



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0076868  
(43) 공개일자 2011년07월06일

(51) Int. Cl.

*C12N 1/21* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)  
*C12P 5/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7002773

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년07월01일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년02월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/049429

(87) 국제공개번호 WO 2010/003007

국제공개일자 2010년01월07일

(30) 우선권주장

61/133,947 2008년07월02일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

다니스코 유에스 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토  
페이지 밀 로드 925

더 굿이어 타이어 앤드 러버 캄파니

미국 오하이오주 44316-1 애크론 이스트 마켓트  
스트리트 1144

(72) 발명자

칼라브리아 앤소니 루돌프

미국 94402 캘리포니아주 산 마테오 사우스 텔라  
웨어 스트리트 945

서빈 마가렛 에이

미국 94062 캘리포니아주 레드우드 시티 팔로마  
드라이브 404

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리어나

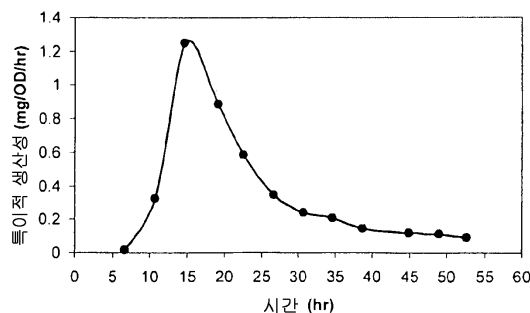
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 분리 조건 및/또는 안전한 작업 범위 하에서의 C5 탄화수소가 없는 이소프렌의 제조 방법 및 조성물

### (57) 요약

본 발명은 세포가 정지상에 있는, 배양된 세포로부터의 이소프렌의 제조 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 배양된 세포 및/또는 증가된 양의 이소프렌을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 기상 내에 불연성 농도의 이소프렌을 포함하는 시스템을 제공한다. 부가적으로는, 본 발명은 이소프렌 조성물, 예컨대 증가된 양의 이소프렌 또는 증가된 순도를 갖는 조성물을 제공한다.

대표도 - 도111c



(72) 발명자

**초타니 고팔 케이**

미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 캐롤 리 드라이브 10166

**맥컬리프 조셉 씨**

미국 94085 캘리포니아주 쉐니베일 프린스턴 드라이브 663

**밀러 마이클 찰스**

미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 텍사스 스트리트 298 넘버9

**사보 티모시 앨런**

미국 44470 오하이오주 사우팅턴 파크맨 로드 3327

**웹스터 에린 린**

미국 44313 오하이오주 애크론 웨더베인 레인 1329 넘버3씨

**샌포드 칼 제이**

미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 알리시아 코트 10434

**라 두카 리차드**

미국 94588 캘리포니아주 플레전튼 징거 코트 7430

**화이트드 그레고리 엠**

미국 94002 캘리포니아주 벨몬트 사우스 로드 304

(30) 우선권주장

61/134,011 2008년07월02일 미국(US)

61/134,094 2008년07월02일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

세포가 정지상에 있고, 이소프렌 제조가 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조된 이소프렌의 양의 약 2 배 이상인, 이소프렌을 제조할 수 있는 배양물 내 세포.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 이소프렌이 기상에서 제조되고,

(a) 기상이 약 9.5 % (부피) 이상의 산소를 포함하고, 기상 내 이소프렌의 농도가 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이거나

(b) 기상 내 이소프렌의 농도가 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이고, 세포가 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 세포.

### 청구항 3

세포가 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하는 조건 하에서 성장하는, 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포.

### 청구항 4

세포가 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하는 조건 하에서 성장하는, 약 0.1 mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr 초과의 이소프렌의 평균 용적 생산성을 갖는 배양물 내 세포.

### 청구항 5

세포가 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하는 조건 하에서 성장하는, 세포가 세포 배양 배지로부터 소모하는 탄소의 약 0.002 몰% 초과를 이소프렌으로 전환시키는 배양물 내 세포.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 제한된 글루코오스 조건 하에서 성장하는 세포.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 정지상 동안 제조된 이소프렌의 양이 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조된 이소프렌의 양의 약 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 배 또는 그 이상의 배수인 세포.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함하는 세포.

### 청구항 9

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2 mg 초과로 포함하고, 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.94 중량% 이상의 이소프렌을 포함하는 조성물.

### 청구항 10

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 mg 이상 포함하는 조성물.

### 청구항 11

제 1 항의 세포로부터의 휘발성 유기 분획의 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g 이상의 이

소프렌 (w/w) 을 포함하는 조성물.

#### 청구항 12

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2 mg 초과로 포함하고, 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물 내 임의의 화합물에 대해 화합물 당 약 0.5 ug/L 이하를 포함하는 조성물.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물이 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 및 *시스*-펜트-3-엔-1-인으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 C5 탄화수소를 포함하는 조성물.

#### 청구항 14

제 12 항에 있어서, 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물이 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인을 갖는 조성물.

#### 청구항 15

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2 mg 초과로 포함하고, 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 갖는 조성물.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서, 이소프렌이 배출-기체 부분으로부터 회수되는 조성물.

#### 청구항 17

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2 mg 초과로 포함하고, 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 및 탄소수 10 이상의 이소프레노이드 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 조성물.

#### 청구항 18

제 1 항의 세포에 의해 제조되는 이소프렌을 약 2 mg 초과로 포함하고, 2-헵타논, 6-메틸-5-헵텐-2-온, 2,4,5-트리메틸피리딘, 2,3,5-트리메틸피라진, 시트로넬랄, 아세트알데하이드, 메탄티올, 메틸 아세테이트, 1-프로판올, 디아세틸, 2-부타논, 2-메틸-3-부텐-2-올, 에틸 아세테이트, 2-메틸-1-프로판올, 3-메틸-1-부타날, 3-메틸-2-부타논, 1-부탄올, 2-펜타논, 3-메틸-1-부탄올, 에틸 이소부티레이트, 3-메틸-2-부테날, 부틸 아세테이트, 3-메틸부틸 아세테이트, 3-메틸-3-부트-1-에닐 아세테이트, 3-메틸-2-부트-1-에닐 아세테이트, (E)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, (Z)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, 및 2,3-시클로헵텐올피리딘으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제 2 화합물을 포함하며; 이소프렌의 양에 대한 제 2 화합물의 양은 약 0.01 % (w/w) 이상인 조성물.

#### 청구항 19

(i) 이소프렌을 포함하는 기상 및 (ii) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 배양물 내 세포를 포함하는 조성물.

#### 청구항 20

제 19 항에 있어서, 조성물이 폐쇄계를 포함하고, 1 시간 동안 배양된 1 OD<sub>600</sub> 1 mL 로 표준화되었을 때 기상이 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 ug/L 이상의 이소프렌을 포함하는 조성물.



#### 청구항 21

제 19 항에 있어서, 조성물이 개방계를 포함하고, 1 vvm 의 속도로 살포되었을 때 기상이 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 ug/L 이상의 이소프렌을 포함하는 조성물.

#### 청구항 22

제 19 항에 있어서, 조성물이 휘발성 유기 분획 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 포함하는 기상의 휘발성 유기 분획을 포함하는 조성물.

#### 청구항 23

하기 단계를 포함하는, 이소프렌의 제조 방법:

(a) 이소프렌의 제조에 적합한 배양 조건 하에서 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 세포를 배양하는 단계로서; 정지상 동안 제조되는 이소프렌의 양이 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조되는 이소프렌의 양의 약 2 배 이상인 단계, 및

(b) 이소프렌을 제조하는 단계.

#### 청구항 24

제 23 항에 있어서, 세포가 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양되는 방법.

#### 청구항 25

제 23 항에 있어서, 이소프렌이 세포 배양물의 방출-기체 일부로부터 회수되는 방법.

#### 청구항 26

기상이 약 9.5 % (부피) 미만의 산소 또는 약 9.5 % (부피) 이상의 산소를 포함하고, 기상 내 이소프렌의 농도가 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과인, 기상 내에 불연성 농도의 이소프렌을 포함하는 시스템.

#### 청구항 27

제 26 항에 있어서, 이소프렌 이외의 기상의 부분이 약 10% 내지 약 100% (부피) 산소를 포함하는 시스템.

#### 청구항 28

제 26 항에 있어서, 이소프렌 이외의 기상의 부분이 약 0% 내지 약 99% (부피) 질소를 포함하는 시스템.

#### 청구항 29

제 26 항에 있어서, 이소프렌 이외의 기상의 부분이 약 1% 내지 약 50% (부피) CO<sub>2</sub> 를 포함하는 시스템.

#### 청구항 30

하기 단계를 포함하는, 이소프렌의 제조 방법:

(a) 이소프렌의 제조에 적합한 배양 조건 하에서 세포를 배양하는 단계로서; 기상이 약 9.5 % (부피) 이상의 산소를 포함하는 단계, 및

(b) 이소프렌을 제조하는 단계로서, 기상 내 이소프렌의 농도는 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이고, 세포는 약 400 nmole/g<sub>DCM</sub>/hr 초과인 이소프렌을 제조하는 단계.

#### 청구항 31

하기 단계를 포함하는, 이소프렌의 제조 방법:

(a) 이소프렌의 제조에 적합한 배양 조건 하에서 세포를 배양하는 단계로서; 기상이 약 9.5 % (부피) 이하의 산소를 포함하는 단계, 및

(b) 이소프렌을 제조하는 단계로서, 세포는 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과인 이소프렌을 제조하는 단계.

## 명세서

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 각각의 내용이 전체가 참조로서 본원에 인용되어 있는 2008 년 7 월 2 일에 출원된 미국 가출원 61/134,094 호, 2008 년 7 월 2 일에 출원된 미국 가출원 61/133,947 호 및 2008 년 7 월 2 일에 출원된 미국 가출원 61/134,011 호의 우선권을 주장한다.

### 배경 기술

[0003] 이소프렌 (2-메틸-1,3-부타디엔) 은 다양한 합성 중합체, 특히 현저하게는 합성 고무에 대한 중요한 원료이다.

이소프렌은 다양한 미생물, 식물 및 동물 중에 의해 자연적으로 생성된다. 특히, 이소프렌의 생합성에 대해서는 하기 2 가지 경로: 메발로네이트 (MVA) 경로 및 비-메발로네이트 (DXP) 경로 (도 19) 가 밝혀졌다.

그러나, 자연 발생적 유기체로부터의 이소프렌의 수율은 상업적으로는 매력적이지 않다. 연간 약 800,000 톤의 시스-폴리이소프렌이 이소프렌 중합으로부터 제조되고, 이들 폴리이소프렌 대부분은 타이어 및 고무 산업에서 사용된다. 이소프렌은 또한 신발, 기계 제품, 의료 제품, 스포츠 용품 및 라텍스와 같은 다른 제품에서 합성 엘라스토머로서 사용하기 위해 공중합된다.

[0004] 현재, 타이어 및 고무 산업은 천연 및 합성 고무의 사용에 기반을 두고 있다. 천연 고무는 고무나무 또는 아프리카의 우림지역에서 발견되는 식물의 유액즙으로부터 수득된다. 합성 고무는 주로 부타디엔 중합체를 기초로 한다. 상기 중합체의 경우, 부타디엔은 에틸렌 및 프로필렌 제조로부터 조-생성물로서 수득된다.

[0005] 이소프렌은 석유 분별에 의해 수득될 수 있지만, 상기 물질의 정제는 값비싸고 시간 소모적이다. 탄화수소의 C5 스트림의 석유 열분해로는 오직 약 15% 이소프렌 만을 생성한다. 그러므로, 더욱 경제적인 이소프렌의 제조 방법이 필요하다. 특히, 이소프렌을 탄탄한 상업 공정의 요구를 충족시키기에 충분한 속도, 적정농도 및 순도로 생성하는 방법이 요망된다. 또한 값싼 원료로부터 이소프렌을 제조하기 위한 시스템이 요망된다.

### 발명의 내용

#### 과제의 해결 수단

##### [0006] 발명의 요약

[0007] 하나의 양상에서, 본 발명은 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 약 400 nmole 초과인 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/시간 (nmole/g<sub>wcm</sub>/hr) 의 이소프렌을 생성하는 배양물 내 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 탄수화물, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합과 같은 탄소원을 제한 없이 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다.

[0008] 일부 구현예에서, 본 발명은 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.002% 초과를 이소프렌으로 전환시키는 배양물 내 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 탄수화물, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합과 같은 탄소원을 제한 없이 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다.

- [0009] 일부 구현예에서, 본 발명은 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산을 포함하는 배양물 내 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 이중 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 탄수화물, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합과 같은 탄소원을 제한 없이 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다.
- [0010] 하나의 양상에서, 본 발명은 이소프렌 제조를 위해 본원에 기재된 임의의 세포를 사용하는 방법과 같은 이소프렌의 제조 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과 이소프렌을 제조하기에 충분한 조건 하에서의 세포의 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 또한 세포에 의해 제조된 이소프렌의 회수를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 세포에 의해 제조된 이소프렌의 정제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 이소프렌의 중합을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 이중 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 탄수화물, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합과 같은 탄소원을 제한 없이 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다. 다양한 구현예에서, 정지상 동안 제조된 이소프렌의 양 (예컨대, OD<sub>600</sub> 당 시간당 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양 또는 제조된 이소프렌의 총 양) 은 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조된 이소프렌의 양의 약 2 배 이상이다. 일부 구현예에서, 기상은 약 9.5 % (부피) 이상의 산소를 포함하고, 기상 내 이소프렌의 농도는 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이다. 특정 구현예에서, (i) 기상 내 이소프렌의 농도는 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이고, (ii) 세포는 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과 이소프렌을 제조한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 본 방법은 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.002% (mol/mol) 초과를 이소프렌으로 전환시키는데 충분한 조건 하에서의 세포의 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 또한 세포에 의해 제조된 이소프렌의 회수를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 세포에 의해 제조된 이소프렌의 정제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 이소프렌의 중합을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 이중 핵산을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 탄수화물, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합과 같은 탄소원을 제한 없이 포함하는 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다.
- [0012] 일부 구현예에서, 이소프렌은 오직 정지상에서만 제조된다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 성장상 및 정지상 모두에서 제조된다. 다양한 구현예에서, 정지상 동안 제조된 이소프렌의 양 (예컨대, OD<sub>600</sub> 당 시간당 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양 또는 제조된 이소프렌의 총 양) 은 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조된 이소프렌의 양의 약 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 배 이상 또는 그 이상의 배수이다.
- [0013] 하나의 양상에서, 본 발명은 이소프렌을 포함하는 조성물 및 시스템을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 mg 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 조성물의 휘발성 유기 분획의 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g 이상의 이소프렌(w/w) 을 포함한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 본 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 이소프렌 이외의 C5 탄화수소 (예컨대 1,3-시클로펜타디엔, 시스-1,3-펜타디엔, 트랜스-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, 트랜스-피페릴렌, 시스-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, 트랜스-펜트-3-엔-1-인, 또는 시스-펜트-3-엔-1-인) 를 포함한다. 일부 구현예

에서, 본 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 미만의 1,3-시클로펜타디엔, 시스-1,3-펜타디엔, 트랜스-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, 트랜스-피페릴렌, 시스-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, 트랜스-펜트-3-엔-1-인, 또는 시스-펜트-3-엔-1-인을 갖는다. 특정 구현예에서, 본 조성물은 약 2 mg 초과와 이소프렌을 갖고, 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 갖는다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 조성물은 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물 내 임의의 화합물에 대해 이소프렌의 중합을 억제하는 화합물을 약 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ug/L 이하로 갖는다. 특정 구현예에서, 본 조성물은 또한 약 2 mg 초과와 이소프렌을 갖는다.

[0016] 일부 구현예에서, 본 조성물은 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 및 탄소수 10 이상의 이소프레노이드 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 약 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 또는 120 ug/L 이상의 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올 (예컨대, 3-메틸-3-부텐-1-올 또는 3-메틸-2-부텐-1-올), 또는 상기 중 임의의 2 개 이상을 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물은 약 2 mg 초과와 이소프렌을 갖고, 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 및 탄소수 10 이상의 이소프레노이드 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 갖는다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 조성물은 이소프렌 및, 2-헵타논, 6-메틸-5-헵텐-2-온, 2,4,5-트리메틸피리딘, 2,3,5-트리메틸피라진, 시트로넬랄, 아세트알데하이드, 메탄티올, 메틸 아세테이트, 1-프로판올, 디아세틸, 2-부타논, 2-메틸-3-부텐-2-올, 에틸 아세테이트, 2-메틸-1-프로판올, 3-메틸-1-부타날, 3-메틸-2-부타논, 1-부탄올, 2-펜타논, 3-메틸-1-부탄올, 에틸 이소부티레이트, 3-메틸-2-부테날, 부틸 아세테이트, 3-메틸부틸 아세테이트, 3-메틸-3-부트-1-에닐 아세테이트, 3-메틸-2-부트-1-에닐 아세테이트, (E)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, (Z)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, 및 2,3-시클로헵텐올피리딘으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제 2 화합물을 포함한다. 다양한 구현예에서, 중량% 단위의 이소프렌 양에 대한 상기 제 2 성분 중 하나의 양 (즉, 성분의 중량을 이소프렌 중량으로 나누고 100 을 곱함) 은 약 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 110% (w/w) 이상이다.

[0018] 일부 구현예에서, 본 조성물은 (i) 이소프렌을 포함하는 기상 및 (ii) 약 400 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 초과와 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 폐쇄계를 포함하고, 1 시간 동안 배양된 1 OD<sub>600</sub> 1 mL 로 표준화되었을 때 기상은 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ug/L 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 개방계를 포함하고, 1 vvm 의 속도로 살포되었을 때 기상은 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ug/L 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 휘발성 유기 분획 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 휘발성 유기 분획 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 이소프렌 이외의 C5 탄화수소 (예컨대, 1,3-시클로펜타디엔, 시스-1,3-펜타디엔, 트랜스-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, 트랜스-피페릴렌, 시스-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, 트랜스-펜트-3-엔-1-인, 또는 시스-펜트-3-엔-1-인) 를 포함한다. 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 휘발성 유기 분획 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 1,3-시클로펜타디엔, 시스-1,3-펜타디엔, 트랜스-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, 트랜스-피페릴렌, 시스-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, 트랜스-펜트-3-엔-1-인, 또는 시스-펜트-3-엔-1-인을 갖는다. 특정 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 약 2 mg 초과와 이소프렌을 갖고, 휘발성 유기 분획 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 갖는다.

[0019] 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 이소프렌의 중합을 억제하는 기상의 휘발성 유기 분획 내 임의의 화합물에 대해 이소프렌의 중합을 억제하는 화합물을 약 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ug/L 이하로 갖는다. 특정 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 또한 약 2 mg 초과와 이소프렌을 갖는다.

[0020] 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 및 탄소수 10 이상의 이소프레노이드 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 갖는다. 일부 구현예에서, 기상

의 휘발성 유기 분획은 약 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 또는 120 ug/L 이상의 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올 (예컨대, 3-메틸-3-부텐-1-올 또는 3-메틸-2-부텐-1-올), 또는 상기 중 임의의 2 개 이상을 갖는다. 특정 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 약 2 mg 초과,의 이소프렌을 갖고, 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 및 탄소수 10 이상의 이소프레노이드 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 갖는다.

[0021] 일부 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획은 이소프렌 및, 2-헵타논, 6-메틸-5-헵텐-2-온, 2,4,5-트리메틸피리딘, 2,3,5-트리메틸피라진, 시트로넬랄, 아세트알데하이드, 메탄티올, 메틸 아세테이트, 1-프로판올, 디아세틸, 2-부타논, 2- 메틸-3-부텐-2-올, 에틸 아세테이트, 2-메틸-1-프로판올, 3-메틸-1-부타날, 3-메틸-2-부타논, 1-부타놀, 2-펜타논, 3-메틸-1-부타놀, 에틸 이소부티레이트, 3-메틸-2-부테날, 부틸 아세테이트, 3-메틸부틸 아세테이트, 3-메틸-3-부트-1-에닐 아세테이트, 3-메틸-2-부트-1-에닐 아세테이트, (E)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, (Z)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, 및 2,3-시클로헵텐올피리딘으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제 2 화합물을 포함한다. 다양한 구현예에서, 기상의 휘발성 유기 분획 내, 중량% 단위의 이소프렌 양에 대한 상기 제 2 성분 중 하나의 양 (즉, 성분의 중량을 이소프렌 중량으로 나누고 100 을 곱함) 은 약 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 110% (w/w) 이상이다.

[0022] 본 발명의 임의의 조성물의 일부 구현예에서, 이소프렌의 일부 이상은 기상에 있다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 일부 이상은 액상 (예컨대 응축물) 에 있다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 일부 이상은 고상에 있다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 일부 이상은 고체 지지체, 예컨대 실리카 및/또는 활성 탄소를 포함하는 지지체에 흡착된다. 일부 구현예에서, 조성물은 에탄올을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 75 내지 약 90 중량% 의 에탄올, 예컨대 약 75 내지 약 80 중량%, 약 80 내지 약 85 중량%, 또는 약 85 내지 약 90 중량% 의 에탄올을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 4 내지 약 15 중량% 의 이소프렌, 예컨대 약 4 내지 약 8 중량%, 약 8 내지 약 12 중량%, 또는 약 12 내지 약 15 중량% 의 이소프렌을 포함한다.

[0023] 일부 구현예에서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 세포 및/또는 조성물을 포함하는 시스템을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 시스템은 챔버가 약 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이상의 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포를 포함하는 반응기를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 폐쇄계가 아니다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 일부 이상은 시스템으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 시스템은 이소프렌을 포함하는 기상을 포함한다. 다양한 구현예에서, 기상은 본원에 기재된 임의의 조성물을 포함한다.

[0024] 하나의 양상에서, 본 발명은 폴리이소프렌을 포함하는 타이어를 제공한다. 일부 구현예에서, 폴리이소프렌은 (i) 본원에 기재된 임의의 조성물 내에서 이소프렌을 중합함 또는 (ii) 본원에 기재된 임의의 조성물로부터 회수된 이소프렌을 중합함으로써 제조된다. 일부 구현예에서, 폴리이소프렌은 시스-1,4-폴리이소프렌을 포함한다.

[0025] 본 발명의 임의의 조성물, 시스템 및 방법의 일부 구현예에서, 기상에서 불연성 농도의 이소프렌이 제조된다. 일부 구현예에서, 기상은 약 9.5 % (부피) 미만의 산소를 포함한다. 일부 구현예에서, 기상은 약 9.5 % (부피) 이상의 산소를 포함하고, 기상 내 이소프렌의 농도는 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초과이다. 일부 구현예에서, 이소프렌 외의 기상의 부분은 약 0% 내지 약 100% (부피) 산소, 예컨대 약 10% 내지 약 100% (부피) 산소를 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 외의 기상의 부분은 약 0% 내지 약 99% (부피) 질소를 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 외의 기상의 부분은 약 1% 내지 약 50% (부피) CO<sub>2</sub> 를 포함한다.

[0026] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌을 약 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이상의 이소프렌으로 제조한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6% 이상을 이소프렌으로 전환시킨다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌을 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, 100,000 이상의, 이소프렌 ng/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/hr (ng/g<sub>wcm</sub>/h) 으로 제조한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌의 누적 걱정농도 (총 양) 를 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000 이상의, 이



소프렌 mg/브로쓰 L (mg/L<sub>브로쓰</sub>, 브로쓰의 부피에는 세포 및 세포 배지의 부피가 포함된다) 로 제조한다. 다 른 예시적인 이소프렌 제조 속도 및 이소프렌 제조 총량이 본원에 기재된다.

[0027] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 카피의 삽입을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 DXS 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 IDI 폴리펩티드 및 DXS 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 핵산이 이소프렌 합성효소 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및 DXS 폴리펩티드를 코딩한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 하나의 벡터가 이소프렌 합성효소 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및 DXS 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 구현예에서, 벡터는 선별 마커, 예컨대 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0028] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산은 T7 프로모터, 예컨대 중 또는 고 카 피 플라스미드에 함유된 T7 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산은 Trc 프로모터, 예컨대 중 또는 고 카피 플라스미드에 함유된 Trc 프로모터에 작 동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산은 Lac 프로 모터, 예컨대 저 카피 플라스미드에 함유된 Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상 의 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산은 내생 프로모터, 예컨대 내생 알칼리 세린 프로테아제 프로 모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산은 선별 마커 없이 세포의 염색체 내에 통합된다.

[0029] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 성장상에서보다 정지상에서 더욱 활성인 인자 또는 프로모터의 통제 하에 놓인다. 예를 들어, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 정지상 시그마 인자, 예컨대 RpoS 의 통제 하에 놓일 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 정지상에서 유도가능한 프로모터, 예컨대 정 지상에서 활성인 반응 조절자에 의해 유도가능한 프로모터의 통제 하에 놓인다.

[0030] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포의 일부 이상은 이중 이소프렌 합성효소 핵산을 약 5, 10, 20, 40, 50, 60, 65 이상의, 연속 배양물 내 세포 분열 (예컨대 희석 없는 연속 배양물) 동안 유지한다. 본 발 명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, IDI, 또는 DXS 핵산을 포함하는 핵산은 또한 선별 마 커, 예컨대 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0031] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지아 (Saccharomyces cerevisia) 또는 엔테로코쿠스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis)로부터의 MVA 경로 폴리펩 티드) 를 코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지아 (Saccharomyces cerevisia) 또는 엔테로코쿠스 파에칼리 스 (Enterococcus faecalis)로부터의 MVA 경로 폴리펩티드) 를 코딩하는 내생 핵산의 카피의 삽입을 추가로 포 함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 이소프렌 합성효소, DXS, 및 MVA 경로 핵산을 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 이소프렌 합성효소 핵산, DXS 핵산, IDI 핵산, 및 MVA 경로 핵 (IDI 핵산 외에) 을 포함한다.

[0032] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 푸에라리아 (Pueraria) (예를 들어, 푸에라리아 몬타나 (Pueraria montana) 또는 푸에라리아 로바타 (Pueraria lobata)) 와 같은 식물로부터 의 자연 발생적 폴리펩티드이다.

[0033] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 박테리아 세포, 예컨대 그람-양성 박테리아 세포 (예를 들어, 바실러스 (Bacillus) 세포, 예컨대 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis) 세포 또는 스트렙토마이세 스 (Streptomyces) 세포, 예컨대 스트렙토마이세스 리비단스 (Streptomyces lividans), 스트렙토마이세스 코엘 리콜로르 (Streptomyces coelicolor), 또는 스트렙토마이세스 그리세우스 (Streptomyces griseus) 세포) 이다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 그람-음성 박테리아 세포 (예를 들어, 에스케리차 (Escherichia) 세포, 예컨대 에스케리차 콜라이 (Escherichia coli) 세포 또는 판토에아 (Pantoea) 세포, 예컨 대 판토에아 시트레아 (Pantoea citrea) 세포) 이다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 진 균 세포, 예컨대 사상 진균 세포 (예를 들어, 트리코데르마 (Trichoderma) 세포, 예컨대 트리코데르마 레에세이 (Trichoderma reesei) 세포 또는 아스페르길루스 (Aspergillus) 세포, 예컨대 아스페르길루스 오리자에

(*Aspergillus oryzae*) 및 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*) 또는 효모 세포 (예를 들어, 야로이아 (*Yarrowia*) 세포, 예컨대 야로이아 리폴라이티카 (*Yarrowia lipolytica*) 세포) 이다.

[0034] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 미생물 폴리펩티드 탄소원은 효모 또는 박테리아로부터 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 식물 폴리펩티드 탄소원은 대두, 옥수수, 카놀라, 야트로파, 야자, 땅콩, 해바라기, 코코넛, 머스타드, 평지씨, 면화씨, 야자핵, 올리브, 잇꽃, 참깨, 또는 아마씨로부터 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한다.

[0035] 하나의 양상에서, 본 발명은 본 발명의 방법 또는 임의의 조성물에 의해 제조된 생성물을 특징으로 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1 은 E. 콜라이 (*E. coli*) 내 발현에 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 코돈의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:1). atg 출발 코돈은 이탤릭체로 되어 있고, 정지 코돈은 굵은체로, 부가된 PstI 부위는 밑줄쳐 있다.

도 2 는 pTrcKudzu 의 맵이다.

도 3 은 pTrcKudzu 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:2). RBS 는 밑줄 쳐있고, kudzu 이소프렌 합성효소 출발 코돈은 굵은 대문자이고, 정지 코돈은 굵은, 대문자, 이탤릭체이다. 벡터 백본은 pTrcHis2B 이다.

도 4 는 pETNHisKudzu 의 맵이다.

도 5 는 pETNHisKudzu 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:5).

도 6 은 pCL-lac-Kudzu 의 맵이다.

도 7 은 pCL-lac-Kudzu 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:7).

도 8A 는 벡터가 없는 E. 콜라이 BL21 세포에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다.

도 8B 는 pCL-lac-Kudzu 가 있는 E. 콜라이 BL21 세포에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다.

도 8C 는 pTrcKudzu 가 있는 E. 콜라이 BL21 세포에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다.

도 8D 는 pETN-HisKudzu 가 있는 E. 콜라이 BL21 세포에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다.

도 9A 는 14 리터 공급 배치 발효에서의 E. 콜라이 BL21/pTrcKudzu 의 발효 시간에 걸친 OD 를 나타내는 그래프이다.

도 9B 는 14 리터 공급 배치 발효에서의 E. 콜라이 BL21/pTrcKudzu 의 발효 시간에 걸친 이소프렌 제조를 나타내는 그래프이다.

도 10A 는 판테오아 시트레아 (*Pantaea citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 대조군 세포는 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소가 없다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타낸다.

도 10B 는 pCL-lac Kudzu 를 발현하는 판테오아 시트레아 (*Pantaea citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타낸다.

도 10C 는 pTrcKudzu 를 발현하는 판테오아 시트레아 (*Pantaea citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타낸다.

도 11 은 재조합 이소프렌 합성효소를 발현하는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. BG3594comK 는 플라스미드 (본래 이소프렌 제조) 가 없는 B. 서브틸리스 균주이다. CF443-BG3594comK 는 pBSKudzu (재조합 이소프렌 제조) 를 가진 B. 서브틸리스 균주이다. y-축 상의 IS 는 이소프렌을 나타낸다.

도 12 는 pBS Kudzu #2 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:57).

도 13 은 야로이아 (*Yarrowia*) 내 발현에 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 코돈의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 8).

도 14 는 야로이아 (*Yarrowia*) 내 발현에 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 코돈을 포함하는 pTrex3g 의 맵이다.

도 15 는 벡터 pSPZ1(MAP29Spb) 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:11).

도 16 은 야로이아 (*Yarrowia*) 내 발현에 최적화된 합성 kudzu (푸에라리아 몬타나 (*Pueraria montana*)) 이소프렌 유전자 코돈의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 12).

도 17 은 합성 혼성 포플러 (포플러스 알바 x 포플러스 트레몰라 (*Populus alba* x *Populus tremula*)) 이소프렌 합성효소 유전자의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 13). ATG 출발 코돈은 굵은체로, 정지 코돈은 밑줄 쳐있다.

도 18A 는 벡터 pYLA 1, pYL1 및 pYL2 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 18B 는 벡터 pYLA(POP1) 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 18C 는 벡터 pYLA(KZ1) 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 18D 는 벡터 pYLI(KZ1) 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 18E 는 벡터 pYLI(MAP29) 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 18F 는 벡터 pYLA(MAP29) 의 도식적 구축 개요를 보여준다.

도 19 는 이소프렌에 대한 MVA 및 DXP 대사 경로를 보여준다 (F. Bouvier et al., Progress in Lipid Res. 44: 357-429, 2005 에 근거함). 하기 설명에는 경로 내 각각의 폴리펩티드에 대한 대안적인 명칭 및 표시된 폴리펩티드의 활성을 측정하기 위한 어세이를 설명한 참조가 포함된다 (이들 참조 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 각각 인용됨, 특히 MVA 및 DXP 경로 내 폴리펩티드에 대한 폴리펩티드 활성에 대한 어세이에 대해).

**메발로네이트 경로:** **AACT**; 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제, MvaE, EC 2.3.1.9. Assay: J. Bacteriol., 184: 2116-2122, 2002; **HMGS**; 히드록시메틸글루타릴-CoA 합성효소, MvaS, EC 2.3.3.10. Assay: J. Bacteriol., 184: 4065-4070, 2002; **HMGR**; 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타아제, MvaE, EC 1.1.1.34. Assay: J. Bacteriol., 184: 2116-2122, 2002; **MVK**; 메발로네이트 키나아제, ERG12, EC 2.7.1.36. Assay: Curr Genet 19:9-14, 1991. **PMK**; 포스포메발로네이트 키나아제, ERG8, EC 2.7.4.2, Assay: Mol Cell Biol, 11:620-631, 1991; **DPMDC**; 디포스포메발로네이트 데카르복실라아제, MVD1, EC 4.1.1.33. Assay: Biochemistry, 33:13355-13362, 1994; **IDI**; 이소펜테닐-디포스페이트 델타-이소머라아제, IDI1, EC 5.3.3.2. Assay: J. Biol. Chem. 264:19169-19175, 1989.

**DXP 경로:** **DXS**; 1-데옥시자일롤로오스-5-포스페이트 합성효소, dxs, EC 2.2.1.7. Assay: PNAS, 94:12857-62, 1997; **DXR**; 1-데옥시-D-자일롤로오스 5-포스페이트 리덕토이소머라아제, dxr, EC 2.2.1.7. Assay: Eur. J. Biochem. 269:4446-4457, 2002; **MCT**; 4-디포스포스티딜-2C-메틸-D-에리트리톨 합성효소, IspD, EC 2.7.7.60. Assay: PNAS, 97: 6451-6456, 2000; **CMK**; 4-디포스포스티딜-2C-메틸-D-에리트리톨 키나아제, IspE, EC 2.7.1.148. Assay: PNAS, 97:1062-1067, 2000; **MCS**; 2C-메틸-D-에리트리톨 2,4-시클로디포스페이트 합성효소, IspF, EC 4.6.1.12. Assay: PNAS, 96:11758-11763, 1999; **HDS**; 1-히드록시-2-메틸-2-(E)-부테닐 4-디포스페이트 합성효소, ispG, EC 1.17.4.3. Assay: J. Org. Chem., 70:9168-9174, 2005; **HDR**; 1-히드록시-2-메틸-2-(E)-부테닐 4-디포스페이트 리덕타아제, IspH, EC 1.17.1.2. Assay: JACS, 126:12847-12855, 2004.

도 20 은 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자가 없는 (좌측) 또는 있는 (우측) 재조합 Y. 리폴라이티카 (*lipolytica*) 균주에 의한 이소프렌 제조의 GC-MS 분석 결과를 나타내는 그래프를 보여준다. 화살표는 진정한 이소프렌 표준의 용리 시간을 나타낸다.

