAGCTT GTCGAC tgaa tggcgaatgg cgctttgcct
 ! HindIII SalI..
 ! (2/2) HincII
 8740 ggtttccggc accagaagcg gtgccgga gctggctgga gtgcgatctt
 !

10

20

30

40

【0 1 8 1】

【表 1 1 - 1 4】

(表 120 系統 (13))

10

8790 CCTGAGG
 ! Bau36I...
 8797 ccgat actgtcgtcg tcccctcaaa ctggcagatg
 8832 caccgttacg atgcgcccat ctacaccaac gtaacctatc ccattacggt caatccgccg
 8892 tttgttccca cggagaatcc gacgggttgt tactcgctca cattaatgt tgatgaaagc
 8952 tggctacagg aagccagac gcgaattatt tttgatggcg ttccatttgg ttaaaaaatg
 9012 agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaATTAAA
 ! SwaI...
 9072 Tatttgccta tacaatcttc ctgtttttgg ggcttttctg attatcaacc GGGGTAcac
 ! RBS?
 9131 ATG att gac atg cta gtt tta cga tta ccg ttc atc gat tot ctt gtt tgc
 ! 開始遺伝子 II
 9182 tcc aga ctc tca ggc aat gac ctg ata gcc ttt gtA GAT CTC tca aaa ata
 ! BglII...
 9233 gct acc ctc tcc ggc atg aat tta tca gct aga acg gtt gaa tat cat att
 9284 gat ggt gat ttg act gtc tcc ggc ctt tct cac cct ttt gaa tot tta cct
 9335 aca cat tac tca ggc att gca ttt aaa ata tat gag ggt tot aaa aat ttt
 9386 tat cct tgc gtt gaa ata aag got tct ccc gca aaa gta tta cag ggt cat
 9437 aat gtt ttt ggt aca acc gat tta gct tta tgc tct gag got tta ttg ctt
 9488 aat ttt gct aat tot ttg cct tgc ctg tat gat tta ttg gat gtt ! 9532
 ! 遺伝子 II 区間終了

20

30

40

【0 1 8 2】

【表 1 1 - 1 5】

(表 120 続き ⑭)

表 120B: MALIA3 の配列、短縮された

LOCUS	MALIA3	9532	CIRCULAR
ORIGIN			
1	AATGCTACTA	CTATTAGTAG	AATTGATGCC
61	ATAGCTAAAC	AGGTTATTGA	CCATTTCGCA
121	CGITCGCAGA	AITGGGAATC	AACGTGTACA
181	GTTCATATT	TAAAACATGT	TGAGCTACAG
241	TCCGCAAAAA	TGACCTCTTA	TCAAAAGGAG
301	TTGGAGTTTG	CTTCGGGTCT	GGTTCGCTTT
361	TCITTCGGGC	TTCTCTTAA	TCITTTTGAT
421	CAGGGTAAAG	ACCTGATTTT	TGATTTATGG
481	TTTGAGGGGG	ATTCAATGAA	TATTTATGAC
541	AAACATTTTA	CTATTACCCC	CTCTGGCAAA
601	GGTTTTTATC	GTCTCTGGT	AAACGAGGGT
661	AATTCCTTTT	GGCGTTATGT	ATCTGCATTA
721	ATGAATCTTT	CTACCTGTA	TAACTGTTGT
781	TCITCCCAAC	GTCTGACTG	GTAAATGAG
841	CAATGATTA	AGTTGAAAT	AAACCATCTC
901	CTCGTCAGGG	CAAGCCTTAT	TCACTGAATG
961	AATATCCGGT	TCTTGTCAAG	ATTACTCTTG
1021	TGTACACCGT	TCACTGTCC	TCITTCAAAG
1081	GTCTGCGCCT	CGTTCGGGCT	AAGTAACATG
1141	CAGGCGATGA	TACAAATCTC	CGTTGTACTT
1201	CAAAGATGAG	TGTTTATG	TATCTTTTCG
1261	GTGGCATTAC	GTATTTTACC	CGTTTAAATG
1321	CAAGCCTCT	GTAGCCGTTG	CTACCCCTCGT
1381	CGATCCCGCA	AAAGCGGCCCT	TTAACTCCCT
1441	TGCGTGGGCG	ATGTTTGTG	TCATTGTCTG
1501	ATTCACTCTG	AAAGCAAGCT	GATAAACCGA
1561	TTTTTGGAGA	TTTTCAAGCT	GAAAAAATA
1621	TATTTCTACA	GTGCACAGTC	TGTCGTGACG
1681	CAGAGGGTCA	CCATCTCCTG	CACTGGGAGC
1741	CACTGGTACC	AGCAGCTTCC	AGGAACAGCC
1801	CGGCCCTCAG	GGGTCCCTGA	CCGATTCTCT
1861	GCCATCACTG	GGCTCCAGGC	TGAGGATGAG
1921	AGCCTGAGTG	GCCTTTATGT	CTTCGGAACT
1981	AAGGCCAACC	CCACTGTCTAC	TCTGTTCCCG
2041	GCCACACTAG	TGTGTCTGAT	CAGTGACTTC
2101	GCAGATAGCA	GCCCCGTCAA	GGCGGGAGTG

【0 1 8 3】

【表 1 1 - 1 6】

(表 120 続き (15))

2161 AACAACTACG CGGCCAGCAG CTATCTGAGC CTGACGCCTG AGCAGTGGAA GTCCACACAGA
 2221 AGCTACAGCT GCCAGGTCAC GCATGAAGGG AGCACCCTGG AGAAGACAGT GGCCCTTACA
 2281 GAATGTTCTT AATAAACCGC CTCACCCGGG CGCGCCATTT CTATTTCAAG GAGACAGTCA
 2341 TAATGAAATA CCTATTGCCT ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCG GCCCAGCCGG
 2401 CCATGGCCGA AGTTCAATTG TTAGAGTCTG GTGGCGGTCT TGTTCAGCCT GGTGGTTCTT
 2461 TACGTCTTTC TTGCGCTGCT TCCGGATTCA CTTTCTCTTC GTACGCTATG TCTTGGGTTT
 2521 GCCAAGCTCC TGGTAAAGGT TTGGAGTGGG TTTCTGCTAT CTCTGGTTCT GGTGGCAGTA
 2581 CTTACTATGC TGACTCCGTT AAAGGTCGCT TCACATCTTC TAGAGACAAC TCTAAGAATA
 2641 CTCTCTACTT GCAGATGAAC AGCTTAAGGG CTGAGGACAC TGCAGTCTAC TATTGCGCTA
 2701 AAGACTATGA AGGTACTGGT TATGCTTTCG ACATATGGGG TCAGGTACT ATGGTCACCG
 2761 TCTCTAGTGC CTCACCAAG GGCCTATCGG TCTTCCCCCT GGCACCTCC TCCAGAGCA
 2821 CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC GAACCGGTGA
 2881 CGGTGTCTG GAACTCAGGC GCCCTGACCA GCGGCGTCCA CACCTTCCCC GCTGTCTTAC
 2941 AGTCTAGCGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TAGTGACCGT GCGCTCTTCT AGCTTGGGCA
 3001 CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTG GACAAGAAAG
 3061 TTGAGCCCAA ATCTTGTGCG GCCGCTCATC ACCACCATCA TCACCTCTGCT GAACAAAAC
 3121 TCATCTCAGA AGAGGATCTG AATGGTGCCG CAGATATCAA CGATGATCGT ATGGCTGGCG
 3181 CCCTCTGAAC TGTGAAAGT TGTTTAGCAA AACCCCTATC AGAAAATCA TTTACTAAGC
 3241 TCTGGAAAGA CGACAAAAC TTAGATCGTT ACGCTAATA TGAGGTTTGT CTGTGGAATG
 3301 CTACAGGCGT TGTAGTTTGT ACTGGTGACG AAACCTCAGT TTACGGTACA TGGGTTCTTA
 3361 TTGGGCTTGC TATCCCTGAA AATGAGGCTG GTGGCTCTGA GGGTGGCGGT TCTGAGGTTG
 3421 GCGGTTCTGA GGGTGGCGGT ACTAAACCTC CTGAGTACGG TGATACACCT ATTCGGGGCT
 3481 ATACTTATAT CAACCCCTCTC GACGGCACTT ATCCGCTGCG TACTGAGCAA AACCCGCTA
 3541 ATCCTAATCC TTCTCTTGAG GAGTCTCAGC CTCTTAATAC TTTCATGTTT CAGAATAATA
 3601 GGTTCCGAAA TAGGCAGGGG GCATTAACTG TTTATACGGG CACTGTACT CAAGGCAGTG
 3661 ACCCCGTTAA AACTTATTAC CAGTACACTC CTGTATCATC AAAAGCCATG TATGACGCTT
 3721 ACTGGAACGG TAAATTCAGA GACTGCGCTT TCCATCTGCG CTTTAATGAA GATCCATTGG
 3781 TTTGTGAATA TCAAGGCCAA TCGTCTGACC TGCCTCAACC TCCTGTCAAT GCTGGCGGCG
 3841 GCTCTGGTGG TGGTTCTGGT GCGGCTCTG AGGGTGGTGG CTCTGAGGT GCGGTTCTG
 3901 AGGGTGGCGG CTCTGAGGGA GCGGTTCCG GTGGTGGCTC TGGTTCCGGT GATTITGATT
 3961 ATGAAAAGAT GGCAAACGCT AATAAGGGGG CTATGACCGA AAATGCCGAT GAAAACGCGC
 4021 TACAGTCTGA CGCTAAAGGC AAACCTTGATT CTGTGCTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG
 4081 ATGGTTTCAT TGGTGACGTT TCCGECCTTG CTAATGGTAA TGGTGCTACT GGTGATTTTG
 4141 CTGGCTCTAA TTCCCAAATG GCTCAAGTCG GTGACGGTGA TAATTCACCT TTAATGAATA
 4201 ATTTCCGTCA ATATTACCT TCCCTCCCTC AATCGGTTGA ATGTCGCCCT TTGTCTTTA
 4261 CGCTGGTAA ACCATATGAA TTTCTIATTG ATTGTGACAA AATAAACTTA TTCCGTGGTG
 4321 TCTTTGCGTT TCTTTIATAT GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCTACG TTTGCTAACA
 4381 TACTGCGTAA TAAGGAGTCT TAATCATGCC AGTTCTTTTG GGTATTCGGT TATTATTGCG
 4441 TTTCTCTCGT TTCTTCTGCG TAACTTTGT CCGCTATCTG CTTACTTTTC TTAATAAGGG

10

20

30

40

【0 1 8 4】

【表 1 1 - 1 7】

(表 120 系克子 (6))

4501 CTTCCGTAAG ATAGCTATTG CTATTTTCATT GTTTCCTGCT CTTATTATTG GGCTTAACCTC
 4561 AATTCTTGTG GGTATCTCT CTGATATTAG CGCTCAATTA CCTCTGACT TTGTTGAGGG
 4621 TGTTGAGTTA ATTCTCCCGT CTAATGCGCT TCCCTGTTTT TATGTTATTC TCTCTGTAAA
 4681 GGCTGCTATT TTCAATTTTG ACGTTAAACA AAAATCGTT TCTTATTTGG ATTGGGATAA
 4741 AATAATATGGC TGTATTATTT GTAACCTGGCA AATTAGGCTC TGGAAAGACG CTCGTTAGCG
 4801 TTGGTAAGAT TCAGGATAAA ATTGTAGCTG GGTGCAAAAT AGCAACTAAT GTTGATTAA
 4861 GGCTTCAAAA CCTCCCGCAA GTCGGGAGGT TCGCTAAAAC GCCTCGCGTT CTAGAAATAC
 4921 CGGATAAGCC TTCTATATCT GATTTGCTTG CTATTGGGCG CGGTAATGAT TCCTACGATG
 4981 AAAATAAAAA CGGCTTGCTT GTTCTCGATG AGTCCGCTAC TTGGTTAAT ACCCGTTCTT
 5041 GGAATGATAA GGAAGACAG CCGATTATTG ATTGGTTCT ACATGCTCGT AAATTAGGAT
 5101 GGGATATTAT TTTTCTTGT CAGGACTTAT CTATTGTGA TAAACAGCG CGTCTGCTAT
 5161 TAGCTGAACA TGTGTATTAT TGTCTGCTG TGGACAGAT TACTTTACCT TTGTGCGTA
 5221 CTTTATATTC TCTTATACT GGCTCGAAA FGCCTCTGCC TAAATTACAT GTTGGCGTTG
 5281 TTAATATGCG CGATTCTCAA TTAAGCCCTA CTGTTGAGCG TTGGCTTTAT ACTGGTAAGA
 5341 ATTTGTATAA CGCATATGAT ACTAAACAGG CTTTTCCTAG TAATTATGAT TCCGGTGTCT
 5401 ATCTTATATT AAGCCCTTAT TTATCACAGG GTCGGTATTT CAAACCATAA AATTAGGTC
 5461 AGAAGATGAA ATTAACATAA ATATATTTGA AAAAGTTTTC TCGCGTTCTT TGTCTTCCGA
 5521 TTGGATTGTC ATCAGCATTT ACATAEAGTT ATATAACCA ACCTAAGCCG GAGGTTAAAA
 5581 AGGTAGTCTC TCAGACCTAT GATTTTGATA AATTCAGTAT TGACTCTTCT CAGCGTCTTA
 5641 ATCTAAGCTA TCGCTATGTT TTCAAGGATT CTAAGGGAAA ATTAATTAAT AGCGACGATT
 5701 TACAGAAGCA AGGTATATCA CTCACATATA TTGATTATG TACTGTTCC AATAAAAAAG
 5761 GTAATTCAAA TGAATTGTT AATGTAAAT AATTTTGTG TCTTGATGTT TGTTCATCA
 5821 TCTTCTTTTG CTCAGGTAAT TGAATGAAT AATTCGCTC TGCCTGATT TGTAACTGG
 5881 TATTCAAGC AATCAGGCGA ATCCGTTATT GTTCTCCCG ATGTAAAAGG TACTGTTACT
 5941 GTATATTAT CTGACGTTAA ACCTGAAAT CTACGCAATT TCTTTATTT TGTTTTACGT
 6001 GCTAATAATT TTGATATGGT TGGTTCAATT CCTCCATAA TTCAGAATA TAATCCAAAC
 6061 AATCAGGATT ATATTGATGA ATTGCCATCA TCTGATAATC AGGAATATGA TGATAATTCC
 6121 GCTCCTCTG GTGGTTTCTT TGTTCCGCA AATGATAATG TTAATCAAAC TTTTAAAAAT
 6181 AATAACGTTG GGGCAAAGGA TTAATACGA GTTGTCGAAT TGTTTGATAA GTCTAATACT
 6241 TCTAATCCT CAAATGTATT ATCTATTGAC GGCCTAATC TATTAGTTGT TTCTGCACCT
 6301 AAAGATATT TAGATAACCT TCCTCAATC CTTTCTACTG TTGATTGTC AACTGACCAG
 6361 ATATTGATG AGGGTTTGT ATTTGAGGT CAGCAAGTG ATGCTTTAGA TTTTTCATT
 6421 GCTGCTGGCT CTCAGCGTGG CACTGTTGCA GCGGTGTTA ATACTGACCG CCTCACCTCT
 6481 GTTTTATCTT CTGCTGGTGG TTGTTCCGT ATTTTAAATG GCGATGTTT AGGGCTATCA
 6541 GTTCGCGCAT TAAAGACTAA TAGCCATTCA AAAATATTGT CTGTGCCAGG TATCTTACG
 6601 CTTTCAGGTC AGAAGGGTTC TATCTCTGTT GGCAGAAATG TCCCTTTTAT TACTGGTCGT
 6661 GTGACTGGTG AATCTGCCAA TGTAAATAAT CCATTTCAGA CGATTGAGCG TCAAAATGTA
 6721 GGTATTTCCTA TGAGCGTTTT TCCTGTTGCA ATGGCTGGCG GTAAATATTG TCTGGATATT
 6781 ACCAGCAAGG CCGATAGTTT GAGTTCTTCT ACTCAGGCAA GTGATGTTAT TACTAATCAA

10

20

30

40

【0 1 8 5】

【表 11-18】

(表120 系発⑦)