도 21 은 pTrcKudzu yIDI DXS Kan 의 맵이다.

도 22 는 pTrcKudzu yIDI DXS Kan 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:20).

도 23A 는 BL21/pTrcKudzukkan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu$ mol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu$ g/L 상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu$ g/L 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu$ g/L) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu$ g/L/OD) 을 나타낸다.

도 23B 는 BL21/pTrcKudzu yIDI kan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간



0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23C 는 BL21/pTrcKudzu DXS kan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23D 는 BL21/pTrcKudzu yIDI DXS kan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23E 는 BL21/pCL PtrcKudzu 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23F 는 BL21/pCL PtrcKudzu yIDI 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23G 는 BL21/pCL PtrcKudzu DXS 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 23H 는 BL21/pTrcKudzu IDIDXSkan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 화살표는 IPTG (400  $\mu\text{mol}$ ) 로의 유도 시간을 나타낸다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD<sub>600</sub> 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간) 또는 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L}$  상부공간/OD) 이다. 검은색 다이아몬드는 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 검은색 삼각형은 이소프렌 생산성 ( $\mu\text{g/L}$ ) 을 나타내고, 흰색 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ( $\mu\text{g/L/OD}$ ) 을 나타낸다.

도 24 는 pTrcKKDyIkIS kan 의 맵이다.

도 25 는 pTrcKKDyIkIS kan 의 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:33).

도 26 은 pCL PtrcUpperPathway 의 맵이다.

도 27A-27D 는 pCL PtrcUpperPathway 의 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:46).

도 28 은 하위 MVA 경로 및 nprE 유전자좌에서 B. 서브틸리스 염색체 내로의 통합을 위한 효모 idi 를 함유하는 카세트의 맵을 보여준다. nprE 상류방향/하류방향은 통합을 위한 nprE 유전자좌로부터의 서열 1 kb 각각을 나타낸다. aprE 프로모터 (알칼리 세린 프로테아제 프로모터) 는 aprE 유전자의 프로모터 (-35, -10, +1 전사 시작 부위, RBS) 를 나타낸다. MVK1 은 효모 메발로네이트 키나아제 유전자를 나타낸다. RBS-PMK 는 시작 부위의 바실러스 RBS 상류방향을 갖는 효모 포스포메발로네이트 키나아제 유전자를 나타낸다. RBS-MPD 는 시작 부위의 바실러스 RBS 상류방향을 갖는 효모 디포스포메발로네이트 데카르복실라아제 유전자를 나타낸다. RBS-IDI 는 시작 부위의 바실러스 RBS 상류방향을 갖는 효모 idi 유전자를 나타낸다. 터미네

이터는 B. 아밀리퀘파시엔스 (amyliquefaciens) 로부터의 터미네이터 알칼리 세린 프로테아제 전사 터미네이터를 나타낸다. SpecR 은 스펙티노마이신 내성 마커를 나타낸다. "amp 에 대한 nprE 상류방향 반복" 은 증폭을 위해 사용되는 상류방향 영역의 직접적 반복을 나타낸다.

도 29 는 하위 MVA 경로 및 nprE 유전자좌에서 B. 서브틸리스 염색체 내로의 통합을 위한 효모 idi 를 함유하는 카세트의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:47).

도 30 은 p9796-poplar 의 맵이다.

도 31 은 p9796-poplar 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:48).

도 32 는 pTrcPoplar 의 맵이다.

도 33 은 pTrcPoplar 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:49).

도 34 는 pTrcKudzu yIDI Kan 의 맵이다.

도 35 는 pTrcKudzu yIDI Kan 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 50).

도 36 은 pTrcKudzuDXS Kan 의 맵이다.

도 37 은 pTrcKudzuDXS Kan 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 51).

도 38 은 pCL PtrcKudzu 의 맵이다.

도 39 는 pCL PtrcKudzu 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:52).

도 40 은 pCL PtrcKudzu A3 의 맵이다.

도 41 은 pCL PtrcKudzu A3 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:53).

도 42 는 pCL PtrcKudzu yIDI 의 맵이다.

도 43 은 pCL PtrcKudzu yIDI 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:54).

도 44 는 pCL PtrcKudzu DXS 의 맵이다.

도 45 는 pCL PtrcKudzu DXS 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:55).

도 46 은 바이오매스 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 패널 A 는 옥수수 대로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 B 는 버갸스 (bagasse) 로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 C 는 침엽수 펄프로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 D 는 글루코오스로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 E 는 부가적인 공급원료가 없는 세포로부터의 이소프렌 제조를 보여준다. 회색 사각형은 표시된 접종 후 시간에서의 배양물의 OD<sub>600</sub> 측정을 나타내고, 검은색 삼각형은 표시된 접종 후 시간에서의 이소프렌 제조를 나타낸다.

도 47A 는 글루코오스를 첨가하지 않은 배양물 내 BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 에 의한 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 (μg/ml).

도 47B 는 BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 에 의한 1% 글루코오스 공급원료 전화당으로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 (μg/ml).

도 47C 는 BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 에 의한 1% 전화당 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 (μg/ml).

도 47D 는 BL21 (λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 에 의한 1% AFEX 옥수수 대 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD<sub>600</sub> 을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 (μg/ml).

도 48 은 이소프렌 제조의 효모 추출물의 효과를 입증하는 그래프를 보여준다. 패널 A 는 효모 추출물의 양을 달리하여 공급된 반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정을 보여준다. 패널 B 는 효모 추출물의 양을 달리하

여 공급된 반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정을 보여준다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다. 패널 C 는 공급-배치식 배양물에서 성장된 E. 콜라이 내 이소프렌 제조에 대한 효모 추출물의 효과를 보여준다.

도 49 는 pTrcKudzu + yIDI + DXS 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 500 L 생물반응기로부터 이소프렌 제조를 입증하는 그래프를 보여준다. 패널 A 는 글루코오스 및 효모 추출물이 공급된 500 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정을 보여준다. 패널 B 는 글루코오스 및 효모 추출물이 공급된 500 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정을 보여준다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다. 패널 C 는 글루코오스 및 효모 추출물이 공급된 500 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정을 보여준다.

도 50 은 pJMupperpathway2 의 맵이다.

도 51 은 pJMupperpathway2 의 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:56).

도 52 는 pBS Kudzu #2 의 맵이다.

도 53A 는 14 리터 공급 배치 발효 내 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 바실러스 (Bacillus) 의 발효 시간 동안의 성장을 나타내는 그래프이다. 검은색 다이아몬드는 재조합 이소프렌 합성효소가 없는 대조군 균주 (BG3594comK) (본래 이소프렌 제조) 를 나타내고, 회색 삼각형은 pBSKudzu 가 있는 바실러스 (재조합 이소프렌 제조) 를 나타낸다.

도 53B 는 14 리터 공급 배치 발효 내 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 바실러스 (Bacillus) 의 발효 시간 동안의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프이다. 검은색 다이아몬드는 재조합 이소프렌 합성효소가 없는 대조군 균주 (BG3594comK) (본래 이소프렌 제조) 를 나타내고, 회색 삼각형은 pBSKudzu 가 있는 바실러스 (재조합 이소프렌 제조) 를 나타낸다.

도 54 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 55 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 56 은 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정이다.

도 57 은 글리세롤이 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 58 은 글리세롤이 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 59 는 글리세롤이 공급된 15 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정이다.

도 60A-60C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 메발론산 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 61A-61C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 메발론산 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 62A-62C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 메발론산 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 63A-63C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 이소프렌 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 64A-64C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 이소프렌 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 65A-65C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 이소프렌 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 66A-66C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 이소프렌 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 67A-67C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도, 이소프렌 적정농도, 및 특이적 생산성의 시간 과정이다.

도 68 은 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 A 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다. 예를 들어, 도면 범례에서 첫번째 입력부분 (40℃, 공기 중의 이소프렌) 은 그래프에서 가장 높은 위치의 곡선과 상응한다.

도 69 는 4% 물과 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 B 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 70 은 5% CO<sub>2</sub> 와 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 C 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 71 은 10% CO<sub>2</sub> 와 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 D 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 72 는 15% CO<sub>2</sub> 와 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 E 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 73 은 20% CO<sub>2</sub> 와 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 F 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 74 는 30% CO<sub>2</sub> 와 함께 다양한 산소 수준에 대한 연료 농도의 함수로서 시리즈 G 에 대한 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다. 도면 범례에는 그래프에 나타나는 순서대로 곡선을 나열한다.

도 75A 는 시리즈 A 에 대해 중량% 대 부피% 로부터의 CAFT Model 결과의 전환 표이다.

도 75B 는 부피% 로서 작성된 도 68 에서 시리즈 A 에 대한 CAFT 모델로부터의 가연성 결과의 그래프이다.

도 76A 는 시리즈 B 에 대해 중량% 대 부피% 로부터의 CAFT Model 결과의 전환 표이다.

도 76B 는 부피% 로서 작성된 도 69 에서 시리즈 B 에 대한 CAFT 모델로부터의 가연성 결과의 그래프이다.

도 77 은 가연성 시험 용기의 도면이다.

도 78A 는 시험 시리즈 1: 0% 스팀, 0 psig, 및 40℃ 에 대한 가연성 곡선의 그래프이다.

도 78B 는 시험 시리즈 1 에 대한 폭발 및 비-폭발 데이터 지점을 요약하는 표이다.

도 78C 는 CAFT Model 과 비교한 시험 시리즈 1 에 대한 가연성 곡선의 그래프이다.

도 79A 는 시험 시리즈 2: 4% 스팀, 0 psig, 및 40℃ 에 대한 가연성 곡선의 그래프이다.

도 79B 는 시험 시리즈 2 에 대한 폭발 및 비-폭발 데이터 지점을 요약하는 표이다.

도 79C 는 CAFT Model 과 비교한 시험 시리즈 2 에 대한 가연성 곡선의 그래프이다.

도 80A 및 80B 는 시험 시리즈 1 에 대한 상세한 실험 조건 및 결과의 표이다.

도 81 은 시험 시리즈 2 에 대한 상세한 실험 조건 및 결과의 표이다.

도 82 는 3 대기압에서 다양한 질소/산소 비에 대한 연료 농도의 함수로서 작성된 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다.

도 83 은 1 대기압에서 다양한 질소/산소 비에 대한 연료 농도의 함수로서 작성된 계산된 단열 불꽃 온도의 그래프이다.

도 84 는 도 82 로부터의 데이터를 사용하고, 실시예 13 에 기재된 방법론에 따라 구축된 가연성 엔벨로프의 그래프이다. 실험 데이터 지점 (원) 은 1 초기 시스템 대기압에서 수행되었던 본원에 기재된 시험으로부터 유래된다.

도 85 는 도 83 으로부터의 데이터를 사용하고, 실시예 13 에 기재된 방법론에 따라 구축된 가연성 엔벨로프의 그래프이다. 실험 데이터 지점 (원) 은 1 초기 시스템 대기압에서 수행되었던 본원에 기재된 시험으로부터

유래된다.

도 86A 는 발효 방출-기체의 GC/MS 크로마토그램이다.

도 86B 는 발효 방출-기체 내에 존재하는 소량 휘발물질을 나타내기 위한 도 86A 의 팽창이다.

도 87A 는 -78℃ 에서의 저온-포획 후 방출-기체 내에 존재하는 미량 휘발물질의 GC/MS 크로마토그램이다.

도 87B 는 -196℃ 에서의 저온-포획 후 방출-기체 내에 존재하는 미량 휘발물질의 GC/MS 크로마토그램이다.

도 87C 는 도 87B 의 확대이다.

도 87D 는 도 87C 의 확대이다.

도 88A 및 88B 는 석유-유도 이소프렌 (도 88A) 과 생물학적으로 제조된 이소프렌 (도 88B) 으로부터의 C5 탄화수소를 비교하는 GC/MS 크로마토그램이다. 표준은 주된 이소프렌 피크 근처에서 용리되는 3 가지 C5 탄화수소 불순물을 함유한다 (도 88A). 대조적으로, 생물학적으로 제조된 이소프렌은 상당량의 에탄올 및 아세톤을 함유한다 (실행 시간 3.41 분) (도 88A).

도 89 는 3 g/L 효모 추출물과 함께 글루코오스가 공급되고 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) pTrcIS 균주의 발효 방출-기체의 분석 그래프이다.

도 90 은 이소프렌과 구조적으로 유사하고, 또한 중합 촉매 독소로서 작용할 수 있는 여러 불순물의 구조를 보인다.

도 91 은 pTrcHis2AUpperPathway (또한 pTrcUpperMVA 로 불림) 의 맵이다.

도 92A-92C 는 pTrcHis2AUpperPathway (또한 pTrcUpperMVA 로 불림) 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:86).

도 93 은 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 94 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 95 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정이다.

도 96 은 전화당이 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 97 은 전화당이 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 98 은 전화당이 공급된 15 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정이다.

도 99 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 100 은 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 101 은 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기로부터의 이소프렌 특이적 활성의 시간 과정이다.

도 102 는 pCLPtrcUpperPathwayHGS2 의 맵이다.

도 103A-103C 는 pCLPtrcUpperPathwayHGS2 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 87).

도 104 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 105 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 106 은 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기로부터 제조된 총 이소프렌의 시간 과정이다.

도 107 은 플라스미드 MCM330 의 맵이다.

도 108A-108C 는 플라스미드 MCM330 의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:90).

도 109 는 pET24D-Kudzu 의 맵이다.

도 110A 및 110B 는 pET24D-Kudzu 의 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:101).

도 111A 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정이다.

도 111B 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌 적정농도의 시간 과정이다. 적정농도는 발효 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양으로서 정의된다.

도 111C 는 글루코오스가 공급된 15 L 생물반응기 내의 이소프렌의 특이적 생산성의 시간 과정이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

하나의 양상에서, 본 발명은 증가된 양 및/또는 순도로의 이소프렌의 제조 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "이소프렌" 또는 "2-메틸-1,3-부타디엔" (CAS# 78-79-5) 은 3,3-디메틸알릴 피로포스페이트 (DMAPP) 로부터의 피로포스페이트의 제거로부터 생성된 직접적 및 최종 휘발성 C5 탄화수소 생성물을 말하고, 하나 이상의 DMAPP 분자에 대한 하나 이상의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 분자의 연결 또는 중합을 포함하지 않는다.

[0038]

대부분의 이소프렌은 물질이 중합에 적합하기 전 집중적인 정제를 필요로 하는 불순한 C5 탄화수소 분획으로서 석유화학 공급원으로부터 유도된다. 여러 불순물은 이소프렌과의 구조적 유사성 및 중합 촉매 독성으로서 작용할 수 있다는 사실로 인해 특히 문제가 있다. 이러한 화합물에는 1,3-시클로펜타디엔, *시스*- 및 *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜텐, 2-펜텐, 3-메틸-1-부텐, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 및 *시스*-펜트-3-엔-1-인 (도 90) 이 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 이소프렌 조성물은 임의의 오염 불포화 C5 탄화수소가 실질적으로 없다. 실시예 10 에 추가로 기재되는 바와 같이, 이소프렌 이외의 불포화 C5 탄화수소 (예컨대 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜텐, 2-펜텐, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부텐, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인) 의 검출가능한 양이 본원에 기재된 방법을 사용하여 제조된 이소프렌 조성물에서 발견되지 않았다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 제조된 일부 이소프렌 조성물은 GC/MS 분석에 의해 측정되는 바와 같이 에탄올, 아세톤, 및 C5 프레닐 알코올을 함유한다. 모든 이들 성분은 석유화학 공급원으로부터 유도된 이소프렌 조성물에 존재하는 이성질체 C5 탄화수소 분획보다 이소프렌 스트림으로부터 더욱 쉽게 제거된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 이소프렌 조성물은 중합 등급을 위해 최소의 처리를 필요로 한다.

[0039]

하나의 양상에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 이소프렌 제조 속도를 증가시키고 제조되는 이소프렌의 총 양을 증가시킨다. 예를 들어,  $4.8 \times 10^4$  nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 의 이소프렌을 생성하는 세포 배양 시스템이 제조되었다 (표 1). 상기 시스템의 효율은 세포가 세포 배양 배지로부터 소모하는 탄소의 약 2.2% 를 이소프렌으로 전환함으로써 입증된다. 실시예 및 표 2 에서 제시되는 바와 같이, 브로쓰 1 리터 당 대략 3 g 의 이소프렌이 생성되었다. 바람직한 경우, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 다른 조건을 사용하여 더욱 많은 양의 이소프렌이 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 재생가능 탄소원이 이소프렌의 제조에 사용된다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 제조는 세포의 성장과 분리된다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 농도 및 임의의 산화제는 이소프렌의 제조 또는 회수 동안 화재가 일어날 수 있는 위험을 감소 또는 제거시키기 위해 불연성 범위 내에 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 세포 당 고 이소프렌 수율, 고 탄소 수율, 고 이소프렌 순도, 고 생산성, 저 에너지 사용, 저 제조 비용 및 투자, 및 최소 부작용을 허용케 하므로 바람직하다. 이소프렌 제조를 위한 상기 효율적인, 대규모, 생합성 방법은 합성 이소프렌-기재 고무를 위한 이소프렌 공급원을 제공하고, 천연 고무 사용에 대한 바람직한, 저비용 대안을 제공한다.

[0040]

하기 추가 논의되는 바와 같이, 세포에 의해 제조된 이소프렌의 양은 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 (예를 들어, 식물 이소프렌 합성효소 폴리펩티드) 를 코딩하는 이중 핵산을 세포 내에 도입함으로써 크게 증가될 수 있다. 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP) 를 이소프렌으로 전환시킨다. 실시예에서 제시되는 바와 같이, 이중 푸에라리아 몬타나 (*Pueraria Montana*) (kudzu) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 다양한 숙주 세포, 예컨대 에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*), 판테오아 시트레아 (*Pantoea citrea*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 야로이아 리폴라이티카 (*Yarrowia lipolytica*), 및 트리코데르마 레에세이 (*Trichoderma reesei*) 에서 발현되었다. 모든 상기 세포는 이중 이소프렌 합성효소 폴리펩티드가 없는 상응하는 세포보다 더욱 많은 이소프렌을 제조한다. 표 1 및 2 에서 예증되는 바와 같이, 본원에 기재된 방법을 사용하여 다량의 이소프렌이 제조된다. 예를 들어, 이중 이소프렌 합성효소 핵산이 있

는 B. 서브틸리스 세포는 이중 핵산이 없는 상응하는 대조군 B. 서브틸리스 세포보다 14 리터 발효기에서 대략 10 배 더 많은 이소프렌을 제조한다 (표 2). 발효기 내, E. 콜라이에 의한 브로쓰 1 리터 당 300 mg 의 이소프렌 (mg/L, 브로쓰의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 포함된다) 및 B. 서브틸리스에 의한 30 mg/L 의 제조는 현저한 양의 이소프렌이 제조될 수 있음을 나타낸다 (표 2). 바람직한 경우, 이소프렌은 더욱 큰 규모로 제조될 수 있거나, 본원에 기재된 다른 조건이 이소프렌의 양을 추가로 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 표 1 및 2 에 열거된 벡터 및 실험 조건은 하기 추가 상세한 사항 및 실시예 섹션에 기재되어 있다.

[0041]

**표 1: 본 발명의 세포 배양물 및 방법을 사용하는 진탕 플라스크로부터의 이소프렌의 예시적 수율.** 이소프렌 제조 측정을 위한 어세이는 실시예 I, 파트 II 에 기재되어 있다. 본 어세이를 위해, 진탕 플라스크로부터 샘플을 1 회 이상의 시점에서 제거하고, 30 분 동안 배양하였다. 그 다음 본 샘플에서 제조된 이소프렌의 양을 측정하였다. 이소프렌 제조의 상부공간 농도 및 특이적 속도는 표 1 에 나열되어 있고 본원에서 추가로 기재된다.

균주	상부공간 바이알 내 이소프렌 제조 *	
	상부공간 농도  $\mu\text{g/L}_{\text{기체}}$	특이적 속도  $\mu\text{g/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}/\text{OD}$  ( $\text{nmol/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$ )
<i>E. 콜라이</i> / BL21/ pTrcKudzu IS	1.40	53.2 (781.2)
<i>E. 콜라이</i> / BL21/ pCL DXS yidi Kudzu IS	7.61	289.1 ( $4.25 \times 10^3$ )
kudzu IS 및 전체 MVA 경로를 가진 <i>E. 콜라이</i> / BL21/MCM127	23.0	874.1 ( $12.8 \times 10^3$ )
<i>E. 콜라이</i> / BL21/ pET N-HisKudzu IS	1.49	56.6 (831.1)
<i>판토메아 시트레이</i> /pTrcKudzu IS	0.66	25.1 (368.6)
<i>E. 콜라이</i> w/ <i>Poplar IS</i> [Miller (2001)]	-	5.6 (82.2)
US 5849970 호의 <i>바실러스 리케니포르미스</i>	-	4.2 (61.4)
kudzu 이소프렌 합성효소를 가진 <i>아로이아 리플라이티카</i>	~0.05 $\mu\text{g/L}$	~2 (~30)
kudzu 이소프렌 합성효소를 가진 <i>트리코테르마 레에세이</i>	~0.05 $\mu\text{g/L}$	~2 (~30)
kudzu IS 및 하위 MVA 경로를 가진 <i>E. 콜라이</i> / BL21/ pTrcKKD <sub>y</sub> IkIS	85.9	$3.2 \times 10^3$ ( $4.8 \times 10^4$ )

[0042]

[0043]

\* 액체 대 상부공간 부피비가 1:19 인 밀봉된 상부공간 바이알에서 1 시간 동안 배양된, 1 OD<sub>600</sub> 1 mL 로 표준화 됨.

[0044]

**표 2: 본 발명의 세포 배양물 및 방법을 사용하는 발효기 내 이소프렌의 예시적 수율.** 이소프렌 제조 측정을 위한 어세이는 실시예 I, 파트 II 에 기재되어 있다. 본 어세이를 위해, 발효기의 방출-기체의 샘플을 취하고, 이소프렌의 양에 대해 분석하였다. 피크 상부공간 농도 (발효 동안 최고 상부공간 농도임), 적정농도 (브로쓰 1 리터 당 제조되는 이소프렌의, 누적 총 양임), 및 이소프렌 제조의 피크 특이적 속도 (발효 동안 최고 특이적 속도임) 가 표 2 에 나열되고 본원에 추가로 기재되어 있다.

균주	발효기 내 이소프렌 제조		
	피크 상부공간 농도 ** ( $\mu\text{g/L}_{\text{기체}}$ )	적정농도 ( $\text{mg/L}_{\text{브로쓰}}$ )	피크 특이적 속도 $\mu\text{g/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}/\text{OD}$ ( $\text{nmol/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$ )
Kudzu IS 를 가진 <i>E. 콜라이</i> /BL21 /pTrcKudzu	52	41.2	37 (543.3)
<i>E. 콜라이</i> FM5/pTrcKudzu IS	3	3.5	21.4 (308.1)
<i>E. 콜라이</i> BL21/삼중 균주 (DXS, yidi, IS)	285	300	240 ( $3.52 \times 10^3$ )
<i>E. 콜라이</i> FM5/삼중 균주 (DXS, yidi, IS)	50.8	29	180.8 ( $2.65 \times 10^3$ )
Kudzu IS 및 전체 MVA 경로를 가진 <i>E. 콜라이</i> /MCM127	3815	3044	992.5 ( $1.46 \times 10^4$ )
<i>E. 콜라이</i> BL21/pCLPtrc UpperPathway gi1.2 통합 하위 경로	2418	1640	1248 ( $1.83 \times 10^4$ )

<i>E. 콜라이</i> BL21/pCLPtrc UpperPathwayHGS2 - pTrcKKDyIkIS	3500	3300	1088 ( $1.60 \times 10^4$ )
바실러스 서브틸리스 야생형	1.5	2.5	0.8 (11.7)
바실러스 pBS Kudzu IS	16.6	~30 (100 시간 이상)	5 (73.4)
바실러스마르버그 6051 [Wagner and Fall (1999)]	2.04	0.61	24.5 (359.8)
US 5849970 호의 바실러스마르버그 6051	0.7	0.15	6.8 (100)

\*\* 1 vvm (방출-기체 1 부피/1 L<sub>브로쓰</sub>/분) 의 방출-기체 흐름 속도에 표준화됨.

부가적으로는, 이중 이소프렌 합성효소 핵산을 함유하는 세포에 의한 이소프렌 제조는 세포에 의해 발현되는 1-데옥시-D-자일로오스-5-포스페이트 합성효소 (DXS) 폴리펩티드 및/또는 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라아제 (IDI) 폴리펩티드의 양을 증가시킴으로써 향상될 수 있다. 예를 들어, DXS 핵산 및/또는 IDI 핵산은 세포 내에 도입될 수 있다. DXS 핵산은 이중 핵산 또는 내생 핵산의 이중 카피일 수 있다. 유사하게는, IDI 핵산은 이중 핵산 또는 내생 핵산의 이중 카피일 수 있다. 일부 구현예에서, DXS 및/또는 IDI 폴리펩티드의 양은 내생 DXS 및/또는 IDI 프로모터 또는 조절 영역을 DXS 및/또는 IDI 핵산의 더 큰 전사를 야기하는 기타 프로모터 및/또는 조절 영역으로 대체함으로써 증가된다. 일부 구현예에서, 세포는 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산 (예를 들어, 식물 이소프렌 합성효소 핵산) 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 이중 카피 모두를 함유한다.



- [0049] 코딩된 DXS 및 IDI 폴리펩티드는 이소프렌의 생합성을 위한 DXP 경로의 일부이다 (도 19). DXS 폴리펩티드는 피루베이트 및 D-글리세르알데하이드-3-포스페이트를 1-데옥시-D-자일롤로오스-5-포스페이트로 전환시킨다. 임의의 특정 이론에 얽매는 것으로 의도되지 않으면서, DXS 폴리펩티드의 양의 증가가 DXP 경로를 통해 탄소의 흐름을 증가시켜, 더 큰 이소프렌 제조를 야기하는 것으로 여겨진다. IDI 폴리펩티드는 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 와 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP) 의 상호전환을 촉매화한다. 임의의 특정 이론에 얽매는 것으로 의도되지 않으면서, 세포 내 IDI 폴리펩티드의 양의 증가가 DMAPP 로 전환되고, 그 후 이소프렌으로 전환되는 IPP 의 양 (및 전환 속도) 을 증가시키는 것으로 여겨진다.
- [0050] 예를 들어, kudzu 이소프렌 합성효소, S. 세레비지아 IDI, 및 E. 콜라이 DXS 핵산을 가진 E. 콜라이 세포의 발효를 이소프렌 제조에 사용하였다. 이소프렌 수준은 15 시간의 시간 동안 50 내지 300  $\mu\text{g/L}$  로 변화였다 (실시예 7, 파트 VII).
- [0051] 일부 구현예에서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산의 존재는 이들 이중 또는 추가의 내생 핵산 중 오직 1 개 또는 2 개를 갖는 상응하는 세포와 비교하여, 세포를 더욱 재생가능하게 성장시키고 더욱 장기간 생존가능하게 남아있게 한다. 예를 들어, 이중 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산을 함유하는 세포는 이중 이소프렌 합성효소 및 DXS 핵산 만을 갖는 세포 또는 이중 이소프렌 합성효소 핵산 만을 갖는 세포보다 잘 성장하였다. 또한, 이중 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산은 E. 콜라이 세포에 의해 유지되었던 고 카피 플라스미드 상의 강한 프로모터에 성공적으로 작동가능하게 연결되어 있고, 이것은 다량의 상기 폴리펩티드가 세포에게 과량의 독성을 유발하지 않으면서 세포에서 발현될 수 있음을 암시한다. 임의의 특정 이론에 얽매는 것으로 의도되지 않으면서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소 및 IDI 핵산의 존재가, 세포에 오직 이중 또는 추가의 내생 DXS 핵산 만이 존재했을 경우 축적될 것인 하나 이상의 잠재적으로 독성인 중간체의 양을 감소시킬 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0052] 일부 구현예에서, 이중 이소프렌 합성효소 핵산을 함유하는 세포에 의한 이소프렌의 제조는 세포에 의해 발현된 MVA 폴리펩티드의 양을 증가시킴으로써 증가된다 (도 19). 예시적 MVA 경로 폴리펩티드에는 하기 폴리펩티드 중 임의의 것이 포함된다: 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제 (AA-CoA 티올라아제) 폴리펩티드, 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소 (HMG-CoA 합성효소) 폴리펩티드, 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타아제 (HMG-CoA 리덕타아제) 폴리펩티드, 메발로네이트 키나아제 (MVK) 폴리펩티드, 포스포메발로네이트 키나아제 (PMK) 폴리펩티드, 디포스포메발로네이트 데카복실라아제 (MVD) 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및 2 개 이상의 MVA 경로 폴리펩티드의 활성을 갖는 폴리펩티드 (예를 들어, 융합 폴리펩티드). 예를 들어, 하나 이상의 MVA 경로 핵산이 세포 내에 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 AA-CoA 티올라아제, HMG-CoA 합성효소, 및 HMG-CoA 리덕타아제 핵산을 포함하는 상위 MVA 경로를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 MVK, PMK, MVD, 및 IDI 핵산을 포함하는 하위 MVA 경로를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 AA-CoA 티올라아제, HMG-CoA 합성효소, HMG-CoA 리덕타아제, MVK, PMK, MVD, 및 IDI 핵산을 포함하는 전체 MVA 경로를 함유한다. MVA 경로 핵산은 이중 핵산 또는 내생 핵산의 이중 카피일 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로 폴리펩티드의 양은 MVA 경로 핵산에 대한 내생 프로모터 또는 조절 영역을 MVA 경로 핵산의 더 큰 전사를 유발하는 기타 프로모터 및/또는 조절 영역으로 대체함으로써 증가된다. 일부 구현예에서, 세포는 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산 (예를 들어, 식물 이소프렌 합성효소 핵산) 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 이중 카피 모두를 함유한다.
- [0053] 예를 들어, kudzu 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisia*) MVK, PMK, MVD, 및 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 함유하는 E. 콜라이 세포는 이소프렌을  $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol/L}_{\text{브로쓰}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$  의 속도로 제조하였다 (실시예 8 참조). 부가적으로는, 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*) AA-CoA 티올라아제, HMG-CoA 합성효소, 및 HMG-CoA 리덕타아제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 갖는 E. 콜라이 세포의 14 리터 발효는 22 그램의 메발론산 (MVA 경로의 중간체) 을 제조하였다. 상기 세포의 진탕 플라스크는 리터 당 2-4 그램의 메발론산을 제조하였다. 이 결과는 이중 MVA 경로 핵산이 E. 콜라이에서 활성임을 나타낸다. 상위 MVA 경로 및 하위 MVA 경로 모두, 뿐 아니라 kudzu 이소프렌 합성효소에 대한 핵산을 함유하는 E. 콜라이 세포 (균주 MCM 127) 는 오직 하위 MVA 경로 및 kudzu 이소프렌 합성효소에 대한 핵산을 갖는 E. 콜라이 세포와 비교하여 (균주 MCM 131) 유의하게 많은 이소프렌 (874  $\mu\text{g/L}$ ) 을 제조하였다 (표 3 및 실시예 8, 파트 VIII 참조).
- [0054] 일부 구현예에서, 세포의 일부 이상은 연속 배양물 (예컨대 희석 없는 연속 배양물) 에서 약 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 이상의 세포 분열에 대해 이중 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산을 유

지한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산의 이중 또는 이중 카피를 포함하는 핵산은 또한 선별 마커, 예컨대 카나마이신, 암피실린, 카르베니실린, 젠타마이신, 하이그로마이신, 플레오마이신, 블레오마이신, 네오마이신, 또는 클로르암페니콜 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0055] 실시예 7, 파트 VI 에서 나타내는 바와 같이, 제조되는 이소프렌의 양은 효모 추출물을 세포 배양 배지에 첨가함으로써 추가로 증가될 수 있다. 본 실시예에서, 제조되는 이소프렌의 양은 시험된 농도에 대해 세포 배지 내 효모 추출물의 양에 선형 비례하였다 (도 48C). 부가적으로는, 브로쓰 1 리터 당 대략 0.11 그램의 이소프렌을 효모 추출물 및 글루코오스가 있는 세포 배지로부터 제조하였다 (실시예 7, 파트 VIII). 상기 실험 모두는 이소프렌을 제조하기 위해 kudzu 이소프렌 합성효소, S. 세레비지아 IDI, 및 E. 콜라이 DXS 핵산을 갖는 E. 콜라이 세포를 사용하였다. 글루코오스의 존재하에서의 효모 추출물의 양의 증가는 효모 추출물의 존재하에서의 글루코오스의 양의 증가보다 더 많은 이소프렌이 제조되도록 하였다. 또한, 효모 추출물 양의 증가는 세포에게 더 긴 시간 동안 높은 수준의 이소프렌을 제조하게 하였고, 세포의 건강을 향상시켰다.

[0056] 또한 탄소원으로서 3 가지 유형의 가수분해된 바이오매스 (버개스, 옥수수 대, 및 침엽수 펄프) 를 사용하여 이소프렌 제조를 입증하였다 (도 46A-C). kudzu 이소프렌 합성효소, S. 세레비지아 IDI, 및 E. 콜라이 DXS 핵산을 갖는 E. 콜라이 세포는 동등량의 글루코오스로부터 생성된 것만큼의 이소프렌을 상기 가수분해된 바이오매스 탄소원으로부터 제조하였다 (예를 들어, 1% 글루코오스, w/v). 바람직한 경우, 임의의 기타 바이오매스 탄소원이 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. 바이오매스 탄소원은 많은 통상적인 세포 배지보다 값싸기 때문에 바이오매스 탄소원이 바람직하고, 이로 인해 이소프렌의 경제적인 제조를 용이하게 한다.

[0057] 부가적으로는, 전화당은 이소프렌 발생을 위한 탄소원으로서 기능하는 것으로 제시되었다 (도 47C 및 96-98). 예를 들어, 2.4 g/L 의 이소프렌을 MVA 경로 폴리펩티드 및 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 세포로부터 제조하였다 (실시예 8, 파트 XV). 글리세롤은 또한 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 세포로부터 2.2 mg/L 의 이소프렌 발생을 위한 탄소원으로서 사용되었다 (실시예 8, 파트 XIV). 이소프렌 합성효소 핵산 외에 DXS 핵산, IDI 핵산, 및/또는 하나 이상의 MVA 경로 핵산 (예컨대, 전체 MVA 경로를 코딩하는 핵산) 을 발현하는 것은 글리세롤로부터 이소프렌의 제조를 증가시킬 수 있다.

[0058] 일부 구현예에서, 오일이 세포 배지에 포함된다. 예를 들어, 오일 및 글루코오스 공급원을 함유하는 세포 배지에서 배양되는 경우 kudzu 이소프렌 합성효소 핵산을 함유하는 B. 서브틸리스 세포는 이소프렌을 제조하였다 (실시예 4, 파트 III). 일부 구현예에서, 1 개 초과와 오일 (예컨대 2, 3, 4, 5 개 이상의 오일) 이 세포 배지에 포함된다. 임의의 특정 이론에 얽매는 것으로 의도되지 않으면서, (i) 오일은 이소프렌으로의 전환에 이용가능한 세포 내 탄소의 양을 증가시킬 수 있고, (ii) 오일은 세포 내 아세틸-CoA 의 양을 증가시켜, MVA 경로를 통한 탄소 흐름을 증가시킬 수 있고, 및/또는 (ii) 오일은 세포에 추가 영양분을 제공할 수 있으며, 이것은 세포 내의 많은 탄소가 다른 생성물보다 이소프렌으로 전환되므로 바람직한 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, 오일을 함유하는 세포 배지에서 배양된 세포는 이소프렌을 제조하기 위해 자연적으로 MVA 경로를 사용하고, 전체 MVA 경로에 대한 핵산을 함유하도록 유전적으로 개질된다. 일부 구현예에서, 오일은 숙주 세포에 의해 오일의 사용을 용이하게 하기 위해 세포 배양 배지에 첨가되기 전에 부분적으로 또는 완전히 가수분해된다.

[0059] 세포 (예를 들어, 박테리아) 내 이소프렌과 같은 소형 분자의 상업적 제조에 대한 주요 장애 중 하나는 분자 제조를 세포의 성장과 분리시키는 것이다. 이소프렌의 상업적으로 실행가능한 제조를 위한 일부 구현예에서, 공급원료로부터의 상당한 양의 탄소가 세포의 성장 및 유지 ("탄소 효율") 보다, 이소프렌으로 전환된다. 다양한 구현예에서, 세포는 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.0015, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 또는 8.0% 이상을 이소프렌으로 전환시킨다. 특정 구현예에서, 하류방향 생성물로 전환된 공급원료로부터의 탄소의 상당한 부분이 이소프렌으로 전환된다. 실시예 11 에 추가로 기재되는 바와 같이, MVA 경로 및 kudzu 이소프렌 합성효소 핵산을 발현하는 E. 콜라이 세포는 이소프렌 또는 중간체 메발론산 제조와 성장과의 분리를 보여, 높은 탄소 효율을 야기한다. 특히, 메발론산은 엔테로코쿠스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis) 로부터의 상위 MVA 경로를 발현하는 세포로부터 형성되었다. 이소프렌은 엔테로코쿠스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis) 로부터의 상위 MVA 경로, 사카로마이세스 세레비지아에 (Saccharomyces cerevisiae) 로부터의 하위 MVA 경로, 및 푸에라리아 몬타나 (Pueraria montana) (Kudzu) 로부터의 이소프렌 합성효소를 발현하는 세포로부터 형성되었다. 이러한 이소프렌 또는 메발론산 제조와 성장과의 분리는 E. 콜라이의 4 가지 상이한 균주: BL21(LDE3), BL21(LDE3) 튜너 (Tuner), FM5, 및 MG1655 에서 입증

되었다. 첫번째 2 개의 E. 콜라이 균주는 B 균주이고, 나머지 2 개는 K12 균주이다. 제조와 성장과의 분리는 또한 ack 및 pta 유전자가 결실된 MG1655 의 변이체에서 입증되었다. 상기 변이체는 또한 아세테이트의 제조가 적은 것이 입증되었다.

[0060] 예시적 폴리펩티드 및 핵산

[0061] 다양한 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산이 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0062] 본원에 사용되는 바와 같이, "폴리펩티드"에는 폴리펩티드, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드의 분절, 및 융합 폴리펩티드가 포함된다. 일부 구현예에서, 융합 폴리펩티드에는 첫번째 폴리펩티드의 일부 또는 전부 (예를 들어, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 또는 이의 촉매적으로 활성인 분절)가 포함되고, 임의로 제 2 폴리펩티드의 일부 또는 전부 (예를 들어, 융합 폴리펩티드의 정제 또는 결실을 용이하게 하는 펩티드, 예컨대 His-태그)가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 폴리펩티드는 2 개 이상의 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, AA-CoA 티올라아제 및 HMG-CoA 리덕타아제 폴리펩티드)의 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 2 개 이상의 MVA 경로 폴리펩티드의 활성을 갖는 자연 발생적 폴리펩티드 (예컨대, 엔테로코쿠스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis) mvaE 핵산에 의해 코딩된 폴리펩티드)이다.

[0063] 다양한 구현예에서, 폴리펩티드는 약 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 개 이상의 아미노산을 갖는다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 분절은 전장 폴리펩티드로부터 약 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 개 이상의 인접 아미노산을 함유하고, 상응하는 전장 폴리펩티드의 활성의 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 이상을 갖는다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드에는 임의의 자연 발생적 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열 또는 절편이 포함된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 야생형 (즉, 자연 발생적 서열) 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 서열과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 갖는다.

[0064] 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "단리된 폴리펩티드"는 폴리펩티드의 라이브러리, 예컨대 2, 5, 10, 20, 50 이상의 상이한 폴리펩티드의 라이브러리의 일부가 아니고, 자연적으로 발생하는 하나 이상의 성분과 분리된다. 단리된 폴리펩티드는 예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산의 발현에 의해 수득될 수 있다.

[0065] 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 이중 폴리펩티드이다. "이중 폴리펩티드"는 그의 아미노산 서열이 동일한 숙주 세포에서 자연적으로 발견되는 또다른 폴리펩티드의 서열과 일치하지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 특히, 이중 폴리펩티드는 자연에서 동일한 숙주 세포에서 발견되는 야생형 핵산과 일치하지 않는다.

[0066] 본원에 사용되는 바와 같이, "핵산"은 단일 또는 이중 가닥 형태의 2 개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드를 말한다. 일부 구현예에서, 핵산은 재조합 핵산이다. "재조합 핵산"은 관심의 핵산이 유래한 유기체의 자연에서 발생하는 게놈 내에, 관심의 핵산 측면에 있는 하나 이상의 핵산 (예를 들어, 유전자)이 없는 관심의 핵산을 의미한다. 그러므로 용어에는 예를 들어, 벡터 내에, 자가 복제성 플라스미드 또는 바이러스 내에, 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈 DNA 내에 도입된, 또는 다른 서열과 독립적인 개별 분자 (예를 들어, cDNA, 게놈 DNA 분절, 또는 PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 제조된 cDNA 분절)로서 존재하는 재조합 DNA가 포함된다. 다양한 구현예에서, 핵산은 재조합 핵산이다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은, 재조합 핵산이 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 또다른 폴리펩티드의 전부 또는 일부 (예를 들어, 융합 폴리펩티드의 정제 또는 결실을 용이하게 하는 펩티드, 예컨대 His-태그)를 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하도록 또다른 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 코딩하는 또다른 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산의 일부 또는 전부는 화학적으로 합성된다.

[0067] 일부 구현예에서, 핵산은 이중 핵산이다. "이중 핵산"은 그의 핵산 서열이 동일한 숙주 세포에서 자연적으로 발견되는 또다른 핵산의 서열과 일치하지 않는 핵산을 의미한다.

[0068] 특정 구현예에서, 핵산에는 임의의 자연 발생적 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 전체 핵산 서열 또는 절편이 포함된다. 일부 구현예에서, 핵산에는 자연 발생적 이소프렌 합성효소 핵산 DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산으로부터 약 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 개 이상의 인접 뉴클레오타이드가 포함된다. 일부 구현예에서, 핵산은 야생형 (즉, 자연에서 발생하는 서열) 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 서열과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산은 이



소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 전사 또는 번역을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이 (예를 들어, 묵음 돌연변이) 를 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산은 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 핵산의 축퇴 변이체이다.

[0069] "코돈 축퇴성" 은 코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 주지 않으면서 뉴클레오티드 서열의 변화를 가능하게 하는 유전적 코드의 다양성을 말한다. 당업자는 제공된 아미노산을 구체화하기 위한 뉴클레오티드 코돈의 사용에서 특이적 숙주 세포에 의해 나타내진 "코돈-편향" 을 잘 알고 있다. 그러므로, 숙주 세포에서 향상된 발현을 위해 핵산을 합성하는 경우, 일부 구현예에서, 코돈 사용 빈도가 숙주 세포의 바람직한 코돈 사용 빈도에 근접하도록 핵산을 디자인하는 것이 바람직하다.

[0070] 예시적 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 접근 번호는 부록 1 에 나열되어 있다 (부록 1 의 접근 번호 및 상응하는 서열은, 특히 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 아미노산 및 핵산 서열에 대해, 본원에 그 전체가 참조로서 인용되어 있다). Kegg 데이터베이스는 또한 수 많은 예시적 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 아미노산 및 핵산 서열 (예를 들어, 특히 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 아미노산 및 핵산 서열과 관련하여, 전체가 본원에 각각 참조로서 인용된 "genome.jp/kegg/pathway/map/map00100.html" 웹사이트 및 그곳의 서열 참조) 을 함유한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및/또는 핵산 중 하나 이상은 부록 1 중의 임의의 접근 번호 또는 Kegg 데이터베이스에 존재하는 임의의 서열에 상응하는 임의의 서열과 같은 2007 년 12 월 12 일에 공개적으로 이용가능한 서열과 일치하는 서열을 갖는다. 부가적인 예시적 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산은 하기에 추가로 기재되어 있다.

[0071] 예시적 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 및 핵산

[0072] 상기 주지된 바와 같이, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP) 를 이소프렌으로 전환시킨다. 예시적 이소프렌 합성효소 폴리펩티드에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 표준 방법은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 DMAPP 를 이소프렌으로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 활성을 갖는지의 여부를 측정하는데 사용될 수 있다. 예시적 어세이에서, 세포 추출물은 실시예 1 에 기재된 바와 같은 진탕 플라스크 방법에서 균주 (예를 들어, 본원에 기재된 E. 콜라이/pTrcKudzu 균주) 를 성장시켜 조제된다. 유도 완료 후, 대략 10 mL 의 세포를 7000 × g 에서 10 분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하고, 글리세롤 없이 5 ml 의 PEB 에 재현탁시켰다. 표준 절차를 사용하여 프렌치 압력 셀 (French Pressure cell) 을 사용하여 세포를 용해시켰다. 대안적으로는, -80°C 에서 동결/해동 후 세포에 라이소자임 (Ready-Lyse 라이소자임 용액; EpiCentre) 을 처리한다.

[0073] 세포 추출물 내의 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 활성은 예를 들어, 특히, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 활성에 대한 어세이에 대해, 전체가 각각 본원에 참조로서 인용된 문헌 [Silver et al., J. Biol. Chem. 270:13010-13016, 1995] 및 그곳의 참조에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다. DMAPP (Sigma) 를 질소 스트림 하에서 건조 상태로 증발시키고, 100 mM 인산칼륨 완충액 (pH 8.2) 중 100 mM 의 농도로 재수화시켜, -20°C 에 저장하였다. 어세이를 수행하기 위해, 5 μl 의 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM (250 μg/ml) DMAPP, 65 μl 의 식물 추출물 완충액 (PEB) (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% 글리세롤, 및 2 mM DTT) 의 용액을 금속 스크류 캡 및 테플론 코팅 실리콘 격막을 가진 20 ml Headspace 바이알 (Agilent Technologies) 에 25 μl 의 세포 추출물에 첨가하고, 37°C 에서 15 분 동안 진탕하면서 배양하였다. 200 μl 의 250 mM EDTA 를 첨가하여 반응을 쉼시키고, 실시예 1, 파트 II 에 기재된 바와 같이 GC/MS 에 의해 정량하였다.

[0074] 예시적 이소프렌 합성효소 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 또는 이소프렌 합성효소 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 포함된다. 예시적 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 및 핵산에는 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 및 핵산 뿐 아니라 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터 유래된 돌연변이체 폴리펩티드 및 핵산이 포함된다.

[0075] 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산은 파바세아에 (Fabaceae) 과, 예컨대 파보이데아에 (Faboideae) 아과로부터의 것이다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산은, 특히, 이소프렌 합성효소 핵산 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드의 발현에 대해 각각 전체가 참조로서 인용된, 푸에라리아 몬타나 (Pueraria montana) (kudzu) (Sharkey et al., Plant Physiology 137: 700-712, 2005), 푸에라리아

로바타 (*Pueraria lobata*), 포플러 (예컨대, 포플러스 알바 x 트레물라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696) Miller et al., *Planta* 213: 483-487, 2001) 사시나무 (예컨대, 포플러스 트레물로이데스 (*Populus tremuloides*) Silver et al., *JBC* 270(22): 13010-1316, 1995), 또는 영국산 오크 (English Oak) 퀘르쿠스 로부르 (*Quercus robur*) (Zimmer et al., WO 98/02550) 로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산이다. 적합한 이소프렌 합성효소에는 특히 이소프렌 합성효소 핵산 및 폴리펩티드의 서열에 대해, 전체가 참조로서 각각 인용된 Genbank 접근 번호 AY341431, AY316691, AY279379, AJ457070, 및 AY182241 이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산은 퀘르쿠스 로부르 (*Quercus robur*) 로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산이 아니다 (즉, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산은 퀘르쿠스 로부르 (*Quercus robur*) 로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산 이외의 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산이다). 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 핵산 또는 폴리펩티드는 포플러 (예컨대, 포플러스 알바 x 트레물라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696) 로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산이 아니다.

[0076] 예시적 DXS 폴리펩티드 및 핵산

[0077] 상기 주지된 바와 같이, 1-데옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트 합성효소 (DXS) 폴리펩티드는 피루베이트 및 D-글리세르알데하이드-3-포스페이트를 1-데옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트로 전환시킨다. 예시적 DXS 폴리펩티드에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 및 DXS 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 가진 융합 폴리펩티드가 포함된다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 피루베이트 및 D-글리세르알데하이드-3-포스페이트를 1-데옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 DXS 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 예시적 DXS 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 또는 DXS 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 가진 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 포함된다. 예시적 DXS 폴리펩티드 및 핵산에는 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 및 핵산 뿐 아니라 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터 유래된 돌연변이체 폴리펩티드 및 핵산이 포함된다.

[0078] 예시적 IDI 폴리펩티드 및 핵산

[0079] 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라아제 폴리펩티드 (이소펜테닐-디포스페이트 델타-이소머라아제 또는 IDI) 는 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 및 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP) 의 상호전환 (예를 들어, IPP 를 DMAPP 로 전환시킴 및/또는 DMAPP 를 IPP 로 전환시킴) 을 촉매화한다. 예시적 IDI 폴리펩티드에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 및 IDI 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 IPP 및 DMAPP 를 상호전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 IDI 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 예시적 IDI 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 또는 IDI 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 포함된다. 예시적 IDI 폴리펩티드 및 핵산에는 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 및 핵산 뿐 아니라 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터 유래된 돌연변이체 폴리펩티드 및 핵산이 포함된다.

[0080] 예시적 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산

[0081] 예시적 MVA 경로 폴리펩티드에는 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제 (AA-CoA 티올라아제) 폴리펩티드, 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소 (HMG-CoA 합성효소) 폴리펩티드, 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타아제 (HMG-CoA 리덕타아제) 폴리펩티드, 메발로네이트 키나아제 (MVK) 폴리펩티드, 포스포메발로네이트 키나아제 (PMK) 폴리펩티드, 디포스포메발로네이트 데카르복실라아제 (MVD) 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및 2 개 이상의 MVA 경로 폴리펩티드의 활성을 갖는 폴리펩티드 (예를 들어, 융합 폴리펩티드) 가 포함된다. 특히, MVA 경로 폴리펩티드에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 및 MVA 경로 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 예시적 MVA 경로 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 펩티드, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 포함된다. 예시적 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산에는 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 및 핵산 뿐 아니라 본원에 기재된 임의의 공급원 유기체로부터 유래된 돌연변이체 폴리펩티드 및 핵산이 포함된다.

[0082] 특히, 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제 폴리펩티드 (AA-CoA 티올라아제 또는 AACT) 는 아세틸-CoA 의 2 개의 분자를 아세토아세틸-CoA 로 전환시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 아세틸-CoA 의 2 개의 분자를 아세토아세틸-CoA 로 전환시키는 폴리펩티드의

능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 AA-CoA 티올라아제 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

- [0083] 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 합성효소 (HMG-CoA 합성효소 또는 HMGS) 폴리펩티드는 아세토아세틸-CoA 를 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 로 전환시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 아세토아세틸-CoA 를 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 HMG-CoA 합성효소 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0084] 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타아제 (HMG-CoA 리덕타아제 또는 HMGR) 폴리펩티드는 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 를 메발로네이트로 전환시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 를 메발로네이트로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 HMG-CoA 리덕타아제 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0085] 메발로네이트 키나아제 (MVK) 폴리펩티드는 메발로네이트가 메발로네이트-5-포스페이트를 형성하도록 인산화시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 메발로네이트를 메발로네이트-5-포스페이트로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 MVK 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0086] 포스포메발로네이트 키나아제 (PMK) 폴리펩티드는 메발로네이트-5-포스페이트가 메발로네이트-5-디포스페이트를 형성하도록 인산화시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 메발로네이트-5-포스페이트를 메발로네이트-5-디포스페이트로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 PMK 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0087] 디포스포메발로네이트 데카르복실라아제 (MVD 또는 DPMDC) 폴리펩티드는 메발로네이트-5-디포스페이트를 이소펜테닐 디포스페이트 폴리펩티드 (IPP) 로 전환시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법) 은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 메발로네이트-5-디포스페이트를 IPP 로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 MVD 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0088] 예시적 IDI 폴리펩티드 및 핵산은 상기 기재되어 있다.
- [0089] 핵산 단리를 위한 예시적 방법
- [0090] 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산은 표준 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 관심의 공급원 유기체 (예컨대, 박테리아 계통) 로부터의 바람직한 핵산 수득 방법은 공통적이고, 분자 생물학 업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 특히, 관심의 핵산의 단리에 대해, 각각 전체가 본원에 참조로서 인용된, WO 2004/033646 호 및 그곳에 언급된 참고문헌 참조). 예를 들어, 핵산의 서열이 공지된 경우 (예컨대 본원에 기재된 임의의 공지된 핵산), 적합한 계통 라이브러리는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 생성될 수 있고, 바람직한 핵산 서열에 상보적인 탐침으로 스크리닝할 수 있다. 일단 서열이 단리되면, DNA 는 표준 프라이머 지정 증폭 방법, 예컨대 적합한 벡터를 사용하는 형질전환에 적합한 DNA 의 양을 수득하기 위한 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) (특히, PCR 방법에 대해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 제 4,683,202 호) 을 사용하여 증폭될 수 있다.
- [0091] 대안적으로는, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산 (예컨대, 공지된 핵산 서열을 가진 임의의 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산) 은 표준 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0092] 본원에 기재된 조성물 및 방법에 사용하기에 적합할 수 있는 부가적인 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산은 표준 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 이소프렌을 제조하는 것으로 알려진 유기체의 염색체 DNA 의 코스미드 라이브러리는 E. 콜라이와 같은 유기체에서 구축될 수 있고, 그 다음 이소프렌 제조에 대해 스크리닝된다. 특히, 코스미드 라이브러리는 계통 DNA 의 큰 절편 (35-45 kb) 이 벡터 내로 패키징되는 곳에서 작성될 수 있고, 적합한 숙주를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 코스미드 벡터는 다량의 DNA 를 수용할 수 있다는데 있어 독특하다. 일반적으로, 코스미드 벡터는 이중 DNA 의 패키징 및 후속 환형화에 필요한 cos DNA 서열의 하나 이상의 카피를 갖는다. cos 서열 외에, 상기 벡터는 또한 ColEI 및 암피실린 또는 네오마이신에 내성인 핵산과 같은 약물 내성 마커와 같은 복제 기원을 함유한다. 적합한 박테리아 숙주의 형질전환을 위해 코스미드 벡터를 사용하는 방법은, 특히, 형질전환 방법과 관련하여, 전체가 참조로서 본원에 인용된 문헌 [Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989] 에 잘 기재되어 있다.

[0093] 전형적으로는 코스미드를 클로닝하기 위해, 적합한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 이중 DNA 를 단리하고, 적합한 리가아제를 사용하여 코스미드 벡터의 cos 영역에 인접하게 라이게이션하였다. 그 다음 선형화 이중 DNA 를 함유하는 코스미드 벡터를 박테리오파지와 같은 DNA 패키지 비히클과 반응시켰다. 패키지 과정 동안, cos 부위는 분할되고, 이중 DNA 가 박테리아 바이러스 입자의 머리 부분 내에 패키징되었다. 그 다음 상기 입자는 E. 콜라이와 같은 적합한 숙주 세포를 트랜스펙션시키기 위해 사용된다. 일단 세포 내에 주입 되면, 이중 DNA 는 cos 점착성 말단의 영향 하에서 환형화된다. 이 방식으로, 이중 DNA 의 큰 절편이 숙주 세포에 도입되고 발현된다.

[0094] 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산을 획득하기 위한 부가적인 방법에는 어세이 (예컨대 본원에 기재된 상부공간 어세이) 에 의해 또는 보존된 아미노산 길이 (예를 들어, 3 개 이상의 보존된 아미노산) 를 코딩하는 뉴클레오티드에 대해 지정된 프라이머를 사용하는 PCR 에 의해 메타게놈 라이브러리를 스크리닝하는 것이 포함된다. 보존된 아미노산은 공지된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드의 아미노산 서열을 정렬시켜 확인될 수 있다. 이소프렌 합성효소 폴리펩티드에 대해 보존된 아미노산은 공지된 이소프렌 합성효소 폴리펩티드의 정렬된 서열에 근거하여 확인될 수 있다. 자연적으로 이소프렌을 제조하는 것으로 발견된 유기체는 표준 단백질 정제 방법 (당업계에 잘 알려짐) 에 적용될 수 있고, 수득된 정제된 폴리펩티드는 표준 방법을 사용하여 서열분석될 수 있다. 다른 방법은 문헌 (예를 들어, 특히 이소프렌의 합성에 관여하는 핵산의 확인에 대해, 전체가 참조로서 본원에 인용된 문헌 [Julsing *et al.*, *Applied Microbiol. Biotechnol.* 75: 1377-84, 2007; Withers *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* 73(19):6277-83, 2007] 참조) 에서 발견된다.

[0095] 부가적으로는, 표준 서열 정렬 및/또는 구조 예측 프로그램은 일차 및/또는 예측된 폴리펩티드 이차 구조와, 공지된 DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 구조와의 유사성에 근거한 부가적인 DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 스위스포트-트램블 데이터베이스 (웹사이트 "expasy.org", Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU - 1 rue Michel Servet CH-1211 Geneva 4, Switzerland) 와 같은 표준 데이터베이스가 또한 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 이차 및/또는 삼차 구조는 표준 구조 예측 프로그램, 예컨대 PredictProtein (630 West, 168 Street, BB217, New York, N.Y. 10032, USA) 의 디폴트 설정을 사용하여 예측될 수 있다. 대안적으로는, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 실제 이차 및/또는 삼차 구조는 표준 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 부가적인 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 또한 공지된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산으로부터 생성된 탐침에 대한 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

[0096] 예시적 프로모터 및 벡터

[0097] 본원에 기재된 임의의 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 하나 이상의 벡터에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 가진 벡터를 특징으로 한다. 본원에 사용되는 바와 같이, "벡터" 는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심의 핵산을 전달할 수 있는, 바람직하게는 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예에는 플라스미드, 바이러스 벡터, DNA 또는 RNA 발현 벡터, 코스미드, 및 파지 벡터가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 벡터는 발현 조절 서열의 조절 하에서 핵산을 함유한다.

[0098] 본원에 사용되는 바와 같이, "발현 조절 서열" 은 관심의 핵산의 전사를 지정하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 조절 서열은 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도성 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. "유도성 프로모터" 는 환경적 또는 발달적 규제 하에서 활성화된 프로모터이다. 발현 조절 서열은 전사되는 핵산 절편에 작동가능하게 연결된다.

[0099] 일부 구현예에서, 벡터는 선별 마커를 포함한다. "선별 마커" 라는 용어는 도입된 핵산 또는 벡터를 함유하는 숙주 세포의 선별을 용이하게 하는, 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 핵산을 말한다. 선별가능한 마커의 예에는 항생제 내성 핵산 (예를 들어, 카나마이신, 암피실린, 카르베니실린, 젠타마이신, 하이그로마이신, 플레오마이신, 블레오마이신, 네오마이신, 또는 클로르암페니콜) 및/또는 대사적 장점, 예컨대 숙주 세포에 대한 영양적 장점을 부여하는 핵산이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 영양 선별 마커에는 amdS, argB, 및 pyr4 로서 당업계에 공지된 마커가 포함된다. 트리코데르마 (Trichoderma) 의 형질전환을 위한 벡터 시스템에 유용한 마커는 당업계에 알려져 있다 (예를 들어, 특히 선별 마커에 관해, 본원에 전체가



참조로서 인용된 문헌 [Finkelstein, Chapter 6 in Biotechnology of Filamentous Fungi, Finkelstein et al., Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, Chap. 6., 1992; 및 Kinghorn et al., Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, 1992] 참조). 일부 구현예에서, 선별 마커는 amdS 핵산이며, 이것은 효소 아세타미다아제를 코딩하고, 형질변환된 세포를 질소원으로서 아세타미드 상에서 성장하도록 한다. 선별 마커로서 A. 니둘란스 (A. nidulans) amdS 핵산의 사용이 [Kelley et al, EMBO J. 4:475 - 479, 1985 및 Penttila et al., Gene 61:155-164, 1987 (특히 선별 마커에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용됨)] 에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 선별 마커 없이 세포의 염색체 내에 통합된다.

[0100] 적합한 벡터는 사용되는 숙주 세포와 상용성인 것이다. 적합한 벡터는 예를 들어, 박테리아, 바이러스 (예컨대, 박테리오파지 T7 또는 M-13 유래 파지), 코스미드, 효모, 또는 식물로부터 유래될 수 있다. 이러한 벡터를 수득하기 위한 프로토콜 그리고 사용하는 프로토콜은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 특히 벡터의 사용에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989 참조).

[0101] 프로모터는 당업계에 잘 알려져 있다. 숙주 세포에서 기능하는 임의의 프로모터는 숙주 세포 내 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 발현에 사용될 수 있다. 다양한 숙주 세포에서 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 발현을 유도하는데 유용한 개시 조절 영역 또는 프로모터는 수 많으며, 당업자에게 익숙하다 (예를 들어, 특히, 관심의 핵산의 발현용 벡터에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 WO 2004/033646 및 그곳에 언급된 참조문헌 참조). 상기 핵산을 유도할 수 있는 사실상 임의의 프로모터가 본 발명에 적합하다 (CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADCI, TRP1, URA3, LEU2, ENO, 및 TPI (사카로마이세스 (Saccharomyces) 에서의 발현에 유용함); AOX1 (피치아 (Pichia) 에서의 발현에 유용함); 및 lac, trp, □P<sub>L</sub>, □P<sub>R</sub>, T7, tac, 및 trc (E. 콜라이에서의 발현에 유용함) 를 포함하나 이에 제한되지 않음).

[0102] 일부 구현예에서, 글루코오스 이소머라아제 프로모터가 사용된다 (예를 들어, 관심의 폴리펩티드의 발현을 위한 각각의 프로모터 및 플라스미드 시스템에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 7,132,527 및 그곳에 언급된 참조문헌 참조). 보고된 글루코오스 이소머라아제 프로모터 돌연변이체는 글루코오스 이소머라아제 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코딩된 폴리펩티드의 발현 수준을 변화시키기 위해 사용될 수 있다 (미국 특허 번호 7,132,527). 다양한 구현예에서, 글루코오스 이소머라아제 프로모터는 저, 중간 또는 고 카피 플라스미드에 함유된다 (미국 특허 번호 7,132,527).

[0103] 다양한 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산은 저 카피 플라스미드 (예를 들어, 세포 당 약 1 내지 약 4 카피로 유지되는 플라스미드), 중 카피 플라스미드 (예를 들어, 세포 당 약 10 내지 약 15 카피로 유지되는 플라스미드), 또는 고 카피 플라스미드 (예를 들어, 세포 당 약 50 개 이상의 카피로 유지되는 플라스미드) 에 함유된다. 일부 구현예에서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 T7 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, T7 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 중 또는 고 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 중 또는 고 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 저 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 내생 프로모터, 예컨대 내생 에스케리차 (Escherichia), 판테오아 (Pantoea), 바실러스 (Bacillus), 야로이와 (Yarrowia), 스트렙토마이세스 (Streptomyces), 또는 트리코테르마 (Trichoderma) 프로모터 또는 내생 알칼리 세린 프로테아제, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 내생 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 고 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 벡터는 세포 내 세포 내 염색체 내에 통합되지 않는 복제 플라스미드이다. 일부 구현예에서, 벡터의 일부 또는 모두는 세포 내 염색체 내에 통합된다.

[0104] 일부 구현예에서, 벡터는 진균 숙주 세포 내로 도입되는 경우 숙주 세포 게놈 내로 통합되고 복제되는 임의의



벡터이다. 벡터 목록에 대해 Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, 특히 벡터에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 웹사이트 "fgsc.net" 및 그곳에 언급된 참조문헌) 을 참조한다. 적합한 발현 및/또는 통합 벡터의 부가적인 예는 (특히 벡터에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989, Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., (eds) 1987, Supplement 30, section 7.7.18); van den Hondel et al. in Bennett and Lasure (Eds.) More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press pp. 396-428, 1991]; 및 미국 특허 번호 5,874,276) 에 제공된다. 특히 유용한 벡터에는 pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, 및 pENTR/D 가 포함된다.

[0105] 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 진균 숙주 세포에서 전사 활성을 나타내는 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 프로모터는 숙주 세포에 대해 내생 또는 이종인 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 트리코데르마 (*Trichoderma*) 숙주에서 유용하다. 프로모터의 적합한 비-제한적 예에는 *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *pepA*, *hfb1*, *hfb2*, *xyn1*, 및 *amy* 가 포함된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 숙주 세포에 대해 본래의 것이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, T. 레에세이가 숙주인 경우, 프로모터는 본래의 T. 레에세이 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 T. 레에세이 *cbh1* 이고, 이것은 유도성 프로모터이고, 특히 프로모터에 대해, 전체가 참조로서 인용된 접근 번호 D86235 로 GenBank 에 기탁되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 진균 숙주 세포에 대해 이종인 것이다. 유용한 프로모터의 다른 예에는 A. 아와모리 및 A 니게르 글루코아밀라아제 (*glaA*) (특히 프로모터에 관해, 각각 전체가 참조로서 본원에 인용된 Nunberg et al., *Mol. Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984 및 Boel et al., *EMBO J.* 3:1581-1585, 1984); 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*) 알파 아밀라아제, 아스페르길루스 오리자 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, T. 레에세이 *xln1*, 및 T. 레에세이 셀로바이오히드롤라아제 1 (특히 프로모터에 관해, 전체가 참조로서 인용된 EP 137280) 의 유전자로부터의 프로모터가 포함된다.

[0106] 일부 구현예에서, 발현 벡터에는 또한 종결 서열이 포함된다. 종결 조절 영역은 또한 숙주 세포에 대해 본래의 것인 다양한 유전자로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 종결 서열 및 프로모터 서열은 동일한 공급원으로부터 유래된다. 또다른 구현예에서, 종결 서열은 숙주 세포에 대해 내생이다. 특히 적합한 터미네이터 서열은 트리코데르마 균주 (예컨대, T. 레에세이) 로부터 유래된 *cbh1* 이다. 기타 유용한 진균 터미네이터에는 A. 니게르 또는 A. 아와모리 글루코아밀라아제 핵산으로부터의 터미네이터 (특히 진균 터미네이터에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 Nunberg et al., *Mol. Cell Biol.* 4:2306-2315, 1984 및 Boel et al., *EMBO J.* 3:1581-1585, 1984) 가 포함된다. 임의로, 종결 부위가 포함될 수 있다. 폴리펩티드의 효과적인 발현을 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 는 발현이 적합한 메신저 RNA 의 형성을 야기하도록 선택된 발현 조절 영역에 개시 코돈을 통해 작동가능하게 연결된다.

[0107] 일부 구현예에서, 프로모터, 코딩 영역 및 터미네이터 모두는 발현될 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산으로부터 기원한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산에 대한 코딩 영역은, 이것이 발현 구축물 프로모터 및 터미네이터 서열의 전사 통제 하에 있도록 일반적인-목적 발현 벡터 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 유전자 또는 이의 일부는 강한 *cbh1* 프로모터의 하류방향에 삽입된다.

[0108] 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 표준 기술 (특히 적합한 DNA 서열의 스크리닝 및 벡터의 구축에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982]) 을 사용하여 발현 벡터와 같은 벡터 내로 도입될 수 있다. 관심의 핵산 (예컨대, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산), 프로모터, 터미네이터, 및 기타 서열을 포함하는 DNA 구축물을 라이게이션하기 위해 사용되는 방법 및 이들을 적합한 벡터 내에 삽입하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 제한 효소는 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산 및 벡터를 분할하기 위해 사용될 수 있다. 그 다음, 분할된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 상용성 말단 및 분할된 벡터는 라이게이션될 수 있다. 연결은 일반적으로 편리한 제한 부위에서의 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 링커는 통상의 실시예에 따라 사용된다 (특히, 올리고뉴클레오타이드 링커에 관해, 전체가 참조로서 본원에 각각 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989, 및 Bennett and Lasure, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego, pp 70-76, 1991] 참조). 부가적으로는, 벡터는 공지된 재조합 기술을 사용하여 구축될 수 있다 (예를 들어, Invitrogen Life Technologies,

Gateway Technology).