6841 AGAAGTATTG CTACAACGGT TAATTTGCGT GATGGACAGA CTCCTTTTACT CGGTGGCCTC
 6901 ACTGATTATA AAAACACTTC TCAAGATTCT GCGTACCGT TCCTGTCTAA AATCCCTTTA
 6961 ATCGGCCTCC TGTTTAGCTC CCGCTCTGAT TCCAACGAGG AAAGCACGTT ATACGTGCTC
 7021 GTCAAAGCAA CCATAGTACG CGCCCTGTAG CGCGGCATTA AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT
 7081 TACGCGCAGC GTGACCCTA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT
 7141 CCCTTCCTTT CTCGCCAGT TCGCCGCTT TCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC
 7201 TTTAGGCTTC CGATTTAGTG CTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTGGGTGA
 7261 TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCTTTGA CGTTGGAGTC
 7321 CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTCCA AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGG
 7381 CTATTTCTTT GATTATAAG GGATTTTGGC GATTTGCGAA CCACCATCAA ACAGGATTTT
 7441 CGCCTGCTGG GGCAAACCAG CGTGGACCGC TTGCTGCAAC TCTCTCAGGG CCAGGCGGTG
 7501 AAGGGCAATC AGCTGTGGC CGTCTCACTG GTGAAAAGAA AAACGACCCCT GGATCCAAAGC
 7561 TTGCAGGTGG CACTTTTCGG GGAATGTGC GCGGAACCCC TATTTGTTA TTTTCTAAA
 7621 TACATTCAAA TATGTATCCG CTCATGAGAC AATAACCGTG ATAAATGCTT CAATAATATT
 7681 GAAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT TCCGTGTCGC CCTTATCCC TTTTGTGGG
 7741 CATTTTGCCCT TCCTGTGTTT GCTCAGCCAG AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG
 7801 ATCAGTTGGG CGCAGAGTG GGTACATCG AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTTG
 7861 AGAGTTTTCG CCCGAAGAA CGTTTCCAA TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTC
 7921 ATACACTATT ATCCCTATT GACCCGCGGC AAGAGCAACT CGGTGCGCGG GCGCGGTATT
 7981 CTCAGATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA
 8041 CAGTAAGAGA ATTATGCACT GCTGCCATAA CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC
 8101 TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC
 8161 ATGTAACTCG CCTTGATCGT TGGGAACCGG ASCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC
 8221 GTGACACCAC GATGCCCTGA GCAATGCCAA CAACGTTGCG CAAACTATTA ACTGGCGAAC
 8281 TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA TAGACTGGAT GGAGGCGGAT AAGTTGCAG
 8341 GACCACTTCT GCGCTCGGCC CTTCGCGCTG GCTGGTTTAT TGCTGATAAA TCTGGAGCCG
 8401 GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG CACTGGGGCC AGATGGTAAG CCCTCCGTA
 8461 TCGTAGTTAT CTACACGAGG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG
 8521 CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAGCATT GGTAACGTGC AGACCAAGTT TACTCATATA
 8581 TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTT AATTAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCCTT
 8641 TTGATAATCT CATGACGAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTTC GTTCCACTGT ACGTAAGACC
 8701 CCCAAGCTTG TCGACTGAAT GCGGAATGGC GCTTTGCTG GTTCCGGA CCAGAAGCGG
 8761 TGCCGGAAG CTGGCTGGAG TCGATCTTC CTGAGGCCGA TACTGTCTG GTCCCTCAA
 8821 ACTGGCAGAT GCACGGTTAC GATCGGCCA TCTACACCA CGTAACCTAT CCCATTACGG
 8881 TCAATCCGCC GTTGTCTCC ACAGAGAATC CGACGGGTTG TTAAGTCTC ACATTTAATG
 8941 TTGATGAAAG CTGGCTACAG GAAGGCCAGA CGCGAATTAT TTTTGATGGC GTTCTTATG
 9001 GTTAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAAT TAACGCGAAT TTTAACAAA TATTACGTT
 9061 TACAATTTAA ATATTTGCTT ATACAATCTT CCTGTTTTG GGGCTTTCT GATTATCAAC
 9121 CGGGGTACAT ATGATTGACA TGCTAGTTT ACGATTACG TTCATCGATT CTCCTGTTG
 9181 CTCCAGACTC TCAGGCAATG ACCTGATAGC CTTGTAGAT CTCCTAAAA TAGCTACCTT
 9241 CTCCGCGATG AATTATCAG CTAGAACGGT TGAATATCAT ATTGATGGTG ATTTGACTGT
 9301 CTCCGGCCTT TCTACCCCTT TTGAATCTT ACCTACACAT TACTCAGGCA TTGCATTTAA
 9361 AATATATGAG GGTTCIAAAA ATTTTATCC TTGCGTTGAA ATAAAGGCTT CTCCGCAAA
 9421 AGTATTACAG GGTCAATAAG TTTTGTGAC AACCGATTGA GCTTATGCT CTGAGGCTTT
 9481 ATTGCTTAAT TTGCTAAT CTTCGCTTG CCGTATGAT TTATTGGATG TT

10

20

30

40

【0186】

【表 1 2 - 1】

表 200: 15以上のヒトGLGを切断するが、FR3中の5塩基認識を有する
ものがいずれかの西条系

代表的なエントリー

RName: 塩基

片 部位

GLGid#: 塩基# GLGid#: 塩基# GLGid#: 塩基# ...

BstEII Ggtacc 2

1: 3 48: 3

塩基 #3 で2ヒットがある

MaeIII gtnac 36

1: 4 2: 4 3: 4 4: 4 5: 4 6: 4
7: 4 8: 4 9: 4 10: 4 11: 4 37: 4
37: 58 38: 4 38: 58 39: 4 39: 58 40: 4
40: 58 41: 4 41: 58 42: 4 42: 58 43: 4
43: 58 44: 4 44: 58 45: 4 45: 58 46: 4
46: 58 47: 4 47: 58 48: 4 49: 4 50: 58

塩基 #4 で24ヒットがある

Tsp45I gtsac 33

1: 4 2: 4 3: 4 4: 4 5: 4 6: 4
7: 4 8: 4 9: 4 10: 4 11: 4 37: 4
37: 58 38: 4 38: 58 39: 58 40: 4 40: 58
41: 58 42: 58 43: 4 43: 58 44: 4 44: 58
45: 4 45: 58 46: 4 46: 58 47: 4 47: 58
48: 4 49: 4 50: 58

塩基 #4 で21ヒットがある

HphI tcacc 45

1: 5 2: 5 3: 5 4: 5 5: 5 6: 5
7: 5 8: 5 11: 5 12: 5 12: 11 13: 5
14: 5 15: 5 16: 5 17: 5 18: 5 19: 5
20: 5 21: 5 22: 5 23: 5 24: 5 25: 5
26: 5 27: 5 28: 5 29: 5 30: 5 31: 5
32: 5 33: 5 34: 5 35: 5 36: 5 37: 5
38: 5 40: 5 43: 5 44: 5 45: 5 46: 5
47: 5 48: 5 49: 5

塩基 #5 で44ヒットがある

【表 1 2 - 2】

(表 200 系表き①)

NlaIII CATG 26

1: 9	1: 42	2: 42	3: 9	3: 42	4: 9
4: 42	5: 9	5: 42	6: 42	6: 78	7: 9
7: 42	8: 21	8: 42	9: 42	10: 42	11: 42
12: 57	13: 48	13: 57	14: 57	31: 72	38: 9
48: 78	49: 78				

塩基 #42 で 11 ヒットがある。

塩基 #48 で 1 ヒットがある。不調和を起すこと得る

10

BsaJI Cnnngg 37

1: 14	2: 14	5: 14	6: 14	7: 14	8: 14
8: 65	9: 14	10: 14	11: 14	12: 14	13: 14
14: 14	15: 65	17: 14	17: 65	18: 65	19: 65
20: 65	21: 65	22: 65	26: 65	29: 65	30: 65
33: 65	34: 65	35: 65	37: 65	38: 65	39: 65
40: 65	42: 65	43: 65	48: 65	49: 65	50: 65
51: 14					

塩基 #65 で 23 ヒットがある。

塩基 #14 で 14 ヒットがある。

20

AluI AGct 42

1: 47	2: 47	3: 47	4: 47	5: 47	6: 47
7: 47	8: 47	9: 47	10: 47	11: 47	16: 63
23: 63	24: 63	25: 63	31: 63	32: 63	36: 63
<u>37: 47</u>	<u>37: 52</u>	<u>38: 47</u>	<u>38: 52</u>	<u>39: 47</u>	<u>39: 52</u>
<u>40: 47</u>	<u>40: 52</u>	<u>41: 47</u>	<u>41: 52</u>	<u>42: 47</u>	<u>42: 52</u>
<u>43: 47</u>	<u>43: 52</u>	<u>44: 47</u>	<u>44: 52</u>	<u>45: 47</u>	<u>45: 52</u>
<u>46: 47</u>	<u>46: 52</u>	<u>47: 47</u>	<u>47: 52</u>	49: 15	50: 47

塩基 #47 で 23 ヒットがある。

塩基 #52 で 11 ヒットがある。47 からの 5 塩基のみ

BlpI GCtnagc 21

1: 48	2: 48	3: 48	5: 48	6: 48	7: 48
8: 48	9: 48	10: 48	11: 48	37: 48	38: 48
39: 48	40: 48	41: 48	42: 48	43: 48	44: 48
45: 48	46: 48	47: 48			

塩基 #48 で 21 ヒットがある。

30

40

【0 1 8 8】

【表 1 2 - 3】

(表 200 続き②)

MwoI GCNNNNNnggc 19
 1: 48 2: 28 19: 36 22: 36 23: 36 24: 36
 25: 36 26: 36 35: 36 37: 67 39: 67 40: 67
 41: 67 42: 67 43: 67 44: 67 45: 67 46: 67
 47: 67

塩基 # 67 で 10 ヒットがある

塩基 # 36 で 7 ヒットがある。

DdeI Ctnag 71
 1: 49 1: 58 2: 49 2: 58 3: 49 3: 58
 3: 65 4: 49 4: 58 5: 49 5: 58 5: 65
 6: 49 6: 58 6: 65 7: 49 7: 58 7: 65
 8: 49 8: 58 9: 49 9: 58 9: 65 10: 49
 10: 58 10: 65 11: 49 11: 58 11: 65 15: 58
 16: 58 16: 65 17: 58 18: 58 20: 58 21: 58
 22: 58 23: 58 23: 65 24: 58 24: 65 25: 58
 25: 65 26: 58 27: 58 27: 65 28: 58 30: 58
 31: 58 31: 65 32: 58 32: 65 35: 58 36: 58
 36: 65 37: 49 38: 49 39: 26 39: 49 40: 49
 41: 49 42: 26 42: 49 43: 49 44: 49 45: 49
 46: 49 47: 49 48: 12 49: 12 51: 65

塩基 # 58 で 29 ヒットがある。

塩基 # 49 で 22 ヒットがある。58 からの 9 塩基のみ。

塩基 # 65 で 16 ヒットがある。58 からの 7 塩基のみ。

BglII Agatct 11
 1: 61 2: 61 3: 61 4: 61 5: 61 6: 61
 7: 61 9: 61 10: 61 11: 61 51: 47

塩基 # 61 で 10 ヒットがある。

BstYI Rgacgc 12
 1: 61 2: 61 3: 61 4: 61 5: 61 6: 61
 7: 61 8: 61 9: 61 10: 61 11: 61 51: 47

塩基 # 61 で 11 ヒットがある。

【0 1 8 9】

10

20

30

40

【表 1 2 - 4】

(表 200 続き③)

Hpy188I TCNGa

17

1: 64 2: 64 3: 64 4: 64 5: 64 6: 64
 7: 64 8: 64 9: 64 10: 64 11: 64 16: 57
 20: 57 27: 57 35: 57 48: 67 49: 67

塩基 # 6 4 で 1 1 ヒットがある。

塩基 # 5 7 で 4 ヒットがある。

塩基 # 6 7 で 2 ヒットがある。不調和であり得る。

MslI CAXNNnnRTG

44

1: 72 2: 72 3: 72 4: 72 5: 72 6: 72
 7: 72 8: 72 9: 72 10: 72 11: 72 15: 72
 17: 72 18: 72 19: 72 21: 72 23: 72 24: 72
 25: 72 26: 72 28: 72 29: 72 30: 72 31: 72
 32: 72 33: 72 34: 72 35: 72 36: 72 37: 72
 38: 72 39: 72 40: 72 41: 72 42: 72 43: 72
 44: 72 45: 72 46: 72 47: 72 48: 72 49: 72
 50: 72 51: 72

塩基 # 7 2 で 4 4 ヒットがある。

BclII CGRYcg

23

1: 74 3: 74 4: 74 5: 74 7: 74 8: 74
 9: 74 10: 74 11: 74 17: 74 22: 74 30: 74
 33: 74 34: 74 37: 74 38: 74 39: 74 40: 74
 41: 74 42: 74 45: 74 46: 74 47: 74

塩基 # 7 4 で 2 3 ヒットがある。

EaeI Yggcor

23

1: 74 3: 74 4: 74 5: 74 7: 74 8: 74
 9: 74 10: 74 11: 74 17: 74 22: 74 30: 74
 33: 74 34: 74 37: 74 38: 74 39: 74 40: 74
 41: 74 42: 74 45: 74 46: 74 47: 74

塩基 # 7 4 で 2 3 ヒットがある。

EagI Cggcgg

23

1: 74 3: 74 4: 74 5: 74 7: 74 8: 74
 9: 74 10: 74 11: 74 17: 74 22: 74 30: 74

【0 1 9 0】

【表 1 2 - 5】

(表 200 続き④)

33: 74 34: 74 37: 74 38: 74 39: 74 40: 74

41: 74 42: 74 45: 74 46: 74 47: 74

塩基 # 7 4 で 2 3 ヒットがある。

HaeIII GGcc

27

1: 75 3: 75 4: 75 5: 75 7: 75 8: 75

9: 75 10: 75 11: 75 16: 75 17: 75 20: 75

22: 75 30: 75 33: 75 34: 75 37: 75 38: 75

39: 75 40: 75 41: 75 42: 75 45: 75 46: 75

47: 75 48: 63 49: 63

塩基 # 7 5 で 2 5 ヒットがある。

Bst4CY ACNgt 65°C

63 部位 第3のイソ制限酵素の位置

1: 86 2: 86 3: 86 4: 86 5: 86 6: 86

7: 34 7: 86 8: 86 9: 86 10: 86 11: 86

12: 86 13: 86 14: 86 15: 36 15: 86 16: 53

16: 86 17: 36 17: 86 18: 86 19: 86 20: 53

20: 86 21: 36 21: 86 22: 0 22: 86 23: 86

24: 86 25: 86 26: 86 27: 53 27: 86 28: 36

28: 86 29: 86 30: 86 31: 86 32: 86 33: 36

33: 86 34: 86 35: 53 35: 86 36: 86 37: 86

38: 86 39: 86 40: 86 41: 86 42: 86 43: 86

44: 86 45: 86 46: 86 47: 86 48: 86 49: 86

50: 86 51: 0 51: 86

塩基 # 8 6 で 5 1 ヒットがある。他の部位は良く離れている。

BpyCH4III ACNgt

63

1: 86 2: 86 3: 86 4: 86 5: 86 6: 86

7: 34 7: 86 8: 86 9: 86 10: 86 11: 86

12: 86 13: 86 14: 86 15: 36 15: 86 16: 53

16: 86 17: 36 17: 86 18: 86 19: 86 20: 53

20: 86 21: 36 21: 86 22: 0 22: 86 23: 86

24: 86 25: 86 26: 86 27: 53 27: 86 28: 36

28: 86 29: 86 30: 86 31: 86 32: 86 33: 36

33: 86 34: 86 35: 53 35: 86 36: 86 37: 86

38: 86 39: 86 40: 86 41: 86 42: 86 43: 86

【0 1 9 1】

【表 1 2 - 6】

(表 200 続き⑤)

44: 86 45: 86 46: 86 47: 86 48: 86 49: 86
 50: 86 51: 0 51: 86

塩基 # 8 6 で 5 1 ヒットがある。

HinfI Gantc 43
 2: 2 3: 2 4: 2 5: 2 6: 2 7: 2
 8: 2 9: 2 9: 22 10: 2 11: 2 15: 2
 16: 2 17: 2 18: 2 19: 2 19: 22 20: 2
 21: 2 23: 2 24: 2 25: 2 26: 2 27: 2
 28: 2 29: 2 30: 2 31: 2 32: 2 33: 2
 33: 22 34: 22 35: 2 36: 2 37: 2 38: 2
 40: 2 43: 2 44: 2 45: 2 46: 2 47: 2
 50: 60

塩基 # 2 で 3 8 ヒットがある。

MlyI GAGTCNNNNNn 18
 2: 2 3: 2 4: 2 5: 2 6: 2 7: 2
 8: 2 9: 2 10: 2 11: 2 37: 2 38: 2
 40: 2 43: 2 44: 2 45: 2 46: 2 47: 2

塩基 # 2 で 1 8 ヒットがある。

PleI gagtc 18
 2: 2 3: 2 4: 2 5: 2 6: 2 7: 2
 8: 2 9: 2 10: 2 11: 2 37: 2 38: 2
 40: 2 43: 2 44: 2 45: 2 46: 2 47: 2

塩基 # 2 で 1 8 ヒットがある。

AclI Cagc 24
 2: 26 9: 14 10: 14 11: 14 27: 74 37: 62
 37: 65 38: 62 39: 65 40: 62 40: 65 41: 65
 42: 65 43: 62 43: 65 44: 62 44: 65 45: 62
 46: 62 47: 62 47: 65 48: 35 48: 74 49: 74

塩基 # 6 2 で 8 ヒットがある。

塩基 # 6 5 で 8 ヒットがある。

塩基 # 1 4 で 3 ヒットがある。

塩基 # 7 4 で 3 ヒットがある。

塩基 # 2 6 で 1 ヒットがある。

塩基 # 3 5 で 1 ヒットがある。

【0 1 9 2】

10

20

30

40

【表 1 2 - 7】

(表 200 系統⑥)

-- Gagg 11
8: 91 9: 16 10: 16 11: 16 37: 67 39: 67
40: 67 42: 67 43: 67 45: 67 46: 67

10

塩基# 67で7ヒットがある。

塩基# 16で3ヒットがある。

塩基# 91で1ヒットがある。

BclHKAI GWGCWc 20
2: 30 4: 30 6: 30 7: 30 9: 30 10: 30
12: 89 13: 89 14: 89 37: 51 38: 51 39: 51
40: 51 41: 51 42: 51 43: 51 44: 51 45: 51
46: 51 47: 51

塩基# 51で11ヒットがある。

Bsp1286I GDGCHc 20
2: 30 4: 30 6: 30 7: 30 9: 30 10: 30
12: 89 13: 89 14: 89 37: 51 38: 51 39: 51
40: 51 41: 51 42: 51 43: 51 44: 51 45: 51
46: 51 47: 51

20

塩基# 51で11ヒットがある。

HglAI GWGCWc 20
2: 30 4: 30 6: 30 7: 30 9: 30 10: 30
12: 89 13: 89 14: 89 37: 51 38: 51 39: 51
40: 51 41: 51 42: 51 43: 51 44: 51 45: 51
46: 51 47: 51

塩基# 51で11ヒットがある。

BsoFI GCngc 26
2: 53 3: 53 5: 53 6: 53 7: 53 8: 53
9: 51 9: 53 10: 53 11: 53 31: 53 36: 36
37: 64 39: 64 40: 64 41: 64 42: 64 43: 64
44: 64 45: 64 46: 64 47: 64 48: 53 49: 53
50: 45 51: 53

30

塩基# 53で13ヒットがある。

塩基# 64で10ヒットがある。

TseI Gcwgc 17
2: 53 3: 53 5: 53 6: 53 7: 53 8: 53

40

【0 1 9 3】

【表 1 2 - 8】

(表 200 続き⑦)

9: 53 10: 53 11: 53 31: 53 36: 36 45: 64
 46: 64 48: 53 49: 53 50: 45 51: 53

塩基 # 53 で 13 ヒットがある

MnlI gagg 34
 3: 67 3: 95 4: 51 5: 16 5: 67 6: 67
 7: 67 8: 67 9: 67 10: 67 11: 67 13: 67
 16: 67 17: 67 19: 67 20: 67 21: 67 22: 67
 23: 67 24: 67 25: 67 26: 67 27: 67 28: 67
 29: 67 30: 67 31: 67 32: 67 33: 67 34: 67
 35: 67 36: 67 50: 67 51: 67

塩基 # 67 で 31 ヒットがある。

HpyCH4V TGen 34
 5: 90 6: 90 11: 90 12: 90 13: 90 14: 90
 15: 44 16: 44 16: 90 17: 44 18: 90 19: 44
 20: 44 21: 44 22: 44 23: 44 24: 44 25: 44
 26: 44 27: 44 27: 90 28: 44 29: 44 33: 44
 34: 44 35: 44 35: 90 36: 38 48: 44 49: 44
 50: 44 50: 90 51: 44 51: 52