- [0109] 일부 구현예에서, 자연 발생적 세포에서 현재 발견되는 것보다 훨씬 더 높은 수준으로 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산을 과발현시키는 것이 바람직한 것이다. 이 결과는 상기 폴리펩티드를 다중카피 플라스미드로 코딩하는 핵산의 선택성 클로닝 및 강한 유도성 또는 구성적 프로모터 하에 상기 핵산을 놓음으로써 달성될 수 있다. 원하는 폴리펩티드의 과발현 방법은 분자 생물학 업계에 공통적이고 잘 알려져 있으며, 예는 특히, 클로닝 기술에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989] 에서 찾을 수 있다.
- [0110] 하기 자원에는 본 발명에 따라 유용한 부가적인 일반적 방법론의 설명이 포함된다: 특히, 분자 생물학 및 클로닝 기술에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Kreigler, Gene Transfer and Expression; A Laboratory Manual, 1990 및 Ausubel et al., Eds. Current Protocols in Molecular Biology, 1994].
- [0111] 예시적 공급원 유기체
- [0112] 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산 (및 그들의 코딩된 폴리펩티드) 은 자연적으로 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산을 함유하는 임의의 유기체로부터 수득될 수 있다. 상기 주지된 바와 같이, 이소프렌은 다양한 유기체, 예컨대 박테리아, 효모, 식물 및 동물에 의해 자연적으로 형성된다. 유기체는 이소프렌을 제조하기 위해 MVA 경로, DXP 경로, 또는 MVA 및 DXP 경로 모두를 함유한다 (도 19). 그러므로, DXS 핵산은 예를 들어, DXP 경로를 함유하는 또는 MVA 및 DXP 경로 모두를 함유하는 임의의 유기체로부터 선택될 수 있다. IDI 및 이소프렌 합성효소 핵산은 예를 들어, MVA 경로, DXP 경로, 또는 MVA 및 DXP 경로 모두를 함유하는 임의의 유기체로부터 수득될 수 있다. MVA 경로 핵산은 MVA 경로를 함유하는 또는 MVA 및 DXP 경로 모두를 함유하는 임의의 유기체로부터 수득될 수 있다.
- [0113] 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산의 핵산 서열은 자연에서 하기 유기체 중 임의의 것에 의해 제조되는 핵산의 서열과 일치한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 아미노산 서열은 자연에서 하기 유기체 중 임의의 것에 의해 제조되는 폴리펩티드의 서열과 일치한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산 또는 폴리펩티드는 본원에 기재된 임의의 유기체로부터 유래된 돌연변이체 핵산 또는 폴리펩티드이다. 본원에서 사용되는 바와 같은, "~로부터 유래된" 은 하나 이상의 돌연변이가 도입된 핵산 또는 폴리펩티드의 공급원을 말한다. 예를 들어, "식물 폴리펩티드로부터 유래된" 폴리펩티드는 하나 이상의 돌연변이를 야생형 (즉, 자연에서 발생하는 서열) 식물 폴리펩티드의 서열 내에 도입함으로써 산출되는 관심의 폴리펩티드를 말한다.
- [0114] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 진균이고, 이의 예는 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 종, 예컨대 *A. 오리자에* 및 *A. 니게르*, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 종, 예컨대 *S. 세레비시아에*, 스퀴조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*) 종, 예컨대 *S. 폼베*, 및 트리코테르마 (*Trichoderma*) 종, 예컨대 *T. 레에세이*이다. 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 사상 진균 세포이다. "사상 진균" 이라는 용어는 아문 에우마이코티나 (*Eumycotina*) 의 모든 사상 형태 (Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, New York 참조) 를 말한다. 상기 진균은 키틴, 셀룰로오스, 및 기타 복합 다당류로 구성된 세포벽을 갖는 영양 균사체를 특징으로 한다. 사상 진균은 효모와 형태적으로, 물리적으로 그리고 유전적으로 구별된다. 사상 진균에 의한 영양적 성장은 균사 신장에 의해 이루어지고, 탄소 이화작용은 의무적 호기성이다. 사상 진균 모 세포는 트리코테르마 (*Trichoderma*), (예를 들어, 트리코테르마 레에세이 (*Trichoderma reesei*), 하이포크레아 제코리나 (*Hypocrea jecorina*) 의 무성 형태, 이전에는 *T. 롱기브라키아툼* (*T. longibrachiatum*), 트리코테르마 비리데 (*Trichoderma viride*), 트리코테르마 코닝기이 (*Trichoderma koningii*), 트리코테르마 하르시아눔 (*Trichoderma harzianum*) 으로서 분류되었음) (Sheir-Neirs et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol* 20: 46-53, 1984; ATCC No. 56765 및 ATCC No. 26921); 페니실리움 (*Penicillium*) 종, 휴미콜라 (*Humicola*) 종 (예를 들어, *H. 인솔렌스* (*H. insolens*), *H. 라누기노스* (*H. lanuginosa*), 또는 *H. 그리세아* (*H. grisea*)); 크리소스포리움 (*Chrysosporium*) 종 (예를 들어, *C. 루크노웬스* (*C. lucknowense*)), 글리오클라디움 (*Gliocladium*) 종, 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 종 (예를 들어, *A. 오리자에* (*A. oryzae*), *A. 니게르* (*A. niger*), *A. 소자에* (*A. sojae*), *A. 자포니쿠스* (*A. japonicus*), *A. 니둘란스* (*A. nidulans*), 또는 *A. 아와모리* (*A. awamori*)) (Ward et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 7380743, 1993 및 Goedegebuur et al, *Genet* 41: 89-98, 2002), 푸사리움 종 (*Fusarium* sp.), (예를 들어, *F. 로세움* (*F. roseum*), *F. 그라미눔* (*F. graminum*), *F. 세레알리스* (*F. cerealis*), *F. 옥시스포룸* (*F. oxysporum*), 또는 *F. 베네나툼* (*F. venenatum*)), 뉴로스포라 (*Neurospora*) 종 (예를 들어, *N. 크라싸* (*N. crassa*)), 하이포크레아 (*Hypocrea*) 종, 무코르 (*Mucor*) 종 (예를

들어, M. 미에헤이 (M. miehei)), 리조푸스 (Rhizopus) 종 및 에메리셀라 (Emmericella) 종 (또한, Innis et al., Sci. 228: 21-26, 1985 참조) 의 세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. "트리코테르마" 또는 "트리코테르마 종 (Trichoderma sp. 또는 Trichoderma spp.)" 이라는 용어는 트리코테르마로서 이전에 또는 현재 분류되는 임의의 진균 속을 말한다.

[0115] 일부 구현예에서, 진균은 A. 니둘란스, A. 아와모리, A. 오리자에, A. 아쿨레아투스 (A. aculeatus), A. 니게르, A. 자포니쿠스, T. 레에세이, T. 비리데, F. 옥시스포룸, 또는 F. 솔라니이다. 아스페르길루스 (Aspergillus) 균주는 특히, 진균에 관해, 전체가 본원에 각각 참조로서 인용된 문헌 [Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743, 1993 및 Goedegebuur et al., Curr Gene 41:89-98, 2002] 에 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 진균은 트리코테르마의 균주, 예컨대 T. 레에세이의 균주이다. T. 레에세이의 균주는 알려져 있고, 비제한적인 예에는 특히, T. 레에세이의 균주에 관해, 전체가 본원에 각각 참조로서 인용된 ATCC No. 13631, ATCC No. 26921, ATCC No. 56764, ATCC No. 56765, ATCC No. 56767, 및 NRRL 15709 가 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주 균주는 RL-P37 의 유도체이다. RL-P37 은 특히, T. 레에세이의 균주에 관해, 전체가 본원에 참조로서 인용된 문헌 [Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46-53, 1984] 에 기재되어 있다.

[0116] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 효모, 예컨대 사카로마이세스 종, 스퀴조사카로마이세스 종, 피치아 종, 또는 칸디다 (Candida) 종이다.

[0117] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 박테리아, 예컨대 바실러스의 균주, 예컨대 B. 리케니포르미스 또는 B. 서브틸리스, 판토에아 (Pantoea) 균주, 예컨대 P. 시트레아 (P. citrea), 슈도모나스 (Pseudomonas) 균주, 예컨대 P. 알칼리제네스 (P. alcaligenes), 스트렙토마이세스 균주, 예컨대 S. 리비단스 또는 S. 루비지노수스 (S. rubiginosus), 또는 에스케리차 균주, 예컨대 E. 콜라이이다.

[0118] 본원에서 사용되는 바와 같이, "바실러스 속" 에는 당업자에게 알려진 바와 같은 "바실러스" 속 내의 모든 종이 포함되며, B. 서브틸리스, B. 리케니포르미스, B. 렌투스, B. 브레비스, B. 스테아로테르모필루스 (B. stearothermophilus), B. 알칼로필루스 (B. alkalophilus), B. 아밀로리퀘파시엔스 (B. amyloliquefaciens), B. 클라우시 (B. clausii), B. 할로두란스 (B. halodurans), B. 메가테리움 (B. megaterium), B. 코아굴란스 (B. coagulans), B. 씨쿨란스 (B. circulans), B. 라우투스 (B. lautus), 및 B. 투링지엔시스 (B. thuringiensis) 가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바실러스 속에 대한 분류학 재편성이 지속적으로 이루어짐을 인지한다. 그러므로, 속에는 이제는 "제오바실러스 스테아로테르모필루스 (Geobacillus stearothermophilus)" 라고 칭하는 B. 스테아로테르모필루스 (B. stearothermophilus) 와 같은 유기체가 포함되나 이에 제한되지 않는, 재분류된 종이 포함되는 것으로 의도된다. 산소의 존재하에서 저항성 내생포자의 생성은 바실러스 속의 정의된 특징으로 간주되나, 이러한 특성은 또한 최근의 명칭 알리시클로바실러스 (Alicyclobacillus), 암피바실러스 (Amphibacillus), 아뉴리니바실러스 (Aneurinibacillus), 아녹시바실러스 (Anoxybacillus), 브레비바실러스 (Brevibacillus), 필로바실러스 (Filobacillus), 그라실리바실러스 (Gracilibacillus), 할로바실러스 (Halobacillus), 파에니바실러스 (Paenibacillus), 살리바실러스 (Salibacillus), 테르모바실러스 (Thermobacillus), 우레이바실러스 (Ureibacillus), 및 버지바실러스 (Virgibacillus) 에도 적용된다.

[0119] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 그람-양성 박테리아이다. 비-제한적인 예에는 스트렙토마이세스 (Streptomyces) (예를 들어, S. 리비단스, S. 코엘리콜로르, 또는 S. 그리세우스) 및 바실러스의 균주가 포함된다. 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 그람-음성 박테리아, 예컨대 E. 콜라이 또는 슈도모나스 종이다.

[0120] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 식물, 예컨대 파바세아에 (Fabaceae) 족, 예컨대 파보이테아에 (Faboideae) 아족으로부터의 식물이다. 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 칙, 포플러 (예컨대, 포플러스 알바 x 트레물라 (Populus alba x tremula) CAC35696), 사시나무 (예컨대, 포플러스 트레물로이데스 (Populus tremuloides)), 또는 퀘르쿠스 로부르 (Quercus robur) 이다.

[0121] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 조류, 예컨대 녹색 조류, 적색 조류, 회조류, 클로라라크니오조류, 유글레나, 크로미스타, 또는 와편모충이다.

[0122] 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 시아노박테리아, 예컨대 형태학 상으로 하기 그룹 중 임의의 것으로 분류되는 시아노박테리아이다: 크로코칼스 (Chroococcales), 플레오캡살스 (Pleurocapsales), 오실라토리아레스 (Oscillatoriales), 노스토칼레스 (Nostocales), 또는 스티고네마탈레스 (Stigonematales).

[0123] 예시적 숙주 세포

[0124] 다양한 숙주 세포는 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드를 발현하고, 청구된 본 발명의 방법에서 이소프렌을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 예시적 숙주 세포에는 "예시적 공급원 유기체" 라는 표제하에서 이전 섹션에서 열거된 임의의 유기체로부터의 세포가 포함된다. 숙주 세포는 이소프렌을 자연적으로 제조하는 세포 또는 이소프렌을 자연적으로 제조하지 않는 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DXP 경로를 사용하여 이소프렌을 자연적으로 제조하고, 이소프렌 합성효소, DXS, 및/또는 IDI 핵산은 상기 경로를 사용하여 이소프렌의 제조를 향상시키기 위해 첨가된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 MVA 경로를 사용하여 이소프렌을 자연적으로 제조하고, 이소프렌 합성효소 및/또는 하나 이상의 MVA 경로 핵산은 상기 경로를 사용하여 이소프렌의 제조를 향상시키기 위해 첨가된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DXP 경로를 사용하여 이소프렌을 자연적으로 제조하고, 하나 이상의 MVA 경로 핵산은 MVA 경로의 일부 또는 전부 뿐 아니라 DXP 경로를 사용하여 이소프렌을 제조하기 위해 첨가된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DXP 및 MVA 경로 모두를 사용하여 이소프렌을 자연적으로 제조하고, 하나 이상의 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 상기 경로 중 하나 또는 모두에 의한 이소프렌의 제조를 향상시키기 위해 첨가된다.

[0125] 예시적 형질전환 방법

[0126] 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산 또는 이들을 함유하는 벡터는 코딩된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드의 발현을 위해 표준 기술을 사용하여 숙주 세포 (예를 들어, 식물 세포, 진균 세포, 효모 세포, 또는 본원에 기재된 박테리아 세포) 내로 삽입될 수 있다. 숙주 세포 내로의 DNA 구축물 또는 벡터의 도입은 형질전환, 전기천공법, 핵 마이크로주입, 형질도입, 트랜스펙션 (예를 들어, 리포펙틴 매개 또는 DEAE-덱스트린 매개 트랜스펙션 또는 재조합 파지 바이러스를 사용하는 트랜스펙션), 인산칼슘 DNA 침전물로의 인큐베이션, DNA-코팅 마이크로발사체로의 고속 포격, 및 원생동물 융합과 같은 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 일반적인 형질전환 기술은 당업계에 알려져 있다 (예를 들어, 특히, 형질전환 방법에 관해, 전체가 참조로서 본원에 각각 인용된 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. (eds) Chapter 9, 1987; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989; 및 Campbell et al., *Curr. Genet.* 16:53-56, 1989] 참조). 트리코테르마 내 이중 폴리펩티드의 발현은 특히, 형질전환 및 발현 방법에 관해, 전체가 참조로서 본원에 각각 인용된 미국 특허 번호 6,022,725; 미국 특허 번호 6,268,328; 미국 특허 번호 7,262,041; WO 2005/001036; Harkki *et al.*; *Enzyme Microb. Technol.* 13:227-233, 1991; Harkki *et al.*, *Bio Technol.* 7:596-603, 1989; EP 244,234; EP 215,594; 및 Nevalainen *et al.*, "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes," in Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY pp. 129 - 148, 1992] 에 기재되어 있다. 또한, 아스페르길루스 균주의 형질전환에 대해 Cao et al., (*Sci.* 9:991-1001, 2000; EP 238023; 및 Yelton *et al.*, *Proceedings. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474, 1984 (특히, 형질전환 방법에 관해, 전체가 참조로서 본원에 각각 인용됨) 를 참조할 수 있다. 도입된 핵산은 염색체 DNA 내로 통합될 수 있거나, 외부염색체 복제 서열로서 유지될 수 있다.

[0127] 당업계에 공지된 임의의 방법은 형질전환체를 선택하는데 사용될 수 있다. 하나의 비제한적 예에서, amdS 마커를 포함하는 안정한 형질전환체는, 빠른 성장 속도와 아세타미드를 함유하는 고체 배양 배지 상에서의 우월 투들하다기 보다는 매끈한 가장자리를 갖는 원형 콜로니의 형성에 의해 불안정한 형질전환체와 구별된다. 부가적으로는, 일부 경우에서, 추가의 안정성 시험은, 고체 비-선별 배지 (예를 들어, 아세타미드가 결핍된 배지) 상에서 형질전환체를 성장시키고, 상기 배양 배지로부터 포자를 수확하고, 아세타미드를 함유하는 선별 배지 상에서 후속적으로 발아하고 성장하는 포자의 % 를 측정하여 수행된다.

[0128] 일부 구현예에서, 진균 세포는 원생동물 형성 및 원생동물의 형질전환 후 공지된 방식으로 세포 벽의 재생을 포함하는 방법에 의해 형질전환된다. 하나의 특이적 구현예에서, 형질전환을 위한 트리코테르마 종의 조제는 진균 군사로부터의 원생동물의 조제를 포함한다 (특히, 형질전환 방법에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16:53-56, 1989] 참조). 일부 구현예에서, 군사는 발아된 영양 포자로부터 획득된다. 군사는 원생동물을 야기하는 세포벽을 소화하는 효소로 처리된다. 그 다음 원생동물은 현탁 배지 내 삼투압 안정화제의 존재에 의해 보호된다. 상기 안정화제에는 소르비톨, 만니톨, 염화칼륨, 황산마그네슘 등이 포함된다. 통상, 상기 안정화제의 농도는 0.8 M 내지 1.2 M 이다. 현탁 배지 내 소르비톨의 약 1.2 M 용액을 사용하는 것이 바람직하다.



- [0129] 숙주 트리코데르마 종 균주 내로의 DNA 의 섭취는 칼슘 이온 농도에 따라 다르다. 일반적으로, 약 10 mM CaCl<sub>2</sub> 내지 50 mM CaCl<sub>2</sub> 가 섭취 용액에 사용된다. 섭취 용액 내 칼슘 이온 외에, 일반적으로 포함되는 다른 화합물은 TE 완충액 (10 Mm Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA) 또는 10 mM MOPS, pH 6.0 완충액 (모르폴린프로판술폰산) 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 과 같은 완충 시스템이다. 임의의 특정 이론에 구애되는 것으로 의도되지 않으면서, 폴리에틸렌 글리콜은 세포막을 융합시키도록 작용하여, 배지의 내용물이 트리코데르마 종 균주의 세포질 내로 전달되도록 하고, 플라스미드 DNA 가 핵으로 이동되도록 하는 것으로 여겨진다. 상기 융합은 종종 숙주 염색체 내에 통합된 플라스미드 DNA 의 다중 카피를 남긴다.
- [0130] 통상적으로, 10<sup>5</sup> 내지 10<sup>7</sup>/mL (예컨대 2 × 10<sup>6</sup>/mL) 의 밀도로 투과성 처리에 적용된 트리코데르마 종 원생동물 또는 세포를 함유하는 현탁액이 형질전환에 사용된다. 적합한 용액 (예를 들어, 1.2 M 소르비톨 및 50 mM CaCl<sub>2</sub>) 내 부피 100 μL 의 상기 원생동물 또는 세포를 바람직한 DNA 와 혼합한다. 일반적으로, 고 농도의 PEG 를 섭취 용액에 첨가한다. 0.1 내지 1 부피의 25% PEG 4000 을 원생동물 현탁액에 첨가할 수 있다. 일부 구현예에서, 약 0.25 부피를 원생동물 현탁액에 첨가한다. 디메틸 술폰드, 헤파린, 스페르미딘, 염화칼륨 등과 같은 첨가제를 또한 섭취 용액에 첨가하고 형질전환을 도울 수 있다. 유사한 절차가 다른 진균 숙주 세포 (예를 들어, 특히, 형질전환 방법에 관해, 각각 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 6,022,725 및 6,268,328 참조) 에 대해 이용가능하다.
- [0131] 일반적으로, 그 다음 혼합물은 10 내지 30 분의 기간 동안 대략 0℃ 에서 배양된다. 그 다음 부가적인 PEG 를 혼합물에 첨가하여 바람직한 핵산 서열의 섭취를 추가로 향상시킨다. 25% PEG 4000 은 일반적으로 형질전환 혼합물의 부피의 5 내지 15 배 부피로 첨가된다; 그러나, 다소 적거나 많은 부피가 적합할 수 있다. 25% PEG 4000 은 바람직하게는 형질전환 혼합물의 약 10 배 부피이다. PEG 를 첨가한 후, 그 다음 형질전환 혼합물은 소르비톨 및 CaCl<sub>2</sub> 용액의 첨가 전 실온 또는 방상에서 배양된다. 그 다음 원생동물 현탁액을 성장 배지의 용융 분취액에 추가로 첨가한다. 성장 배지가 성장 선별 (예를 들어, 아세타미드 또는 항생제) 에 포함되는 경우, 이것은 형질전환체의 성장만을 허용한다.
- [0132] 박테리아 세포의 형질전환은 예를 들어, 특히, 형질전환 방법에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982] 에 기재된 바와 같은 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0133] 예시적 세포 배양 배지
- [0134] 본 발명에는 또한 이소프렌을 제조하는 세포 또는 배양물 내 세포의 집단이 포함된다. "배양물 내 세포"란, 세포가 1 회 이상의 세포 분열을 겪도록 하는 용액 (예를 들어, 세포 배지) 내 2 개 이상의 세포를 의미한다. "배양물 내 세포"에는 식물 조직으로 분화된 세포를 함유하는 살아있는, 다세포 식물의 일부인 식물 세포는 포함되지 않는다. 다양한 구현예에서, 세포 배양물에는 약 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 5,000, 10,000 개 이상의 세포가 포함된다.
- [0135] 임의의 탄소원은 숙주 세포를 배양하기 위해 사용될 수 있다. "탄소원"이라는 용어는 숙주 세포 또는 유기체에 의해 대사될 수 있는 하나 이상의 탄소-함유 화합물을 말한다. 예를 들어, 숙주 세포를 배양하는데 사용되는 세포 배지에는 생존력을 유지하거나 숙주 세포를 성장시키는데 적합한 임의의 탄소원이 포함될 수 있다.
- [0136] 일부 구현예에서, 탄소원은 탄수화물 (예컨대, 단당류, 이당류, 올리고당류, 또는 다당류), 전하당 (예를 들어, 효소적으로 처리된 수크로오스 시럽), 글리세롤, 글리세린 (예를 들어, 바이오디젤 또는 비누 제조 공정의 글리세린 부산물), 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일 (예를 들어, 식물 또는 식물성 오일, 예컨대 옥수수, 야자, 또는 대두유), 동물 지방, 동물 오일, 지방산 (예를 들어, 포화 지방산, 불포화 지방산, 또는 다중불포화 지방산), 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 재생가능 탄소원 (예를 들어, 바이오매스 탄소원, 예컨대 가수분해된 바이오매스 탄소원), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 중합체, 산, 알코올, 알데하이드, 케톤, 아미노산, 숙시네이트, 락테이트, 아세테이트, 에탄올, 또는 상기 중 2 개 이상의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 탄소원은 글루코오스를 포함하나 이에 제한되지 않는 광합성 생성물이다.
- [0137] 예시적 단당류에는 글루코오스 및 프룩토오스가 포함되고; 예시적 올리고당류에는 락토오스 및 수크로오스가 포함되고, 예시적 다당류에는 전분 및 셀룰로오스가 포함된다. 예시적 탄수화물에는 C6 당 (예를 들어, 프룩토오스, 만노오스, 갈락토오스, 또는 글루코오스) 및 C5 당 (예를 들어, 자일로오스 또는 아라비노오스) 이 포

함된다. 일부 구현예에서, 세포 배지에는 탄수화물 뿐 아니라 탄수화물 이외의 탄소원 (예를 들어, 글리세롤, 글리세린, 디히드록시아세톤, 일-탄소원, 오일, 동물 지방, 동물 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세롤지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생가능 탄소원, 또는 효모 추출물로부터의 성분)이 포함된다. 일부 구현예에서, 세포 배지에는 탄수화물 뿐 아니라 폴리펩티드 (예를 들어, 미생물 또는 식물 단백질 또는 펩티드)가 포함된다. 일부 구현예에서, 미생물 폴리펩티드는 효모 또는 박테리아로부터의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 식물 폴리펩티드는 대두, 옥수수, 카놀라, 야트로파, 야자, 땅콩, 해바라기, 코코넛, 머스타드, 평지씨, 면화씨, 야자핵, 올리브, 잇꽃, 참깨, 또는 아마씨로부터의 폴리펩티드이다.

[0138] 일부 구현예에서, 탄수화물의 농도는 브로스 1 리터 당 약 5 그램 이상 (g/L, 브로스의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 모두 포함된다), 예컨대 약 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 이상 g/L 이다. 일부 구현예에서, 탄수화물의 농도는 약 50 내지 약 400 g/L, 예컨대 약 100 내지 약 360 g/L, 약 120 내지 약 360 g/L, 또는 약 200 내지 약 300 g/L 이다. 일부 구현예에서, 상기 탄수화물의 농도에는 숙주 세포의 배양 전 및/또는 그 동안 첨가되는 탄수화물의 총 양이 포함된다.

[0139] 일부 구현예에서, 세포는 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다. "제한된 글루코오스 조건"이란, 첨가되는 글루코오스의 양이 세포에 의해 소모되는 글루코오스의 양의 약 105% 이하 (예컨대, 약 100%) 인 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 배양 배지에 첨가되는 글루코오스의 양은 특정 시간 동안 세포에 의해 소모되는 글루코오스의 양과 대략 동일하다. 일부 구현예에서, 세포 성장 속도는 세포가 세포 배지 내 글루코오스의 양에 의해 지지될 수 있는 속도로 성장하는 식으로 첨가된 글루코오스의 양을 제한하여 조절된다. 일부 구현예에서, 글루코오스는 세포가 배양된 시간 동안 축적되지 않는다. 다양한 구현예에서, 세포는 약 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 또는 70 시간 이상 동안 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다. 다양한 구현예에서, 세포는 세포가 배양되는 총 시간 길이의 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 또는 100% 이상 동안 제한된 글루코오스 조건 하에서 배양된다. 임의의 특정 이론에 구애되는 것으로 의도되지 않으면서, 제한된 글루코오스 조건이 더욱 바람직한 세포의 조절을 가능하게 할 수 있을 것으로 여겨진다.

[0140] 일부 구현예에서, 세포는 과량의 글루코오스의 존재하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 첨가되는 글루코오스의 양은 특정 시간 기간 동안 세포에 의해 소모되는 글루코오스의 양의 약 105% (예컨대, 약 110, 120, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 또는 500% 초과) 이상이다. 일부 구현예에서, 글루코오스는 세포가 배양되는 시간 동안 축적된다.

[0141] 예시적 지질은 포화, 불포화 또는 분지된 C4 이상의 지방산인 하나 이상의 지방산을 함유하는 임의의 성분이다.

[0142] 예시적 오일은 실온에서 액체인 지질이다. 일부 구현예에서, 지질은 하나 이상의 C4 이상의 지방산 (예를 들어, 4 개 이상의 탄소를 갖는 하나 이상의 포화, 불포화 또는 분지형 지방산을 함유함)을 함유한다. 일부 구현예에서, 오일은 대두, 옥수수, 카놀라, 야트로파, 야자, 땅콩, 해바라기, 코코넛, 머스타드, 평지씨, 면화씨, 야자핵, 올리브, 잇꽃, 참깨, 아마씨, 유질 미생물 세포, 오구나무, 또는 상기 중 2 이상의 임의의 조합으로부터 수득된다.

[0143] 예시적 지방산에는 화학식  $RCOOH$  (식 중, "R" 은 탄화수소임)의 화합물이 포함된다. 예시적 불포화 지방산에는 "R" 에 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합이 포함되는 화합물이 포함된다. 예시적 불포화 지방산에는 올레산, 박센산, 리놀레산, 팔미텔라이드산, 및 아라키돈산이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적 다중불포화 지방산에는 "R" 에 다수의 탄소-탄소 이중 결합이 포함되는 화합물이 포함된다. 예시적 포화 지방산에는 "R" 이 포화 지방족 기인 화합물이 포함된다. 일부 구현예에서, 탄소원에는 하나 이상의  $C_{12}$ - $C_{22}$  지방산, 예컨대  $C_{12}$  포화 지방산,  $C_{14}$  포화 지방산,  $C_{16}$  포화 지방산,  $C_{18}$  포화 지방산,  $C_{20}$  포화 지방산, 또는  $C_{22}$  포화 지방산이 포함된다. 예시적 구현예에서, 지방산은 팔미트산이다. 일부 구현예에서, 탄소원은 지방산의 염 (예를 들어, 불포화 지방산), 지방산의 유도체 (예를 들어, 불포화 지방산), 또는 지방산의 염 또는 유도체 (예를 들어, 불포화 지방산)이다. 적합한 염에는 리튬 염, 칼륨 염, 나트륨 염 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 디- 및 트리글리세롤은 글리세롤의 지방산 에스테르이다.

[0144] 일부 구현예에서, 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드의 농도는 브로스 1 리터 당 약 1 그램 이상 (g/L, 브로스의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 모두 포함된다), 예컨대 약 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400 g/L 이상이다. 일부 구현예에서, 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드의 농도는 약 10

내지 약 400 g/L, 예컨대 약 25 내지 약 300 g/L, 약 60 내지 약 180 g/L, 또는 약 75 내지 약 150 g/L 이다.

일부 구현예에서, 농도에는 숙주 세포의 배양 전 및/또는 그 동안 첨가되는 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드의 총 양이 포함된다. 일부 구현예에서, 탄소원에는 (i) 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드 및 (ii) 탄수화물, 예컨대 글루코오스가 모두 포함된다. 일부 구현예에서, 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드 내 탄수화물의 비는 탄소 기준으로 (즉, 탄수화물 탄소 당 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드 내 1 개 탄소) 약 1:1 이다. 특정 구현예에서, 지질, 오일, 지방, 지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 또는 트리글리세라이드의 양은 약 60 내지 180 g/L 이고, 탄수화물의 양은 약 120 내지 360 g/L 이다.

[0145] 예시적 미생물 폴리펩티드 탄소원에는 효모 또는 박테리아로부터의 하나 이상의 폴리펩티드가 포함된다. 예시적 식물 폴리펩티드 탄소원에는 대두, 옥수수, 카놀라, 야트로파, 야자, 땅콩, 해바라기, 코코넛, 머스타드, 평지씨, 면화씨, 야자핵, 올리브, 잇꽃, 참깨, 또는 아마씨로부터의 하나 이상의 폴리펩티드가 포함된다.

[0146] 예시적 재생가능 탄소원에는 치즈 유청 침투물, 옥수수 침지액, 사탕무 당밀, 보리 누룩, 및 상기 중 임의의 것으로부터의 성분이 포함된다. 예시적 재생가능 탄소원에는 또한 바이오매스에 존재하는 글루코오스, 헥소오스, 펜토오스 및 자일로오스, 예컨대 옥수수, 지팡이풀 (switchgrass), 사탕수수, 발효 공정의 세포 폐기물, 및 대두, 옥수수, 또는 밀의 제분으로부터의 단백질 부산물이 포함된다. 일부 구현예에서, 바이오매스 탄소원은 리그노셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 또는 셀룰로오스 물질, 예컨대, 잔디, 밀, 밀짚, 버갠스, 사탕수수 버갠스, 침엽수 펄프, 옥수수, 옥수수 속 또는 겉껍질, 옥수수 핵, 옥수수 핵으로부터의 섬유, 옥수수 대, 지팡이풀, 왕겨 생성물, 또는 곡물의 습윤 또는 건조 제분으로부터의 부산물 (예를 들어, 옥수수, 수수, 호밀, 라이밀 (triticale), 보리, 밀, 및/또는 주정박) 이나 이에 제한되지 않는다. 예시적 셀룰로오스 물질에는 목재, 종이 및 펄프 폐기물, 초본 식물, 및 과일 과육이 포함된다. 일부 구현예에서, 탄소원에는 임의의 식물 부분, 예컨대 줄기, 곡물, 뿌리 또는 덩이줄기가 포함된다. 일부 구현예에서, 하기 식물 중 임의의 것의 전부 또는 일부는 탄소원으로서 사용된다: 옥수수, 밀, 호밀, 수수, 라이밀, 쌀, 기장, 보리, 카사바, 콩과, 예컨대 콩 및 완두콩, 감자, 고구마, 바나나, 사탕수수, 및/또는 타피오카. 일부 구현예에서, 탄소원은 바이오매스 가수분해물, 예컨대 자일로오스 및 글루코오스를 모두 포함하는 또는 수크로오스 및 글루코오스를 모두 포함하는 바이오매스 가수분해물이다.

[0147] 일부 구현예에서, 재생가능 탄소원 (예컨대, 바이오매스) 은 세포 배양 배지에 첨가되기 전에 전처리된다. 일부 구현예에서, 전처리에는 효소적 전처리, 화학적 전처리, 또는 효소적 및 화학적 전처리 모두의 조합 (예를 들어, 특히, 재생가능 탄소원의 전처리에 관해, 각각 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Farzaneh *et al.*, *Bioresource Technology* 96 (18): 2014-2018, 2005]; 미국 특허 번호 6,176,176; 미국 특허 번호 6,106,888 참조) 이 포함된다. 일부 구현예에서, 재생가능 탄소원은 세포 배양 배지에 첨가되기 전에 부분적으로 또는 완전히 가수분해된다.

[0148] 일부 구현예에서, 재생가능 탄소원 (예컨대, 옥수수 대) 은 세포 배양 배지에 첨가하기 전에 암모니아 섬유 펄프 (AFEX) 전처리에 적용된다 (예를 들어, 문헌 [Farzaneh *et al.*, *Bioresource Technology* 96 (18): 2014-2018, 2005] 참조). AFEX 전처리 동안, 재생가능 탄소원을 중간 온도 (예컨대, 약 60 내지 약 100°C) 및 고압 (예컨대, 약 250 내지 약 300 psi) 에서 약 5 분 동안 액체 무수 암모니아로 처리한다. 그 다음, 압력은 빠르게 방출된다. 이 과정에서, 리그닌 가용화, 헤미셀룰로오스 가수분해, 셀룰로오스 탈결정화 (decrystallization) 의 조합된 화학적 및 물리적 효과, 및 증가된 표면적은 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스의 발효성 당으로의 거의 완전한 효소적 전환을 가능하게 한다. AFEX 전처리는, 거의 모든 암모니아가 회수 및 재사용될 수 있는 반면, 나머지는 하류방향 과정 내 미생물에 대한 질소원으로서 담당한다는 장점을 갖는다. 또한, 세정 스트림이 AFEX 전처리에 필요하지 않다. 그러므로, AFEX 처리 후 건조 물질 회수는 본질적으로 100% 이다. AFEX 는 기본적으로 건조 내지 건조 공정이다. 처리된 재생가능 탄소원은 장기간 동안 안정하고, 효소적 가수분해 또는 발효 공정에 매우 높은 고체 적재량으로 공급될 수 있다. 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스는 분해되지 않거나 거의 분해되지 않으면서, AFEX 공정에서 매우 잘 보존된다. AFEX 전처리를 거친 재생가능 탄소원의 효소적 가수분해 전에 중화할 필요가 없다. AFEX-처리된 탄소원의 효소적 가수분해는 후속 발효 용도를 위해 깨끗한 당 스트림을 생성한다.

[0149] 일부 구현예에서, 탄소원 (예를 들어, 재생가능 탄소원) 의 농도는 약 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50% 이상 글루코오스 (w/v) 에 동등하다. 동등량의 글루코오스는 탄소원으로부터 발생된 글루코오스의 양을 측정하기 위한 참조로서 글루코오스로의 표준 HPLC 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 일

부 구현예에서, 탄소원 (예를 들어, 재생가능 탄소원) 의 농도는 약 0.1 내지 약 20% 글루코오스, 예컨대 약 0.1 내지 약 10% 글루코오스, 약 0.5 내지 약 10% 글루코오스, 약 1 내지 약 10% 글루코오스, 약 1 내지 약 5% 글루코오스, 또는 약 1 내지 약 2% 글루코오스에 동등하다.

[0150] 일부 구현예에서, 탄소원에는 효모 추출물 또는 효모 추출물의 하나 이상의 성분이 포함된다. 일부 구현예에서, 효모 추출물의 농도는 브로쓰 1 리터 당 1 그램 이상의 효모 추출물 (g/L, 브로쓰의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 모두 포함된다), 예컨대 약 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300 g/L 이상이다. 일부 구현예에서, 효모 추출물의 농도는 약 1 내지 약 300 g/L, 예컨대 약 1 내지 약 200 g/L, 약 5 내지 약 200 g/L, 약 5 내지 약 100 g/L, 또는 약 5 내지 약 60 g/L 이다. 일부 구현예에서, 농도에는 숙주 세포의 배양 전 및/또는 그 동안 첨가되는 효모 추출물의 총 양이 포함된다. 일부 구현예에서, 탄소원에는 효모 추출물 (또는 그의 하나 이상의 성분) 및 또다른 탄소원, 예컨대 글루코오스 모두가 포함된다. 일부 구현예에서, 효모 추출물 대 다른 탄소원의 비는 약 1:5, 약 1:10, 또는 약 1:20 (w/w) 이다.

[0151] 부가적으로는, 탄소원은 또한 이산화탄소, 또는 메탄올과 같은 1-탄소 기질일 것이다. 단일 탄소원 (예를 들어, 메탄올, 포름알데하이드, 또는 포르메이트) 로부터의 글리세롤 제조는 메틸요구성 효모 (특히, 탄소원에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Yamada *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 53(2) 541-543, 1989]) 및 박테리아 (특히, 탄소원에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Hunter *et al.*, *Biochemistry*, 24, 4148-4155, 1985]) 에서 보고되어 있다. 상기 유기체는 메탄에서 포르메이트로의 산화 상태 범위의 단일 탄소 화합물을 동화시키고, 글리세롤을 제조할 수 있다. 탄소 동화 경로는 리블로오스 모노포스페이트를 통해, 세린을 통해, 또는 자일룰로오스-모노포스페이트를 통해 (특히, 탄소원에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Gottschalk, *Bacterial Metabolism*, Second Edition, Springer-Verlag: New York, 1986]) 이루어질 수 있다. 리블로오스 모노포스페이트 경로에는 프룩토오스 및 결국에는 3 탄소 생성물 글리세르알데하이드-3-포스페이트가 되는 6 탄당을 형성하는, 포르메이트의 리블로오스-5-포스페이트와의 축합이 포함된다. 마찬가지로, 세린 경로는 메틸렌테트라히드로폴레이트를 통한 당분해 경로로 1-탄소 화합물을 동화시킨다.

[0152] 1 내지 2 탄소 기질 외에, 메틸요구성 유기체는 또한 대사 활성을 위해 메틸아민, 글루코사민과 같은 화합물 및 다양한 아미노산을 함유하는 수 많은 다른 탄소를 이용하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 메틸요구성 효모는 트레할로오스 또는 글리세롤을 형성하기 위해 메틸아민으로부터 탄소를 이용하는 것으로 알려져 있다 (특히, 탄소원에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Bellion *et al.*, *Microb. Growth Cl Compd.*, [Int. Symp.], 7<sup>th</sup> ed., 415-32. Editors: Murrell *et al.*, Publisher: Intercept, Andover, UK, 1993]). 유사하게는, 칸디다의 다양한 종은 알라닌 또는 올레산을 대사한다 (특히, 탄소원에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Suiter *et al.*, *Arch. Microbiol.* 153(5), 485-9, 1990]).

[0153] 일부 구현예에서, 세포를 생리학적 염 및 영양분을 함유하는 표준 배지에서 배양한다 (예를 들어, 특히, 세포 배지에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 문헌 [Pourquie, J. *et al.*, *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, eds. Aubert *et al.*, Academic Press, pp. 71-86, 1988 및 Ilmen *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1298-1306, 1997] 참조). 예시적 성장 배지는 보통의 시판 제조 배지, 예컨대 루리아 베르타니 (Luria Bertani: LB) 브로쓰, 사보우라우드 텍스트로오스 (Sabouraud Dextrose: SD) 브로쓰, 또는 효모 배지 (Yeast medium: YM) 브로쓰이다. 기타 정의된 또는 합성 성장 배지가 또한 사용될 수 있고, 특정 숙주 세포의 성장에 적합한 배지가 미생물학 또는 발효 과학 당업자에게 알려져 있다.

[0154] 적합한 탄소원 외에, 세포 배지는 바람직하게는 적합한 미네랄, 염, 보조인자, 완충액, 및 배양물 성장 또는 이소프렌 제조의 향상에 적합한 당업자에게 알려져 있는 다른 성분을 함유한다 (예를 들어, 특히, 세포 배지 및 세포 배양 조건에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 WO 2004/033646 및 그곳에 언급된 참조문헌 및 WO 96/35796 및 그곳에 언급된 참조문헌 참조). 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산이 유도성 프로모터의 조절 하에 있는 일부 구현예에서, 유도제 (예를 들어, 당, 금속 염 또는 항생제) 가 바람직하게는, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 효과적인 농도로 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 배지는 하나 이상의 DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산을 갖는 벡터 상의 항생제 내성 핵산 (예컨대, 카나마이신 내성 핵산) 에 상응하는 항생제 (예컨대, 카나마이신) 를 갖는다.

[0155] 예시적 세포 배양 조건

[0156] 박테리아 배양물의 유지 및 성장에 적합한 물질 및 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예시적 기술은 특히, 세포 배양 기술에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 문헌 [*Manual of Methods for General*



Bacteriology Gerhardt et al., eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994) 또는 Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA] 에서 찾을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 숙주 세포 내에 삽입된 핵산에 의해 코딩되는 하나 이상의 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 배양 배지에서 배양된다.

[0157] 표준 세포 배양 조건은 세포를 배양하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 특히, 세포 배양 및 발효 조건에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 WO 2004/033646 및 그곳에 언급된 참조문헌 참조). 적합한 온도, 기체 혼합물, 및 pH (예컨대 약 20 내지 약 37°C, 약 6% 내지 약 84% CO<sub>2</sub>, 및 pH 약 5 내지 약 9) 에서 세포를 성장 및 유지시킨다. 일부 구현예에서, 적합한 세포 배지에서 세포를 35°C 에서 성장시킨다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 원하는 양의 이소프렌 제조가 달성될 때까지 배양물을 진탕 배양물 또는 발효기 내의 적합한 배지에서 대략 28°C 에서 배양한다. 일부 구현예에서, 발효를 위한 pH 범위는 약 pH 5.0 내지 약 pH 9.0 (예컨대, 약 pH 6.0 내지 약 pH 8.0 또는 약 6.5 내지 약 7.0) 이다. 숙주 세포의 요구에 근거해, 호기성, 무산소성 또는 혐기성 조건 하에서 반응을 수행할 수 있다. 제시된 사상 진균을 위한 예시적 배양 조건은 당업계에 알려져 있고, 과학 문헌 및/또는 미국 미생물 보존센터 및 진균 유전학 저장 센터 [American Type Culture Collection and Fungal Genetics Stock Center] 와 같은 진균 공급원으로부터 찾을 수 있다.

[0158] 다양한 구현예에서, 임의의 공지된 발효 방식, 예컨대 배치, 공급-배치, 또는 연속 과정을 사용하여 세포를 성장시킨다. 일부 구현예에서, 배치 발효 방법이 사용된다. 고전적인 배치 발효는 배치 조성이 발효 시작 시에 고정되고, 발효 동안 인위적인 변경을 적용하지 않는 폐쇄계이다. 그러므로, 발효 시작 시, 세포 배지를 바람직한 숙주 세포로 접종하고, 발효는 시스템에 아무것도 첨가하지 않고 일어나게 한다. 그러나, 전형적으로는 "배치" 발효는 탄소원의 첨가에 관한 배치이고, pH 및 산소 농도와 같은 인자에 대한 조절 시도가 종종 이루어진다. 배치 시스템에서, 시스템의 대사물질 및 바이오매스 조성물은 발효가 중지되는 시간까지 계속 변한다. 배치 배양물 내에서, 세포는 정적 지체상에서 고속 성장 로그 상으로, 그리고 최종적으로 성장 속도가 감소하거나 중단되는 정지상으로 조정된다. 일부 구현예에서, 로그상 내 세포는 대부분의 이소프렌 제조를 담당한다. 일부 구현예에서, 정지상 내 세포는 이소프렌을 제조한다.

[0159] 일부 구현예에서, 표준 배치 시스템에 대한 변형, 예컨대 공급-배치식 시스템이 사용된다. 공급-배치식 발효 공정은 발효가 진행되면 탄소원을 증분으로 첨가하는 제외가 있는 전형적인 배치 시스템을 포함한다. 공급-배치식 시스템은 대사물질 억제가 세포의 대사를 억제하기 쉬울 때, 및 세포 배지 내 제한된 양의 탄소원을 갖는 것이 바람직한 경우 유용하다. 공급-배치식 발효는 제한된 양 또는 과량의 탄소원 (예를 들어, 글루코오스) 으로 수행될 수 있다. 공급-배치식 시스템 내 실제 탄소원 농도의 측정은 어렵고, 그러므로 측정가능한 인자, 예컨대 pH, 용존 산소, 및 CO<sub>2</sub> 와 같은 폐 기체의 부분압의 변화에 근거하여 추정된다. 배치 및 공급-배치식 발효는 통상적이고 당업계에 잘 알려져 있으며, 예는 특히, 세포 배양물 및 발효 조건에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 문헌 [Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc.] 에서 찾을 수 있다.

[0160] 일부 구현예에서, 연속 발효 방법이 사용된다. 연속 발효는 정의된 발효 배지를 생물반응기에 연속해서 첨가하고, 동등 양의 조건화 배지를 처리를 위해 동시에 제거하는 개방계이다. 연속 발효는 일반적으로, 세포가 주로 로그 상 성장에 있을 때 일정한 고 밀도로 배양물을 유지한다.

[0161] 연속 발효는 세포 성장 또는 이소프렌 제조에 영향을 주는 하나의 인자 또는 임의의 수의 인자의 조절을 가능하게 한다. 예를 들어, 하나의 방법은 제한 영양분, 예컨대 탄소원 또는 질소 수준을 고정된 속도로 유지하고, 모든 다른 변수를 적정하게 한다. 다른 시스템에서, 성장에 영향을 주는 다수의 인자는 계속 변할 수 있지만, 세포 농도 (예를 들어, 배치 탁도에 의해 측정된 농도) 가 일정하게 유지된다. 연속 시스템은 안정한 상태 성장 조건을 유지하기 위해 노력한다. 그러므로, 배출되는 배지로 인한 세포 손실은 발효 내 세포 성장 속도에 대해 균형을 이룬다. 연속 발효 공정을 위한 영양분 및 성장 인자 조절 방법 뿐 아니라, 생성물 형성 속도 최대화 기술은 산업 미생물 분야에 잘 알려져 있고, 다양한 방법이 특히, 세포 배양물 및 발효 조건에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc.] 에 상세히 기재되어 있다.

[0162] 일부 구현예에서, 세포는 전체 세포 촉매로서 기질 상에 고정되고, 이소프렌 제조를 위해 발효 조건에 적용된다.

- [0163] 일부 구현예에서, 산소를 액체에 도입하고 배양물의 균일성을 유지하기 위해 액체 배양 병을 진탕기 내에 둔다. 일부 구현예에서, 배양물이 성장하는 온도, 습도, 진탕 속도, 및/또는 다른 조건을 조절하기 위해 인큐베이터를 사용한다. 가장 간단한 인큐베이터는 전형적으로 약 65°C 이하인, 조절가능한 히터가 있는 절연 박스이다. 더욱 정교한 인큐베이터에는 또한 온도 (냉장고를 통해) 저하 능력, 또는 습도 또는 CO<sub>2</sub> 수준 조절 능력이 포함될 수 있다. 대부분의 인큐베이터에는 타이머가 포함되고; 일부는 또한 상이한 온도, 습도 수준, 등을 통해 사이클을 프로그래밍할 수 있다. 인큐베이터는 크기가 테이블탑에서 유닛까지 작은 공간의 크기가 다양할 수 있다.
- [0164] 원한다면, 세포 배지의 일부 또는 전부는 영양분 보충 및/또는 잠재적으로 유해한 대사 부산물 및 사멸 세포의 축적을 피하기 위해 교체될 수 있다. 현탁 배양의 경우, 세포는 현탁 배양물을 원심분리 또는 여과한 다음, 신선한 배지에 세포를 재현탁함으로써 배지로부터 분리될 수 있다. 부착 배양의 경우, 배지는 흡입에 의해 직접적으로 제거되고 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배지는 세포의 일부 이상이 연속 배양물 (예컨대, 희석 없는 연속 배양물) 에서 약 5, 10, 20, 40, 50, 60, 65 이상의 세포 분열에 대해 분열하도록 한다.
- [0165] 일부 구현예에서, 구성적 또는 누출 프로모터 (예컨대, Trc 프로모터) 가 사용되고, 화합물 (예컨대, IPTG) 은 프로모터에 작동가능하게 연결된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산(들) 의 발현을 유도하기 위해 첨가되지 않는다. 일부 구현예에서, 화합물 (예컨대, IPTG) 은 프로모터에 작동가능하게 연결된 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산(들) 의 발현을 유도하기 위해 첨가된다.
- [0166] 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하기 위한 예시적 방법
- [0167] 바람직하게는, 공급원료로부터의 탄소는 세포의 성장 및 유지보다는 이소프렌으로 전환된다. 일부 구현예에서, 세포를 저 내지 중간 OD<sub>600</sub> 으로 성장시킨 다음, 이소프렌 제조를 시작 또는 증가시킨다. 상기 전략은 많은 부분의 탄소가 이소프렌으로 전환되도록 한다.
- [0168] 일부 구현예에서, 세포는 이들이 더이상 분열하지 않거나 매우 천천히 분열하면서, 여러 시간 (예컨대, 약 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 시간 이상) 동안 이소프렌을 계속 제조하는 정도의 광학 밀도에 도달한다. 예를 들어, 도 60A-67C 는 세포가 이들이 더이상 분열하지 않거나 매우 천천히 분열하는 정도의 광학 밀도에 도달한 후 세포가 상당량의 메발론산 또는 이소프렌을 계속 제조할 수 있음을 나타낸다. 이 경우, 550 nm 에서의 광학 밀도는 시간에 걸쳐 감소하고 (예컨대 세포가 세포 용해, 성장 중단, 영양분 결핍 또는 세포 성장 결핍을 초래하는 다른 인자로 인해 더이상 기하급수적 성장상에 있지 않은 후 광학 밀도의 감소), 세포는 상당량의 메발론산 또는 이소프렌을 계속 제조한다. 일부 구현예에서, 세포의 550 nm 에서의 광학 밀도는 특정 시간 동안 (예컨대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 또는 60 시간 이상) 에 걸쳐 약 50% 이하 (예컨대 약 40, 30, 20, 10, 5, 또는 0% 이하) 로 증가하고, 상기 시간 동안 세포는 이소프렌을 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000; 1,250; 1,500; 1,750; 2,000; 2,500; 3,000; 4,000; 5,000; 10,000; 20,000; 30,000; 40,000; 50,000; 100,000; 200,000; 300,000; 400,000; 500,000; 600,000; 700,000; 800,000; 900,000; 1,000,000 이상 몰의 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/시간 (nmole/g<sub>wcm</sub>/hr) 로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 예컨대 약 2 내지 약 100 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 100 내지 약 500 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 150 내지 약 500 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 500 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 1,000 내지 약 2,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 100 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 200 내지 약 2,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 200 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 300 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 또는 약 400 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이다.
- [0169] 일부 구현예에서, 세포의 550 nm 에서의 광학 밀도는 특정 시간 (예컨대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 또는 60 시간 이상) 에 걸쳐 약 50% 이하 (예컨대 약 40, 30, 20, 10, 5, 또는 0% 이하) 로 감소하고, 세포는 상기 시간 동안 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, mg 이상의 이소프렌/브로쓰 L (mg/L<sub>브로쓰</sub>, 브로쓰의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 포함된다) 의 이소프렌의 누적 적정농도 (총량) 를 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 예컨대 약 2 내지 약 100 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 100 내지 약 500 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 500 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 1,000 내지 약 2,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>

쓰, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub> 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 100 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 200 내지 약 2,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 200 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 300 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 또는 약 400 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub> 이다.

[0170] 일부 구현예에서, 세포의 550 nm 에서의 광학 밀도는 특정 시간 (예컨대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 또는 60 시간 이상) 에 걸쳐 약 50% 이하 (예컨대 약 40, 30, 20, 10, 5, 또는 0% 이하) 로 증가하고, 그 시간 동안 세포는 약 0.0015, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 또는 8.0% 이상의 세포 배양 배지 내 탄소를 이소프렌으로 전환시킨다. 일부 구현예에서, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 예컨대 약 0.002 내지 약 4.0%, 약 0.002 내지 약 3.0%, 약 0.002 내지 약 2.0%, 약 0.002 내지 약 1.6%, 약 0.002 내지 약 0.005%, 약 0.005 내지 약 0.01%, 약 0.01 내지 약 0.05%, 약 0.05 내지 약 0.15%, 0.15 내지 약 0.2%, 약 0.2 내지 약 0.3%, 약 0.3 내지 약 0.5%, 약 0.5 내지 약 0.8%, 약 0.8 내지 약 1.0%, 또는 약 1.0 내지 약 1.6% 이다. 일부 구현예에서, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 약 0.002 내지 약 0.4%, 0.002 내지 약 0.16%, 0.04 내지 약 0.16%, 약 0.005 내지 약 0.3%, 약 0.01 내지 약 0.3%, 또는 약 0.05 내지 약 0.3% 이다.

[0171] 일부 구현예에서, 이소프렌은 오직 정지상에서 제조된다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 성장상 및 정지상 모두에서 제조된다. 다양한 구현예에서, 정지상 동안 제조된 이소프렌의 양 (예컨대 제조된 이소프렌의 총 양 또는 OD<sub>600</sub> 당 1 시간 당 브로쓰 1 리터 당 제조된 이소프렌의 양) 은 동일한 시간 동안의 성장상 동안 제조된 이소프렌의 양의 약 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 배 이상이다. 다양한 구현예에서, 세포가 정지상에 있는 동안, 제조되는 이소프렌의 총 양 (예컨대, 특정 시간, 예컨대 20 시간 동안의 발효 동안 이소프렌의 제조) 의 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% 이상이 제조된다. 다양한 구현예에서, 세포의 550 nm 에서의 광학 밀도가 약 50% 이하 (예컨대, 약 40, 30, 20, 10, 5, 또는 0% 이하) 로 증가하는 정도로 세포가 천천히 분열하거나 전혀 분열하지 않는 동안, 제조되는 이소프렌의 총 양 (예컨대, 특정 시간, 예컨대 20 시간 동안의 발효 동안 이소프렌의 제조) 의 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% 이상이 제조된다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 오직 성장상에서 제조된다.

[0172] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 성장상에서보다 정지상에서 더욱 활성인 프로모터 또는 인자의 조절 하에 있다. 예를 들어, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 정지상 시그마 인자, 예컨대 RpoS 의 조절 하에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 핵산은 정지상에서 활성인 반응 조절자에 의해 유도 가능한 프로모터와 같은, 정지상에서 유도가 가능한 프로모터의 조절 하에 있다.

[0173] *안전한 조작 범위 내에서의 이소프렌의 제조*

[0174] 가연성 특성에 따라 안전한 조작 수준 내에서의 이소프렌의 제조는 상업적 설비의 디자인 및 구축을 단순히하고, 안전하게 작업하기 위한 능력을 크게 향상시키고, 화재 발생 잠재성을 제한한다. 특히, 이소프렌 제조를 위한 최적 범위는 안전한 구역, 즉, 불연성 범위의 이소프렌 농도 내이다. 하나의 이러한 양상에서, 본 발명은 불연성 범위의 이소프렌 농도 내 (이소프렌의 가연성 엔벨로프 외부) 이소프렌의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0175] 그러므로, 공정 안전성을 확실히 하기 위해, 이소프렌의 연소 한계 (예컨대 O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 또는 상기 기체 중 2 개 이상의 임의의 조합의 존재하에서의 이소프렌) 를 측정하는데 컴퓨터 모델링 및 실험적 시험을 사용하였다.

가연성 엔벨로프는 연소 하한계 (LFL), 연소 상한계 (UFL), 제한 산소 농도 (LOC), 및 제한 온도를 특징으로 한다. 연소되는 시스템에 대해, 최소량의 연료 (예컨대, 이소프렌) 가 최소량의 산화제, 전형적으로 산소의 존재하에 있어야만 한다. LFL 은 연소를 유지하기 위해 존재해야만 하는 최소량의 이소프렌인 반면, UFL 은 존재할 수 있는 최대 량의 이소프렌이다. 상기 제한 초과에서, 혼합물은 풍부한 연료이고, 산소 분획은 가연성 혼합물을 갖기엔 너무 낮다. LOC 는 가연성 혼합물을 갖기 위해 또한 존재해야만 하는 최소 분획의 산소를 나타낸다. 제한 온도는 이소프렌 발화점을 기준으로 하며, 이소프렌의 연소를 발할 수 있는 최하 온도이다. 상기 한계는 이소프렌의 농도, 산화제의 유형 및 농도, 시스템 내 존재하는 비활성 물질, 온도, 및 시스템의 압력에 특이적이다. 가연성 엔벨로프의 제한 내에 놓인 조성물은 연소를 발하고 공정 설비의 디자인 및 조작 모두에서 부가적인 안전성 예방책을 필요로 한다.

[0176] 하기 조건은 컴퓨터 시뮬레이션 및 수학적 분석 및 실험적 시험을 사용하여 시험되었다. 원한다면, 다른 조

건 (예컨대 다른 온도, 압력, 및 영구 기체 조성) 은 LFL, UFL, 및 LOC 농도를 측정하기 위해 본원에 기재된 방법을 사용하여 시험될 수 있다.

**(1) 컴퓨터 시뮬레이션 및 수학적 분석**

**시험 스위트 1:**

이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

O<sub>2</sub>: 6 wt% - 21 wt%

N<sub>2</sub>: 79 wt% - 94 wt%

**시험 스위트 2:**

이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

O<sub>2</sub>: 6 wt% - 21 wt%

N<sub>2</sub>: 79 wt% - 94 wt%

H<sub>2</sub>O 로 포화됨

**시험 스위트 3:**

이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

O<sub>2</sub>: 6 wt% - 21 wt%

N<sub>2</sub>: 79 wt% - 94 wt%

CO<sub>2</sub>: 5 wt% - 30 wt%

**(2) 연소 한계의 최종 측정을 위한 실험적 시험**

**시험 스위트 1:**

이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

O<sub>2</sub>: 6 wt% - 21 wt%

N<sub>2</sub>: 79 wt% - 94 wt%

**시험 스위트 2:**

이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

O<sub>2</sub>: 6 wt% - 21 wt%

N<sub>2</sub>: 79 wt% - 94 wt%

H<sub>2</sub>O 로 포화됨

시뮬레이션 소프트웨어를 사용하여 여러 상이한 시험 조건에 대해 시스템의 가연성 특성의 추정치를 제공하였다. CO<sub>2</sub> 는 시스템의 연소 한계에 대해 유의한 영향을 보이지 않았다. 시험 스위트 1 및 2 는 실험적 시험에 의해 확인되었다. 모델링 결과는 실험적 시험 결과와 연관이 있었다. 물을 첨가하면 약간의 변화만이 발견되었다.

LOC 는 40℃, 1 대기압에서 이소프렌, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, 및 CO<sub>2</sub> 혼합물에 대해 9.5 부피% 인 것으로 측정되었다. 30% 이하의 CO<sub>2</sub> 의 첨가는 이소프렌, O<sub>2</sub>, 및 N<sub>2</sub> 혼합물의 가연성 특성에 유의하게 영향을 미치지 않았다. 가연성 특성에서의 오직 약간의 변화가 건조 및 물 포화 이소프렌, O<sub>2</sub>, 및 N<sub>2</sub> 시스템 사이에서 보였다. 제한 온도는 약 -54℃ 이다. 약 -54℃ 미만의 온도는 이소프렌의 연소를 발하기에는 너무 낮다.



- [0204] 일부 구현예에서, 시스템 내의 산소의 양에 따라 이소프렌의 LFL 은 약 1.5 부피% 내지 약 2.0 부피% 의 범위이고, 이소프렌의 UFL 은 약 2.0 부피% 내지 약 12.0 부피% 의 범위이다. 일부 구현예에서, LOC 는 약 9.5 부피% 산소이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 LFL 은 약 1.5 부피% 내지 약 2.0 부피% 이고, 이소프렌의 UFL 은 약 2.0 부피% 내지 약 12.0 부피% 이고, 온도가 약 25℃ 내지 약 55℃ (예컨대, 약 40℃) 인 경우 LOC 는 약 9.5 부피% 산소이고, 압력은 약 1 대기압 내지 3 대기압이다.
- [0205] 일부 구현예에서, 이소프렌은 약 9.5 부피% 산소 미만 (즉, 이소프렌의 가연성 혼합물을 갖기 위해 필요한 LOC 미만) 의 존재하에서 제조된다. 이소프렌이 약 9.5 부피% 산소 이상의 존재하에서 제조되는 일부 구현예에서, 이소프렌 농도는 LFL 미만 (예컨대 약 1.5 부피% 미만) 이다. 예를 들어, 이소프렌의 양은 이소프렌 조성물을 비활성 기체로 희석함으로써 (예를 들어, 이소프렌 조성물을 LFL 미만으로 유지하기 위해 질소와 같은 비활성 기체를 연속적으로 또는 주기적으로 첨가함으로써) LFL 미만으로 유지될 수 있다. 이소프렌이 약 9.5 부피% 산소 이상의 존재하에서 제조되는 일부 구현예에서, 이소프렌 농도는 UFL 초과 (예컨대 약 12 부피% 초과) 이다. 예를 들어, 이소프렌의 양은 이소프렌을 UFL 초과와 농도로 제조하는 시스템 (예컨대 본원에 기재된 세포 배양 시스템 중 임의의 것) 을 사용하여 UFL 초과와 농도로 유지될 수 있다. 바람직한 경우, 비교적 낮은 수준의 산소가 사용되어 UFL 이 또한 비교적 낮도록 할 수 있다. 이 경우, UFL 초과로 남아있기 위해 보다 낮은 이소프렌 농도가 필요하다.
- [0206] 이소프렌이 약 9.5 부피% 산소 이상의 존재하에서 제조되는 일부 구현예에서, 이소프렌 농도는 가연성 엔벨로프 내 (예컨대 LFL 내지 UFL) 이다. 이소프렌 농도가 가연성 엔벨로프 내에 있을 수 있는 일부 구현예에서, 화재 또는 폭발 가능성을 감소시키기 위해 하나 이상의 단계가 수행된다. 예를 들어, 하나 이상의 점화원 (예컨대, 스파크를 일으킬 수 있는 임의의 물질) 이 회피될 수 있다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 농도가 가연성 엔벨로프 내에 남아있는 시간을 감소시키기 위해 하나 이상의 단계가 수행된다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 농도가 가연성 엔벨로프 근처이거나 그 내에 있는 때를 검출하기 위해 센서가 사용된다. 바람직한 경우, 이소프렌의 농도는 세포 배양 동안 1 이상의 시점에서 측정할 수 있고, 세포 배양 조건 및/또는 비활성 기체의 양은 이소프렌의 농도가 가연성 엔벨로프 근처이거나 그 내에 있는 경우 표준 방법을 사용하여 조정될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 배양 조건 (예컨대, 발효 조건) 은 이소프렌의 농도를 LFL 미만으로 감소시키거나, 이소프렌의 농도를 UFL 초과로 증가시키기 위해 조정된다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 이소프렌 조성물을 비활성 기체로 희석함으로써 (예컨대, 이소프렌 조성물을 LFL 미만으로 유지하기 위해 비활성 기체를 연속적으로 또는 주기적으로 첨가함으로써) LFL 미만으로 유지된다.
- [0207] 일부 구현예에서, 이소프렌 이외의 가연성 휘발물질 (예컨대 하나 이상의 당) 의 양은 제조되는 이소프렌의 양의 적어도 약 2, 5, 10, 50, 75, 또는 100 배 미만이다. 일부 구현예에서, 이소프렌 기체 이외의 기상 부분은 약 0% 내지 약 100% (부피) 산소, 예컨대 약 0% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% (부피) 산소를 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 기체 이외의 기상 부분은 약 0% 내지 약 99% (부피) 질소, 예컨대 약 0% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 99% (부피) 질소를 포함한다.
- [0208] 일부 구현예에서, 이소프렌 기체 이외의 기상 부분은 약 1% 내지 약 50% (부피) CO<sub>2</sub>, 예컨대 약 1% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 또는 약 40% 내지 약 50% (부피) CO<sub>2</sub> 를 포함한다.
- [0209] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 또한 에탄올을 함유한다. 예를 들어, 에탄올은 이소프렌의 추출 증류에 사용되어, 에탄올 및 이소프렌 모두를 포함하는 조성물 (예컨대 중간체 생성물 스트림) 을 산출할 수 있다. 바람직하게는, 에탄올의 양은 에탄올에 대해 가연성 엔벨로프 외부에 있다. 에탄올의 LOC 는 약 8.7 부피% 이고, 에탄올에 대한 LFL 은 표준 조건, 예컨대 약 1 대기압 및 약 60°F 에서 약 3.3 부피% 이다 (특히, LOC, LFL, 및 UFL 값에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [NFPA 69 *Standard on Explosion Prevention Systems*, 2008 edition] 참조). 일부 구현예에서, 이소프렌 및 에탄올을 포함하는 조성물은 에탄올의 가연성 혼합물을 갖는데 필요한 LOC 미만 (예컨대 약 8.7% 부피% 미만) 의 존재하에서 제조된다. 이소프렌 및 에탄올을 포함하는 조성물이 에탄올의 가연성 혼합물을 갖는데 필요한 약 LOC 이상의 존재하에서 제조되는 일부 구현예에서, 에탄올 농도는 LFL 미만 (예컨대 약 3.3 부피% 미만) 이다.
- [0210] 다양한 구현예에서, 산화제 (예컨대 산소) 의 양은 시스템 내 임의의 연료 (예컨대 이소프렌 또는 에탄올) 의

LOC 미만이다. 다양한 구현예에서, 산화제 (예컨대 산소) 의 양은 이소프렌 또는 에탄올의 LOC 의 약 60, 40, 30, 20, 10, 또는 5% 미만이다. 다양한 구현예에서, 산화제 (예컨대 산소) 의 양은 2, 4, 5, 이상의 절대 % 지점 (부피%) 으로 이소프렌 또는 에탄올의 LOC 미만이다. 특정 구현예에서, 산소의 양은 이소프렌 또는 에탄올의 LOC 미만으로 2 절대 % 지점 (부피%) 이상이다 (예컨대, 이소프렌의 LOC 가 9.5 부피% 인 경우 7.5 부피% 미만의 산소 농도). 다양한 구현예에서, 연료의 양 (예컨대 이소프렌 또는 에탄올) 은 연료에 대한 LFL 의 약 25, 20, 15, 10, 또는 5% 이하이다.

[0211] 이소프렌의 예시적 제조

[0212] 일부 구현예에서, 세포는 세포에 의해 이소프렌의 제조를 허용하는 조건 하에서 배양 배지에서 배양된다. "피크 절대 생산성" 이란, 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안 방출-기체 내의 이소프렌의 최대 절대량을 의미한다. "피크 절대 생산성 시점" 이란, 방출-기체 내 이소프렌의 절대 양이 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안 최대인 때의 발효 실행 동안의 시점을 의미한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 양은 피크 절대 생산성 시점에서 측정된다. 일부 구현예에서, 세포에 대한 피크 절대 생산성은 대략 본원에 기재된 이소프렌 양 중 임의의 양이다.

[0213] "피크 특이적 생산성" 이란, 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안 세포 당 제조되는 이소프렌의 최대 양을 의미한다. "피크 특이적 생산성 시점" 이란, 세포 당 제조되는 이소프렌의 양이 최대인 때의 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안의 시점을 의미한다. 특이적 생산성은 총 생산성을, 600 nm 에서의 광학 밀도 (OD600) 에 의해 측정된 바와 같은 세포의 양으로 나누어 결정된다. 일부 구현예에서, 이소프렌 양은 피크 특이적 생산성 시점에서 측정된다. 일부 구현예에서, 세포에 대한 피크 특이적 생산성은 대략 본원에 기재된 세포 당 이소프렌의 양 중 임의의 양이다.

[0214] "누적 총 생산성" 이란, 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안 제조되는 이소프렌의 누적, 총 양을 의미한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 누적, 총 양을 측정한다. 일부 구현예에서, 세포에 대한 누적 총 생산성은 대략 본원에 기재된 이소프렌의 양 중 임의의 양이다.

[0215] "상대적 검출기 반응" 이란, 하나의 화합물 (예컨대, 이소프렌) 에 대한 검출기 반응 (예컨대, GC/MS 영역) 대 하나 이상의 화합물 (예컨대, 모든 C5 탄화수소) 의 검출기 반응 (예컨대, GC/MS 영역) 사이의 비를 말한다. 검출기 반응은 본원에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다 (예컨대 Agilent HP-5MS GC/MS 컬럼 (30 m × 250  $\mu$ m; 0.25  $\mu$ m 필름 두께) 이 구비된 Agilent 6890 GC/MS 시스템으로 수행되는 GC/MS 분석). 바람직한 경우, 상대적 검출기 반응은 각각의 화합물에 대한 반응 인자를 사용하여 중량% 로 전환될 수 있다. 상기 반응 인자는 제공된 양의 특정 화합물에 대해 얼마나 많은 신호가 발생하는지 (즉, 검출기가 특정 화합물에 대해 얼마나 민감한지) 에 대한 측정값이다. 상기 반응 인자는 검출기가 비교되는 화합물에 대해 상이한 민감성을 가지고 있는 경우 상대적 검출기 반응을 중량% 로 전환시키기 위한 교정 인자로서 사용될 수 있다. 대안적으로는, 중량% 는 반응 인자가 비교되는 화합물에 대해 동일하다는 것을 추정함으로써 근사치를 계산할 수 있다. 그러므로, 중량% 는 상대적 검출기 반응과 대략 동일한 것으로 추정될 수 있다.

[0216] 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌을 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 이상 몰의 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/시간 (nmole/g<sub>wcm</sub>/hr) 으로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 예컨대 약 2 내지 약 100 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 100 내지 약 500 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 150 내지 약 500 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 500 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 1,000 내지 약 2,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 100 내지 약 5,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 200 내지 약 2,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 200 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 약 300 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr, 또는 약 400 내지 약 1,000 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 이다.