塩基 # 44 で 21 ヒットがある。

塩基 # 52 で 1 ヒットがある。

AccI Glnkac 13 5塩基認識
 7: 37 11: 24 37: 16 38: 16 39: 16 40: 16
 41: 16 42: 16 43: 16 44: 16 45: 16 46: 16
 47: 16

塩基 # 16 で 1 ヒットがある。

SacII CCGCgg 8 6塩基認識
 9: 14 10: 14 11: 14 37: 65 39: 65 40: 65
 42: 65 43: 65

塩基 # 65 で 5 ヒットがある。

塩基 # 14 で 3 ヒットがある。

TfiI Gawtc 24
 9: 22 15: 2 16: 2 17: 2 18: 2 19: 2
 19: 22 20: 2 21: 2 23: 2 24: 2 25: 2

【0 1 9 4】

【表 1 2 - 9】

(表 200 系発(8))

26: 2 27: 2 28: 2 29: 2 30: 2 31: 2
 32: 2 33: 2 33: 22 34: 22 35: 2 36: 2

塩基#2で20ヒットがある。

BamAI Nnnnnngagac 19
 15: 11 16: 11 20: 11 21: 11 22: 11 23: 11
 24: 11 25: 11 26: 11 27: 11 28: 11 28: 56
 30: 11 31: 11 32: 11 35: 11 36: 11 44: 87
 48: 87

塩基#11で16ヒットがある。

BpmI ctccag 19
 15: 12 16: 12 17: 12 18: 12 20: 12 21: 12
 22: 12 23: 12 24: 12 25: 12 26: 12 27: 12
 28: 12 30: 12 31: 12 32: 12 34: 12 35: 12
 36: 12

塩基#12で19ヒットがある。

XmnI GAANNnttc 12
 37: 30 38: 30 39: 30 40: 30 41: 30 42: 30
 43: 30 44: 30 45: 30 46: 30 47: 30 50: 30

塩基#30で12ヒットがある

BsrI NCcagt 12
 37: 32 38: 32 39: 32 40: 32 41: 32 42: 32
 43: 32 44: 32 45: 32 46: 32 47: 32 50: 32

塩基#32で12ヒットがある。

BanII GRGcYc 11
 37: 51 38: 51 39: 51 40: 51 41: 51 42: 51
 43: 51 44: 51 45: 51 46: 51 47: 51

塩基#51で11ヒットがある。

Ecl136I GAGctc 11
 37: 51 38: 51 39: 51 40: 51 41: 51 42: 51
 43: 51 44: 51 45: 51 46: 51 47: 51

塩基#51で11ヒットがある。

SacI GAGCTc 11
 37: 51 38: 51 39: 51 40: 51 41: 51 42: 51
 43: 51 44: 51 45: 51 46: 51 47: 51

塩基#51で11ヒットがある。

【0 1 9 5】

10

20

30

40

【表 1 3】

表206: 潜在的切断部位の位置を示すヒト重鎖の合成3-23 FR3

合成遺伝子において処理された部位を大文字DNAで、垂直棒(|) X b a I | のように示す。

GLGにおいて頻繁に見出されるRERSは、合成配列の下に名前の右側に示される (g t nにおいて、a c=Mae I I I (24) のように示され、これは、51のGLGの24が部位を含むことを示す)。

新発見の DNA

FR3
89 90 (合成 3-23 に
R F おける コドン 井)
|cgc|ttc| 6
|cgn|ttg|
|agr|
ga ttc = HinfI (39)
ga gtc = PstI (18)
ga wtc = TfiI (20)
gtm ac = MaeIII (24)
gcs ac = Tsp45I (21)
tc acc = BphI (44)

FR3

91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M
act atc TCT AGA gac aac tct aag aat act ctc tac ttg cag atg	51													
allowed acn ath tcn cgn gay aay tcn aar aay acn ttr tay ttr car atg														
agy agr														
ga gac = BsaAI (16)														ag ct = AluI (23)
c tcc ag = BpmI (19)														g ctm agc = Alpi (21)
g aan nnn ttc = XmaI (12)														
tg ca = BpyCH4V (21)														
XbaI														

FR3

106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K
aac agc TTA AGg gct gag gac act GCA Gtc tac tat tgc gct aaa	96													
allowed aay tcn ttr cgn gcn gar gay acn gcn gtt tay tay tgy gcn aar														
agy ctn agr														
cc nng g = BsaVI (23)														ac ngt = Bst4GI (51)
aga tct = BglII (10)														ac ngt = BpyCH4II (51)
Rga tcy = BstXI (11)														ac ngt = TaaI (51)
c ayn nnn rto = MliI (44)														
cg ryc g = BsiEI (23)														
yg gcc r = HaeI (23)														
cg gcc g = BglI (23)														
lg gcc = HaeIII (25)														
gag g = MniI (31)														
PstI														
AFIII														

【表 1 4 - 1】

表217: ヒト HCGLGFR1 配列
VH1- スケルトン配列整列

VH1	
1-02	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC
1-03	cag gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act
1-08	cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc
1-18	cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc
1-24	cag gtc cag ctg gta cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ttc act
1-45	cag atg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag act ggg tcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc acc
1-46	cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc
1-58	caA atg cag ctg gtg cag tct ggg cct gag gtg aag aag cct ggg acc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ttc acc ttt act
1-69	cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga gcc acc ttc agc
1-a	cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga gcc acc ttc agc
1-f	cag gtc cag ctg gta cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gct tca gtg aag atc tcc tgc aag gtt tct gga tac acc ttc acc
VH2	
2-05	CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC CTC ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC AGC
2-26	cag gtc acc ttg aag gag tct ggt cct gtg ctg gtg aaa ccc aca gag acc ctc acg ctg acc tgc acc gtc tct ggg ttc tca ctc agc
2-70	cag gtc acc ttg aag gag tct ggt cct gcg ctg gtg aaa ccc aca gag acc ctc aca ctg acc tgc acc ttc tct ggg ttc tca ctc agc
VH3	
3-07	GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT
3-09	gaA gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agy tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat
3-11	Cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag cct gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-13	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-15	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt
3-20	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct ggg ggg tcc ctg aga

【0 1 9 7】

【表 1 4 - 2】

	ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt GAt
3-21	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc Ctg gtc Aag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-23	gag gtg cag ctg Ttg gag tct ggg gga ggc ttg gTAA cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agC
3-30	Cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc Gtg gtc cag cct ggg Agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-30.3	Cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc Gtg gtc cag cct ggg Agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-30.5	Cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc Gtg gtc cag cct ggg Agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-33	Cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc Gtg gtc cag cct ggg Agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-43	gAA gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gTc Gtg gTAA cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt GAt
3-48	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gTAA cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-49	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gTAA cag cAA ggg Cgg tcc ctg aga ctc tcc tgt Aca gCT tct gga ttc acc ttt Ggt
3-53	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg ATc cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc acc GtC agt
3-64	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-66	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc GtC agt
3-72	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-73	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg tcc ctg aAA ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc acc ttc agt
3-74	gag gtg cag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tTA gTt cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt
3-d	gag gtg cag ctg gtg gag tct Cgg gga gTc ttg gTAA cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc GtC agt
VH4	
4-04	CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GGG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC
4-28	cag gtg cag ctg cag gag teg ggc cca gga ctg gtg aag cct teg gAC acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt TAA tcc atc agc
4-30.1	cag gtg cag ctg cag gag teg ggc cca gga ctg gtg aag cct tca CAg acc ctg tcc ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc atc agc
4-30.2	cag Ctg cag ctg cag gag tcc ggc TcA gga ctg gtg aag cct tca CAg acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ggc tcc atc agc
4-30.4	cag gtg cag ctg cag gag teg ggc cca gga ctg gtg aag cct tca CAg acc ctg tcc ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc atc agc

10

20

30

【 0 1 9 8 】

【表 1 4 - 3】

4-31 cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg g'g aag cct tca CAg acc ctg tcc
ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc atc agc

4-34 cag gtg cag cTA cag Cag tGg ggc Gca gga ctg Ttg aag cct tcg gAg acc ctg tcc
ctc acc tgc gct gtc tAt ggt ggG tcc Ttc agT

4-39 cag Ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gAg acc ctg tcc
ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc atc agc

4-59 cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gAg acc ctg tcc
ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc atc agT

4-61 cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gAg acc ctg tcc
ctc acc tgc Act gtc tct ggt ggc tcc Gtc agc

4-b cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gAg acc ctg tcc
ctc acc tgc gct gtc tct ggt TAc tcc atc agc

VH5

5-51 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG
ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC

5-a gAA gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag tct ctg aGg
atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc

VH6

6-1 CAG GZA CAG CTG CAG CAG TCA GGT CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG CAG ACC CTC TCA
CTC ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT GTC TCT

VH7

7-4.1 CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG
GTT TCC TCC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT

10

20

30

40

【表 15-1】

表220: 少なくとも20の GLG 切断があるヒト HC GLG FR1 における RERS 配列

BsgI	GTGCAG				71	(右に16/14塩基を切断)					
1:	4	1:	13	2:	13	3:	4	3:	13	4:	13
6:	13	7:	4	7:	13	8:	13	9:	4	9:	13
10:	4	10:	13	15:	4	15:	65	16:	4	16:	65
17:	4	17:	65	18:	4	18:	65	19:	4	19:	65
20:	4	20:	65	21:	4	21:	65	22:	4	22:	65
23:	4	23:	65	24:	4	24:	65	25:	4	25:	65
26:	4	26:	65	27:	4	27:	65	28:	4	28:	65
29:	4	30:	4	30:	65	31:	4	31:	65	32:	4
32:	65	33:	4	33:	65	34:	4	34:	65	35:	4
35:	65	36:	4	36:	65	37:	4	38:	4	39:	4
41:	4	42:	4	43:	4	45:	4	46:	4	47:	4
48:	4	48:	13	49:	4	49:	13	51:	4		

塩基番号41において39のヒットがある

塩基番号65において21のヒットがある

-"- ctgcac				9			
12: 63	13: 63	14: 63	39: 63	41: 63	42: 63		
44: 63	45: 63	46: 63					
BbvI GCAGC				65			
1: 6	3: 6	6: 6	7: 6	8: 6	9: 6		
10: 6	15: 6	15: 67	16: 6	16: 67	17: 6		
17: 67	18: 6	18: 67	19: 6	19: 67	20: 6		
20: 67	21: 6	21: 67	22: 6	22: 67	23: 6		
23: 67	24: 6	24: 67	25: 6	25: 67	26: 6		
26: 67	27: 6	27: 67	28: 6	28: 67	29: 6		
30: 6	30: 67	31: 6	31: 67	32: 6	32: 67		
33: 6	33: 67	34: 6	34: 67	35: 6	35: 67		
36: 6	36: 67	37: 6	38: 6	39: 6	40: 6		
41: 6	42: 6	43: 6	44: 6	45: 6	46: 6		
47: 6	48: 6	49: 6	50: 12	51: 6			

塩基番号61において43のヒットがある 太字の部位は、非常に近い部位 以下に列挙

塩基番号67において21のヒットがある

-"- gctgc				13							
37:	9	38:	9	39:	9	40:	3	40:	9	41:	9
42:	9	44:	3	44:	9	45:	9	46:	9	47:	9

【0200】

10

20

30

40

【表 15-2】

50: 9

塩基番号9において11のヒットがある

BsoFI GCngc

78

1: 6	3: 6	6: 6	7: 6	8: 6	9: 6
10: 6	15: 6	15: 67	16: 6	16: 67	17: 6
17: 67	18: 6	18: 67	19: 6	19: 67	20: 6
20: 67	21: 6	21: 67	22: 6	22: 67	23: 6
23: 67	24: 6	24: 67	25: 6	25: 67	26: 6
26: 67	27: 6	27: 67	28: 6	28: 67	29: 6
30: 6	30: 67	31: 6	31: 67	32: 6	32: 67
33: 6	33: 67	34: 6	34: 67	35: 6	35: 67
36: 6	36: 67	37: 6	37: 9	38: 6	38: 9
39: 6	39: 9	40: 3	40: 6	40: 9	41: 6
41: 9	42: 6	42: 9	43: 6	44: 3	44: 6
44: 9	45: 6	45: 9	46: 6	46: 9	47: 6
47: 9	48: 6	49: 6	50: 9	50: 12	51: 6

塩基番号6において43のヒットがある これらは、しばしば一緒に生じる

塩基番号9において11のヒットがある

塩基番号3において2のヒットがある

塩基番号67において21のヒットがある

TseI Gwgc

78

1: 6	3: 6	6: 6	7: 6	8: 6	9: 6
10: 6	15: 6	15: 67	16: 6	16: 67	17: 6
17: 67	18: 6	18: 67	19: 6	19: 67	20: 6
20: 67	21: 6	21: 67	22: 6	22: 67	23: 6
23: 67	24: 6	24: 67	25: 6	25: 67	26: 6
26: 67	27: 6	27: 67	28: 6	28: 67	29: 6
30: 6	30: 67	31: 6	31: 67	32: 6	32: 67
33: 6	33: 67	34: 6	34: 67	35: 6	35: 67
36: 6	36: 67	37: 6	37: 9	38: 6	38: 9
39: 6	39: 9	40: 3	40: 6	40: 9	41: 6
41: 9	42: 6	42: 9	43: 6	44: 3	44: 6
44: 9	45: 6	45: 9	46: 6	46: 9	47: 6
47: 9	48: 6	49: 6	50: 9	50: 12	51: 6

塩基番号6において43のヒットがある しばしばいっしょである

塩基番号9において11のヒットがある

【0201】

10

20

30

40

【表 15-3】

塩基番号3において2のヒットがある
 塩基番号12において1のヒットがある
 塩基番号67において21のヒットがある

MspAII CMGckg						
48						
1: 7	3: 7	4: 7	5: 7	6: 7	7: 7	
8: 7	9: 7	10: 7	11: 7	15: 7	16: 7	
17: 7	18: 7	19: 7	20: 7	21: 7	22: 7	
23: 7	24: 7	25: 7	26: 7	27: 7	28: 7	
29: 7	30: 7	31: 7	32: 7	33: 7	34: 7	
35: 7	36: 7	37: 7	38: 7	39: 7	40: 1	
40: 7	41: 7	42: 7	44: 1	44: 7	45: 7	
46: 7	47: 7	48: 7	49: 7	50: 7	51: 7	

塩基番号7において46のヒットがある

PvaII CAGctg						
48						
1: 7	3: 7	4: 7	5: 7	6: 7	7: 7	
8: 7	9: 7	10: 7	11: 7	15: 7	16: 7	
17: 7	18: 7	19: 7	20: 7	21: 7	22: 7	
23: 7	24: 7	25: 7	26: 7	27: 7	28: 7	
29: 7	30: 7	31: 7	32: 7	33: 7	34: 7	
35: 7	36: 7	37: 7	38: 7	39: 7	40: 1	
40: 7	41: 7	42: 7	44: 1	44: 7	45: 7	
46: 7	47: 7	48: 7	49: 7	50: 7	51: 7	

塩基番号7において46のヒットがある
 塩基番号1において2のヒットがある

AluI AGct					
54					
1: 8	2: 8	3: 8	4: 8	4: 24	5: 8
6: 8	7: 8	8: 8	9: 8	10: 8	11: 8
15: 8	16: 8	17: 8	18: 8	19: 8	20: 8
21: 8	22: 8	23: 8	24: 8	25: 8	26: 8
27: 8	28: 8	29: 8	29: 69	30: 8	31: 8
32: 8	33: 8	34: 8	35: 8	36: 8	37: 8
38: 8	39: 8	40: 2	40: 8	41: 8	42: 8
43: 8	44: 2	44: 8	45: 8	46: 8	47: 8
48: 8	48: 82	49: 8	49: 82	50: 8	51: 8

塩基番号8において48のヒットがある

【表 15-4】

塩基番号2において2のヒットがある

DdeI Ctnag		48			
1: 26	1: 48	2: 26	2: 48	3: 26	3: 48
4: 26	4: 48	5: 26	5: 48	6: 26	6: 48
7: 26	7: 48	8: 26	8: 48	9: 26	10: 26
11: 26	12: 85	13: 85	14: 85	15: 52	16: 52
17: 52	18: 52	19: 52	20: 52	21: 52	22: 52
23: 52	24: 52	25: 52	26: 52	27: 52	28: 52
29: 52	30: 52	31: 52	32: 52	33: 52	35: 30
35: 52	36: 52	40: 24	49: 52	51: 26	51: 48

塩基番号52において22のヒットがある 52と48は決して一緒ではない

塩基番号48において9のヒットがある

塩基番号26において12のヒットがある 26と24は決して一緒ではない

BphI tcacc		42			
1: 86	3: 86	6: 86	7: 86	8: 80	11: 86
12: 5	13: 5	14: 5	15: 80	16: 80	17: 80
18: 80	20: 80	21: 80	22: 80	23: 80	24: 80
25: 80	26: 80	27: 80	28: 80	29: 80	30: 80
31: 80	32: 80	33: 80	34: 80	35: 80	36: 80
37: 59	38: 59	39: 59	40: 59	41: 59	42: 59
43: 59	44: 59	45: 59	46: 59	47: 59	50: 59

塩基番号80において22のヒットがある 80と86は決して一緒ではない

塩基番号86において5のヒットがある

塩基番号59において12のヒットがある

BsaKI Ncngg		50			
1: 39	2: 39	3: 39	4: 39	5: 39	7: 39
8: 39	9: 39	10: 39	11: 39	15: 39	16: 39
17: 39	18: 39	19: 39	20: 39	21: 29	21: 39
22: 39	23: 39	24: 39	25: 39	26: 39	27: 39
28: 39	29: 39	30: 39	31: 39	32: 39	33: 39
34: 39	35: 19	35: 39	36: 39	37: 24	38: 24
39: 24	41: 24	42: 24	44: 24	45: 24	46: 24
47: 24	<u>48: 39</u>	<u>48: 40</u>	<u>49: 39</u>	<u>49: 40</u>	50: 24
50: 73	51: 39				

塩基番号39において35のヒットがある 39と40は2回一緒に生じる

塩基番号40において2のヒットがある

【表 15-5】

BsaJI Ccngg						47
1: 40	2: 40	3: 40	4: 40	5: 40	7: 40	
8: 40	9: 40	9: 47	10: 40	10: 47	11: 40	
15: 40	18: 40	19: 40	20: 40	21: 40	22: 40	
23: 40	24: 40	25: 40	26: 40	27: 40	28: 40	
29: 40	30: 40	31: 40	32: 40	34: 40	35: 20	
35: 40	36: 40	37: 24	38: 24	39: 24	41: 24	
42: 24	44: 24	45: 24	46: 24	47: 24	<u>48: 40</u>	
<u>48: 41</u>	<u>49: 40</u>	<u>49: 41</u>	50: 74	51: 40		