[0217] 단위 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 의 이소프렌의 양은 특히, 이소프렌 제조의 측정에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 5,849,970 에 기재된 바와 같이 측정할 수 있다. 예를 들어, 2 mL 의 상부공간 (예를 들어, 200 rpm 에서 대략 3 시간 동안 진탕하며 32°C 의 밀폐 바이알에서 배양된 2 mL 의 배양물과 같은 배양물로부터의 상부공간) 은 표준 기체 크로마토그래피 시스템, 예컨대 n-옥탄/porasil C 컬럼 (Alltech Associates, Inc., Deerfield, Ill.) 이 구비되고, RGD2 산화제2수는 환원 기체 검출기 (Trace Analytical, Menlo Park,



CA)가 연결된 등온선적으로 (85℃) 작동되는 시스템을 사용하여 이소프렌에 대해 분석한다 (예를 들어, 특히, 이소프렌 제조의 측정에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 문헌 [Greenberg et al, *Atmos. Environ.* 27A: 2689-2692, 1993; Silver et al., *Plant Physiol.* 97:1588-1591, 1991] 참조). 기체 크로마토그래피 영역 단위는 표준 이소프렌 농도 검정 곡선을 통해 nmol 이소프렌으로 전환된다. 일부 구현예에서, 세포의 습윤 중량에 대한 세포의 그래프에 대한 값은 세포 배양물의 샘플에 대한  $A_{600}$  값을 수득한 다음,  $A_{600}$  값을 공지된  $A_{600}$  값을 갖는 세포 배양물에 대한 습윤 중량의 검정 곡선에 대해 세포의 그래프로 전환시킴으로써 계산된다.

일부 구현예에서, 세포의 그래프는,  $A_{600}$  값이 1 인 1 리터의 브로쓰 (세포 배지 및 세포 포함)가 1 그래프의 습윤 세포 중량을 갖는 것으로 가정함으로써 추정한다. 값은 또한 배양물을 인큐베이션하는 시간의 수, 예컨대 3 시간으로 나눈다.

[0218]

일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌을 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, 100,000, 이상의 ng 의 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/hr (ng/g<sub>wcm</sub>/h)로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 예컨대 약 2 내지 약 100 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 100 내지 약 500 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 500 내지 약 1,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 1,000 내지 약 2,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 100 내지 약 5,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 200 내지 약 2,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 200 내지 약 1,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 약 300 내지 약 1,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h, 또는 약 400 내지 약 1,000 ng/g<sub>wcm</sub>/h 이다. 이소프렌의 양 (ng/g<sub>wcm</sub>/h)은 상기 논의된 nmole/g<sub>wcm</sub>/hr 의 단위의 이소프렌 제조에 대한 값에 68.1 을 곱하여 (하기 방정식 5 에 기재된 바와 같음) 계산될 수 있다.

[0219]

일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 이소프렌의 누적 적정농도 (총 양)를 약 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 이상 mg 의 이소프렌/브로쓰 L (mg/L<sub>브로쓰</sub>, 브로쓰의 부피에는 세포 및 세포 배지의 부피가 포함된다)로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 예컨대 약 2 내지 약 100 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 100 내지 약 500 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 500 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 1,000 내지 약 2,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub> 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 100 내지 약 5,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 200 내지 약 2,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 200 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 약 300 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub>, 또는 약 400 내지 약 1,000 mg/L<sub>브로쓰</sub> 이다.

[0220]

이소프렌의 특이적 생산성 (이소프렌 mg/진탕 플라스크 또는 유사한 배양물로부터의 상부공간 L)은, 대략 1.0 의 OD<sub>600</sub> 값에서 세포 배양물로부터 1 ml 샘플을 취하고, 이것을 20 mL 바이알에 넣고, 30 분 동안 인큐베이션한 다음, 상부공간 내 이소프렌의 양을 측정함으로써 (예를 들어, 실시예 I, 파트 II 에 기재된 바와 같음) 측정할 수 있다. OD<sub>600</sub> 값이 1.0 이 아닌 경우, 측정은 OD<sub>600</sub> 값으로 나눔으로써 1.0 의 OD<sub>600</sub> 값에 표준화될 수 있다. 이소프렌 mg/상부공간 L 의 값은 38 의 인자를 곱하여 mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr/OD<sub>600</sub> 배양 브로쓰로 전환될 수 있다. mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr/OD<sub>600</sub> 단위의 값은 시간의 수 및 OD<sub>600</sub> 값을 곱하여 이소프렌 mg/브로쓰 L 단위의 누적 적정 농도를 수득할 수 있다.

[0221]

발효기 내의 즉각적인 이소프렌 제조 속도 (mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr)는 발효기 방출-기체의 샘플을 취하고, 이것을 예를 들어, 실시예 I, 파트 II 에 기재된 바와 같이 이소프렌의 양에 대해 분석하고 (단위, 예컨대 L<sub>기체</sub> 당 이소프렌 mg), 이 값을 방출-기체가 브로쓰 1 리터를 통과하는 속도로 곱함으로써 (예를 들어, 1 vvm (공기의 부피/브로쓰의 부피/분)에서 이것은 시간 당 60 L<sub>기체</sub> 이다) 측정할 수 있다. 그러므로, 1 mg/L<sub>기체</sub> 의 방출-기체 수준은 1 vvm 의 공기 흐름에서 60 mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr 의 즉각적인 제조 속도에 상응한다. 바람직하게는, mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr 단위의 값은 OD<sub>600</sub> 값으로 나누어 mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr/OD 단위의 특이적 속도를 수득할 수 있다. 이소프렌 mg/L<sub>기체</sub> 의 평균 값은 상기 평균 방출-기체 이소프렌 농도에 발효 동안 발효 브로쓰 1 리터당 살포되는 방출-기체의 총 양을 곱함으로써 총 생물 생산성 (발효 브로쓰 1 리터 당 이소프렌 그램, mg/L<sub>브로쓰</sub>)으로 전환될 수 있다.

그러므로, 1 vvm 에서 10 시간에 걸친 0.5 mg/L<sub>브로쓰</sub>/hr 의 평균 방출-기체 이소프렌 농도는 300 mg 이소프렌

/L<sub>브로쓰</sub> 의 총 생성물 농도에 상응한다.

[0222] 일부 구현예에서, 배양물 내 세포는 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.0015, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 또는 8.0% 이상을 이소프렌으로 전환시킨다. 일부 구현예에서, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 약 0.002 내지 약 4.0%, 약 0.002 내지 약 3.0%, 약 0.002 내지 약 2.0%, 약 0.002 내지 약 1.6%, 약 0.002 내지 약 0.005%, 약 0.005 내지 약 0.01%, 약 0.01 내지 약 0.05%, 약 0.05 내지 약 0.15%, 0.15 내지 약 0.2%, 약 0.2 내지 약 0.3%, 약 0.3 내지 약 0.5%, 약 0.5 내지 약 0.8%, 약 0.8 내지 약 1.0%, 또는 약 1.0 내지 약 1.6% 이다. 일부 구현예에서, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 약 0.002 내지 약 0.4%, 0.002 내지 약 0.16%, 0.04 내지 약 0.16%, 약 0.005 내지 약 0.3%, 약 0.01 내지 약 0.3%, 또는 약 0.05 내지 약 0.3% 이다.

[0223] 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율 (또한 "% 탄소 수율" 로서 언급됨) 은 제조되는 이소프렌 내 탄소 물을 탄소원 내 탄소 물 (예컨대, 배지 및 공급 글루코오스 및 효모 추출물 내 탄소 물) 로 나누어 측정할 수 있다. 상기 수에 100% 를 곱하여 % 값을 산출한다 (방정식 1 에 표시된 바와 같음).

[0224] **방정식 1**

[0225]  $\% \text{ 탄소 수율} = (\text{제조되는 이소프렌 내 탄소 물}) / (\text{탄소원 내 탄소 물}) * 100$

[0226] 상기 계산을 위해, 효모 추출물은 50% w/w 탄소를 함유하는 것으로 추정될 수 있다. 예로서, 실시예 7, 파트 VIII 에 기재된 500 리터에 대해, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 방정식 2 에 제시된 바와 같이 계산할 수 있다.

[0227] **방정식 2**

[0228]  $\% \text{ 탄소 수율} = (39.1 \text{ g 이소프렌} * 1/68.1 \text{ mol/g} * 5 \text{ C/mol}) / [(181221 \text{ g 글루코오스} * 1/180 \text{ mol/g} * 6 \text{ C/mol}) + (17780 \text{ g 효모 추출물} * 0.5 * 1/12 \text{ mol/g})] * 100 = 0.042\%$

[0229] 본원에 기재된 2 개의 500 리터 발효 (실시예 7, 파트 VII 및 VIII) 의 경우, 탄소의 이소프렌으로의 % 전환율은 0.04 내지 0.06% 였다. 0.11 내지 0.16% 탄소 수율은 본원에 기재된 바와 같은 14 리터 시스템을 사용하여 달성하였다. 실시예 11, 파트 V 에는 본원에 기재된 방법을 사용하여 탄소의 이소프렌으로의 1.53% 전환율이 기재되어 있다.

[0230] 당업자는 이소프렌 제조 속도 또는 제조된 이소프렌의 양을 임의의 기타 단위로 쉽게 전환시킬 수 있다. 예시적 방정식은 단위 사이에 상호전환을 위해 하기에 열거되어 있다.

[0231] 이소프렌 제조 속도에 대한 단위 (총 및 특이적)

[0232] **방정식 3**

[0233]  $1 \text{ g 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr} = 14.7 \text{ mmol 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}$  (총 체적 속도)

[0234] **방정식 4**

[0235]  $1 \text{ nmol 이소프렌/g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 1 \text{ nmol 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}/\text{OD}_{600}$  (이 전환율은 1 의 OD<sub>600</sub> 값을 갖는 브로쓰 1 리터가 1 그램의 습윤 세포 중량을 갖는다는 것으로 추정한다)

[0236] **방정식 5**

[0237]  $1 \text{ nmol 이소프렌/g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 68.1 \text{ ng 이소프렌/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$  (제공된 이소프렌의 분자량)

[0238] **방정식 6**

[0239]  $1 \text{ nmol 이소프렌/L}_{\text{기체}} \text{ O}_2/\text{hr} = 90 \text{ nmol 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}$  (배양 브로쓰 L 당 90 L/hr 의 O<sub>2</sub> 흐름 속도로)

[0240] **방정식 7**

[0241]  $1 \text{ ug 이소프렌/L}_{\text{기체}} \text{ 방출-기체 내 이소프렌} = 60 \text{ ug 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{hr}$ , L<sub>브로쓰</sub> 당 60 L<sub>기체</sub> 의 흐름 속도로 (1 vvm)

- [0242] 적정농도에 대한 단위 (총 및 특이적)
- [0243] **방정식 8**
- [0244]  $1 \text{ nmol 이소프렌/세포 단백질 mg} = 150 \text{ nmol 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}/\text{OD}_{600}$  (이 전환율은 1 의  $\text{OD}_{600}$  값을 갖는 브로쓰 1 리터가 대략 150 mg 의 총 세포 단백질을 갖는다는 것으로 추정한다) (특이적 생산성)
- [0245] **방정식 9**
- [0246]  $1 \text{ g 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}} = 14.7 \text{ mmol 이소프렌/L}_{\text{브로쓰}}$  (총 적정농도)
- [0247] 바람직한 경우, 방정식 10 은 세포의 습윤 중량을 포함하는 임의의 단위를 세포의 건조 중량을 포함하는 상응하는 단위로 전환하기 위해 사용될 수 있다.
- [0248] **방정식 10**
- [0249] 세포의 건조 중량 = (세포의 습윤 중량)/3.3
- [0250] 바람직한 경우, 방정식 11 은 ppm 내지 ug/L 단위 사이를 전환하기 위해 사용될 수 있다. 특히, "ppm" 은 ug/g (w/w) 또는 uL/L (vol/vol) 로 정의된 백만 당 부를 의미한다. ug/L 에서 ppm 로의 전환 (예를 들어, 기체 g 당 분석물 ug) 은 방출-기체 L 당 질량 (즉, 기체의 밀도) 을 측정하여 수행될 수 있다. 예를 들어, STP 에서의 공기 1 리터는 대략 1.2 g/L 의 밀도를 갖는다. 그러므로, 1 ppm (ug/g) 의 농도는 STP 에서의 0.83 ug/L (방정식 11) 과 동일하다. ppm (ug/g) 에서 ug/L 로의 전환은 압력, 온도, 및 방출-기체의 전체적인 조성 모두의 함수이다.
- [0251] **방정식 11**
- [0252] 1 ppm (ug/g) 은 표준 온도 및 압력 (STP; 101.3 kPa (1 bar) 및 273.15K) 에서의 0.83 ug/L 와 동일하다.
- [0253] ug/L 에서 ppmv 으로의 전환 (예를 들어, 기체 L 당 분석물 uL) 은 이상 기체 법칙 (방정식 12) 을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 1000 ug/L<sub>기체</sub> 의 방출-기체 농도는 14.7 umol/L<sub>기체</sub> 에 상응한다. 이상 기체 상수는  $0.082057 \text{ L.atm K}^{-1}\text{mol}^{-1}$  이고, 방정식 12 를 사용하여, STP 에서 HG 의 14.7 umol 에 의해 점유된 부피는 0.329 mL 이다. 그러므로, 1000 ug/L HG 의 농도는 STP 에서 329 ppmv 또는 0.0329% (v/v) 이다.
- [0254] **방정식 12**
- [0255]  $PV = nRT$ , 식 중, "P" 는 압력이고, "V" 는 부피이고, "n" 은 기체의 몰이고, "R" 은 이상 기체 상수이고, "T" 는 온도 (Kelvin) 이다.
- [0256] 이소프렌 조성물 내 불순물의 양은 전형적으로 본원에서 부피 당 중량 (w/v) 기반, 단위 예컨대 ug/L 로 측정된다. 바람직한 경우, 단위 ug/L 의 측정치는 방정식 13 을 사용하는  $\text{mg/m}^3$  으로 전환될 수 있다.
- [0257] **방정식 13**
- [0258]  $1 \text{ ug/L} = 1 \text{ mg/m}^3$
- [0259] 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산을 포함하는 세포는 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산 없이 본질적으로 동일한 조건하에서 성장하는 상응하는 세포로부터 제조되는 이소프렌의 양보다 약 2 배, 3 배, 5 배, 10 배, 25 배, 50 배, 100 배, 150 배, 200 배, 400 배 이상의 이소프렌의 양을 제조한다.
- [0260] 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이중 핵산 및 DXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 이중 핵산을 포함하는 세포는 이중 핵산 없이 본질적으로 동일한 조건하에서 성장하는 상응하는 세포로부터 제조되는 이소프렌의 양보다 약 2 배, 3 배, 5 배, 10 배, 25 배, 50 배, 100 배, 150 배, 200 배, 400 배 이상의 이소프렌의 양을 제조한다.
- [0261] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90, 99.92, 99.94, 99.96, 99.98, 또는 100 중량% 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소에 대한 검출기 반응과 비교하여 이소프렌에 대해, 약 99.90, 99.91, 99.92, 99.93, 99.94, 99.95, 99.96, 99.97, 99.98, 99.99, 또는 100% 이상의 상대적 검출기 반응을 갖는다. 일부 구현예에서, 이소프렌

조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 99.90 내지 약 99.92, 약 99.92 내지 약 99.94, 약 99.94 내지 약 99.96, 약 99.96 내지 약 99.98, 약 99.98 내지 100 중량% 이상의 이소프렌을 포함한다.

[0262] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001 중량% 이하의 이소프렌 이외의 C5 탄화수소 (예컨대, 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인) 를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소에 대한 검출기 반응에 대해, 이소프렌 이외의 C5 탄화수소에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001% 이하의 상대적 검출기 반응을 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소에 대한 검출기 반응에 대해, 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인에 대해 약 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005, 또는 0.00001% 이하의 상대적 검출기 반응을 갖는다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 조성물 내 모든 C5 탄화수소의 총 중량에 대해, 약 0.02 내지 약 0.04%, 약 0.04 내지 약 0.06%, 약 0.06 내지 0.08%, 약 0.08 내지 0.10%, 또는 약 0.10 내지 약 0.12 중량% 의 이소프렌 이외의 C5 탄화수소 (예컨대, 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인) 를 포함한다.

[0263] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물 내 임의의 화합물에 대한 이소프렌의 중합을 억제하는 화합물을 약 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ug/L 이하 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 이소프렌의 중합을 억제하는 조성물 내 임의의 화합물에 대한 이소프렌의 중합을 억제하는 화합물을 약 0.005 내지 약 50, 예컨대 약 0.01 내지 약 10, 약 0.01 내지 약 5, 약 0.01 내지 약 1, 약 0.01 내지 약 0.5, 또는 약 0.01 내지 약 0.005 ug/L 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ug/L 이하의 이소프렌 이외의 탄화수소 (예컨대, 1,3-시클로펜타디엔, *시스*-1,3-펜타디엔, *트랜스*-1,3-펜타디엔, 1-펜틴, 2-펜틴, 1-펜텐, 2-메틸-1-부텐, 3-메틸-1-부틴, *트랜스*-피페릴렌, *시스*-피페릴렌, 펜트-4-엔-1-인, *트랜스*-펜트-3-엔-1-인, 또는 *시스*-펜트-3-엔-1-인) 을 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 0.005 내지 약 50, 예컨대 약 0.01 내지 약 10, 약 0.01 내지 약 5, 약 0.01 내지 약 1, 약 0.01 내지 약 0.5, 또는 약 0.01 내지 약 0.005 ug/L 의 이소프렌 이외의 탄화수소를 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ug/L 이하의 단백질 또는 지방산 (예컨대, 천연 고무와 자연적으로 관련된 단백질 또는 지방산) 을 포함한다.

[0264] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 10, 5, 1, 0.8, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ppm 이하의 알파 아세틸렌, 피페릴렌, 아세토니트릴, 또는 1,3-시클로펜타디엔을 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ppm 이하의 황 또는 알렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 30, 20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ppm 이하의 모든 아세틸렌 (예컨대, 펜틴-1, 부틴-2, 2MB1-3-인, 및 1-펜틴-4-인) 을 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 또는 0.005 ppm 이하의 이소프렌 이량체, 예컨대 시클릭 이소프렌 이량체 (예를 들어, 2 개의 이소프렌 단위의 이량체화로부터 유도된 시클릭 C10 화합물) 를 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물에는 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올 (예컨대, 3-메틸-3-부텐-1-올 또는 3-메틸-2-부텐-1-올), 또는 상기 중 임의의 2 개 이상이 포함된다. 특정 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 또는 120 ug/L 이상의 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올 (예컨대, 3-메틸-3-부텐-1-올 또는 3-메틸-2-부텐-1-올), 또는 상기 중 임의의 2 개 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 약 0.005 내지 약 120, 예컨대 약 0.01 내지 약 80, 약 0.01 내지 약 60, 약 0.01 내지 약 40, 약 0.01 내지 약 30, 약 0.01 내지 약 20, 약 0.01 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 80, 약 0.1 내지 약 60, 약 0.1 내지 약 40, 약 5 내지 약 80, 약 5 내지 약 60, 또는 약 5 내지 약 40 ug/L 의 에탄올, 아세톤, C5 프레닐 알코올, 또는 상기 중 임의의 2 개 이상을 포함한다.

[0266] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물에는 하나 이상의 하기 성분이 포함된다: 2-헵타논, 6-메틸-5-헵텐-2-온, 2,4,5-트리메틸피리딘, 2,3,5-트리메틸피라진, 시트로넬랄, 아세트알데하이드, 메탄티올, 메틸 아세테이트, 1-

프로판올, 디아세틸, 2-부타논, 2-메틸-3-부텐-2-올, 에틸 아세테이트, 2-메틸-1-프로판올, 3-메틸-1-부타날, 3-메틸-2-부타논, 1-부탄올, 2-펜타논, 3-메틸-1-부탄올, 에틸 이소부티레이트, 3-메틸-2-부테날, 부틸 아세테이트, 3-메틸부틸 아세테이트, 3-메틸-3-부트-1-에닐 아세테이트, 3-메틸-2-부트-1-에닐 아세테이트, (E)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, (Z)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리엔, 2,3-시클로헥텐올피리딘, 또는 선형 이소프렌 중합체 (예컨대, 다중 이소프렌 단위의 중합으로부터 유도된 선형 이소프렌 이량체 또는 선형 이소프렌 삼량체). 다양한 구현예에서, 중량% 의 단위 내 이소프렌의 양에 대한 상기 성분 중 하나의 양 (즉, 성분의 중량  $\div$  이소프렌의 중량  $\times$  100) 은 약 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 110% (w/w) 이상이다. 일부 구현예에서, 이소프렌에 대한 검출기 반응에 대한 제 2 화합물에 대한 상대적 검출기 반응은 약 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 110% 이상이다. 다양한 구현예에서, 중량% 의 단위 내 이소프렌의 양에 대한 상기 성분 중 하나의 양 (즉, 성분의 중량  $\div$  이소프렌의 중량  $\times$  100) 은 약 0.01 내지 약 105% (w/w), 예컨대 약 0.01 내지 약 90, 약 0.01 내지 약 80, 약 0.01 내지 약 50, 약 0.01 내지 약 20, 약 0.01 내지 약 10, 약 0.02 내지 약 50, 약 0.05 내지 약 50, 약 0.1 내지 약 50, 또는 0.1 내지 약 20% (w/w) 이다.

[0267] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물에는 하기 중 하나 이상이 포함된다: 알코올, 알데하이드, 또는 케톤 (예컨대, 본원에 기재된 알코올, 알데하이드, 또는 케톤 중 임의의 것). 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물에는 (i) 알코올 및 알데하이드, (ii) 알코올 및 케톤, (iii) 알데하이드 및 케톤, 또는 (iv) 알코올, 알데하이드, 및 케톤이 포함된다.

[0268] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 메탄올, 아세트알데하이드, 에탄올, 메탄티올, 1-부탄올, 3-메틸-1-프로판올, 아세톤, 아세트산, 2-부타논, 2-메틸-1-부탄올, 또는 인돌 중 하나 이상을 함유한다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 메탄올, 아세트알데하이드, 에탄올, 메탄티올, 1-부탄올, 3-메틸-1-프로판올, 아세톤, 아세트산, 2-부타논, 2-메틸-1-부탄올, 또는 인돌 중 하나 이상을 1 ppm 이상 함유한다. 일부 구현예에서, 메탄올, 아세트알데하이드, 에탄올, 메탄티올, 1-부탄올, 3-메틸-1-프로판올, 아세톤, 아세트산, 2-부타논, 2-메틸-1-부탄올, 또는 인돌 중 하나 이상의 농도는, 이소프렌 조성물 (예컨대 정제 전 방출-기체) 내에서 약 1 내지 약 10,000 ppm 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물 (예컨대 하나 이상의 정제 단계를 거친 후의 방출-기체)에는 메탄올, 아세트알데하이드, 에탄올, 메탄티올, 1-부탄올, 3-메틸-1-프로판올, 아세톤, 아세트산, 2-부타논, 2-메틸-1-부탄올, 또는 인돌 중 하나 이상이 약 1 내지 약 100 ppm, 예컨대 약 1 내지 약 10 ppm, 약 10 내지 약 20 ppm, 약 20 내지 약 30 ppm, 약 30 내지 약 40 ppm, 약 40 내지 약 50 ppm, 약 50 내지 약 60 ppm, 약 60 내지 약 70 ppm, 약 70 내지 약 80 ppm, 약 80 내지 약 90 ppm, 또는 약 90 내지 약 100 ppm 의 농도로 포함된다. 세포 배양물 (예컨대, 세포 배양물의 상부공간 내 휘발성 유기 화합물)로부터의 휘발성 유기 화합물은 표준 방법, 예컨대 본원에 기재된 방법 또는 다른 표준 방법, 예컨대 양자 이동 반응-질량 분석 (예를 들어, 특히, 휘발성 유기 화합물의 분석에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Bunge *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7):2179-2186, 2008] 참조) 을 사용하여 분석될 수 있다.

[0269] 일부 구현예에서, 조성물은 약 2 mg 초과와 이소프렌, 예컨대 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 mg 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g 이상의 이소프렌을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물 내 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 mg, 예컨대 약 2 내지 약 100 mg, 약 100 내지 약 500 mg, 약 500 내지 약 1,000 mg, 약 1,000 내지 약 2,000 mg, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 mg 이다. 일부 구현예에서, 조성물 내 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 mg, 약 100 내지 약 5,000 mg, 약 200 내지 약 2,000 mg, 약 200 내지 약 1,000 mg, 약 300 내지 약 1,000 mg, 또는 약 400 내지 약 1,000 mg 이다. 일부 구현예에서, 조성물의 휘발성 유기 분석의 약 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 95 중량% 이상은 이소프렌이다.

[0270] 일부 구현예에서, 조성물에는 에탄올이 포함된다. 일부 구현예에서, 조성물에는 약 75 내지 약 90 중량% 의 에탄올, 예컨대 약 75 내지 약 80 중량%, 약 80 내지 약 85 중량%, 또는 약 85 내지 약 90 중량% 의 에탄올이 포함된다. 조성물에 에탄올이 포함되는 일부 구현예에서, 조성물에는 또한 약 4 내지 약 15 중량% 의 이소프렌, 예컨대 약 4 내지 약 8 중량%, 약 8 내지 약 12 중량%, 또는 약 12 내지 약 15 중량% 의 이소프렌이 포함된다.

[0271] 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드, DXS 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 이중 핵산을 포함하는 세포는, 하나 이상의 이중 핵산이 없는 본질적으로 동일한 조건 하에서 성장된 상응하는 세포로부터 제조된 이소프레노이드 화합물보다 약 2 배, 3 배,



5 배, 10 배, 25 배, 50 배, 100 배, 150 배, 200 배, 400 배 초과하는 양의 이소프레노이드 화합물 (예컨대, 하나 이상의 IPP 분자와 하나 이상의 DMAPP 분자의 반응으로부터 형성된 10 개 이상의 탄소 원자를 갖는 화합물) 을 제조한다. 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드, DXS 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 이중 핵산을 포함하는 세포는, 하나 이상의 이중 핵산이 없는 본질적으로 동일한 조건 하에서 성장된 상응하는 세포로부터 제조된 C5 프레닐 알코올의 양보다 약 2 배, 3 배, 5 배, 10 배, 25 배, 50 배, 100 배, 150 배, 200 배, 400 배 초과하는 양의 C5 프레닐 알코올 (예컨대 3-메틸-3-부텐-1-올 또는 3-메틸-2-부텐-1-올) 을 제조한다.

[0272] 예시적 이소프렌 정제 방법

[0273] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 방법은 이소프렌을 회수하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 제조된 이소프렌은 표준 기술, 예컨대 기체 스트리핑, 막 향상 분리, 분획화, 흡착/탈착, 투석증발, 고상으로부터 이소프렌의 열 또는 진공 탈착, 또는 고상에 고정 또는 흡착된 이소프렌의 용매로의 추출을 사용하여 회수될 수 있다 (예를 들어, 특히, 이소프렌 회수 및 정제 방법에 관해, 본원에 전체가 각각 참조로서 인용된 미국 특허 번호 4,703,007 및 4,570,029 참조). 특정 구현예에서, 알코올 (예컨대 에탄올, 메탄올, 프로판올, 또는 이의 조합) 로의 추출 증류는 이소프렌을 회수하기 위해 사용된다.

일부 구현예에서, 이소프렌의 회수에는 액체 형태의 이소프렌의 단리 (예컨대, 이소프렌의 순 용액 또는 용매 중의 이소프렌의 용액) 가 포함된다. 기체 스트리핑에는 연속 방식으로의 발효 방출-기체 스트림으로부터의 이소프렌 증기의 제거가 포함된다. 이러한 제거는 고상에 대한 흡착, 액상 내로의 분할, 또는 직접 응축 (예컨대 응축 코일에 대한 노출로 인한 또는 압력 증가로 인한 응축) 을 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 증기의 이슬점 초과 회석 이소프렌 증기 스트림의 막 풍부는 액체 이소프렌의 응축을 야기한다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 압착되고 응축된다.

[0274] 이소프렌의 회수에는 1 단계 또는 다단계가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 발효 방출-기체로부터의 이소프렌 증기의 제거 및 이소프렌의 액상에서의 전환은 연속으로 수행된다. 예를 들어, 이소프렌은 방출-기체 스트림으로부터 직접 응축되어 액체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 발효 방출-기체로부터의 이소프렌 증기의 제거 및 이소프렌의 액상에서의 전환은 연속으로 수행된다. 예를 들어, 이소프렌은 고상에 흡착된 다음, 고상으로부터 용매로 추출될 수 있다.

[0275] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 방법에는 이소프렌을 정제하는 것이 추가로 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 제조된 이소프렌은 표준 기술을 사용하여 정제될 수 있다. 정제는 이소프렌이 제조될 때, 존재하는 하나 이상의 성분으로부터 이소프렌을 분리하는 방법을 말한다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 실질적으로 순수한 액체로서 수득된다. 정제 방법의 예에는 (i) 액체 추출제 내 용액으로부터의 증류 및 (ii) 크로마토그래피가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같은, "정제된 이소프렌" 은 이소프렌이 제조될 때, 존재하는 하나 이상의 성분으로부터 분리된 이소프렌을 의미한다. 일부 구현예에서, 이소프렌은 이소프렌이 제조될 때, 존재하는 다른 성분이 없이 약 20 중량% 이상이다. 다양한 구현예에서, 이소프렌은 약 25 중량%, 30 중량%, 40 중량%, 50 중량%, 60 중량%, 70 중량%, 75 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량%, 또는 99 중량% 이상 순수하다. 순도는 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피, HPLC 분석, 또는 GC-MS 분석에 의해 어세이할 수 있다.

[0276] 일부 구현예에서, 이소프렌의 제거를 위한 하나 이상의 회수 단계 후 남은 기상의 일부 이상은 이소프렌의 제조를 위해 기상을 세포 배양 시스템 (예컨대 발효기) 내로 도입함으로써 재생된다.

[0277] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 방법에는 이소프렌을 중합하는 것이 추가로 포함된다. 예를 들어, 표준 방법은 정제된 이소프렌을 중합하여 시스-폴리이소프렌 또는 표준 방법을 사용하는 기타 하위 스트림 생성물을 형성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 이소프렌 조성물로 만들어진 폴리이소프렌, 예컨대 시스-1,4-폴리이소프렌 및/또는 트랜스-1,4-폴리이소프렌을 포함하는 타이어를 특징으로 한다.

[0278] 실시예

[0279] 본 발명의 순수한 예로 의도되고, 그러므로 본 발명을 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 고려되지 않아야 하는 실시예, 및 상기 논의된 본 발명의 상세한 양상 및 구현예를 또한 설명한다. 다르게 언급되지 않는 경우, 온도는 섭씨 온도이고, 기압은 대기압 또는 그 근처의 압력이다. 하기 실시예 및 상세한 설명은 제한이 아닌 예로서 제공되는 것이다. 본 명세서에 언급된 모든 공개, 특허 출원 및 특허는, 각각의 개별 공개,



특허 출원, 또는 특허가 참조로서 인용되는 것으로 구체적으로 개별적으로 나타내지는 경우와 같이 참조로서 본원에 인용된다. 특히, 본원에 언급된 모든 공개는 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 조성물 및 방법론을 설명 및 기재하려는 목적으로 참조로서 본원에 표현적으로 인용된다. 상기 발명이 설명으로서, 이해의 명확성을 목적으로 실시예로서 일부 상세히 기재되어 있지만, 당업자에게는 본 발명의 교시의 견지에서 특허청구범위의 취지 또는 범주로부터 벗어남 없이 특정 변화 및 개질이 이루어질 수 있다는 것이 쉽게 명백할 것이다.

## [0280] 실시예 1: 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 제조

### [0281] I. E. 콜라이 내 kudzu 이소프렌 합성효소의 발현용 벡터의 구축

[0282] kudzu (푸에라리아 몬타나 (*Pueraria montana*)) 이소프렌 합성효소 유전자 (IspS) 에 대한 단백질 서열을 GenBank (AAQ84170) 로부터 획득하였다. E. 콜라이 코돈 용법에 대해 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 DNA2.0 (SEQ ID NO: 1) 에서 구입하였다. BspLU11I/PstI 로의 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 공급된 플라스미드로부터 이소프렌 합성효소 유전자를 제거하고, 젤-정제하고, NcoI/PstI 으로 소화된 pTrcHis2B (Invitrogen) 내에 라이게이션하였다. PstI 부위에 대해 이소프렌 합성효소 유전자 5' 에 정지 코돈이 있도록 구축물을 디자인하였다. 그 결과, 구축물이 발현될 때, His-태그는 이소프렌 합성효소 단백질에 부착되지 않는다. 수득 플라스미드인 pTrcKudzu 를 서열분석에 의해 입증하였다 (도 2 및 3).

[0283] 또한 이소프렌 합성효소 유전자를 pET16b (Novagen) 내에 클로닝하였다. 이 경우, 이소프렌 합성효소 유전자를 재조합 이소프렌 합성효소 단백질이 N-말단 His 태그에 함유되도록 pET16b 내에 삽입하였다. 이소프렌 합성효소 유전자를 프라이머 세트 pET-His-Kudzu-2F: 5'-CGTGAGATCATATGTGTGCGACCTCTCTCAATTAC (SEQ ID NO:3) 및 pET-His-Kudzu-R: 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:4) 를 사용하여 PCR 에 의해 pTrcKudzu 로부터 증폭시켰다. 상기 프라이머에 유전자의 5'-말단에 NdeI 부위 및 3' 말단에 BamHI 부위를 각각 첨가하였다. 상기 기재된 플라스미드 pTrcKudzu 를 주형 DNA 로서 사용하였고, 헤르쿨라아제 (Herculase) 폴리머라아제 (Stratagene) 를 제조자의 지침에 따라 사용하였고, 프라이머를 10 pMol 의 농도로 첨가하였다. PCR 을 총 부피 25  $\mu$ l 에서 수행하였다. PCR 생성물을 NdeI/BamHI 으로 소화하고, 동일한 효소로 소화된 pET16b 내로 클로닝하였다. 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 Top10 (Invitrogen) 내로 형질전환시키고, 서열분석에 의해 올바른 클론을 선택하였다. kudzu 이소프렌 합성효소 유전자가 T7 프로모터로부터 발현된 수득된 플라스미드를 pETNHiskudzu (도 4 및 5) 로 지정하였다.