塩基番号40において32のヒットがある 40と41は2回一緒に生じる

塩基番号41において2のヒットがある

塩基番号24において9のヒットがある

塩基番号47において2のヒットがある

BstNI CCwgg						44
PspGI ccwgg						
ScrFI (\$N-HpaII) CCwgg						
1: 40	2: 40	3: 40	4: 40	5: 40	7: 40	
8: 40	9: 40	10: 40	11: 40	15: 40	16: 40	
17: 40	18: 40	19: 40	20: 40	21: 30	21: 40	
22: 40	23: 40	24: 40	25: 40	26: 40	27: 40	
28: 40	29: 40	30: 40	31: 40	32: 40	33: 40	
34: 40	35: 40	36: 40	37: 25	38: 25	39: 25	
41: 25	42: 25	44: 25	45: 25	46: 25	47: 25	
50: 25	51: 40					

塩基番号40において33のヒットがある

ScrFI CCngg						50
1: 40	2: 40	3: 40	4: 40	5: 40	7: 40	
8: 40	9: 40	10: 40	11: 40	15: 40	16: 40	
17: 40	18: 40	19: 40	20: 40	21: 30	21: 40	
22: 40	23: 40	24: 40	25: 40	26: 40	27: 40	
28: 40	29: 40	30: 40	31: 40	32: 40	33: 40	
34: 40	35: 20	35: 40	36: 40	37: 25	38: 25	
39: 25	41: 25	42: 25	44: 25	45: 25	46: 25	
47: 25	48: 40	48: 41	49: 40	49: 41	50: 25	
50: 74	51: 40					

塩基番号40において35のヒットがある

【表 15-6】

塩基番号41において2のヒットがある

EcoO109I RGNccy 34
 1: 43 2: 43 3: 43 4: 43 5: 43 6: 43
 7: 43 8: 43 9: 43 10: 43 15: 46 16: 46
 17: 46 18: 46 19: 46 20: 46 21: 46 22: 46
 23: 46 24: 46 25: 46 26: 46 27: 46 28: 46
 30: 46 31: 46 32: 46 33: 46 34: 46 35: 46
 36: 46 37: 46 43: 79 51: 43

塩基番号46において22のヒットがある 46と43は決して一緒ではない

塩基番号43において11のヒットがある

NlaIV GGNcc 71
 1: 43 2: 43 3: 43 4: 43 5: 43 6: 43
 7: 43 8: 43 9: 43 9: 79 10: 43 10: 79
15: 46 15: 47 16: 47 17: 46 17: 47 18: 46
18: 47 19: 46 19: 47 20: 46 20: 47 21: 46
21: 47 22: 46 22: 47 23: 47 24: 47 25: 47
26: 47 27: 46 27: 47 28: 46 28: 47 29: 47
30: 46 30: 47 31: 46 31: 47 32: 46 32: 47
33: 46 33: 47 34: 46 34: 47 35: 46 35: 47
36: 46 36: 47 37: 21 37: 46 37: 47 37: 79
 38: 21 39: 21 39: 79 40: 79 41: 21 41: 79
 42: 21 42: 79 43: 79 44: 21 44: 79 45: 21
 45: 79 46: 21 46: 79 47: 21 51: 43

塩基番号47において23のヒットがある 46と47はしばしば一緒である

塩基番号46において17のヒットがある 塩基番号43において11のヒットがある

Sau96I Ggncc 70
 1: 44 2: 3 2: 44 3: 44 4: 44 5: 3 5: 44 6: 44
 7: 44 8: 22 8: 44 9: 44 10: 44 11: 3 12: 22 13: 22
 14: 22 15: 33 15: 47 16: 47 17: 47 18: 47 19: 47 20: 47
 21: 47 22: 47 23: 33 23: 47 24: 33 24: 47 25: 33 25: 47
 26: 33 26: 47 27: 47 28: 47 29: 47 30: 47 31: 33 31: 47
 32: 33 32: 47 33: 33 33: 47 34: 33 34: 47 35: 47 36: 47
37: 21 37: 22 37: 47 38: 21 38: 22 39: 21 39: 22 41: 21
 41: 22 42: 21 42: 22 43: 80 44: 21 44: 22 45: 21 45: 22
 46: 21 46: 22 47: 21 47: 22 50: 22 51: 44

塩基番号47において23のヒットがある これらは一緒に生じない

塩基番号44において11のヒットがある

【表 15-7】

塩基番号22において14のヒットがある これらは一緒に生じない

塩基番号21において9のヒットがある

BsmAI GTCTCNnnnn 22
1: 58 3: 58 4: 58 5: 58 8: 58 9: 58
10: 58 13: 70 36: 18 37: 70 38: 70 39: 70
40: 70 41: 70 42: 70 44: 70 45: 70 46: 70
47: 70 48: 48 49: 48 50: 85

塩基番号70において11のヒットがある

-"- Nnnnnngagac 27
13: 40 15: 48 16: 48 17: 48 18: 48 20: 48
21: 48 22: 48 23: 48 24: 48 25: 48 26: 48
27: 48 28: 48 29: 48 30: 10 30: 48 31: 48
32: 48 33: 48 35: 48 36: 48 43: 40 44: 40
45: 40 46: 40 47: 40

塩基番号48において20のヒットがある

AvaII Ggwcc 44
Sau96I (\$M.HaeIII) Ggwcc 44
2: 3 5: 3 6: 44 8: 44 9: 44 10: 44
11: 3 12: 22 13: 22 14: 22 15: 33 15: 47
16: 47 17: 47 18: 47 19: 47 20: 47 21: 47
22: 47 23: 33 23: 47 24: 33 24: 47 25: 33
25: 47 26: 33 26: 47 27: 47 28: 47 29: 47
30: 47 31: 33 31: 47 32: 33 32: 47 33: 33
33: 47 34: 33 34: 47 35: 47 36: 47 37: 47
43: 80 50: 22

塩基番号47において23のヒットがある 44と47は決して一緒に生じない

塩基番号44において4のヒットがある

EpuMI Rggwccy 27
6: 43 8: 43 9: 43 10: 43 15: 46 16: 46
17: 46 18: 46 19: 46 20: 46 21: 46 22: 46
23: 46 24: 46 25: 46 26: 46 27: 46 28: 46
30: 46 31: 46 32: 46 33: 46 34: 46 35: 46
36: 46 37: 46 43: 79

塩基番号46において22のヒットがある 43と46は決して一緒に生じない

塩基番号43において4のヒットがある

【表 15-8】

BsmFI GGGAC 3
 8: 43 37: 46 50: 77
 gtccc 33
 15: 48 16: 48 17: 48 1: 0 1: 0 20: 48
 21: 48 22: 48 23: 48 24: 48 25: 48 26: 48
 27: 48 28: 48 29: 48 30: 48 31: 48 32: 48
 33: 48 34: 48 35: 48 36: 48 37: 54 38: 54
 39: 54 40: 54 41: 54 42: 54 43: 54 44: 54
 45: 54 46: 54 47: 54

塩基番号48において20のヒットがある

塩基番号54において11のヒットがある

HinfI Gantc 80
 8: 77 12: 16 13: 16 14: 16 15: 16 16: 56
 15: 77 16: 16 16: 56 16: 77 17: 16 17: 56
 17: 77 18: 16 18: 56 18: 77 19: 16 19: 56
 19: 77 20: 16 20: 56 20: 77 21: 16 21: 56
 21: 77 22: 16 22: 56 22: 77 23: 16 23: 56
 23: 77 24: 16 24: 56 24: 77 25: 16 25: 56
 25: 77 26: 16 26: 56 26: 77 27: 16 27: 56
 27: 56 27: 77 28: 16 28: 56 28: 77 29: 16
 29: 56 29: 77 30: 56 31: 16 31: 56 31: 77
 32: 16 32: 56 32: 77 33: 16 33: 56 33: 77
 34: 16 35: 16 35: 56 35: 77 36: 16 36: 56
 36: 56 36: 77 37: 16 38: 16 39: 16 40: 16
 41: 16 42: 16 44: 16 45: 16 46: 16 47: 16
 48: 46 49: 46

塩基番号16において34のヒットがある

TfiI Gawtc 21
 8: 77 15: 77 16: 77 17: 77 18: 77 19: 77
 20: 77 21: 77 22: 77 23: 77 24: 77 25: 77
 26: 77 27: 77 28: 77 29: 77 31: 77 32: 77
 33: 77 35: 77 36: 77

塩基番号77において21のヒットがある

【表 15-9】

MlyI GAGTC 38

12: 16	13: 16	14: 16	15: 16	16: 16	17: 16
18: 16	19: 16	20: 16	21: 16	22: 16	23: 16
24: 16	25: 16	26: 16	27: 16	27: 26	28: 16
29: 16	31: 16	32: 16	33: 16	34: 16	35: 16
36: 16	36: 26	37: 16	38: 16	39: 16	40: 16
41: 16	42: 16	44: 16	45: 16	46: 16	47: 16
48: 46	49: 46				

塩基番号16において34のヒットがある

-"- GACTC 21

15: 56	16: 56	17: 56	18: 56	19: 56	20: 56
21: 56	22: 56	23: 56	24: 56	25: 56	26: 56
27: 56	28: 56	29: 56	30: 56	31: 56	32: 56
33: 56	35: 56	36: 56			

塩基番号56において21のヒットがある

FleI gagtc 38

12: 16	13: 16	14: 16	15: 16	16: 16	17: 16
18: 16	19: 16	20: 16	21: 16	22: 16	23: 16
24: 16	25: 16	26: 16	27: 16	27: 26	28: 16
29: 16	31: 16	32: 16	33: 16	34: 16	35: 16
36: 16	36: 26	37: 16	38: 16	39: 16	40: 16
41: 16	42: 16	44: 16	45: 16	46: 16	47: 16
48: 46	49: 46				

塩基番号16において34のヒットがある

-"- gactc 21

15: 56	16: 56	17: 56	18: 56	19: 56	20: 56
21: 56	22: 56	23: 56	24: 56	25: 56	26: 56
27: 56	28: 56	29: 56	30: 56	31: 56	32: 56
33: 56	35: 56	36: 56			

塩基番号56において21のヒットがある

AlwNI CAGNNNctg 26

15: 68	16: 68	17: 68	18: 68	19: 68	20: 68
21: 68	22: 68	23: 68	24: 68	25: 68	26: 68
27: 68	28: 68	29: 68	30: 68	31: 68	32: 68
33: 68	34: 68	35: 68	36: 68	39: 46	40: 46
41: 46	42: 46				

塩基番号68において22のヒットがある

【表 16-1】

表 255: 実際の V 遺伝子のマッピングする REAdaptor の頻度分析
AHC における塩基 35-56 の HYPCHAV

id	ヌクレオチドの位置										id	ヌクレオチド			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
1	510	5	11	274	92	61	25	22	11	1	3	5	443	6-1	agttctccctgcagctgaactc
2	192	54	42	32	24	15	2	3	10	3	1	6	167	3-11	caactglatctgcgaatgacacg
3	58	19	7	17	6	5	1	0	1	0	2	0	54	3-09	ccctgtatctgcgaatgacacg
4	267	42	33	9	8	8	82	43	22	8	11	1	100	5-51	ccgcctaccctgcagtgagacg
5	250	111	59	41	24	7	5	1	0	0	2	0	242	3-15	cgctgtatctgcgaatgacacg
6	7	0	2	0	1	0	0	0	0	0	4	0	3	7-4.1	cggcatactgcagatctgacg
7	7	0	2	2	0	0	2	1	0	0	0	0	4	3-73	cggcatactgcgaatgacacg
8	26	10	4	1	3	1	2	1	3	1	0	0	19	5-a	ctgcctaccctgcagtgagacg
9	21	8	2	3	1	6	1	0	0	0	0	0	20	3-49	tcgcctatctgcgaatgacacg
1338	249	162	379	149	103	120	71	47	13	23	12	1052			
	249	411	790	939	1162	1280	1316								
				1042	1233	1293	1339								

id	ヌクレオチドの位置										id	ヌクレオチド
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
6-1	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	agttctccctgcagctgaactc	6-1	agttctccctgcagctgaactc
3-11	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	caactglatctgcgaatgacacg	3-11	caactglatctgcgaatgacacg
3-09	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	ccctgtatctgcgaatgacacg	3-09	ccctgtatctgcgaatgacacg
5-51	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	ccgcctaccctgcagtgagacg	5-51	ccgcctaccctgcagtgagacg
3-15	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	cgctgtatctgcgaatgacacg	3-15	cgctgtatctgcgaatgacacg
7-4.1	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	cggcatactgcagatctgacg	7-4.1	cggcatactgcagatctgacg
3-73	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	cggcatactgcgaatgacacg	3-73	cggcatactgcgaatgacacg
5-a	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	ctgcctaccctgcagtgagacg	5-a	ctgcctaccctgcagtgagacg
3-49	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	tcgcctatctgcgaatgacacg	3-49	tcgcctatctgcgaatgacacg

【表 1 6 - 2】

B: BpI in HC													
Id	Not	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Not	名前	
1	133	73	16	11	13	6	9	1	4	0	119	1-58	acatggaacgacagcctgag
2	14	11	1	0	0	0	0	1	0	1	12	1-02	acatggaacgacagcctgag
3	34	17	8	2	6	1	0	0	0	0	0	1-18	acatggaacgacagcctgag
4	120	50	32	16	10	9	1	1	1	0	2	5-51	acatggaacgacagcctgag
5	55	13	11	10	17	3	1	0	0	0	0	3-15	acatggaacgacagcctgag
6	340	166	88	41	15	6	3	0	1	0	0	3303	acatggaacgacagcctgag
7	82	25	16	25	12	1	3	0	0	0	0	3-20	acatggaacgacagcctgag
8	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	74.1	acatggaacgacagcctgag
9	23	10	2	2	1	0	0	0	0	0	0	3-66	acatggaacgacagcctgag
10	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3-64	acatggaacgacagcctgag
11	486	249	78	81	38	21	10	4	4	1	467	4301	acatggaacgacagcctgag
12	16	6	3	1	0	1	1	3	1	0	1	6-1	acatggaacgacagcctgag
13	28	15	8	2	2	1	0	0	0	0	0	2-70	acatggaacgacagcctgag
14	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2-26	acatggaacgacagcctgag

601

予想される RE 部位のみの配列 1004
(4以下のミスマッチを含む場合のみ計数する)
予想されない部位のみの配列 0
予想されるおよび予想されない両方の配列 ... 48
(4以下のミスマッチを含む場合のみ計数する)
部位のない配列 0

10

20

【 0 2 1 0 】

【表 16-3】

名前	全配列	ドット様式
1-58	acatggaacCTGACGagcctgag	acatggaacCTGACGagcctgag
1-02	acatggaagctggagagagctgag	g.....
1-18	acatggaagctggagagagcctgag	g.....
5-51	acctggaagctggagagagcctgaa	..c..c..tg.....a
3-15	atctgcaaatggaacagcctgaa	.tc..c..aa...a.....a
3-30.3	atctgcaaatggaacagcctgag	.tc..c..aa...a.....
3-20	atctgcaaatggaacagctctgag	.tc..c..aa...a...t....
7-4.1	atctgcaaatctggagagcctgaa	.tc..c..a..ct.....a..a
3-66	atctgcaaatggaacagcctgag	.tc..tc..aa...a.....
3-64	atctgcaaatggagagagcctgag	.tc..tc..aa..g.....
4-30.1	ccctggaagctggagctctgag	c..c..a.....tctg...c
6-1	ccctggaagctggagctctgag	c..c..c.....a..tctg...c
2-70	tccctgcaaatggaacacacagga	t..c..tcaaa...c..a..ga
2-26	tccctgcaaatggaacacacagga	t..c..tccaa...c..a..ga

予想される RE 部位のみの配列 597 (4以下のミスマッチを含む場合のみ計数する)

予想されない部位のみの配列 2

予想されるおよび予想されない両方の配列 2

部位のない配列 686

C: HybCH4III, BstMCI, or TspI in HC

目的の RE 部位が存在するか否かについてのスコア付けにおいて4以下のミスマッチを有する ONのみを計数する

配列の数 1617

【表 16 - 4】

Id	Not	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Not	Seqnt	Seqnt
1	244	78	92	43	18	10	1	2	0	0	241	10241,1	ccgtgtattactgtgcagaga
2	457	69	150	115	66	34	11	8	3	1	434	10342,3	ctgtgtattactgtgcagaga
3	173	52	45	36	22	14	3	0	0	1	169	10843	ccgtgtattactgtgcagaga
4	16	0	3	2	2	1	6	0	1	1	8	12445,1	ccgtgtattactgtgcagaga
5	4	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	14546	ccgtgtattactgtgcagaga
6	15	1	0	1	0	6	4	1	1	1	8	15448	ccgtgtattactgtgcagaga
7	23	4	8	5	2	2	1	1	0	0	21	205412	ccacattactgtgcacag
8	9	1	1	1	0	3	2	1	0	0	6	226413	ccacattactgtgcacag
9	7	1	1	1	1	0	0	1	0	0	6	270414	ccacattactgtgcacag
10	23	7	3	5	5	2	1	0	0	0	22	309416	ccgtgtattactgtgcagaga
11	35	5	10	7	6	3	3	0	1	0	31	313418	ctgtgtattactgtgcagaga
12	18	2	3	2	2	6	1	0	2	0	15	315419	ccgtgtattactgtgcagaga
13	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3	320420	ccgtgtattactgtgcagaga
14	117	29	23	28	22	8	4	2	1	0	110	323422	ccgtgtattactgtgcagaga
15	75	21	25	13	9	1	4	2	0	0	69	330423	ccgtgtattactgtgcagaga
16	14	2	2	2	3	0	3	1	1	0	9	349429	ccgtgtattactgtgcagaga
17	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	372433	ccgtgtattactgtgcagaga
18	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	373434	ccgtgtattactgtgcagaga
19	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	34436	ctgtgtattactgtgcagaga
20	34	4	9	9	4	5	3	0	0	0	31	428438	ccgtgtattactgtgcagaga
21	17	5	4	2	2	3	1	0	0	0	16	430440	ccgtgtattactgtgcagaga
22	75	15	17	24	7	10	1	1	0	0	73	439444	ccgtgtattactgtgcagaga
23	40	14	15	4	5	1	0	1	0	0	39	551448	ccgtgtattactgtgcagaga
24	213	26	56	60	42	20	7	2	0	0	204	54449	ccgtgtattactgtgcagaga
群	337	471	363	218	130	58	23	11	6				
累積	337	808	1171	1389	1519	1577	1600	1611	1617				
予想されるRE部位のみの配列	1511												
予想されない部位のみの配列	0												

【0 2 1 2】

10

20

30

【表 17】

表 255 B

予測されるおよび予測されない両方の配列 8
 部位のない配列 0

8つの最良の REdaptor のみを用いて繰り返される分析

Id	Ntot	0	1	2	3	4	5	6	7	8+				
1	301	78	101	54	32	16	9	10	1	0	281	102#1	ccgtgtattactgtgcgagaga	
2	493	69	155	125	73	37	14	11	3	6	459	103#2	ctgtgtattactgtgcgagaga	
3	189	52	45	38	23	18	5	4	1	3	176	108#3	ccgtgtattactgtgcgagagg	
4	127	29	23	28	24	10	6	5	2	0	114	323#22	ccgtatattactgtgcgaaga	
5	78	21	25	14	11	1	4	2	0	0	72	330#23	ctgtgtattactgtgcgaaga	
6	79	15	17	25	8	11	1	2	0	0	76	439#44	ctgtgtattactgtgcgagaca	
7	43	14	15	5	5	3	0	1	0	0	42	551#48	ccatgtattactgtgcgagaca	
8	307	26	63	72	51	38	24	14	13	6	250	5a#49	ccatgtattactgtgcgaga	
1	102#1	ccgtgtattactgtgcgagaga										ccgtgtattactgtgcgagaga		
2	103#2	ctgtgtattactgtgcgagaga										.t.....		
3	108#3	ccgtgtattactgtgcgagagg										g		
4	323#22	ccgtatattactgtgcgaaga										a.....a...		
5	330#23	ctgtgtattactgtgcgaaga										.t.....a...		
6	439#44	ctgtgtattactgtgcgagaca										.t.....c.		
7	551#48	ccatgtattactgtgcgagaca										..a.....c.		
8	5a#49	ccatgtattactgtgcgagaAA										..a.....AA		

予想される RE 部位のみの配列 1463 / 1617
 予想されない部位のみの配列 0
 予想される配列および予想されない配列の両方 7
 部位のない配列 0

10

20

【0 2 1 3】

【表 18-1】

表 300: K FR1 GLGs												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	O12
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	.O2
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	O18
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	O8
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	A20
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	A30
AAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCT	GCC	ATG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L14
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L1
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L15
GCC	ATC	CAG	TTG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	L4
GCC	ATC	CAG	TTG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	L18
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCT	TCC	GTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L5
GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCT	TCT	GTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L19
GAC	ATC	CAG	TTG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TTC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	L8
GCC	ATC	CGG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TTC	TCC	CTG	TCT	
GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	!	L23
GCC	ATC	CGG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	TTC	TCT	
GCA	TCT	ACA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	!	L9
GTC	ATC	TGG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TTA	CTC	TCT	

10

20

30

40

【0 2 1 4】

【表 18-2】

GCA TCT ACA GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGT	1	L24
GCC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT		
GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC	1	L11
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT TCC ACC CTG TCT		
GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC	1	L12
GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	O11
GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	O1
GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A17
GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A1
GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC TCT CTG TCC		
GTC ACC CCT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A18
GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC TCT CTG TCC		
GTC ACC CCT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A2
GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A19
GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC		
GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A3
GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC TCC TCA CCT		
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC	1	A23
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT		
TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	A27
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		
TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	A11
GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		
GTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	L2
GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		
GTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	L16
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		
TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	L6
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		
TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC	1	L20
GAA ATT GTA ATG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT		

10

20

30

40

【表 18-3】

TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC 1 L25
 GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT
 GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC 1 B3
 GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CCA GCA TTC ATG TCA
 GCG ACT CCA GGA GAC AAA GTC AAC ATC TCC TGC 1 B2
 GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT
 GTG ACT CCA AAG GAG AAA GTC ACC ATC ACC TGC 1 A26
 GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT
 GTG ACT CCA AAG GAG AAA GTC ACC ATC ACC TGC 1 A10
 GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT CCA GCT TTC CTC TCT
 GTG ACT CCA GGG GAG AAA GTC ACC ATC ACC TGC 1 A14

10

【0216】

【表 19-1】

表302 ヒト KFR1 GLCにおいて見出される HERS 部位

	MsLI	FokI --> <--	PfLEI --> <--	BsaI	BamBI	MnlI	HpyCH 4V			
O12	1-69	3	23	12	49	15	18	47	26	36
O2	101-169	103	123	112	149	115	118	147	126	136
O18	201-269	203	223	212	249	215	218	247	226	236
O8	301-369	303	323	312	349	315	318	347	326	336
A20	401-469	403	423	412	449	415	418	447	426	436
A30	501-569	503	523	512	549	515	518	547	526	536
L14	601-669	603	623	612	649	615	618	647	-	636
L1	701-769	703	723	712	749	715	718	747	726	736
L15	801-869	803	823	812	849	815	818	847	826	836
L4	901-969	-	923	912	949	906	915	918	947	926
L18	1001-1069	-	1023	1012	1049	1006	1015	1018	1047	1026
L5	1101-1169	1103	-	1112	1149	1115	1118	1147	-	1136
L19	1201-1269	1203	1203	1212	1249	1215	1218	1247	-	1236
L8	1301-1369	-	1323	1312	1349	1306	1315	1318	1347	1336
L23	1401-1469	1403	1403	1412	1449	1415	1418	1447	-	1436
L9	1501-1569	1503	1503	1512	1549	1515	1518	1547	1526	1536
L24	1601-1669	1603	1608	1623	1612	1649	1615	1618	1647	1636
L11	1701-1769	1703	1723	1712	1749	1715	1718	1747	1726	1736
L12	1801-1869	1803	1823	1812	1849	1815	1818	1847	-	1836

20

30

40

【0217】

【表 19-2】

	MslI	FokI	PflFI	BsrI	BsmAI	MnlI	HpyCH 4V
011 1901-1969	-	-	-	-	-	1956	-
01 2001-2069	-	-	-	-	-	2056	-
A17 2101-2169	-	-	2112	-	2118	2156	-
A1 2201-2269	-	-	2212	-	2218	2256	-
A18 2301-2369	-	-	-	-	-	2356	-
A2 2401-2469	-	-	-	-	-	2456	-
A19 2501-2569	-	-	2512	-	2518	2556	-
A3 2601-2669	-	-	2612	-	2618	2656	-
A23 2701-2769	-	-	-	-	-	2729 2756	-
A27 2801-2869	-	-	2812	-	2818 2839	2860	-
A11 2901-2969	-	-	2912	-	2918 2939	2960	-
L2 3001-3069	-	-	3012	-	3018 3039	3060	-
L16 3101-3169	-	-	3112	-	3118 3139	3160	-
L6 3201-3269	-	-	3212	-	3218 3239	3260	-

10

20

30

【0218】

【表 1 9 - 3】

	MslI	FokI --> <--	PflFI -->	BsrI	BsmAI	MslI	HpyCH 4V
L20 3301-3369	-	-	3312	-	3318 3339	3360	-
L25 3401-3469	-	-	3412	-	3418 3439	3460	-
VRV							
B3 3501-3569	3503	-	3512	3515	3518 3539	3551<	-
VRV							
B2 3601-3669	-	-	3649	-	3618 3647		-
VRV							
A26 3701-3769	-	-	3712	-	3718		-
A10 3801-3869	-	-	3812	-	3818		-
A14 3901-3969	-	-	3912	-	3918	3930>	-

表302 ヒトκFR1 GLGにおいて見出されるRERS 部位、続き

	SfaNI	SfcXI	HinfI	MlyI --> -->	MaeIII Tsp45I 同じ部位	BphI xx38 xx56 xx62	Bpali MspI xx06 xx52
VRV							
O12 1-69	37	41	53	53	55	56	-
O2 101-169	137	141	153	153	155	156	-
O18 201-269	237	241	253	253	255	256	-

【表 19-4】

	SfaNI	SfiCI	HinFI	MlyI ---> --> <---	MaellI Tsp45I 同じ部位	HphI xx38 xx56 xx62	HpaII MspI xx06 xx52
O8 301-369	337	341	353	353	355	356	-
A20 401-469	437	441	453	453	455	456	-
A30 501-569	537	541	553	553	555	556	-
L14 601-669	637	641	653	653	655	656	-
L1 701-769	737	741	753	753	755	756	-
L15 801-869	837	841	853	853	855	856	-
L4 901-969	937	941	953	953	955	956	-
L18 1001-1069	1037	1041	1053	1053	1055	1056	-
L5 1101-1169	1137	1141	1153	1153	1155	1156	-
L19 1201-1269	1237	1241	1253	1253	1255	1256	-
L8 1301-1369	1337	1341	1353	1353	1355	1356	-
L23 1401-1469	1437	1441	1453	1453	1455	1456	1406
L9 1501-1569	1537	1541	1553	1553	1555	1556	1506
L24 1601-1669	1637	1641	1653	1653	1655	1656	-
L11 1701-1769	1737	1741	1753	1753	1755	1756	-
L12 1801-1869	1837	1841	1853	1853	1855	1856	-
O11 1901-1969	-	-	1918	1918	1937	1938	1952
O1 2001-2069	-	-	2018	2018	2037	2038	2052
A17 2101-2169	-	-	2112	2112	2137	2138	2152
A1 2201-2269	-	-	2212	2212	2237	2238	2252

【0220】

10

20

30

【表 1 9 - 5】

	SfaNI	SfiCI	HinfI	MlyI --> --> <--	MaeIII Tsp45I 同じ部位	XpnI xx38 xx56 xx62	HpaII MspI xx06 xx52
A18 2301-2369	-	-	2318	2318	2337	2338	2352
A2 2401-2469	-	-	2418	2418	2437	2438	2452
A19 2501-2569	-	-	2512	2512	2537	2538	2552
A3 2601-2669	-	-	2612	2612	2637	2638	2652
A23 2701-2769	-	-	2718	2718	2737	2731* 2738*	-
A27 2801-2869	-	-	-	-	-	-	-
A11 2901-2969	-	-	-	-	-	-	-
I2 3001-3069	-	-	-	-	-	-	-
I16 3101-3169	-	-	-	-	-	-	-
I6 3201-3269	-	-	-	-	-	-	-
I20 3301-3369	-	-	-	-	-	-	-
I25 3401-3469	-	-	-	-	-	-	-
B3 3501-3569	-	-	3525	3525	-	-	-
B2 3601-3669	-	-	3639	3639	-	-	-
A26 3701-3769	-	-	3712	3739	3737 3755	3756 3762	-
A10 3801-3869	-	-	3812	3839	3837 3855	3856 3862	-
A14 3901-3969	-	-	3939	3939	3937 3955	3956 3962	-

10

20

30

表302 ヒトKFR! において見出されるRERS部位、続き

BaaJI xx29 xx42 xx43	BaaKI (NatNI) xx22 xx30 xx43	BpmI xx20 xx41 xx44	BszPI Cac8I NaeI NgoKI V	HaeII I	Tsp509I
O12 1-69	-	-	-	-	-
O2 101-169	-	-	-	-	-
O18 201-269	-	-	-	-	-
O8 301-369	-	-	-	-	-
A20 401-469	-	-	-	-	-
A30 501-569	-	-	-	-	-
L14 601-669	-	-	-	-	-
L1 701-769	-	-	-	-	-
L15 801-869	-	-	-	-	-
L4 901-969	-	-	-	-	-
L18 1001-1069	-	-	-	-	-
L5 1101-1169	-	-	-	-	-
L19 1201-1269	-	-	-	-	-
L8 1301-1369	-	-	-	-	-
L23 1401-1469	-	-	-	-	-
L9 1501-1569	-	-	-	-	-
L24 1601-1669	-	-	-	-	-

30

【表 19-7】

	BsaJI xx29 xx42 xx43	BssKI (NotNI) xx22 xx30 xx43	BpmI xx20 xx41 xx44 --> --> <--<--	BsrFI CacBI NaeI NcoMI V	HaeII I	Tsp509I
L11 1701-1769	-	-	-	-	-	-
L12 1801-1869	-	-	-	-	-	-
Q11 1901-1969	1942	1943	1944	1951	1954	-
O1 2001-2069	2042	2043	2044	2051	2054	-
A17 2101-2169	2142	-	-	2151	2154	-
A1 2201-2269	2242	-	-	2251	2254	-
A18 2301-2369	2342	2343	-	2351	2354	-
A2 2401-2469	2442	2443	-	2451	2454	-
A19 2501-2569	2542	2543	2544	2551	2554	-
A3 2601-2669	2642	2643	2644	2651	2654	-
A23 2701-2769	2742	-	-	2751	2754	-
A27 2801-2869	2843	2822 2843	2820 2841	-	-	2803
A11 2901-2969	2943	2943	2920 2941	-	-	2903
L2 3001-3069	3043	3043	3041	-	-	-
L16 3101-3169	3143	3143	3120 3141	-	-	-
L6 3201-3269	3243	3243	3220 3241	-	-	3203
L20 3301-3369	3343	3343	3320 3341	-	-	3303

【0 2 2 3】

10

20

30

【表 1 9 - 8】

	BsaJI xx29 xx42 xx43	BsaKI (NstNI) xx22 xx30 xx43	BpuI xx20 xx41 xx44 --> --> <--	BsrFI CacOI NaeI NgoMI V	HaeII I	Tsp509I
L25 3401-3469	3443	3443	3420 3441	-	-	3403
B3 3501-3569	3529	3530	3520	-	3554	
B2 3601-3669		3643	3620 3641	-	-	
A26 3701-3769		-	3720	-	-	3703
A10 3801-3869		-	3820	-	-	3803
A14 3901-3969	3943	3943	3920 3941	-	-	-

10

20

30

【 0 2 2 4】

【表 20-1】

表400 λFR1 GLG配列

! VL1

CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCT GAA
 GCC CCC AGG CAG AGG GTC ACC ATC TCC TGT ! 1a
 cag tct gtg ctg acg cag ccg ccc tca gtg tct gGG
 gcc ccA Ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc ! 1e
 cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gCg tct gGG
 Acc ccc Ggg cag agg gtc acc atc tct tgt ! 1c
 cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gCg tct gGG
 Acc ccc Ggg cag agg gtc acc atc tct tgt ! 1g
 cag tct gtg Ttg acG cag ccG ccc tca gtg tct gCG
 gcc ccA GgA cag aAg gtc acc atc tcc tgc ! 1b

10

! VL2

CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT CCC TCC GCG TCC GGG
 TCT CCT GGA CAG TCA GTC ACC ATC TCC TGC ! 2c
 cag tct gcc ctg act cag cct cGc tca gTg tcc ggg
 tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc! 2e
 cag tct gcc ctg act cag cct Gcc tcc gTg tct ggg
 tct cct gga cag tcG Atc acc atc tcc tgc ! 2a2
 cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gTg tcc ggg
 tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc ! 2d
 cag tct gcc ctg act cag cct Gcc tcc gTg tct ggg
 tct cct gga cag tcG Atc acc atc tcc tgc ! 2b2

20

! VL3

TCC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CCC TCA GTG TCC GTG
 TCC CCA GGA CAG ACA GCC AGC ATC ACC TGC! 3r
 tcc tat gag ctg act cag cca cTc tca gtg tca gtg
 Gcc cTG gga cag acG gcc agG att acc tGT ! 3j
 tcc tat gag ctg acA cag cca ccc tcG gtg tca gtg
 tcc cca gga caA acG gcc agG atc acc tgc! 3p
 tcc tat gag ctg acA cag cca ccc tcG gtg tca gtg
 tcc cTa gga cag aTG gcc agG atc acc tgc ! 3a
 tct tCt gag ctg act cag GAC cct GcT gtg tct gtg
 Gcc TTG gga cag aca gTc agG atc acA tgc ! 3l

30

b

40

【0225】

【表 20-2】

	tcc tat gTg ctg act cag cca ccc tca gtg tca gtg Gcc cca gga Aag acG gcc agG att acc tgT ! 3h tcc tat gag ctg acA cag cTa ccc tcG gtg tca gtg tcc cca gga cag aca gcc agG atc acc tgc ! 3e tcc tat gag ctg atG cag cca ccc tcG gtg tca gtg tcc cca gga cag acG gcc agG atc acc tgc ! 3m tcc tat gag ctg acA cag cca Tcc tca gtg tca gtg tct ccG gga cag aca gcc agG atc acc tgc ! V2-19	
! VL4	CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC CCG TCT GCA TCT GCC TTG CTG GGA GCC TCG ATC AAG CTC ACC TGC ! 4c cAg cct gtg ctg act caA Tca TcC tct gcC tct gcT tCC ctg gga Tcc tcg Gtc aag ctc acc tgc ! 4a cAg cTt gtg ctg act caA TcG ccC tct gcC tct gcc tCC ctg gga gcc tcg Gtc aag ctc acc tgc ! 4b	10
! VL5	CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA CCT TCC TCC TCC GCA TCT CCT GGA GAA TCC GCC AGA CTC ACC TGC ! 5e cag Gct gtg ctg-act cag ccG Gct tcc CTc tct gca tct cct gga gCa tca gcc agT ctc acc tgc ! 5c cag cct gtg ctg act cag cca Tct tcc CAT tct gca tct Tct gga gCa tca gTc aga ctc acc tgc ! 5b	
! VL6	AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CAC TCT GTG TCG GAG TCT CCG GGG AAG ACG GTA ACC ATC TCC TGC ! 6a	20
! VL7	CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG CCC TCA CTG ACT GTG TCC CCA GGA GGG ACA GTC ACT CTC ACC TGT ! 7a cag Gct gtg gtg act cag gag ccc tca ctg act gtg tcc cca gga ggy aca gtc act ctc acc tgt ! 7b	
! VL8	CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG CCA TCG TTC TCA GTG TCC CCT GGA GGG ACA GTC ACA CTC ACT TGT ! 8a	

30

【0 2 2 6】

【表 20-3】

! VL9

CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA CCT TCT GCA TCA GCC
TCC CTG GGA GCC TCG GTC ACA CTC ACC TGC ! 9a

! VL10

CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCC AAG
GGC TTG AGA CAG ACC GCC ACA CTC ACC TGC ! 10a

40

50

【0227】

【表21-1】

表405 ヒトKFR1 GLGにおいて見出されるREBS

! 31のλGLGがある

MlyI NnnnnnGACTC

25

1: 6	3: 6	4: 6	6: 6	7: 6	8: 6
9: 6	10: 6	11: 6	12: 6	15: 6	16: 6
20: 6	21: 6	22: 6	23: 6	23: 50	24: 6
25: 6	25: 50	26: 6	27: 6	28: 6	30: 6
31: 6					