[0284] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 또한 저 카피 수 플라스미드 pCL1920 내로 클로닝하였다. 프라이머를 상기 기재된 pTrcKudzu 로부터 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 증폭시키는데 사용하였다. 정방향 프라이머에 HindIII 부위 및 E. 콜라이 일치 RBS 를 5' 말단에 첨가하였다. PstI 클로닝 부위는 pTrcKudzu 내 정지 코돈의 바로 3' 에 이미 존재하여, 최종 PCR 생성물에 PstI 부위가 포함되도록 역방향 프라이머를 구축하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같았다: HindIII-rbs-Kudzu F: 5'-CATATGAAAGCTTGATCGATTAAATAAGGAGGAATAAAC (SEQ ID NO:6) 및 BamHI-Kudzu R:

[0285] 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:4). PCR 생성물을 10 pmol 의 농도의 프라이머 및 1 ng 의 주형 DNA (pTrcKudzu) 로, 헤르쿨라아제 폴리머라아제를 사용하여 증폭시켰다. 증폭 프로토콜에는 (1 분 동안 95°C, 1 분 동안 60°C, 2 분 동안 72°C) 의 30 사이클이 포함되었다. 생성물을 HindIII 및 PstI 으로 소화시키고, HindIII 및 PstI 로 소화되었던 pCL1920 내로 라이게이션하였다. 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 Top 10 내로 형질전환시켰다. 여러 개의 형질전환체를 서열분석에 의해 확인하였다. 수득된 플라스미드를 pCL-lac-Kudzu (도 6 및 7) 로 지정하였다.

### [0286] II. 이소프렌 제조의 측정

[0287] 진탕 플라스크 배양을 위해, 1 ml 의 배양물을 진탕 플라스크에서 20 ml CTC 상부공간 바이알 (Agilent 바이알 cat# 5188 2753; 캡 cat# 5188 2759) 로 옮겼다. 캡을 단단히 돌려 잠그고, 바이알을 250 rpm 에서 진탕하면서 동일한 온도에서 인큐베이션하였다. 30 분 후, 바이알을 인큐베이터에서 제거하고, 하기 기재된 바와 같이 분석하였다 (상기 어세이로부터의 일부 실험 값에 대해 표 1 참조).

[0288] 발효기 내 이소프렌 제조가 측정되었던 경우, 샘플을 발효기의 방출-기체로부터 취하고, 하기 기재된 바와 같이 직접적으로 분석하였다 (상기 어세이로부터의 일부 실험 값에 대해 표 2 참조).

[0289] 상부공간 방식으로 작동하는 CTC Analytics (Switzerland) CombiPAL 오토샘플러가 접속된 Agilent 6890 GC/MS 시스템을 사용하여 분석하였다. Agilent HP-5MS GC/MS 컬럼 (30 m  $\times$  0.25 mm; 0.25  $\mu$ m 필름 두께) 를 분석물 분리를 위해 사용하였다. 샘플러를 500  $\mu$ l 의 상부공간 기체를 주입하는 것으로 설정하였다.

GC/MS 방법은 운반 기체로서 헬륨을 1 ml/분의 속도로 이용하였다. 주입 포트를 50:1 의 분열비로 250℃ 에서 유지하였다. 오븐 온도를 분석 2 분 기간 동안 37℃ 로 유지하였다. Agilent 5793N 질량 선택적 검출기를 m/z 67 상의 단일 이온 모니터링 (SIM) 방식으로 실행시켰다. 검출기를 1.4 에서 1.7 분으로 전환시켜 영구 기체 용리를 시켰다. 상기 조건 하에서, 이소프렌 (2-메틸-1,3-부타디엔) 은 1.78 분에 용리되는 것을 관찰하였다. 검정 표를 사용하여 이소프렌 절대량을 정량하였고, 1 µg/L 에서 2000 µg/L 까지 선형인 것으로 발견되었다. 검출 한계는 상기 방법을 사용하여 50 내지 100 ng/L 인 것으로 추정되었다.

[0290] III. 재조합 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 세포를 함유하는 진탕 플라스크 내 이소프렌의 제조

[0291] 상기 기재된 벡터를 E. 콜라이 균주 BL21 (Novagen) 내에 도입하여 균주 BL21/ptrcKudzu, BL21/pCL-lac-Kudzu 및 BL21/pETHisKudzu 를 제조하였다. 균주를 LA (루리아 아가 (Luria agar)) + 카르베니실린 (50 µg/ml) 상의 단리를 위해 얇게 펴뜨리고, 37℃ 에서 밤새 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 20 ml 루리아 베르타니 (Luria Bertani) 브로쓰 (LB) 및 카르베니실린 (100 µg/ml) 을 함유하는 250 ml 배플 (baffled) 진탕 플라스크 내에 인큐베이션하였다. 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 20℃ 에서 밤새 성장시켰다. 밤샘 배양물의 OD<sub>600</sub> 을 측정하고, 배양물을 30 ml MagicMedia (Invitrogen) + 카르베니실린 (100 µg/ml) 을 함유하는 250 ml 배플 진탕 플라스크에 OD<sub>600</sub> ~ 0.05 으로 희석하였다. 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 30℃ 에서 인큐베이션하였다. OD<sub>600</sub> 가 약 0.5 - 0.8 일 때, 400 µM IPTG 를 첨가하고, 세포를 200 rpm 으로 진탕하면서 30℃ 에서 추가 6 시간 동안 인큐베이션하였다. IPTG 로의 인큐베이션 0, 2, 4 및 6 시간 후에, 배양물 1 ml 분취액을 수집하고, OD<sub>600</sub> 을 측정하고, 제조된 이소프렌의 양을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과를 도 8 에 제시한다.

[0292] IV. 14 리터 발효 내 BL21/ptrcKudzu 로부터의 이소프렌의 제조

[0293] 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 함유하는 E. 콜라이로부터의 이소프렌의 대규모 제조를 공급-배치식 배양물로부터 측정하였다. 발효 배지 1 리터 당 발효 배지 (TM2) 에 대한 구성은 다음과 같았다: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6 g, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.2 g, 효모 추출물 5 g, 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 수산화칼륨 (KOH) 으로 pH 를 6.8 으로 조정하고, 부피를 충분히 하였다. 최종 생성물을 0.22 µ 필터 (이것으로만, 오토클레이브하지 않음) 로 필터 멸균하였다. 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 에 대한 구성은 다음과 같았다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한다. 부피를 충분히 하고, 0.22 µ 필터로 필터 멸균하였다.

[0294] 바람직한 발효, pH 6.7 및 온도 34℃ 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 14 L 생물반응기에서 상기 실험을 수행하였다. 동결 바이알로부터 취해진 E. 콜라이 균주 BL21/ptrcKudzu 의 접종물을 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지에서 제조하였다. 접종물을 OD<sub>550</sub> = 0.6 까지 성장시킨 후, 2 개의 600 ml 플라스크를 원심분리하고, 세포 펠렛 (70 ml 의 OD 3.1 물질) 을 생물반응기에 옮기기 위해 내용물을 70 ml 상청액에 재현탁하였다. 접종 후 다양한 시간에서, 샘플을 제거하고, 제조된 이소프렌의 양을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과는 도 9 에 제시된다.

[0295] 실시예 2: 재조합 poplar 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 제조

[0296] poplar (포플러스 알바 x 포플러스 트레몰라 (Populus alba x Populus tremula)) 이소프렌 합성효소에 대한 단백질 서열 (Schnitzler, J-P, et al. (2005) *Planta* 222:777-786) 을 GenBank (CAC35696) 로부터 입수하였다.

E. 콜라이에 대해 최적화된 코돈인 유전자를 DNA2.0 로부터 구입하였다 (p9796-poplar, 도 30 및 31). BspL11I/PstI 로의 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 공급된 플라스미드로부터 이소프렌 합성효소 유전자를 제거하고, 젤-정제하고, NcoI/PstI 으로 소화된 pTrcHis2B 내로 라이게이션하였다. 삽입물 내 정지 코돈이 PstI 부위 전에 있도록 구축물을 클로닝하여, His-태그가 이소프렌 합성효소 단백질에 부착되지 않은 구축물을 산출한다. 수득된 플라스미드 pTrcPoplar (도 32 및 33) 를 서열분석에 의해 입증하였다.

[0297] 실시예 3: 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 판테오아 시트레아 (Pantaea citrea) 내 이소프렌의 제

## 조

- [0298] 실시예 1 에 기재된 pTrcKudzu 및 pCL-lac Kudzu 플라스미드를 P. 시트레아 내로 전기천공시켰다 (미국 특허 번호 7,241,587). 형질전환체를 카르베니실린 (200  $\mu\text{g/ml}$ ) 또는 스펙티노마이신 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 을 각각 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 진탕 플라스크로부터의 이소프렌의 제조 및 제조되는 이소프렌의 양의 측정을 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 균주에 대해 실시예 1 에 기재된 바와 같이 수행하였다. 결과를 도 10 에 제시한다.
- [0299] **실시예 4: 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 바실러스 서브틸리스 내 이소프렌의 제조**
- [0300] I. kudzu 이소프렌 합성효소의 발현을 위한 B. 서브틸리스 복제 플라스미드의 구축
- [0301] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를, aprE 프로모터의 통제 하에서 복제 플라스미드 (클로르암페니콜 내성 카세트가 있는 pBS19) 를 사용하여 바실러스 서브틸리스 aprEnprE Pxyl-comK 균주 (BG3594comK) 에서 발현하였다. 이소프렌 합성효소 유전자, aprE 프로모터 및 전사 터미네이터를 각각 증폭시키고, PCR 를 사용하여 융합시켰다. 구축물을 pBS19 내로 클로닝하고, B. 서브틸리스 내로 형질전환시켰다.
- [0302] a) aprE 프로모터의 증폭
- [0303] aprE 프로모터를 하기 프라이머를 사용하여 바실러스 서브틸리스로부터의 염색체 DNA 로부터 증폭시켰다:
- [0304] CF 797 (+) aprE 프로모터 MfeI 를 출발함
- [0305] 5'- GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:58)
- [0306] CF 07-43 (-) Kudzu ispS 에 대해 aprE 프로모터를 융합함
- [0307] 5'- ATTGAGAAGAGGTCGCACACTCTTTACCCTCTCCTTTTA (SEQ ID NO:59)
- [0308] b) 이소프렌 합성효소 유전자의 증폭
- [0309] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 플라스미드 pTrcKudzu (SEQ ID NO:2) 로부터 증폭시켰다. 유전자는 E. 콜라이에 대해 최적화된 코돈을 가지고 있고, DNA 2.0 에 의해 합성되었다. 하기 프라이머를 사용하였다:
- [0310] CF 07-42 (+) kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 대해 aprE 프로모터를 융합함 (GTG 출발 코돈)
- [0311] 5'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:60)
- [0312] CF 07-45 (-) 터미네이터에 대해 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 3' 말단을 융합함
- [0313] 5'- CCAAGGCCGGTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:61)
- [0314] c) 전사 터미네이터의 증폭
- [0315] 바실러스 아밀리퀘파시엔스의 알칼리 세린 프로테아제로부터의 터미네이터를 하기 프라이머를 사용하여 미리 서열분석된 플라스미드 pJHPms382 로부터 증폭시켰다:
- [0316] CF 07-44 (+) 터미네이터에 대해 kudzu 이소프렌 합성효소의 3' 말단을 융합함
- [0317] 5'- GATTAACCACTGATGTATGTCTAAAAAACCAGCCTTGG (SEQ ID NO:62)
- [0318] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀘파시엔스 터미네이터의 말단 (BamH1)
- [0319] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0320] kudzu 분절을 하기 프라이머로 PCR 을 사용하여 터미네이터 분절에 융합시켰다:
- [0321] CF 07-42 (+) kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 대해 aprE 프로모터를 융합함 (GTG 출발 코돈)
- [0322] 5'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCAAT (SEQ ID NO:61)
- [0323] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀘파시엔스 터미네이터의 말단 (BamH1)
- [0324] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0325] kudzu-터미네이터 분절을 하기 프라이머로 PCR 을 사용하여 프로모터 분절에 융합시켰다:

- [0326] CF 797 (+) aprE 프로모터 MfeI 를 출발함
- [0327] 5'- GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC (SEQ ID NO:64)
- [0328] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀘파시엔스 터미네이터 (BamH1) 의 말단
- [0329] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0330] 융합 PCR 분절을 Qiagen 키트를 사용하여 정제하고, 제한 효소 MfeI 및 BamH1 으로 소화하였다. 상기 소화된 DNA 분절을 Qiagen 키트를 사용하여 젤 정제하고, EcoRI 및 BamH1 으로 소화하여 젤 정제한 pBS19 로서 알려진 벡터와 라이게이션하였다.
- [0331] 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 Top 10 세포 내로 형질전환시키고, 콜로니를 LA+50 카르베니실린 플레이트 상에서 선별하였다. 총 6 개의 콜로니를 선택하고 LB+50 카르베니실린에서 밤새 성장시킨 다음, 플라스미드를 Qiagen 키트를 사용하여 단리하였다. 삽입물을 확인하기 위해 플라스미드를 EcoRI 및 BamH1 으로 소화시키고, 올바른 플라스미드 중 3 개를 하기 프라이머로 서열분석을 위해 보냈다:
- [0332] CF 149 (+) aprE 프로모터의 EcoRI 출발
- [0333] 5'- GACATGAATTCCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO:65)
- [0334] CF 847 (+) pXX 049 내 서열 (aprE 프로모터의 말단)
- [0335] 5'- AGGAGAGGGTAAAGAGTGAG (SEQ ID NO:66)
- [0336] CF 07-45 (-) 터미네이터에 대해 kudzu 이소프렌 합성효소의 3' 말단을 융합함
- [0337] 5'- CCAAGGCCGGTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID NO:61)
- [0338] CF 07-48 (+) kudzu 이소프렌 합성효소에 대한 서열분석 프라이머
- [0339] 5'- CTTTCCATCACCCACCTGAAG (SEQ ID NO:67)
- [0340] CF 07-49 (+) kudzu 이소프렌 합성효소 내 서열분석
- [0341] 5'- GCGGAAATGGTCCAACAACAAAATTATC (SEQ ID NO:68)
- [0342] pBS Kudzu #2 (도 52 및 12) 로 지정된 플라스미드를 서열분석에 의해 정정하고, 바실러스 서브틸리스 숙주 균주인 BG 3594 comK 내로 형질전환시켰다. LA + 5 클로르암페니콜 플레이트 상에서 선별을 수행하였다. 형질전환체를 선택하고, LA + 5 클로르암페니콜 상의 단일 콜로니를 판 다음, OD<sub>600</sub> 이 1.5 에 도달할 때까지 LB+5 클로르암페니콜에서 성장시켰다. 이것을 글리세롤의 존재하에, -80℃ 에서 바이알 내에 동결건조하였다. 수득된 균주를 CF 443 으로 지정하였다.
- [0343] II. 재조합 이소프렌 합성효소를 발현하는 B. 서브틸리스 세포를 함유하는 진탕 플라스크 내 이소프렌의 제조
- [0344] 밤샘 배양물을 LA + 클로르암페니콜 (Cm, 25 µg/ml) 로부터 CF 443 의 단일 콜로니로 접종시켰다. 200 rpm 으로 진탕하면서 37℃ 에서 배양물을 LB + Cm 에서 성장시켰다. 상기 밤샘 배양물 (1 ml) 을 사용하여, 25 µg/ml 의 최종 농도로 25 ml Grants II 배지 및 클로르암페니콜을 함유하는 250 ml 배플 진탕 플라스크를 접종하였다. Grants II 배지 구성은 10 g 소이톤, 3 ml 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 75 g 글루코오스, 3.6 g 우레아, 100 ml 10 × MOPS, 1 L 까지 H<sub>2</sub>O 충전량, pH 7.2 이었고; 10× MOPS 구성은 83.72 g MOPS, 7.17 g 트리신, 12 g KOH 펠렛, 10 ml 0.276M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액, 10 ml 0.528M MgCl<sub>2</sub> 용액, 29.22 g NaCl, 100 ml 100× 미량영양소, 1 L 까지 H<sub>2</sub>O 충전량이었고; 100× 미량영양소 구성은 1.47 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.4 g FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.1 g MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 0.1 g ZnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 0.05 g CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.1 g CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.1 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 1 L 까지 H<sub>2</sub>O 충전량이었다. 진탕 플라스크를 37℃ 에서 인큐베이션하고, 샘플을 18, 24, 및 44 시간에 취하였다. 18 시간에 CF443 의 상부공간 및 대조군 균주를 샘플링하였다. 이것은 이소프렌의 18 시간 축적을 나타내었다. 이소프렌의 양을 실시예 1 에 기재된 바와 같은 기체 크로마토그래피에 의해 측정하였다. 이소프렌의 제조는 재조합 이소프렌 합성효소를 발현시킴으로써 유의하게 향상되었다 (도 11).
- [0345] III. 14 L 발효 내 CF443 에 의한 이소프렌의 제조
- [0346] 복제 플라스미드 상에 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 함유하는 B. 서브틸리스로부터의 이소프렌의



대규모 제조를 공급-배치식 배양물로부터 측정하였다. kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 발현하는 바실러스 균주 CF 443, 또는 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 발현하지 않는 대조균 균주를 대두 가루 (Cargill), 인산나트륨 및 인산칼륨, 황산마그네슘 및, 구연산, 염화제2철 및 염화망간의 용액을 함유하는 영양 배지에서 통상의 공급-배치식 발효에 의해 배양하였다. 발효 전 배지를 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제 및 펙티나아제를 포함하는 효소의 혼합물을 사용하여 90 분 동안 불린다 (참조, W095/04134). 14 L 배치 발효에 60% wt/wt 글루코오스 (Cargill DE99 텍스트로오스, ADM Versadex greens 또는 Danisco 전화당) 및 99% wt/wt 오일 (Western Family 대두 오일, 99% wt/wt 는 세포 배양 배지에 첨가하기 전의 오일의 농도이다) 을 공급한다. 배치 중의 글루코오스가 검출되지 않을 때 공급을 시작하였다. 공급 속도를 여러 시간에 걸쳐 높이고, 동일한 탄소 기체의 오일을 첨가하여 조절하였다. 28% w/v 수산화암모늄을 사용하여 pH 를 6.8 - 7.4 로 조절하였다. 거품이 발생하는 경우, 소포제를 배지에 첨가하였다. 발효 온도를 37°C 에서 조절하고, 발효 배양물을 750 rpm 으로 진탕하였다. pH, DO%, 기류, 및 압력과 같은 다양한 기타 파라미터를 전체 공정 동안 모니터링하였다. DO% 를 20 초과로 유지한다. 샘플을 36 시간의 시간 과정에 걸쳐 채취하고, 세포 성장 (OD<sub>550</sub>) 및 이소프렌 제조에 대해 분석하였다. 상기 실험 결과를 도 53A 및 53B 에 제시한다.

[0347] IV. B. 서브틸리스 내 kudzu 이소프렌 합성효소 (ispS) 의 통합

[0348] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 aprE 프로모터의 통제 하에서 통합 플라스미드 (pJH101-cmpR) 내에 클로닝하였다. 시험된 조건 하에서, 이소프렌이 검출되지 않았다.

[0349] **실시예 5: 트리코테르마 내 이소프렌의 제조**

[0350] I. 트리코테르마 레에세이 내 kudzu 이소프렌 합성효소의 발현용 벡터의 구축

[0351] 야로이아 리폴라이티카 (Yarrowia lipolytica) 코돈-최적화 kudzu IS 유전자를 DNA 2.0 (SEQ ID NO:8) 에 의해 합성하였다 (도 13). 상기 플라스미드는 하기 PCR 증폭 반응에 대한 주형으로서 담당하였다: 총 반응 부피 50  $\mu$ l 중에, 1  $\mu$ l 플라스미드 주형 (20 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 프라이머 EL-945 (10  $\mu$ M) 5'-GCTTATGGATCCTCTAGACTATTACAGTACATCAATTGG (SEQ ID NO:9), 1  $\mu$ l 프라이머 EL-965 (10  $\mu$ M) 5'-CACCATGTGTGCAACCTCCTCCAGTTTAC (SEQ ID NO:10), 1  $\mu$ l dNTP (10 mM), 5  $\mu$ l 10 $\times$  PfuUltra II 용합 HS DNA 폴리머라아제 완충액, 1  $\mu$ l PfuUltra II 용합 HS DNA 폴리머라아제, 40  $\mu$ l 물. 정방향 프라이머에는 Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 상응하지 않으나, pENTR/D-TOPO 벡터 내의 클로닝에 필요한 5'-말단에 부가적인 4 개의 뉴클레오티드가 함유되어 있다. 역방향 프라이머에는 Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 상응하지 않으나, 다른 벡터 백본 내로의 클로닝을 위해 삽입된 5'-말단에 부가적인 21 개의 뉴클레오티드가 함유되어 있다. MJ Research PTC-200 Thermocycler 를 사용하여, PCR 반응을 하기와 같이 수행하였다: 2 분 동안 95°C (첫번째 사이클만), 30 초 동안 95°C, 30 초 동안 55°C, 30 초 동안 72°C (27 사이클 동안 반복), 마지막 사이클 후 1 분 동안 72°C. PCR 생성물을 1.2% E-젤 상에서 분석하여, Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 성공적인 증폭을 확인하였다.

[0352] 그 다음 PCR 생성물을 하기 제조자의 프로토콜에 따라 TOPO pENTR/D-TOPO Cloning Kit 를 사용하여 클로닝하였다: 총 반응 용액 6  $\mu$ l 중에, 1  $\mu$ l PCR 반응물, 1  $\mu$ l 염 용액, 1  $\mu$ l TOPO pENTR/D-TOPO 벡터 및 3  $\mu$ l 물. 반응을 실온에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 1  $\mu$ l 의 TOPO 반응물을 TOP10 화학적으로 수용능이 된 E. 콜라이 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 LA + 50  $\mu$ g/ml 카나마이신 플레이트 상에서 선별하였다. 여러 개의 콜로니를 집어내고, 각각을 LB + 50  $\mu$ g/ml 카나마이신을 함유하는 5 ml 튜브 내에 접종하고, 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라 QIAprep Spin Miniprep Kit 를 사용하여 밤샘 배양 튜브로부터 플라스미드를 단리하였다. 여러 개의 플라스미드를 서열분석하여 DNA 서열이 올바른지를 입증하였다.

[0353] Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 코딩하는 단일 pENTR/D-TOPO 플라스미드를, 주문 제작된 pTrex3g 벡터 내로의 Gateway 클로닝을 위해 사용하였다. pTrex3g 의 구축은 WO 2005/001036 A2 에 기재되어 있다. Gateway LR Clonase II Enzyme Mix Kit (Invitrogen) 에 대한 제조자의 프로토콜에 따라 반응을 수행하였다: 1  $\mu$ l Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 pENTR/D-TOPO 공여체 벡터, 1  $\mu$ l pTrex3g 목적지 벡터, 6  $\mu$ l TE 완충액, pH 8.0 (총 반응 부피 8  $\mu$ l). 반응을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션시킨 다음 1  $\mu$ l 트로테이나아제 K 용액을 첨가하고, 인큐베이션을 37°C 에서 10 분 동안 계속하였다. 그 다음, 1  $\mu$ l 의 반응물을 TOP10 화학적으로 수용능이 된 E. 콜라이 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 LA + 50  $\mu$ g/ml 카르베니실린 플레이트 상에서 선별하였다. 여러 개의 콜로니를 집어내고,

각각을 LB + 50  $\mu\text{g/ml}$  카르베니실린을 함유하는 5 ml 튜브 내에 접종하고, 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.) 를 사용하여 밤샘 배양 튜브로부터 플라스미드를 분리하였다. 여러 개의 플라스미드를 서열분석하여 DNA 서열이 올바른지를 입증하였다.

[0354] 4 개의 (quad) 결실 트리코테르마 레에세이 균주 내로의 Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 pTrex3g 플라스미드의 유전자주입 형질전환 (도 14) 을 Biolistic PDS-1000/HE Particle Delivery System (참조, WO 2005/001036 A2) 을 사용하여 수행하였다. 안정한 형질전환체의 분리 및 진탕 플라스크 평가를 특허 공개 WO 2005/001036 A2 의 실시예 11 에 열거된 프로토콜을 사용하여 수행하였다.

[0355] II. T. 레에세이의 재조합 균주 내 이소프렌의 제조

[0356] 상기 기재된 이소프렌 합성효소 형질전환체의 1 ml 의 15 및 36 시간 동안의 배양물을 상부공간 바이알로 옮겼다. 바이알을 밀봉하고, 5 시간 동안 30°C 에서 인큐베이션하였다. 상부공간 기체를 측정하고, 실시예 1 에 기재된 방법에 의해 이소프렌을 확인하였다. 형질전환체 중 2 개가 미량의 이소프렌을 보였다. 이소프렌의 양은 14 시간 인큐베이션에 의해 증가될 수 있었다. 2 개의 양성 샘플은 14 시간 인큐베이션 동안 약 0.5  $\mu\text{g/L}$  의 수준에서 이소프렌을 보였다. 비-형질전환된 대조군은 검출할 수 없는 이소프렌 수준을 보였다. 상기 실험은 외생 이소프렌 합성효소를 보충하였을 때 T. 레에세이가 내생 전구체로부터 이소프렌을 제조할 수 있음을 보인다.

[0357] **실시예 6: 야로이아 내 이소프렌의 제조**

[0358] I. 야로이아 리폴라이티카 내 kudzu 이소프렌 합성효소의 발현용 벡터의 구축.

[0359] 야로이아 리폴라이티카 내 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 발현용 벡터의 구축을 위한 시작점은 벡터 pSPZ1(MAP29S<sub>sp</sub>) 였다. 상기 벡터 (SEQ ID No: 11) 의 완전한 서열은 도 15 에 제시되어 있다.

[0360] 하기 분절을 주형으로서 Y. 리폴라이티카 균주 GICC 120285 의 염색체 DNA: URA3 유전자의 프로모터가 없는 형태, 18S 리보솜 RNA 유전자의 분절, Y. 리폴라이티카 XPR2 유전자의 전사 터미네이터 및 XPR2 및 ICL1 유전자의 프로모터를 함유하는 2 개의 DNA 분절을 사용하여 PCR 에 의해 증폭하였다. 하기 PCR 프라이머를 사용하였다

[0361] ICL1 3

[0362] 5' - GGTGAATTCAGTCTACTGGGATTCCCAAATCTATATATACTGCAGGTGAC

[0363] (SEQ ID NO:69)

[0364] ICL1 5

[0365] 5'- GCAGGTGGGAACTATGCACTCC (SEQ ID NO:70)

[0366] XPR 3

[0367] 5'- CCTGAATTCGTGGATTGGAGGATTGGATAGTGGG (SEQ ID NO:71)

[0368] XPR 5

[0369] 5'- GGTGTCGACGTACGGTCGAGCTTATTGACC (SEQ ID NO:72)

[0370] XPRT3

[0371] 5'- GGTGGGCCCGCATTTTGCCACCTACAAGCCAG (SEQ ID NO:73)

[0372] XPRT 5

[0373] 5'- GGTGAATTCAGAGGATCCCAACGCTGTTGCCTACAACGG (SEQ ID NO:74)

[0374] Y18S3

[0375] 5'- GGTGCGGCCGCTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCG (SEQ ID NO:75)

[0376] Y18S 5



- [0377] 5'- GGTGGGCCCATTAATCAGTTATCGTTTATTGATAG (SEQ ID NO:76)
- [0378] YURA3
- [0379] 5'- GGTGACCAGCAAGTCCATGGGTGGTTTGATCATGG (SEQ ID NO:77)
- [0380] YURA 50
- [0381] 5'- GGTGCGGCCGCCTTTGGAGTACGACTCCAACATG (SEQ ID NO:78)
- [0382] YURA 51
- [0383] 5'- GCGGCCGAGACTAAATTTATTTTCAGTCTCC (SEQ ID NO:79)
- [0384] PCR 증폭을 위해, PfuUltraII 폴리머라아제 (Stratagene), 공급처에서 제공된 완충액 및 dNTPs, 2.5  $\mu$ M 프라이머 및 표시된 주형 DNA 를 제조자의 지침대로 사용하였다. 하기 사이클을 사용하여 증폭을 수행하였다: 1 분 동안 95°C; 34× (30 초 동안 95°C; 30 초 동안 55°C; 3 분 동안 72°C) 및 72°C 에서 10 분 후, 4°C 인큐베이션.
- [0385] 야로이아 내의 발현을 위해 코돈-최적화된, kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 코딩하는 합성 DNA 분자를 DNA 2.0 로부터 입수하였다 (도 16; SEQ ID NO: 12). 각각 XPR2 및 ICL1 프로모터의 통제하에서 합성 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pYLA(KZ1) 및 pYLI(KZ1) 의 구축물 도식에 대한 상세한 설명을 도 18 에 제시한다. 교배 인자 유전자 (MAP29) 가 이소프렌 합성효소 유전자 대신에 삽입된 대조군 플라스미드를 또한 구축하였다 (도 18E 및 18F).
- [0386] 유사한 클로닝 절차가 poplar (포플러스 알바 x 포플러스 트레물라 (Populus alba x Populus tremula)) 이소프렌 합성효소 유전자를 발현하기 위해 사용될 수 있다. poplar 이소프렌의 서열이 문헌 [Miller B. et al. (2001) *Planta* 213, 483-487] 에 기재되어 있고 도 17 에 제시되어 있다 (SEQ ID NO: 13). 각각 XPR2 및 ICL1 프로모터의 통제하에서 합성 poplar 이소프렌 합성효소 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pYLA(POP1) 및 pYLI(POP1) 의 생성을 위한 구축물 도식을 도 18A 및 B 에 제시한다.
- [0387] II. Y. 리폴라이티카의 재조합 균주에 의한 이소프렌의 제조.
- [0388] 벡터 pYLA(KZ1), pYLI(KZ1), pYLA(MAP29) 및 pYLI(MAP29) 를 SacII 로 소화시키고, 우리딘 영양요구성을 위해 표준 리튬 아세테이트/폴리에틸렌 글리콜 절차에 의해 균주 Y. 리폴라이티카 CLIB 122 를 형질전환시키는데 사용하였다. 간략하게는, 밤새 YEPD (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 글루코오스) 에서 성장된 효모 세포를 원심분리 (4000 rpm, 10 분) 에 의해 수집하고, 멸균수로 1 회 세정하고, 0.1 M 리튬 아세테이트, pH 6.0 에 현탁시켰다. 세포 현탁액의 200  $\mu$ l 분취액을 선형화된 플라스미드 DNA 용액 (10-20  $\mu$ g) 과 혼합하고, 10 분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 샘플 완충액 내 1 ml 의 50% PEG 4000 과 혼합하였다. 현탁액을 1 시간 동안 실온에서 추가로 인큐베이션한 후, 42°C 에서 2 분 열 쇼크를 주었다. 그 다음 세포를 SC his leu 플레이트 (0.67% 효모 질소 베이스, 2% 글루코오스, 류신 및 히스티딘 각각 100 mg/L) 상에 플레이팅하였다. 형질전환체는 30°C 에서 3-4 일의 인큐베이션 후 나타났다.
- [0389] pYLA(KZ1) 형질전환으로부터의 3 개의 단리물, pYLI(KZ1) 형질전환으로부터의 3 개의 단리물, pYLA(MAP29) 형질전환으로부터의 2 개의 단리물 및 pYLI(MAP29) 형질전환으로부터의 2 개의 단리물을 YEP7 배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, pH 7.0) 에서, 30°C 에서 진탕하면서 24 시간 동안 성장시켰다. 10 ml 의 배양액으로부터의 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 3 ml 의 신선한 YEP7 에 재현탁시키고, 15 ml 마개 뚜껑 바이알에 넣었다. 바이알을 천천히 (60 rpm) 진탕하면서 실온에서 밤새 인큐베이션시켰다. 상기 바이알의 상부공간 내 이소프렌 함량을 실시예 1 에 기재된 바와 같은 질량-분석 검출기를 사용하여 기체 크로마토그래피에 의해 분석하였다. pYLA(KZ1) 및 pYLI(KZ1) 로 수득된 모든 형질전환체는 쉽게 검출가능한 양의 이소프렌 (0.5  $\mu$ g/L 내지 1  $\mu$ g/L, 도 20) 을 제조하였다. 이소프렌 합성효소 유전자 대신 피타아제 유전자를 가지고 있는 대조군 균주의 상부공간에서는 이소프렌이 검출되지 않았다.
- [0390] **실시예 7: kudzu 이소프렌 합성효소 및 idi, 또는 dxs, 또는 idi 및 dxs 를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 제조**
- [0391] I. E. 콜라이 내 이소프렌의 제조를 위해 kudzu 이소프렌 합성효소 및 idi, 또는 dxs, 또는 idi 및 dxs 를 코딩하는 벡터의 구축

- [0392] i) pTrcKudzuKan 의 구축
- [0393] pTrcKudzu 의 bla 유전자 (실시에 1 에 기재됨) 를 카나마이신 내성을 부여하는 유전자로 대체하였다. bla 유전자를 제거하기 위해, pTrcKudzu 를 BspHI 로 소화시키고, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 로 처리하고, 65°C 에서 가열 치사시킨 다음, Klenow 분절 및 dNTP 로 말단을 채웠다. 5 kbp 큰 분절을 아가로오스 겔로부터 정제하고, 프라이머 MCM22 5'- GATCAAGCTTAACCGAATTGCCAGCTG (SEQ ID NO: 14) 및 MCM23 5'- GATCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC (SEQ ID NO: 15) 를 사용하여 pCR-Blunt-II-TOPO 로부터 PCR 증폭된 kan<sup>r</sup> 유전자에 라이게이션시키고, HindIII 및 PvuI 으로 소화시키고, 말단을 채웠다. 카나마이신 내성을 부여하는 플라스미드 (pTrcKudzuKan) 를 가지고 있는 형질전환체를 카나마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다.
- [0394] ii) pTrcKudzu yIDI Kan 의 구축
- [0395] pTrcKudzuKan 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 겔 정제하였다. 이것을 합성 RBS 를 가진 S. 세레비지아로부터 idi 를 코딩하는 PCR 생성물에 라이게이션하였다. PCR 에 대한 프라이머는 NsiI-YIDI 1 F 5'- CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAATGAC (SEQ ID NO: 16) 및 PstI-YIDI 1 R 5'- CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC (SEQ ID NO: 17) 이었고; 주형은 S. 세레비지아에 게놈 DNA 였다. PCR 생성물을 NsiI 및 PstI 로 소화시키고, 라이게이션 전에 겔 정제하였다. 라이게이션 혼합물을 화학적으로 수용능이 된 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 50 µg/ml 카나마이신을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 여러 개의 형질전환체를 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pTrcKudzu-y I DI(kan) 으로 불렀다 (도 34 및 35).
- [0396] iii) pTrcKudzu DXS Kan 의 구축
- [0397] 플라스미드 pTrcKudzuKan 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 겔 정제하였다. 이것을 합성 RBS 를 가진 E. 콜라이로부터 dxs 를 코딩하는 PCR 생성물에 라이게이션하였다. PCR 에 대한 프라이머는 MCM 13 5'- GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTTGATATTGCCAAAT ACCCG (SEQ ID NO: 18) 및 MCM14 5'- CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT (SEQ ID NO: 19) 이었고; 주형은 E. 콜라이 게놈 DNA 였다. PCR 생성물을 NsiI 및 PstI 로 소화시키고, 라이게이션 전에 겔 정제하였다. 수득된 형질전환 반응물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 카나마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 여러 개의 형질전환체를 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pTrcKudzu-DXS(kan) 으로 불렀다 (도 36 및 37).
- [0398] iv) pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) 의 구축
- [0399] pTrcKudzu-yIDI(kan) 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 겔 정제하였다. 이것을 NsiI 및 PstI 로 소화시킨 합성 RBS (프라이머 MCM13 5'- GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTTGATATTGCCAAAT ACCCG (SEQ ID NO: 18) 및 MCM14 5'- CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT (SEQ ID NO: 19); 주형 TOP10 세포) 를 가진 E. 콜라이 dxs 를 코딩하는 PCR 생성물에 라이게이션하고, 겔 정제하였다. 최종 플라스미드를 pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) 으로 불렀다 (도 21 및 22).
- [0400] v) pCL PtrcKudzu 의 구축
- [0401] 상기 실시에 1 로부터의 프로모터, 구조적 유전자 및 터미네이터를 함유하는 DNA 의 분절을 SspI 를 사용하여 pTrcKudzu 로부터 소화시키고, 겔 정제하였다. 이것을 PvuII 로 소화시킨 pCL1920 에 라이게이션하고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시켰다. 수득되는 라이게이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA 에서 선별하였다. 여러 개의 클론을 단리하고, 서열분석하고, 2 개를 선별하였다. pCL PtrcKudzu 및 pCL PtrcKudzu (A3) 은 반대 방향의 삽입물을 갖는다 (도 38-41).
- [0402] vi) pCL PtrcKudzu yIDI 의 구축
- [0403] NsiI-PstI 소화되고, 겔 정제된, 상기 IDI PCR 앰플리콘 형태 (ii) 를 PstI 로 소화된 pCL PtrcKudzu 내로 라이게이션하고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시켰다. 라이게이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA 에서 선별하였다. 여러 개의 클론을 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pCL PtrcKudzu yIDI 로 불렀다 (도 42 및 43).
- [0404] vii) pCL PtrcKudzu DXS 의 구축
- [0405] NsiI-PstI 소화되고, 겔 정제된, 상기 DXS PCR 앰플리콘 형태 (iii) 를 PstI 로 소화된 pCL PtrcKudzu (A3) 내

로 라이게이션하고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시켰다. 라이게이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 50  $\mu\text{g/ml}$  을 함유하는 LA 에서 선별하였다. 여러 개의 클론을 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pCL PtrcKudzu DXS 로 불렀다 (도 44 및 45).