塩基番号6において23のヒットがある

-"- GAGTCNNNNNn

1

26: 34

MwoI GCNNNNNngc

20

1: 9	2: 9	3: 9	4: 9	11: 9	11: 56
12: 9	13: 9	14: 9	16: 9	17: 9	18: 9
19: 9	20: 9	23: 9	24: 9	25: 9	26: 9
30: 9	31: 9				

塩基番号9において19のヒットがある

HinfI Gantc

27

1: 12	3: 12	4: 12	6: 12	7: 12	8: 12
9: 12	10: 12	11: 12	12: 12	15: 12	16: 12
20: 12	21: 12	22: 12	23: 12	23: 46	23: 56
24: 12	25: 12	25: 56	26: 12	26: 34	27: 12
28: 12	30: 12	31: 12			

塩基番号12において23のヒットがある

PleI gactc

25

1: 12	3: 12	4: 12	6: 12	7: 12	8: 12
9: 12	10: 12	11: 12	12: 12	15: 12	16: 12
20: 12	21: 12	22: 12	23: 12	23: 56	24: 12
25: 12	25: 56	26: 12	27: 12	28: 12	30: 12
31: 12					

塩基番号12において23のヒットがある

-"- gactc

1

26: 34

【0228】

10

20

30

40

【表 2 1 - 2】

DdeI Ctnag						32
1: 14	2: 24	3: 14	3: 24	4: 14	4: 24	
5: 24	6: 14	7: 14	7: 24	8: 14	9: 14	
10: 14	11: 14	11: 24	12: 14	12: 24	15: 5	
15: 14	16: 14	16: 24	19: 24	20: 14	23: 14	
24: 14	25: 14	26: 14	27: 14	28: 14	29: 30	
30: 14	31: 14					
塩基番号14において21のヒットがある						
BsaJI Ccnnngg						38
1: 23	1: 40	2: 39	2: 40	3: 39	3: 40	
4: 39	4: 40	5: 39	11: 39	12: 38	12: 39	
13: 23	13: 39	14: 23	14: 39	15: 38	16: 39	
17: 23	17: 39	18: 23	18: 39	21: 38	21: 39	
21: 47	22: 38	22: 39	22: 47	26: 40	27: 39	
28: 39	29: 14	29: 39	30: 38	30: 39	30: 47	
31: 23	31: 32					
塩基番号39において17のヒットがある						
塩基番号38において5のヒットがある						
塩基番号40において5のヒットがある 不調和切断を作る						
MnlI ccttc						35
1: 23	2: 23	3: 23	4: 23	5: 23	6: 19	
6: 23	7: 19	8: 23	9: 19	9: 23	10: 23	
11: 23	13: 23	14: 23	16: 23	17: 23	18: 23	
19: 23	20: 47	21: 23	21: 29	21: 47	22: 23	
22: 29	22: 35	22: 47	23: 26	23: 29	24: 27	
27: 23	28: 23	30: 35	30: 47	31: 23		
塩基番号23において21のヒットがある						
塩基番号19において3のヒットがある						
塩基番号29において3のヒットがある						
塩基番号26において1のヒットがある						
塩基番号27において1のヒットがある これらは不調和切断を作り得る						
gagg						7
1: 48	2: 48	3: 48	4: 48	27: 44	28: 44	

10

20

30

40

【表 2 1 - 3】

29: 44

BssKI Nccngg

39

1: 40 2: 39 3: 39 3: 40 4: 39 4: 40
 5: 39 6: 31 6: 39 7: 31 7: 39 8: 39
 9: 31 9: 39 10: 39 11: 39 12: 38 12: 52
 13: 39 13: 52 14: 52 16: 39 16: 52 17: 39
 17: 52 18: 39 18: 52 19: 39 19: 52 21: 38
 22: 38 23: 39 24: 39 26: 39 27: 39 28: 39
 29: 14 29: 39 30: 38

塩基番号39において21のヒットがある

塩基番号38において4のヒットがある

塩基番号31において3のヒットがある

塩基番号40において3のヒットがある 不調和

BstNI CCwgg

30

1: 41 2: 40 5: 40 6: 40 7: 40 8: 40
 9: 40 10: 40 11: 40 12: 39 12: 53 13: 40
 13: 53 14: 53 16: 40 16: 53 17: 40 17: 53
 18: 40 18: 53 19: 53 21: 39 22: 39 23: 40
 24: 40 27: 40 28: 40 29: 15 29: 40 30: 39

塩基番号40において17のヒットがある

塩基番号53において7のヒットがある

塩基番号39において4のヒットがある

塩基番号41において1のヒットがある 不調和

PspGI ccwgg

30

1: 41 2: 40 5: 40 6: 40 7: 40 8: 40
 9: 40 10: 40 11: 40 12: 39 12: 53 13: 40
 13: 53 14: 53 16: 40 16: 53 17: 40 17: 53
 18: 40 18: 53 19: 53 21: 39 22: 39 23: 40
 24: 40 27: 40 28: 40 29: 15 29: 40 30: 39

塩基番号40において17のヒットがある

塩基番号53において7のヒットがある

塩基番号39において4のヒットがある

【0 2 3 0】

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

塩基番号41において1のヒットがある

ScrFI CCngg					
39					
1: 41	2: 40	3: 40	3: 41	4: 40	4: 41
5: 40	6: 32	6: 40	7: 32	7: 40	8: 40
9: 32	9: 40	10: 40	11: 40	12: 39	12: 53
13: 40	13: 53	14: 53	16: 40	16: 53	17: 40
17: 53	18: 40	18: 53	19: 40	19: 53	21: 39
22: 39	23: 40	24: 40	26: 40	27: 40	28: 40
29: 15	29: 40	30: 39			

塩基番号40において21のヒットがある

塩基番号39において4のヒットがある

塩基番号41において3のヒットがある

MaeIII gtnac					
16					
1: 52	2: 52	3: 52	4: 52	5: 52	6: 52
7: 52	9: 52	26: 52	27: 10	27: 52	28: 10
28: 52	29: 10	29: 52	30: 52		

塩基番号52において13のヒットがある

Tsp45I gtsac					
15					
1: 52	2: 52	3: 52	4: 52	5: 52	6: 52
7: 52	9: 52	27: 10	27: 52	28: 10	28: 52
29: 10	29: 52	30: 52			

塩基番号52において12のヒットがある

HphI tcacc					
26					
1: 53	2: 53	3: 53	4: 53	5: 53	6: 53
7: 53	8: 53	9: 53	10: 53	11: 59	13: 59
14: 59	17: 59	18: 59	19: 59	20: 59	21: 59
22: 59	23: 59	24: 59	25: 59	27: 59	28: 59
30: 59	31: 59				

塩基番号59において16のヒットがある

塩基番号53において10のヒットがある

【0 2 3 1】

【表 2 1 - 5】

BspMI ACCTGCNNNNn					
14					
11: 61	13: 61	14: 61	17: 61	18: 61	19: 61
20: 61	21: 61	22: 61	23: 61	24: 61	25: 61
30: 61	31: 61				

塩基番号61において14のヒットがある CDR1に入る

10

20

30

40

50

【0232】

【表22-1】

表500:BsmAIを用いたCJを介して捕捉されるh3401-h2

```

! 1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15
! S  A  Q  D  I  Q  M  T  Q  S  P  A  T  L  S
! aGT GCA Caa gac atc cag atg acc cag tct cca gcc acc ctg tct
! ApaLI... a gcc acc !
L25,L6,L20,L2,L16,A11
! Extender.....Bridge...

! 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
! V  S  P  G  E  R  A  T  L  S  C  R  A  S  Q
! gtg tct cca ggg gaa agg gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag

! 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
! S  V  S  N  N  L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q
! agt gtt agt aac aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag

! 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
! V  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  T  R  A  T  D
! gtt ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc acc agg gcc act gat

! 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
! I  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
! atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act

! 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
! L  T  I  S  R  L  E  P  E  D  F  A  V  Y  Y
! ctc acc atc agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac

! 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
! C  Q  R  Y  G  S  S  P  G  W  T  F  G  Q  G
! tgt cag cgg tat ggt agc tca ccg ggg tgg acg ttc ggc caa ggg

! 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
! T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F
! acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc

! 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
! I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S
! atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct

! 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
! V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V
! gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta

```

10

20

30

40

【0233】

【表 2 2 - 2】

```

! 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
! Q W K V D N A L Q S G N S Q E
cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag

! 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
! S V T E Q D S K D S T Y S L S
agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc

! 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
! S T L T L S K A D Y E K H K V
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc

! 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
! Y A C E V T H Q G L S S P V T
tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg cct gtc aca

! 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223
! K S F N K G E C K G E F A
aag agc ttc aac aaa gga gag tgt aag ggc gaa ttc gc.....

```

10

表501: CJ および BsmAI で捕捉されるh3401-d8 KAPPA

```

! 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
! S A Q D I Q M T Q S P A T L S
aGT GCA Caa gac atc cag atg aac cag tot cct gcc acc ctg tct
! ApaLI...Extender.....a gcc acc !
L25,L6,L20,L2,L16,A11
! A GCC ACC CTG TCT ! L2

! 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
! V S P G E R A T L S C R A S Q
gtg tct cca ggt gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag
! GTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC ! L2

! 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
! N L L S N L A W Y Q Q K P G Q
aat ctt ctc agc aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag

! 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
! A P R L L I Y G A S T G A I G
gct ccc agg ctc ctc atc tat ggt gct tcc acc ggg gcc att ggt

! 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
! I P A R F S G S G S G T E F T
atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gag ttc act

```

20

30

40

【0 2 3 4】

【表 2 2 - 3】

```

! 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
! L T I S S L Q S E D F A V Y F
ctc acc atc agc agc ctg cag tct gaa gat ttt gca gtg tat ttc

! 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
! C Q Q Y G T S P P T F G G G T
tgt cag cag tat ggt acc tca ccg ccc act ttc ggc gga ggg acc

! 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
! K V E I K R T V A A P S V F I
aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc

! 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
! F P P S D E Q L K S G T A S V
ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt

! 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
! V C P L N N F Y P R E A K V Q
gtg tgc ccg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag

! 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
! W K V D N A L Q S G N S Q E S
tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt

! 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
! V T E Q D N K D S T Y S L S S
gtc aca gag cag gac aac aag gac agc acc tac agc ctc agc agc

! 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
! T L T L S K V D Y E K H E V Y
acc ctg acg ctg agc aaa gta gac tac gag aaa cac gaa gtc tac

! 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
! A C E V T H Q G L S S P V T K
gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctt agc tcg ccc gtc acg aag

! 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223
! S F N R G E C K K E F V
agc ttc aac agg gga gag tgt aag aaa gaa ttc gtt t

```

10

20

30

40

【表 2 3 - 2】

{TCT/AGA/gac/aac/tct/aag/aat/aet/ctc/tac/ttg/cag/atg/-
aac/agc/TTA/AGG/gct/gcg/gac/act/GCA/ctc/tac/tat/tgt/Acg ag-3'
(VH881PCR) 5'-cgcttcacTaag/TCT/AGA/gac/aac-3'

表512: K. 塩基12-30

ID	Ntot	0	1	2	3	4	5	6	名前	配列	ドット形式
1	84	40	21	20	1	2	0	0	SK12012	gaccagctctccatctcc	gaccagctctccatctcc
2	32	19	3	6	2	1	0	1	SK12A17	gactcagctctccatctcc	...t.....ct....
3	26	17	8	1	0	0	0	0	SK12A27	gacgcagctctccagccacc	...g.....gg.a...
4	40	21	18	1	0	0	0	0	SK12A11	gacgcagctctccagccacc	...g.....g.a...
182	97	50	28	3	3	0	1				
	97	147	175	178	181	181	182				

URE アダプター:

(SzRB1230-012)	システム ループ 認識	5'-cAcATccgTg TTgTT cAcgATgTg gGAgATgAgAcTgTgTc-3'	5'-gacccagctctccatctcc cAcATccgTg AAcAA cAcgATgTg-3'
	認識	システム FokI.	システム FokI.
(SzRB1230-A17)	システム ループ 認識	5'-cAcATccgTg TTgTT cAcgATgTg gGAgATgAgAcTgTgTc-3'	5'-gactcagctctccatctcc cAcATccgTg AAcAA cAcgATgTg-3'
	認識	システム FokI.	システム FokI.
(SzRB1230-A27)	システム ループ 認識	5'-cAcATccgTg TTgTT cAcgATgTg gGAgATgAgAcTgTgTc-3'	5'-gacccagctctccagccacc cAcATccgTg AAcAA cAcgATgTg-3'
	認識	システム FokI.	システム FokI.
(SzRB1230-A11)	システム ループ 認識	5'-cAcATccgTg TTgTT cAcgATgTg gGAgATgAgAcTgTgTc-3'	5'-gacgcagctctccagccacc cAcATccgTg AAcAA cAcgATgTg-3'
	認識	システム FokI.	システム FokI.

【0 2 3 7】

【表 2 3 - 3】

上の鎖で起きていること	
(szKE1230-012*)	5'-gac cca gtc tcc a-tc etc c-3' 基質における切断部位
(szKE1230-A17*)	5'-gac tca gtc tcc a-ct etc c-3'
(szKE1230-A27*)	5'-gac gca gtc tcc a-gg cac c-3'
(szKE1230-A11*)	5'-gac gca gtc tcc a-gc cac c-3'
(kapeptide)	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAgAA gAc ATc cAg-3' センズ鎖 Scab.....ApalI.
(kapeptidePCR)	5'-ccTctactctTgTcAcAgTg-3' Scab.....
(kaBRO1UR)	5'-ggAggAggA cTggATgtTgt TgtgAcTgt gAcAggATgT gAgg-3' [RC] 5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-tc etc c-3'
(kaBRO2UR)	5'-ggAggAggA cTggATgtTgt TgtgAcTgt gAcAggATgT gAgg-3' [RC] 5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-ct etc c-3'
(kaBRO3UR)	5'-ggTgcTggA cTggATgtTgt TgtgAcTgt gAcAggATgT gAgg-3' [RC] 5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-gg cac c-3'
(kaBRO4UR)	5'-ggTgcTggA cTggATgtTgt TgtgAcTgt gAcAggATgT gAgg-3' [RC] 5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-gc cac c-3' Scab.....ApalI.

上記の ON は、これらの RC である
 上記の ON は、これらの RC である
 上記の ON は、これらの RC である
 上記の ON は、これらの RC である

【 0 2 3 8 】

10

20

30

【表 2 3 - 4】

(VH881PCR) 5'-cgcttcac/aag|TCT|AGA|gac|aac-3'

表512: κ、塩基12-30

ID	Ntot	0	1	2	3	4	5	6	名前	配列	ドット形式
1	84	40	21	20	1	2	0	0	SK12012	gaccagctctccatctctcc	gaccagctctccatctctcc
2	32	19	3	6	2	1	0	1	SK12A17	gactcagctctccatctctcc	...t.....ct....
3	26	17	8	1	0	0	0	0	SK12A27	gacgcagctctccagccacc	...g.....gg.a...
4	40	21	18	1	0	0	0	0	SK12A11	gacgcagctctccagccacc	...g.....g.a...
182	97	50	28	3	3	0	1				
97	147	175	178	181	181	182					

URE アダプター

システム ループ システム 認識
 5'-cacATccgTg TTgTT cAcgATgTg gAgATgAgAcTgTgTc-3'
 [RC] 5'-gaccagctctccatctcc cAcATccgTg ATcAA cAcgATgTg-3'
 認識 システム ループ システム FokI.

システム ループ システム 認識
 5'-cacATccgTg TTgTT cAcgATgTg gAgATgAgAcTgTgTc-3'
 [RC] 5'-gactcagctctccatctcc cAcATccgTg ATcAA cAcgATgTg-3'
 認識 システム ループ システム FokI.

システム ループ システム 認識
 5'-cacATccgTg TTgTT cAcgATgTg gTgTcTgAgAcTgTgTc-3'
 [RC] 5'-gacgcagctctccagccacc cAcATccgTg ATcAA cAcgATgTg-3'
 認識 システム ループ システム FokI.

システム ループ システム 認識
 5'-cacATccgTg TTgTT cAcgATgTg gTgTcTgAgAcTgTgTc-3'
 [RC] 5'-gacgcagctctccagccacc cAcATccgTg ATcAA cAcgATgTg-3'
 認識 システム ループ システム FokI.

【 0 2 3 9 】

10

20

30

【表 2 3 - 5】

上の鎖で始まっていること	:
(SzKB1230-012*)	5'-gac cca gtc tcc a-tc ctc c-3'
	塩基における切断部位
(SzKB1230-A17*)	5'-gac tca gtc tcc a-ct ctc c-3'
(SzKB1230-A27*)	5'-gac gca gtc tcc a-gg cac c-3'
(SzKB1230-A11*)	5'-gac gca gtc tcc a-gc cac c-3'
(kapextURE)	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg-3' センズ鎖
	Scab.....Apali.
(kapextUREPCR)	5'-ccTctactctTgTcAcAgTg-3'
	Scab.....
(kaBRO1UR)	5'-ggAggATgga ctggATgtct TgtgcActgt gAcAggATgTA gAgg-3'
[RC]	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-tc ctc c-3'
(kaBRO2UR)	5'-ggAggATgga ctggATgtct TgtgcActgt gAcAggATgTA gAgg-3'
[RC]	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-ct ctc c-3'
(kaBRO3UR)	5'-ggTgcctTgga ctggATgtct TgtgcActgt gAcAggATgTA gAgg-3'
[RC]	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-gg cac c-3'
(kaBRO4UR)	5'-ggTgcctTgga ctggATgtct TgtgcActgt gAcAggATgTA gAgg-3'
[RC]	5'-ccTctactctTgTcAcAgTgcAcAA gAc ATc cAg tcc a-gc cac c-3'
	Scab.....Apali.

上段の ON は、これらの RC である
 上段の ON は、これらの RC である
 上段の ON は、これらの RC である
 上段の ON は、これらの RC である

【 0 2 4 0 】

10

20

30

【表 2 4 - 1】

表515 λUREアダプター 塩基13.3-19.3

配列の数 128																								
ミスマッチの数																								
Id	Ntot	0	1	2	3	4	5	6	7	8	名前	配列	ドット形式											
1	58	45	7	1	0	0	0	2	2	1	VL133-2a2	gtctctgtgacagtcgac	gtctctgtgacagtcgac											
2	16	10	1	0	1	0	1	1	0	2	VL133-31	ggcttgggacagacgac	.g.cttg.....a.ag..											
3	17	6	0	0	0	4	1	1	5	0	VL133-2c	gtctctgtgacagtcgac	gtctctgtgacagtcgac											
4	37	3	0	10	4	4	3	7	4	2	VL133-1c	ggcccccaggcagagggtc	.g.c..a..g....ag.g..											
	128	64	8	11	5	8	5	11	11	5														
	64	72	83	88	96	101	112	123	128															
システム ループ システム																								
認識																								
(VL133-2a2)	5'-cacATccgTg TtgTt cAggATgTg gATcAcTgTccAggAc-3'																							
	[RC] 5'-gtctctgtgacagtcgac cAcATccgTg ATcAA cAggATgTg-3'																							
認識 システム ループ システム																								
システム ループ システム																								
(VL133-31)	5'-cacATccgTg TtgTt cAggATgTg gATcAcTgTccAggAc-3'																							
	[RC] 5'-ggcccccaggcagagtc cAcATccgTg ATcAA cAggATgTg-3'																							
認識 システム ループ システム																								
システム ループ システム																								
(VL133-2c)	5'-cacATccgTg TtgTt cAggATgTg gATcAcTgTccAggAc-3'																							
	[RC] 5'-gtctctgtgacagtcgac cAcATccgTg ATcAA cAggATgTg-3'																							
認識 システム ループ システム																								
システム ループ システム																								
(VL133-1c)	5'-cacATccgTg TtgTt cAggATgTg gATcAcTgTccAggAc-3'																							
	[RC] 5'-ggcccccaggcagagtc cAcATccgTg ATcAA cAggATgTg-3'																							

【表 2 4 - 2】

頂部の鎖で生じていること ;

! 頂部の鎖中の切断部位

{VL133-2a2*} 5'-g tct cct g|ga cag tcg atc

{VL133-31*} 5'-g gcc ttg g|ga cag aca gtc

{VL133-2c*} 5'-g tct cct g|ga cag tca gtc

{VL133-1c*} 5'-g gcc cca g|gg cag agg gtc

! 以下の Extender および Bridge は全てコドン1-15に対する 2a2 の AA 配列をコードする

! 1

{ON_LamEx133} 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg -

! 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGt gcT TtA acC caA ccG gcT AGT gtT AGC ggT-

! 13 14 15

tcC ccG g ! 2a2

! 1

{ON_LamB1-133} [RC] 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg -

! 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGt gcT TtA acC caA ccG gcT AGT gtT AGC ggT-

! 13 14 15

tcC ccG g ga cag tcg at-3' ! 2a2 N.B.

! 実際の配列は、示されるものの逆向き相補体である

{ON_LamB2-133} [RC] 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg -

! 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGt gcT TtA acC caA ccG gcT AGT gtT AGC ggT-

! 13 14 15

tcC ccG g ga cag aca gt-3' ! 31 N.B.

! 実際の配列は、示されるものの逆向き相補体である

{ON_LamB3-133} [RC] 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg -

! 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGt gcT TtA acC caA ccG gcT AGT gtT AGC ggT-

! 13 14 15

tcC ccG g ga cag tca gt -3' ! 2c N.B.

! 実際の配列は、示されるものの逆向き相補体である

{ON_LamB4-133} [RC] 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg -

10

20

30

【0 2 4 2】

! 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGt gcT TtA acC caA ccG gcT AGT gtT AGC ggT-

! 13 14 15

tcC ccG g gg cag agg gt-3' ! 1c N.B.

! 実際の配列は、示されるものの逆向き相補体である

{ON_Lam133PCR} 5'-ccTcTgAcTgAgT gca cAg AGt gc-3'

【0 2 4 3】

40

【表 2 5 - 1】

表 625: OJ 法および BamAI を用いた κ 経路の捕捉に使用される ON

全ての ON は 5' - 3' で記載される

REAdapters (6)

ON_20SK15O12 888AggATggAgAcTgggTc
 ON_20SK15L12 888AgATggAgAcTgggTc
 ON_20SK15A17 888AgAgTggAgAcTgAgTc
 ON_20SK15A27 888TggcTggAgAcTgggTc
 ON_20SK15A11 888TggcTggAgAcTgggTc
 ON_20SK15B3 888AgTcTggAgAcTgggTc

Bridges (6)

kapbril1O12 888AggATggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88
 kapbril1L12 888AgATggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88
 kapbril1A17 888AgAgTggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88
 kapbril1A27 888TggcTggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88
 kapbril1A11 888TggcTggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88
 kapbril1B3 888AgTcTggAgAcTgggTcATcTggATgTcTgTgAcTgTgAcAg88

Extender (5' ビオチン化)

kapextilbio ccTcTgTcAcAgTgcAcAagAcATccAgATgAcccAgTcTcc

プライマー

kapCRui ccTcTgTcAcAgTgcAcAagAc
 kapfor 5'-aca etc tcc cct gtt gaa gct ctt-3'

表 630 κ DNA の増幅のための PCR プログラム

95°C 5 分

95°C 15 分

65°C 30 分

【表 2 5 - 2】

	72°C	1 分
	72°C	7 分
	4°C	保持
5	試薬 (100 ul 反応):	
	Template	50 ng
	10x turbo PCR 緩衝液	1x
	turbo Pfu	4U
	dNTPs	各々 200 μM
10	kapPCRt1	300 nM
	kapfor	300 nM

10

【 0 2 4 5】

【表 2 6】

表610: VHにおいて使用されるスタッフアー

```

1  TCCGGAGCTT CAGATCTGTT TGCCTTTTGG TGGGGTGGTG CAGATCGCGT TACGGAGATC
61 GACCGACTGC TTGAGCAAAA GCCACGCTTA ACTGCTGATC AGGCATGGGA TGTATTTCGC
121 CAAPCCAGTC GTCAGGATCT TAACCTGAGG CTTTTTTTAC CIACCTCTGCA AGCAGCGACA
181 TCTGGTTTGA CACAGAGCGA TCCGCGTCGT CAGTTGGTAG AAACATTAA ACCTTGGGAT
241 GGCATCAATT TGCTTAATGA TGATGGTAAA ACCTGGCAGC AGCCAGGCTC TGCCATCCTG
301 AACGTTTGGC TGACCAATAT GTTGAAGCGT ACCGTAGTGG CTGCCCTACC TATGCCATTT
361 GATAAGTGGT ACAGCGCCAG TGGCTACGAA ACAACCCAGG ACGGCCCAAC TGGTTCGCTG
421 AATATAAGTG TTGGAGCAAA AATTTTGTAT GAGGCGGTGC AGGGAGACAA ATCACCATC
481 CCACAGGCGG TTGATCTGTT TGCTGGGAAA CCACAGCAGG AGGTTGTGTT GGCTGCGCTG
541 GAAGATACCT GGGAGACTCT TTCCAACGC TATGGCAATA ATGTGAGTAA CTGGAAAACA
601 CCTGCAATGG CCTTAACGTT CCGGGCAAAT AATTTCITTG GTGTACCGCA GGCCGCAGCG
661 GAAGAAACGC GTCATCAGGC GGAGTATCAA AACCGTGGAA CAGAAAACGA TATGATTGTT
721 TTCTCACCAA CGACAAGCGA TCGTCCTGTG CTTGCCCTGG ATGTGGTCCG ACCCGGTCAG
781 AGTGGGTTTA TTGCTCCCGA TGGAACAGTT GATAAGCACT ATGAAGATCA GCTGAAAATG
841 TACGAAAATT TTGCCCGTAA GTCGCTCTGG TTAACGAAGC AGGATGTGGA GCGGCATAAG
901 GAGTCGTCTA GA

```

20

【 0 2 4 6】

30

【表 27-1】

表620:pCES5のDNA 配列

```

| CDR1-2およびCDR2000. 12. 13中にスタッフアーを有するpCes4
| Ngen = 6680
| 有用なRE(3箇所未満のMAnoIを切断
| 切断しない
| 切断する
| 4箇所以上切断する酵素
|AlwNI CAGNNNctg      5
|BsgI  ctgcac          4
|BsrFI  Kccggy          5
|BsrI  CTCTTCNnn      4
|FauI  nNNNNNNGCGGG   10
|
| 1~3箇所切断する酵素
|
|EcoO109I  RGgaccy      3      7  2636  4208
|BssSI  Ctcgtg          1      12
|"-  Caccgag            1  1703
|BspHI  Tcatga          3      43  148  1156
|AatII  GACGTC          1      65
|BciVI  GTATCCNNNNNN   2      140  1667
|EcoS7I  CTGAAG         1      301
|"-  ctccag             2  1349
|AvaI  Cycgry           3      319  2347  6137
|BsiHKAI  GWGCWc        3      401  2321  4245
|HgiAI  GWGCWc          3      401  2321  4245
|BcgI  gcannnnntcg      1      461
|ScaI  AGTact           1      506

```

10

20

【0247】

30

【表 27-2】

!PvuI CGATcg	3	616	3598	5926
!FspI TCCgca	2	763	5946	
!BglI GCCNNNNnggc	3	864	2771	5952
!BpmI CTGGAG	1	898		
!-"~ ctccag	1	4413		
!BsaI GGTCTCmnnn	1	916		
!AhdI GACNNNngtc	1	983		
!Eam1105I GACNNNngtc	1	983		
!DrdI GACNNNngtc	3	1768	6197	6579
!SapI gaagagc	1	1998		
!PvuII CAGctg	3	2054	3689	5896
!PflMI CCANNMntgg	3	2233	3943	3991
!HindIII Aagctt	1	2235		
!ApaLI Gtgcac	1	2321		
!BspMI Nnnnnnnngcaggt	1	2328		
!-"~ ACCTGCNNNNn	2	3460		
!PstI CTGCAg	1	2335		
!AccI GTmkac	2	2341	2611	
!HincII GTYrac	2	2341	3730	
!SalI Gtcgac	1	2341		
!TliI Ctcgag	1	2347		
!XhoI Ctcgag	1	2347		
!BbsI gtcttc	2	2383	4219	
!BlnI Gctnagc	1	2580		
!EspI Gctnagc	1	2580		
!SgrAI CRccggyg	1	2648		
!AqaI Accggt	2	2649	4302	
!AscI GCGcgcc	1	2689		
!BsaHII Gcgcg	1	2690		
!SfiI GCCNNNNnggc	1	2770		
!NaeI GCCggc	2	2776	6349	
!NcoMIV Gccggc	2	2776	6349	
!BtgI Ccrgyg	3	2781	3553	5712
!DsaI Ccrgyg	3	2781	3553	5712
!NcoI Ccatgg	1	2781		
!StyI Ccwggg	3	2781	4205	4472
!MfaI Caattg	1	2795		
!BspBI Tccgga	1	2861		
!BglII Agatct	1	2872		
!BclI Tgatac	1	2956		
!Bsu36I CCTnagg	3	3004	4143	4373
!XbaI CCANNNNnnntgg	1	3215		
!HluI Aagcgt	1	3527		

10

20

【表 27-3】

!HpaI GTTaaC	1	3730	
!XbaI Tctaga	1	3767	
!			
!AflII Cttaag	1	3811	
!BsmI WGoatto	1	3821	
!-"- GAATGCG	1	4695	
!BsrII CGGwcoq	1	3827	
!NheI Gctaga	1	4166	
!BstEII Ggtnaac	1	4182	
!BsmBI CGTCTCnnnnn	2	4188	6625
!-"- Nnnnnngagacg	1	6673	
!ApaI GGGCCC	1	4209	
!BamII GRGcYc	3	4209	4492 6319
!BspI20I Gggccc	1	4209	
!PspOMI Gggccc	1	4209	
!BseRI NNNnnnnnnnctctc	1	4226	
!-"- GAGGAGNNNNNNNNNN	1	4957	
!EcoNI CCTNNnnnagg	1	4278	
!PflFI GACNnngtc	1	4308	
!TthIII GACNnngtc	1	4308	
!KasI Ggcgc	2	4327	5967
!BstXI CCANNNNNNntg	1	4415	
!NotI GCggccgc	1	4507	
!EagI Cggccg	1	4508	
!BamBI Ggatcc	1	5169	
!BspDI ATcgat	1	5476	
!HdaI CATatg	1	5672	
!EcoRI Gaattc	1	5806	
!PaiI TTAtaa	1	6118	
!DraIII CACNNNgtg	1	6243	
!BsaAI YACgtr	1	6246	
1	gacgaaaggy cCTCGTGata cgcctatatt tataggttaa tgcctatgata ataattggtt		
!	BssSI. (1/2)		
61	cttaGACGTC aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aacctctatt tgtttatatt		
!	AntII.		
121	tctaaatata ttcaaatatG TATCCgctca tgagacaata acctgataa atgcttcaat		
!	BciVI.. (1 of 2)		
181	aatattgaaa aggaagagt		
!	塩基番号 201 to 1061 = いくつかの RE 部位が除かれたpUC119由来の APR 遺伝子		
!	1	2	3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
!	IM	S	I Q H F R V A L I P F F A

【表 27-4】

```

201 atg agt att caa cat ttc cgt gtc gcc ctt att ccc ttt ttt gcg
    16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
    A F C L P V F A H P E T L V K
246 gca ttt tgc ctt cct gtt ttt gct cac cca gaa acg ctg gtg aaa
    31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
    V K D A E D Q L G A R V G Y I
291 gta aaa gat gct gaa gat cag ttg ggt gcc cga gtg ggt tac atc
    46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
    E L D L N S G K I L E S F R P
336 gaa ctg gat ctg aac agc ggt aag atc ctt gag agt ttt cgc ccc
    61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
    E E R F P M M S T F K V L L C
381 gaa gaa cgt ttt coa atg atg agc act ttt aaa gtt ctg cta tgt
    76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
    G A V L S R I D A G Q E Q L G
426 ggc gcg gta tta tcc cgt att gac gcc ggg caa gag cha ctc ggt
    Bcgl.....
    91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
    R R I H Y S Q N D L V E Y S P
471 CGc cgc ata cac tat tct cag aat gac ttg gtt gag TAC Tca cca
    ...Bcgl..... ScaI....
    106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
    V T E K H L T D G M T V R S L
516 gtc aca gaa aag cat ctt acg gat ggc atg aca gta aga gaa tta
    121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
    C S A A I T M S D N Y A A N L
561 tgc agt gct gcc ata acc atg agt gat aac act gcg gcc aac tta
    136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
    L L T T I G G P K E L T A F L
606 ctt ctg aca aCG ATC Gga gga ccg aag gag cta acc gct ttt ttg
    PvuI.... (1/2)
    151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
    H N M G D H V T R L D R W E P

```

10

20

【表 27-5】

```

651   cac aac atg ggg gat cat gta act cgc ctt gat cgt tgg gaa ccg
166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
E L H E A I P N D E R D T T M
696   gag ctg aat gaa gcc ata cca aac gac gag cgt gac acc acg atg
181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
P V A M A T T L R K L L T G E
741   cct gta GCA ATG gca aca acg ttG CGC Aaa cta tta act ggc gaa
BsrDI...(1/2) FspI.... (1/2)
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
L L T L A S R Q Q L I D W M E
786   cta ctt act cta gct tcc cgg caa caa tta ata gac tgg atg gag
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
A D K V A G P L L R S A L F A
831   gcg gat aaa gtt gca gga cca ctt ctg cgc tgg gcc ctt ccg gct
226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
G W F I A D K S G A G E R G S
876   ggc tgg ttt att gct gat aaa tCT GGA gcc ggt gag cgt gGG TCT
BpmI....(1/2) BsaI.....
241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
R G I I A A L G P D G K P S R
921   Cgc ggt atC ATT GCA gca ctg ggg cca gat ggt aag ccc tcc cgt
BsaI..... BsrDI...(2/2)
256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
I V V I Y T T G S Q A T M D E
966   atc gta gtt atc tac acG ACg ggg aGT Cag gca act atg gat gaa
AhdI.....
271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285
R N R Q I A E I G A S L I K H
1011  cga aat aga cag atc gct gag ata ggt gcc tca ctg att aag cat
286 287
W .
1056   tgg taa
1062   ctgtcagac caagtttact
1081   catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga

```

10

20

【0251】

30

【表 27-6】

```

1141 tctttttga taatctcatg accaaatcc cttaacgtga gttttcggtc cactgagcgt
1201 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt ctgagatcc ttttttctg cgcgtaactc
1261 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc
1321 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc
1381 ttctagtgtg gcgtagttag ggcacccact tcaagaactc ttagcaccgc cctacatacc
1441 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg
1501 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt
1561 cgtgcataca gccacgcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg
1621 agcattgaga aagcgccacg cttccgaag ggagaagggc ggacagGTAT CCggttaagc
SciVI.. (2 of 2)
1681 gcaggggtcgg aacaggagag cgCACGAGgg agcttcaggg gggaacgcc ttgtatcttt
BssSI. (2/2)
1741 atagtctgtt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg attttgtga tgcctgtcag
1801 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt
1861 gctggccttt tgctCACATG Ttcttctctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta
PciI...
1921 ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagcgg aacgaccgag cgcagcaggt
1981 cagttagcga ggaagcgGAA GAGCgcccac tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc
SapI....
2041 cgattcatta atgCAGCTGg cagcagaggt ttcccagctg gaaagcgggc agtgagcgca
PvuII. (1/3)
2101 acgcaatTAA TGtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggcTTTACAc tttatgcttc
...-35.. Flac ...-10.
2161 cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacaCAGGA AACAGCTATG
M13Rev_seq_primer
2221 ACcatgatta cgCCAGGCTT TGGagccttt tttttggaga ttttcaac
PflMI.....
Hind3.
シグナル::リンカー::CLight
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
fM K K L L F A I P L V V P F Y
2269 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat
リンカー ..... FR4の終り
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
S H S A Q V Q L Q V D L E I K
2314 tct cac agt GCA Cag gtc caa CTG CAG GTC GAC CTC GAG atc aaa
ApaLI..... PstI... XhoI...
BspMI...
Sali...
AccI... (1/2)
HincII. (1/2)

```

10

20

【表 27-7】

Vlightドメインは、ApaLI-XhoIフラグメントとしてクローニングされ得る。
 VL-CL(κ)セグメントは、ApaLI-AscIフラグメントとしてクローニングされ得る。 :-----

 Ckappa-----
 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
 R G T V A A P S V F I F P P S
 2359 cgt gga act gtg gct gca cca tct GTC TTC atc ttc ccg cca tct
 BbsI...(1/2)

46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 D E Q L K S G T A S V V C L L
 2404 gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ttg

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 N N F Y P R E A K V Q W K V D
 2449 aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat

76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
 N A L Q S G N S Q E S V T E Q
 2494 aac gcc ctg caa tcy ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
 D S K D S T Y S L S S T L T L
 2539 gac agc aag gac agc acc tac agc ctg agc acc ctg acc CTG
 EspI...

106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
 S K A D Y E K H K V Y A C E V
 2584 AGC aaa gca gac tac gag aaa cac aaa GTC TAC gcc tgc gaa gtc
 ...EspI.... AccI...(2/2)

121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
 T H Q G L S S P V T K S F N R
 2629 acc cat cag gcc ctg agt tca CCG GTg aca aag agc ttc aac agg
 AgeI...(1/2)

136 137 138 139 140
 G E C . .
 2674 gga gag tgt taa taa GG CGCGCCaatt
 AscI.....
 BssHII.

10

20

```

2701      tttttcaag gagacagtgca ta
|
| PelB::3-23(stuffed)::CH1::III 利与第2
|
|      1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15
|      M   K   Y   L   L   P   T   A   A   A   G   L   L   L   L
| 2723  atg aaa tac.cta ttg oct aog gca gcc gct gga ttg tta tta ctc
|
|-----
|
|      16  17  18  19  20  21  22
|      A   A   Q   P,  A   M   A
| 2768 gcG GCC cag ccG GCC atg gcc
|      SfiI.....
|      NcoMIV.. (1/2)
|      NcoI....
|
|
|      FRI(DP47/V3-23)-----
|      23  24  25  26  27  28  29  30
|      E   V   Q   L   L   E   S   G
| 2789  gaa|gtt|CAA|TTG|tta|gag|tct|ggt|
|           | MfeI |
|
|-----
|      FRI
|      31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45
|      G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L   S   C   A
| 2813 |ggc|ggt|ctt|gtt|cag|oct|ggt|ggt|tct|tta|cgt|ctt|tct|tgc|gct|
|
|-----
|      FRI-----
|      46  47  48
|      A   S   G
| 2858 |gct|TCC|CGA|
|           | BspXI |
|
|
|      Stuffer for CDR1, FR2, and CDR2----->
|
| 2867 27977-485201784111m gcttcAGATC Tgtttgacct
|      BglII..
| 2887 tttgtggggt gatgcagatc gcgttacgga gatcgaccga ctgcttgagc aaagaccag
| 2947 cttaaactgt CATCAGgcatt gggatgttat tcgcacaaac agtcgtcagg atcttaacct
|      BclI...
| 3007 gaggcttttt ttacctactc tgcaagcagc gacatctggt ttgacacaga gccgatccgc
| 3067 tcgtcagttg gtagaacatc taacacgttg ggaatggcatt aatttgotta atgatgatgc

```

30

【表 27-9】

```

3127 taaaacctgg cagcagccag gctotgccat cctgaacgtt tggctgacca gtatgttgaa
3187 ggtaccgta gtggctgccc tacctatgcc Atttgataag TGGtacagcg ccagtggcta
XcmI.....
3247 cgaanacaacc caggacggcc caactgggttc gctgaatata agtgttggag caaaaatttt
3307 gtatgagggc gtgcagggag acaaatcacc aatccacag gcggttgatc tgtttgctgg
3367 gaaaccacag caggaggttg tgttggtgctc gctggaagat accctgggaga ctctttccaa
3427 acgctatggc aataatgtga gtaactggaa aacacctgca atggccttaa cgttcggggc
3487 aataaatttc ttgtgtgtac cgcaggccgc agcgggaaga ACGGCTcacc aggcggagta
MIUI..
3547 tcaaaaccgt ggaacagaaa acgatatgat tgttttctca ccaacgacaa gcgacgtcc
3607 tgtgcttgcc tggatgttg tgcaccccg tccagagtggg tttattgctc ccgatggaa
3667 agttgataag cactatgaag atcagctgaa aatgtacgaa aattttggcc gtaagtgcct
PvuII.
3727 ctgGTIACg aagcaggatg tggagggcca taaggagtcg
HpaI..
HincII(2/2)

-----FR3-----
      4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16
      93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
      S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M
3767 |TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|
      | XbaI |

-----FR3----->|
      17 18 19 20
      106 107 108 109
      M  S  L  S  l  s  i  r  s  g
3806 |aac|agc|TTA|AG t ctg agc att CGG TCC G
      |AflIII | RsrII..

      q  h  s  p  t  .
3834 gg caa cat tct cca aac tga ccagaaga cacaacggc
3872 ttacgctaaa tcccgcgcac gggatggtaa agaggtggcg tctttgctgg cctggactca
3932 tcagatgaag gccaaaaatt ggcaggagtg gacacagcag gcagcgaaac aagcactgac
3992 catcaactgg tactatgctg atgtaaacgg caatattggt tatgttcata ctggtgctta
4052 tccagatcgt caatcaggcc atgatccgcg attacccgtt cctggtacgg gaaaatggga
4112 ctggaaggcg ctattgcott ttgaatgaa cctaaggtg tataacccc ag
4164 aa GCTAGC ctgaggcttc
      NheI..

4182 G|GTC|ACC| gtc tca agc
      | BstEII |

```

10

20

【表 27-10】

```
136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
A S T K G P S V F P L A P S S
4198 gcc tcc acc aag ggc cca tgg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc

151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
K S T S G G T A A L G C L V K
4243 aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag

166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
D Y F P E P V T V S W N S G A
4288 gac tac ttg ccc gaa ccg gtg acg gtg tgg aac tca ggc gcc

181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
L T S G V H T F P A V L Q S S
4333 ctg acc agc ggc gtc cag acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca

196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
G L Y S L S S V V T V P S S S
4378 gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc

211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
L G T Q T Y I C N V N H K P S
4423 ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc

226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238
N T K V D K K V E P K S C
4468 aac acc aag gtg gac aag AAA GTT CAG CCC AAA TCT TGT
ON-TORCiorw.....

139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
A A A H H H H H H G A A
4507 GCG GCC GCA cat cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca
NotI.....
EagI....

151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
E Q K L I S E E D L N G A A
4543 gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag

Mature III----->...
166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
```

10

20

【0256】

30

【表 27-11】

```

T V E S C L A K P H T E N S F
4588 act gtt gaa agt tgt tta gca aaa cct cat aca gaa aat tca ttt
181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
F N V W K D D K T L D R Y A N
4633 act aac gtc tgg aaa gac gac aaa act tta gat cgt tac gct aac
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y E G C L W N A T G V V V C T
4678 tat gag ggc tgt ctg tgg AAT GCT aca ggc gtt gtg gtt tgt act
BsmI....
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
G D E T Q C Y G T W V P I G L
4723 ggt gac gaa act cag tgt tac ggt aca tgg gtt cct att ggg ctt
226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
A I P E N E G G G S E G G S
4768 gct atc cct gaa aat gag ggt ggt ggc tct gag ggt ggc ggt tct
241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255
E G G G S E G G G T K P P E Y
4813 gag ggt ggc ggt tct gag ggt ggc ggt act aaa cct cct gag tac
256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
G D T P I P G Y T Y I N P L D
4858 ggt gat aca cct att ccg ggc tat act tat atc aac cct ctc gac
271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285
G T Y P P G T E Q N P A N P N
4903 ggc act tat ccg cct ggt act gag caa aac ccc gct aat cct aat
286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
P S L E E S Q P L N T F M F Q
4948 cct tct ctt GAG GAG tct cag cct ctt aat act ttc atg ttt cag
BseRI..(2/2)
301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315
N N R F R N R Q G A L T V Y T
4993 aat aat agy ttc cga aat agy cag ggt gca tta act gtt tat acg
316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330
G T V T Q G T D P V K T Y Y Q

```

10

20

【表 27-12】

```

5038   ggc act gtt act caa ggc act gac ccc gtt aaa act tat tac cag
      331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345
      Y T P V S S K A M Y D A Y W N
5083   tac act cct gta tca tca aaa gcc atg tat gac gct tac tgg aac
      346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360
      G K F R D C A F H S G F N E D
5128   ggt aaa ttc aga gac tgc gct ttc cat tct ggc ttt aat gag GAT
      BamHI...
      361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375
      P F V C E Y Q G Q S S D L P Q
5173   CCA ttc gtt tgt gaa tat caa ggc caa tcg tct gac CTG Cct caa
      BamHI... BspMI...(2/2)
      376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390
      P P V N A G G G S G G G S G G
5218   cct cct gtc aat gct ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt tct ggt ggc
      391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405
      G S E G G G S E G G G S E G G
5263   ggc tct gag ggt ggc ggc tct gag ggt ggc ggt tct gag ggt ggc
      406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420
      G S E G G G S G G G S G S G D
5308   ggc tct gag ggt ggc ggt tcc ggt ggc ggc tcc ggt tcc ggt gat
      421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435
      F D Y E K M A N A N K G A M T
5353   ttt gat tat gaa aaa atg gca aac gct aat aag ggg gct atg acc
      436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450
      E N A D E N A L Q S D A K G K
5398   gaa aat gcc gat gaa aac gcg cta cag tct gac gct aaa ggc aaa
      451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465
      L D S V A T D Y G A A I D G F
5443   ctt gat tct gtc gct act gat tac ggt gct gct ATC GAT ggt ttc
      BspDI..
      466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480
      I G D V S G L A N G N G A T G

```

10

20

【0258】

30

【表 27-13】

```

5488 att ggt gac gtt tcc ggc ctt gct aat ggt aat ggt gct act ggt
|
| 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495
| D F A G S N S Q M A Q V G D G
5533 gat ttt gct ggc tct aat tcc caa atg gct caa gtc ggt gac ggt
|
| 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510
| D N S P L M N N F R Q Y L P S
5578 gat aat tca cct tta atg aat aat ttc cgt caa tat tta cct tct
|
| 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525
| L P Q S V E C R P Y V F G A G
5623 ttg cct cag tcg gtt gaa tgt cgc cct tat gtc ttt ggc gct ggt
|
| 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540
| K P Y E F S I D C D K I M L F
5668 aaa cCA TAT Gaa ttt tct att gat tgt gac aaa ata aac tta ttc
| NdeI....
|
| 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555
| R G V F A F L L Y V A T F M Y
5713 cgt ggt gtc ttt gcg ttt ctt tta tat gtt gcc acc ttt atg tat
|
| 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570
| V F S T F A N I L R N K E S .
5758 gta ttt tcg acg ttt gct aac ata ctg cgt aat aag gag tct taa
|
| 571
|
| 5803 taa GAATTC
| EcoRI.
5812 actggcgt cgttttaca cgtcgtgact gggaaaaacc tggcgttacc caacttaac
5871 gccttgacg acatccccc ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcacCGATC
| PvuI..
5931 Gccttccca acagtTCCGC Agcctgaatg gcaaatGCCG CCTgatgcgg tattttctcc
| ...PvuI... (3/3) FspI... (2/2) KsaI... (2/2)
5991 ttacgcactc gtgcggtatt tcacacgcga tataaattgt aaacgttaat attttgttaa
6051 aattcgogtt aaatttttgt taatcagct cattttttaa ccaataggcc gaaatcgga
6111 aaatccCTA TAAatcaaaa gaatagcccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttgga
| PstI...
6171 acaagagtcc actattazag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc
6231 agggcgatgy ccCACTacGT Gaaccatcac ccaatcaag tttttgggg tcgaggtgcc
| DraIII....

```

10

20

【0259】

30

【表 27-14】

```
6291 gtanagcact aaatcggaac cctaaggga gccccgatt tagagcttga cggggaaaGC
!                                     NgMIV..
6351 CGGCgaacgt ggcgagaag gaagggaaga aagcgaagg agcgggcgt agggcgctgg
! ..NgMIV, (2/2)
6411 caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgttaat gcgcgcctac
6471 agggcgcgta ctatggttgc tttagcgggt gcagtctcag tacaatctgc totgatgcg
6531 catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgcgtga cgcgcctga cgggcttgc
6591 tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga
6651 ggttttcacc gtcacacccg aaacgcgcga
```

10

20

【0260】

30

【表 2 8 - 1】

表630:CDR1/2多様性をクローン化するために用いられたオリゴヌクレオチド。

全ての配列は5'-3'である

1) ON_CD1Bsp, 30 塩基

```

A C C T C A C T G G C T T C C G G A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
T T C A C T T T C T C T
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

```

10

2) ON_Br12, 42 塩基

```

A G A A A C C C A C T C C A A A C C
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
T T T A C C A G G A G C T T G G C G
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
A A C C C A
37 38 39 40 41 42

```

3) ON_CD2Xba, 51 塩基

```

G G A A G G C A G T G A T C T A G A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
G A T A G T G A A G C G A C C T T T
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
A A C G G A G T C A G C A T A
37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51

```

20

4) ON_BotXba, 23 塩基

【0 2 6 1】

30

【表 2 8－2】

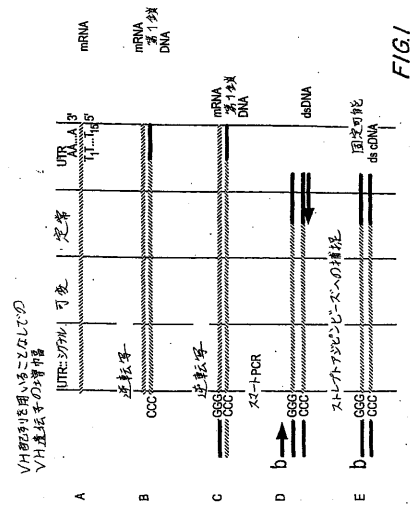
g	g	A	A	g	g	c	A	g	T	g	A	T	c	T	A	g	A
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
g	A	T	A	g													
19	20	21	22	23													

$\frac{1}{2} \ln(h')$

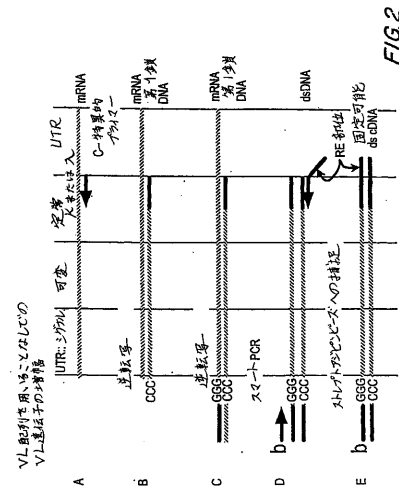
10

20

【図 1】



【図 2】



【図 3】

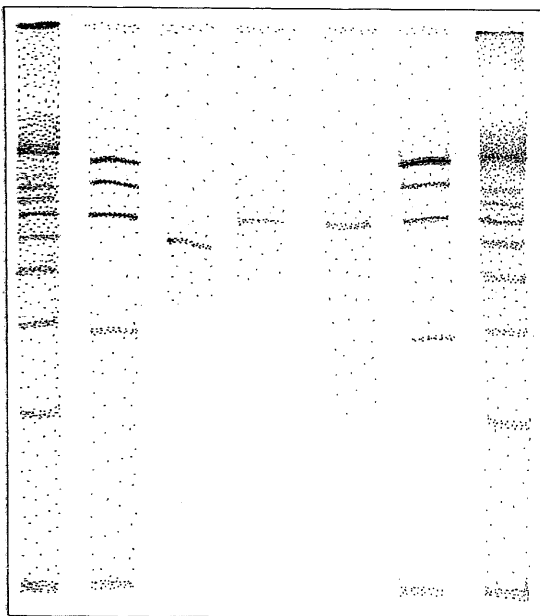


FIG. 3

【図 4】

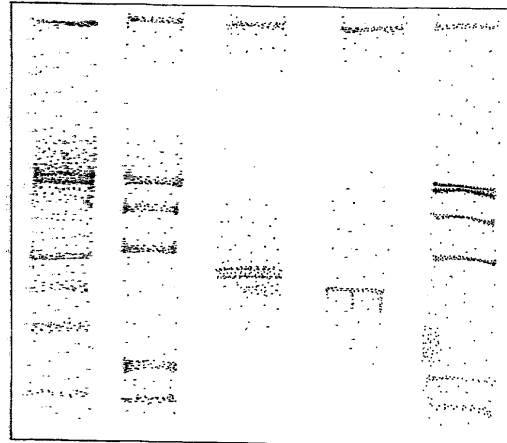


FIG. 4

【図 5】

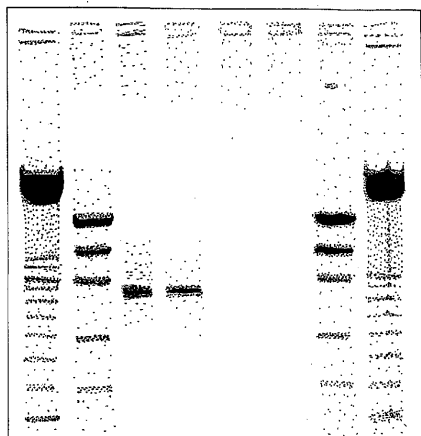


FIG. 5

【図 6】

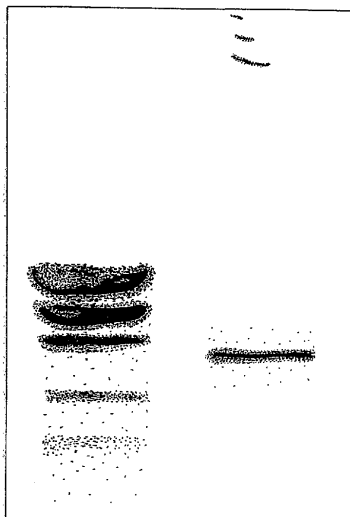


FIG. 6

【配列表】

0005599745000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 エドワード ハーシュ コーエン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, ヒル ロード 55, アパ
ートメント 200
- (72)発明者 ホラシオ ガブリエル ナストリ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02464, ニュートン, ペンシルベニア アベニュー
18
- (72)発明者 クリスティン エル. ルーキー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02151, リビア, ハンコック ストリート 14
- (72)発明者 レーネ ホエト
オランダ国 エヌエルー6226 ツェーツェット マーストリヒト, 32, チャーチラーン

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 国際公開第97/008320 (WO, A1)
国際公開第96/035781 (WO, A1)
特表2000-500647 (JP, A)
米国特許第05962272 (US, A)
米国特許第05962271 (US, A)
国際公開第97/020923 (WO, A1)
国際公開第97/049809 (WO, A1)
JBC, Vol.273, No.34(1998)p.21769-21776
Analytical Biochemistry, 1989, Vol.177, pp.120-124
KIM S C, SCIENCE, 米国, 1988年, V240N4851, P504-506
PODHAJSKA A J SZYBALSKI W, GENE, NL, 1985年, V40N2-3, P175-182

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00