[0406] II. 상이한 카피 수의 kudzu 이소프렌 합성효소, idi, 및/또는 dxs 를 발현하는 배양물로부터의 상부공간 내 이소프렌의 측정

[0407] 플라스미드 pTrcKudzu(kan) (A), pTrcKudzu-yIDI kan (B), pTrcKudzu-DXS kan (C), pTrcKudzu-yIDI-DXS kan (D) 로 이전에 형질전환된 E. 콜라이 BL21( $\lambda$ DE3) 의 배양물을 LB 카나마이신 50  $\mu\text{g/mL}$  에서 성장시켰다. pCL PtrcKudzu (E), pCL PtrcKudzu, pCL PtrcKudzu-yIDI (F) 및 pCL PtrcKudzu-DXS (G) 의 배양물을 LB 스펙티노마이신 50  $\mu\text{g/mL}$  에서 성장시켰다. 배양물을 시간 0 ( $\text{OD}_{600}$  대략 0.5) 에서 400  $\mu\text{M}$  IPTG 로 유도하고, 이소프렌 상부공간 측정을 위해 샘플을 채취하였다 (실시예 1 참조). 결과를 도 23A-23G 에 제시한다.

[0408] 플라스미드 pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) 를 형질전환에 의해 E. 콜라이 균주 BL21 내로 도입하였다. 수득된 균주 BL21/pTrc Kudzu IDI DXS 를 20 $^{\circ}\text{C}$  에서 카나마이신 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 을 함유하는 LB 에서 밤새 성장시키고, 1% 글루코오스를 함유하는 TM3 (13.6 g  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 13.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 2.0 g 구연산 1 수화물, 0.3 g 철 암모늄 시트레이트, 3.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g 효모 추출물, 1.0 ml 1000 $\times$  Modified Trace Metal Solution, pH 6.8 로 조정된 및  $\text{H}_2\text{O}$  총분량, 및 필터 살균됨) 의 진탕 플라스크에 접종하는데 사용하였다.  $\text{OD}_{600}$  이 0.8 에 도달할 때까지, 플라스크를 30 $^{\circ}\text{C}$  에서 인큐베이션시킨 다음, 400  $\mu\text{M}$  IPTG 로 유도하였다. 유도 후 다양한 시간에 샘플을 채취하고, 상부공간 내 이소프렌의 양을 실시예 1 에 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과를 도 23H 에 제시한다.

[0409] III. E. 콜라이/pTrcKudzu yIDI DXS 내 바이오매스로부터의 이소프렌의 제조

[0410] 균주 BL21 pTrcKudzuIDIDXS 를 대조군으로서 글루코오스와 3 가지 유형의 바이오매스; 버게스, 옥수수 대 및 침엽수 펄프로부터 이소프렌을 생성하는 능력에 대해 시험하였다. 바이오매스의 가수분해산물을 효소적 가수분해에 의해 제조하고 (Brown, L and Torget, R., 1996, NREL 표준 어세이 방법 Lap-009 "Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass"), 글루코오스 등가물에 대해 희석물로서 사용하였다. 상기 예에서, 글루코오스 등가물은 1% 글루코오스와 동일하였다. BL21 (DE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 의 새롭게 형질전환된 세포 플레이트로부터의 단일 콜로니를 5 ml 의 LB + 카나마이신 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 접종에 사용하였다. 배양물을 25 $^{\circ}\text{C}$  에서 밤새 진탕하면서 인큐베이션하였다. 다음날, 밤샘 배양물을 25 ml 의 TM3 + 0.2% YE + 1% 공급원료에  $\text{OD}_{600}$  이 0.05 가 되도록 희석하였다. 공급원료는 옥수수 대, 버게스, 또는 침엽수 펄프였다. 글루코오스를 양성 대조군으로서 사용하였고, 음성 대조군으로서 글루코오스가 사용되지 않았다. 배양물을 180 rpm 으로 진탕하면서 30 $^{\circ}\text{C}$  에서 인큐베이션하였다.  $\text{OD}_{600}$  가  $\sim 0.8$  에 도달할 때까지 배양물을  $\text{OD}_{600}$  에 대해 모니터링하고, 배양물을 실시예 1 에 기재된 바와 같이 이소프렌 제조에 대해 1 및 3 시간에 분석하였다. 배양물을 유도하지 않았다. 첨가된 공급원료를 함유하는 모든 배양물은 글루코오스 양성 대조군과 동등한 이소프렌을 제조한다. 실험을 2 중으로 수행하였고, 도 46 에 제시한다.

[0411] IV. E. 콜라이/pTrcKudzuIDIDXS 내 전화당으로부터의 이소프렌의 제조

[0412] BL21 ( $\lambda$ DE3)/pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 의 새롭게 형질전환된 세포 플레이트로부터의 단일 콜로니를 5 mL 의 LB + 카나마이신 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 접종에 사용하였다. 배양물을 25 $^{\circ}\text{C}$  에서 밤새 진탕하면서 인큐베이션하였다. 다음날, 밤샘 배양물을 25 ml 의 TM3 + 0.2% YE + 1% 공급원료에  $\text{OD}_{600}$  이 0.05 가 되도록 희석하였다. 공급원료는 글루코오스, 전환 글루코오스 또는 옥수수 대였다. 전화당 공급원료 (Danisco Invert Sugar) 를 효소적으로 처리한 수크로오스 시럽에 의해 제조하였다. AFEX 옥수수 대를 하기 기재된 바와 같이 제조하였다 (파트 V). 세포를 30 $^{\circ}\text{C}$  에서 성장시키고, 첫번째 샘플을 배양물의  $\text{OD}_{600}$  가  $\sim 0.8-1.0$  에 도달할 때 측정하였다 (0 시간). 배양물을 0, 1 및 3 시간에 실시예 1 과 같이 이소프렌 제조에 대해,  $\text{OD}_{600}$  에 의해 측정된 바와 같은 성장에 대해 분석하였다. 결과를 도 47 에 제시한다.

[0413] V. AFEX 전처리된 옥수수 대로부터의 가수분해물의 제조

[0414] AFEX 전처리된 옥수수 대를 Michigan Biotechnology Institute 로부터 입수하였다. 전처리 조건은 60% 습도, 1:1 암모니아 적재, 및 90 $^{\circ}\text{C}$  에서 30 분 동안이었고, 그 다음 공기 건조시켰다. AFEX 전처리된 옥수수

대 내의 습도 함량은 21.27% 였다. AFEX 전처리된 옥수수 대 내 글루칸 및 자일란의 함량은 각각 31.7% 및 19.1% (건조 기준) 였다. 당화 과정은 다음과 같았다; 20 g 의 AFEX 전처리된 옥수수 대를 5 ml 의 1 M 나트륨 시트레이트 완충액 pH 4.8, 2.25 ml 의 Accellerase 1000, 0.1 ml 의 Grindamyl H121 (제빵 산업에 대한 아스페르길루스 니케르 (*Aspergillus niger*) 로부터의 Danisco 자일라나아제 제품), 및 72.65 ml 의 DI 물이 있는 500 ml 플라스크에 첨가하였다. 플라스크를 오비탈 셰이커에 넣고, 50℃ 에서 96 시간 동안 인큐베이션하였다. 셰이커로부터 1 개의 샘플을 취하고, HPLC 를 사용하여 분석하였다. 가수분해물에는 38.5 g/l 의 글루코오스, 21.8 g/l 의 자일로오스, 및 10.3 g/l 의 글루코오스 및/또는 자일로오스의 올리고머가 함유되어 있다.

[0415] VI. 공급-배치식 배양물에서 성장한 E. 콜라이 내 이소프렌 제조에 대한 효모 추출물의 효과

[0416] 발효를, 상기 기재된 pTrcKudzu yIDI DXS 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 이전에 기재된 바와 같이 14 L 규모로 수행하였다. 효모 추출물 (Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada) 을 기하급수적 속도로 공급하였다. 발효기에 전달된 효모 추출물의 총 양은 40 시간 발효 동안 70 내지 830 g 이었다. 발효 브로쓰의 광학 밀도를 550 nm 의 파장에서 측정하였다. 발효기 내의 최종 광학 밀도는 첨가된 효모 추출물의 양에 비례하였다 (도 48A). 발효기로부터의 방출-기체 내 이소프렌 수준을 이전에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정에 걸쳐 증가하였다 (도 48B). 제조되는 이소프렌의 양은 공급된 효모 추출물의 양에 선형으로 비례하였다 (도 48C).

[0417] VII. pTrcKudzu DXS yIDI 의 500 L 발효 내 이소프렌의 제조

[0418] kudzu 이소프렌 합성효소, S. 세레비시아에 IDI, 및 E. 콜라이 DXS 핵산 (E. 콜라이 BL21 ( $\lambda$ DE3) pTrc Kudzu dxs yidi) 을 갖는 E. 콜라이 세포의 500 리터 발효를 이소프렌을 제조하기 위해 사용하였다. 이소프렌의 수준은 15 시간의 기간에 걸쳐 50 내지 300  $\mu$ g/L 였다. 평균 이소프렌 농도, 장치를 통한 평균 흐름 및 이소프렌 초기흡착포화선 (breakthrough) 의 범위를 기반으로 하여, 수집된 이소프렌의 양은 대략 17 g 인 것으로 계산되었다.

[0419] VIII. 공급-배치식 배양물에서 성장한 E. 콜라이의 500 L 발효 내 이소프렌의 제조

[0420] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0421]  $K_2HPO_4$  7.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 1000  $\times$  개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고,  $diH_2O$  에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 암모니아 기체 ( $NH_3$ ) 로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0422] 1000 $\times$  개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0423] 구연산 \*  $H_2O$  40 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30 g, NaCl 10 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g,  $ZnSO \cdot 7H_2O$  1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100 mg,  $H_3BO_3$  100 mg,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100 mg. 각 성분을  $diH_2O$  에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22  $\mu$  필터로 필터 멸균하였다.

[0424] 발효를, pTrcKudzu yIDI DXS 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 500 L 생물반응기에서 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 글루코오스 및 효모 추출물로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 수행하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주 접종물을 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지에 조제하였다. 접종물을 550 nm 에서 측정된 OD 0.15 까지 성장시킨 후, 20 ml 을 2.5 L 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지를 함유하는 생물반응기 접종에 사용하였다. 2.5 L 생물반응기를 30℃ 에서 OD 1.0 까지 성장시키고, 2.0 L 를 500 L 생물반응기로 옮겼다.

[0425] 효모 추출물 (Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada) 및 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 50 시간 발효 동안 생물반응기에 전달된 글루코오스 및 효모 추출물의 총 양은 각각 181.2 kg 및 17.6 kg 이었다. 시간에 걸친 생물반응기 내의 광학 밀도를 도 49A 에 제시한다. 생물반응기로부터의 방출-기체 내 이소프렌 수준을 이전에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정에 걸쳐 증가하였다 (도 49B). 50 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 55.1 g 이었고, 제조 시간 과정은 도 49C 에 제시된다.



- [0426] 실시예 8: kudzu 이소프렌 합성효소 및 재조합 메발론산 경로 유전자를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 제조
- [0427] I. 하위 MVA 경로 클로닝
- [0428] 하위 메발론산 경로를 클로닝하기 위한 전략은 다음과 같았다. 메발론산 생합성 경로 중 4 개의 유전자; 메발로네이트 키나아제 (MVK), 포스포메발로네이트 키나아제 (PMK), 디포스포메발로네이트 데카르복실라아제 (MVD) 및 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라아제 유전자를 S. 세레비지아에 염색체 DNA로부터 PCR에 의해 증폭시키고, pCR BluntII TOPO 플라스미드 (Invitrogen) 내에 개별적으로 클로닝하였다. 일부 경우에서, idi 유전자를 E. 콜라이 염색체 DNA로부터 증폭시켰다. E. 콜라이 일치 RBS (AGGAGGT (SEQ ID NO:80) 또는 AAGGAGG (SEQ ID NO:81))를 5' 말단에 삽입하고, 출발 코돈 및 PstI 부위의 8 bp 상류방향을 3' 말단에 첨가하는 식으로 프라이머를 디자인하였다. 그 다음 유전자를 전체 경로가 조립될 때까지 pTrcHis2B 벡터 내로 하나씩 클로닝하였다.
- [0429] S. 세레비지아에 S288C로부터의 염색체 DNA를 ATCC (ATCC 204508D)로부터 입수하였다. 제조자의 지침대로 PfuTurbo를 사용하고 프라이머 MVKF (5'-AGGAGGTAAAAACATGTCATTACCGTTCTTAAGTTCTGC, SEQ ID NO:21) 및 MVK-Pst1-R (5'-ATGCTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCTTATGAAGTCCATGTTAAATTCGTG, SEQ ID NO:22)을 사용하여 S. 세레비지아에의 염색체로부터 MVK 유전자를 증폭시켰다. 올바른 크기의 PCR 생성물 (1370 bp)을 1.2% E-젤 (Invitrogen)을 통해 전기영동에 의해 확인하고, pZeroBLUNT TOPO 내로 클로닝하였다. 수득된 플라스미드를 pMVK1로 지정하였다. 플라스미드 pMVK1을 SacI 및 Taq 1 제한 엔도뉴클라아제로 소화시키고, 분절을 젤 정제하고, SacI 및 BstBI로 소화된 pTrcHis2B 내로 라이게이션하였다. 수득된 플라스미드를 pTrcMVK1이라고 불렀다.
- [0430] 메발론산 생합성 경로 내의 제 2 유전자 PMK를 프라이머: PstI-PMK1 R (5'-GAATTCGCCCTTCTGCAGCTACC, SEQ ID NO:23) 및 BsiHKA I-PMK1 F (5'-CGACTGGTGCACCCCTTAAGGAGGAAAAACATGTCAG, SEQ ID NO:24)를 사용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 반응을 제조자의 지침대로 Pfu Turbo 폴리머라아제 (Stratagene)를 사용하여 수행하였다. 올바른 크기의 생성물 (1387 bp)을 PstI 및 BsiHKA I로 소화시키고, PstI로 소화된 pTrcMVK1 내로 라이게이션시켰다. 수득된 플라스미드를 pTrcKK라고 불렀다. MVD 및 idi 유전자를 동일한 방식으로 클로닝하였다. 프라이머 쌍 PstI-MVD 1 R (5'-GTGCTGGAATTCGCCCTTCTGCAGC, SEQ ID NO:25) 및 NsiI-MVD 1 F (5'-GTAGATGCATGCAGAATTCGCCCTTAAGGAGG, SEQ ID NO:26)을 사용하여 PCR을 수행하여 MVD 유전자를 증폭시키고, PstI-YIDI 1 R (5'-CCTTCTGCAGGACGCGTTGTATAGC, SEQ ID NO:27) 및 NsiI-YIDI 1 F (5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAATGAC, SEQ ID NO:28)로 yIDI 유전자를 증폭시켰다. 일부 경우에서, E. 콜라이로부터의 IPP 이소머라아제 유전자, idi를 사용하였다. E. 콜라이 염색체 DNA로부터 idi를 증폭시키기 위해, 하기 프라이머 세트를 사용하였다: PstI-CIDI 1 R (5'-GTGTGATGGATATCTGCAGAATTCG, SEQ ID NO:29) 및 NsiI-CIDI 1 F (5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAACATG, SEQ ID NO:30). 주형 DNA는 E. 콜라이 FM5로부터 표준 방법에 의해 단리된 염색체 DNA였다 (특히, 핵산의 단리에 관해, 본원에 각각 전체가 참조로서 인용된 WO 96/35796 및 WO 2004/033646). 최종 플라스미드를, 효모 idi 유전자를 코딩하는 구축물에 대해 pKKDIy로 또는 E. 콜라이 idi 유전자를 코딩하는 구축물에 대해 pKKDIc라고 불렀다. 플라스미드를 후속 분석을 위해 E. 콜라이 숙주 BL21 내로 형질전환하였다. 일부 경우에서 kudzu로부터의 이소프렌 합성효소를 pKKDIy 내로 클로닝하여, 플라스미드 pKKDIyIS를 산출하였다.
- [0431] 하위 MVA 경로를 또한 카나마이신 항생제 내성 마커를 함유하는 pTrc 내로 클로닝하였다. 플라스미드 pTrcKKDIy를 제한 엔도뉴클레아제 ApaI 및 PstI로 소화시키고, 5930 bp 분절을 1.2% 아가로오스 E-젤 상에서 분리하고, 제조자의 지침에 따라 Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 정제하였다. 실시예 7에 기재된 플라스미드 pTrcKudzuKan을 제한 엔도뉴클레아제 ApaI 및 PstI로 소화시키고, Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 1.2% E-젤로부터 벡터를 함유하는 3338 bp 분절을 정제하였다. 3338 bp 벡터 분절 및 5930 bp 하위 MVA 경로 분절을 Roche Quick Ligation 키트를 사용하여 라이게이션하였다. 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 카나마이신 (50 µg/ml)을 함유하는 LA 상에서 선별하여 밤새 37°C에서 성장시켰다. 형질전환체를 제한 효소 소화에 의해 입증하고, 하나를 저장물로서 동결시켰다. 플라스미드를 pTrcKanKKDIy로 지정하였다.
- [0432] II. pTrcKanKKDIy 내로의 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 클로닝
- [0433] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를, 프라이머 MCM50 5'-GATCATGTCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAACATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTACT (SEQ ID NO:31) 및 MCM53 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:32)를 사용하여 실시예 1에 기재된 pTrcKudzu로부터



PCR 에 의해 증폭시켰다. 수득된 PCR 분절을 pCR2.1 내에 클로닝하고, E. 콜라이 TOP10 내로 형질전환시켰다. 상기 분절은 kudzu 이소프렌 합성효소에 대한 코딩 서열 및 E. 콜라이로부터의 RBS 을 함유하는 상류방향 영역을 함유한다. 형질전환체를 카르베니실린 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 을 함유하는 LA 상에서 선별하여 밤새 37 $^{\circ}\text{C}$  에서 인큐베이션하였다. 분절의 올바른 삽입을 서열분석에 의해 입증하였고, 상기 균주를 MCM93 으로 지정하였다.

[0434] 균주 MCM93 으로부터의 플라스미드를 제한 엔도뉴클레아제 NsiI 및 PstI 로 소화시켜, RBS 및 kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 1724 bp 삽입체를 방출시켰다. 1724 bp 분절을 1.2% 아가로오스 E-젤 상에서 분리하고, 제조자의 지침에 따라 Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 정제하였다. 플라스미드 pTrcKanKKDIy 를 제한 엔도뉴클레아제 PstI 로 소화시키고, SAP 로 30 분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$  에서 처리하고, Qiagen PCR 클린업 (cleanup) 키트를 사용하여 정제하였다. DNA 분절을 코딩하는 플라스미드 및 kudzu 이소프렌 합성효소를 Roche Quick Ligation 키트를 사용하여 라이게이션하였다. 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 50  $\mu\text{g/ml}$  으로 카나마이신을 함유하는 LA 상에서 선별하여 37 $^{\circ}\text{C}$  에서 밤새 성장시켰다. 올바른 형질전환체를 제한 소화에 의해 입증하고, 플라스미드를 pTrcKKDIyIkISKan 이라고 지정하였다 (도 24 및 25). 상기 플라스미드를 BL21( $\lambda$ DE3) 세포 (Invitrogen) 내로 형질전환시켰다.

[0435] III. kudzu 로부터 재조합 하위 메발로네이트 경로 및 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 내 메발로네이트로부터의 이소프렌 제조.

[0436] 균주 BL21/pTrcKKDIyIkISKan 을 pH 7.1 로 조정하고 0.5% 글루코오스 및 0.5% 메발론산을 보충한 MOPS 배지 (Neidhardt et al., (1974) *J. Bacteriology* 119:736-747) 내에서 배양하였다. 또한, 동일한 조건을 사용하나, 0.5% 메발론산을 첨가하지 않은 대조군 배양물을 설정하였다. 1% 접종물이 있는 밤샘 종자 배양물로부터 배양을 시작하고, 배양물의 OD<sub>600</sub> 이 0.3 내지 0.5 에 도달할 때 500  $\mu\text{M}$  IPTG 로 유도하였다. 배양물을 250 rpm 으로 진탕하면서 30 $^{\circ}\text{C}$  에서 성장시켰다. 이소프렌 제조를 실시예 1 에 기재된 상부공간 어세이를 사용함으로써 유도 3 시간 후에 분석하였다. 이소프렌의 최대 제조는  $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol/L}_{\text{브로쓰}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$  (식 중,  $L_{\text{브로쓰}}$  는 브로쓰의 부피이고, 여기에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 모두 포함된다) 였다. 메발론산을 보충하지 않은 대조군 배양물은 측정가능한 이소프렌을 제조하지 않았다.

[0437] IV. 상위 MVA 경로 클로닝

[0438] 3 개의 효소 활성을 코딩하는 2 개의 유전자를 포함하는 상위 메발로네이트 생합성 경로를 엔테로코쿠스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis) 로부터 클로닝하였다. mvaE 유전자는 경로 내의 첫번째 및 세번째 단백질인 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제 및 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA (HMG-CoA) 리덕타아제 모두의 효소 활성을 갖는 단백질을 코딩하고, mvaS 유전자는 경로 내 제 2 효소인 HMG-CoA 합성효소를 코딩한다. mvaE 유전자를 하기 프라이머를 사용하여 앞쪽에 스페이서 및 E. 콜라이 리보솜 결합 부위를 갖는 E. 파에칼리스 게놈 DNA (ATCC 700802D-5) 로부터 증폭시켰다:

[0439] CF 07-60 (+) mvaE w/RBS + ATG 출발 코돈 SacI 의 출발

[0440] 5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAACATGAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:34)

[0441] CF 07-62 (-) 사이에 RBS 를 갖는 mvaS 에 대해 mvaE 를 융합함

[0442] 5' -TTTATCAATCCAATTGTCATGTTTTTACCTCCTTTATTGTTTCTTAAATC (SEQ ID NO:35)

[0443] mvaS 유전자를 하기 프라이머를 사용하여 앞쪽에 E. 콜라이로부터 스페이서 및 RBS 를 갖는 E. 파에칼리스 게놈 DNA (ATCC 700802D-5) 로부터 증폭시켰다:

[0444] CF 07-61 (+) 사이에 RBS 를 갖는 mvaS 에 대해 mvaE 를 융합함

[0445] 5' -GATTTAAGAAACAATAAAGGAGGTAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA (SEQ ID NO:36)

[0446] CF 07-102 (-) mvaS 유전자 BglIII 의 말단

[0447] 5' -GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:37)

[0448] PCR 분절을 하기 프라이머를 사용하는 PCR 로 함께 융합하였다:

[0449] CF 07-60 (+) mvaE w/RBS + ATG 출발 코돈 SacI 의 출발

- [0450] 5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:34)
- [0451] CF 07-102 (-) mvaS 유전자 BglII 의 말단
- [0452] 5'-GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:37)
- [0453] 융합 PCR 분절을 Qiagen 키트를 사용하여 정제하고, 제한 효소 SacI 및 BglIII 로 소화시켰다. 상기 소화된 DNA 분절을 Qiagen 키트를 사용하여 젤 정제하고, SacI 및 BglIII 로 소화된 시판 벡터 pTrcHis2A 내로 라이게이션하고, 젤 정제하였다.
- [0454] 라이게이션 믹스를 E. 콜라이 Top 10 세포 내에 형질전환하고, 콜로니를 LA+50  $\mu$ g/ml 카르베니실린 플레이트 상에서 선별하였다. 총 6 개의 콜로니를 선택하고, LB+50  $\mu$ g/ml 카르베니실린에서 밤새 성장시키고, Qiagen 키트를 사용하여 플라스미드를 단리하였다. 플라스미드를 SacI 및 BglIII 로 소화시켜 삽입물을 확인하고, 하나의 올바른 플라스미드를 하기 프라이머로 서열분석하였다:
- [0455] CF 07-58 (+) mvaE 유전자의 출발
- [0456] 5' - ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:38)
- [0457] CF 07-59 (-) mvaE 유전자의 말단
- [0458] 5' - ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAATAGC (SEQ ID NO:39)
- [0459] CF 07-82 (+) mvaS 유전자의 출발
- [0460] 5' - ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:40)
- [0461] CF 07-83 (-) mvaS 유전자의 말단
- [0462] 5' - TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:41)
- [0463] CF 07-86 (+) mvaE 내 서열
- [0464] 5' - GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:42)
- [0465] CF 07-87 (+) mvaE 내 서열
- [0466] 5' - TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:43)
- [0467] CF 07-88 (+) mvaE 내 서열
- [0468] 5' - GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:44)
- [0469] CF 07-89 (+) 서열 mvaS
- [0470] 5' - GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:45)
- [0471] pTrcHis2UpperPathway#1 이라고 불리는 플라스미드를 서열분석에 의해 정정하고, 시판 E. 콜라이 균주 BL21 내로 형질전환시켰다. LA+ 50  $\mu$ g/ml 카르베니실린 상에서 선별하였다. 2 개의 형질전환체를 선택하고, 이들의 OD<sub>600</sub> 이 1.5 에 도달할 때까지 LB+ 50  $\mu$ g/ml 카르베니실린에서 성장시켰다. 글리세롤의 존재하에 -80 °C 의 바이알에서 모든 균주를 동결시켰다. 균주를 BL21 내 pTrcHis2UpperPathway#1 에 대해서는 CF 449, 단리물 #1 및 BL21 내 pTrcHis2UpperPathway#1 에 대해서는 CF 450, 단리물 #2 로 지정하였다. 분석 시 모든 클론은 동일하게 행동하는 것으로 발견되었다.
- [0472] V. pCL1920 내로의 UpperMVA Pathway 의 클로닝
- [0473] 플라스미드 pTrcHis2UpperPathway 를 제한 엔도뉴클레아제 SspI 으로 소화시켜, pTrc-mvaE-mvaS-(His 태그)-터미네이터를 함유하는 분절을 방출시켰다. 상기 분절에서, his-태그는 번역되지 않았다. 상기 뭉툭한 말단 4.5 kbp 분절을 Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 1.2% E-젤로부터 정제하였다. pCL1920 으로부터의 탈인산화된, 뭉툭한 말단 4.2 kbp 분절을, 벡터를 제한 엔도뉴클레아제 PvuII 로 소화시키고, SAP 로 처리하고, Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 1.2% E-젤로부터 젤 정제함으로써 제조하였다. Roche Quick Ligation Kit 를 사용하여 2 개의 분절을 라이게이션하고, TOP10 화학적으로 수용능이 된 세포 내에 형질전환시켰다. 형질전환체를 스펙티노마이신 (50  $\mu$ g/ml) 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. PCR 에 의한 삽입물의 존재에 대해 스크리닝함으로써 올바른 콜로니를 확인하였다. 플라스미드를 pCL PtrcUpperPathway

(도 26 및 27A-27D) 로 지정하였다.

[0474] VI. 조합된 상위 및 하위 메발론산 경로를 발현하는 균주

[0475] 완전한 메발론산 경로와 kudzu 이소프렌 합성효소를 갖는 균주를 수득하기 위해, 플라스미드 pTrcKKDyIkISkan 및 pCLpTrcUpperPathway 를 모두 BL21( $\lambda$ DE3) 수용능 세포 (Invitrogen) 내에 형질전환시키고, 형질전환체를 카나마이신 (50  $\mu$ g/ml) 및 스펙티노마이신 (50  $\mu$ g/ml) 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 모든 플라스미드가 숙주 내에 유지되었는지를 확인하기 위해 형질전환체를 플라스미드 프랩에 의해 체크하였다. 균주를 MCM 127 로 지정하였다.

[0476] VII. E. 콜라이/pUpperpathway 내 글루코오스로부터 메발론산의 제조

[0477] BL21/pTrcHis2A-mvaE/mvaS 또는 FM5/p pTrcHis2A-mvaE/mvaS 의 단일 콜로니를 LB + 카르베니실린 (100  $\mu$ g/ml) 내에 접종하고, 200 rpm 으로 진탕하면서 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 상기 배양물을 250 ml 배플 플라스크 내의 50 ml 배지 내에 OD<sub>600</sub> 이 0.1 이 되도록 희석하였다. 배지는 TM3 + 1 또는 2% 글루코오스 + 카르베니실린 (100  $\mu$ g/ml) 또는 TM3 + 1% 글루코오스 + 가수분해된 대두 오일 + 카르베니실린 (100  $\mu$ g/ml) 또는 TM3 + 바이오매스 (조제된 버개스, 옥수수 대 또는 지팽이풀) 이었다. 배양물을 OD<sub>600</sub> 0.4 에 도달할 때까지 대략 2-3 시간 동안 200 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 성장시켰다. 이 시점에, mvaE mvaS 구축물로부터의 발현을 IPTG (400  $\mu$ M) 의 첨가에 의해 유도하였다. 2 시간 간격에서 유도 후 6 시간 (그 다음 필요하면 24, 36 및 48 시간) 에 채취된 샘플로 추가 20 또는 40 시간 동안 배양물을 인큐베이션하였다. 1 ml 의 배양물을 제거하고, OD<sub>600</sub> 을 측정하고, 마이크로퓨즈 내 세포를 펠렛화하고, 상청액을 제거하고, 이것을 메발론산에 대해 분석함으로써 샘플링을 수행하였다.

[0478] 엔테로코쿠스 파에칼리스 AA-CoA 티올라아제, HMG-CoA 합성효소, 및 HMG-CoA 리덕타아제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 갖는 E. 콜라이 세포의 14 리터 발효로 세포 배지로서 TM3 배지 및 2% 글루코오스와 함께 22 그램의 메발론산이 제조되었다. 상기 세포의 진탕 플라스크는 세포 배양 배지로서 LB 배지 및 1% 글루코오스와 함께 1 리터 당 2-4 그램의 메발론산을 제조하였다. 상기 균주에서의 메발론산의 제조는 MVA 경로가 E. 콜라이에서 기능을 하였음을 나타내었다.

[0479] VIII. 상위 및 하위 MVA 경로와 kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 E. 콜라이 BL21 로부터의 이소프렌의 제조.

[0480] 하기 균주를 상위 및 하위 MVA 경로를 함유하는 플라스미드 및 상기 기재된 바와 같은 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 및 idi, dxs, 및 dxr 을 함유하는 플라스미드 및 실시예 7 에 기재된 이소프렌 합성효소 유전자의 다양한 조합으로의 형질전환에 의해 제작하였다. 사용된 숙주 세포는 화학적으로 수용능이 된 BL21( $\lambda$ DE3) 이었고, 형질전환을 표준 방법에 의해 수행하였다. 형질전환체를 카나마이신 (50  $\mu$ g/ml) 또는 카나마이신 + 스펙티노마이신 (모두 농도는 50  $\mu$ g/ml 임) 을 함유하는 L 아가 상에서 선별하였다. 플레이트를 37°C 에서 성장시켰다. 수득된 균주를 하기와 같이 지정하였다:

[0481] 카나마이신 + 스펙티노마이신 (각각 50  $\mu$ g/ml) 상에서 성장함

[0482] MCM127 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pCL Upper MVA + pTrcKKDyIkIS (kan)

[0483] MCM131 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pCL1920 + pTrcKKDyIkIS (kan)

[0484] MCM125 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pCL Upper MVA + pTrcHis2B (kan)

[0485] 카나마이신 (50  $\mu$ g/ml) 상에서 성장함

[0486] MCM64 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pTrcKudzu yIDI DXS (kan)

[0487] MCM50 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pTrcKudzu (kan)

[0488] MCM123 - BL21( $\lambda$ DE3) 내 pTrcKudzu yIDI DXS DXR (kan)

[0489] 상기 균주를 동결 저장액으로부터 LA + 적합한 항생제에 스트리킹하고, 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 각 플레이트로부터 단일 콜로니를 진탕 플라스크 (25 ml LB + 적합한 항생제) 에 접종하는데 사용하였다. 플라스크를 200 rpm 으로 진탕하면서 밤새 22°C 에서 인큐베이션시켰다. 다음날 아침, 플라스크를 37°C 인큐베이터로 옮기고, 200 rpm 으로 진탕하면서 추가 4.5 시간 동안 성장시켰다. 세포를 펠렛화하기 위해 25 ml 배

양물을 원심분리하고, 세포를 5 ml LB + 적합한 항생제에 재현탁시켰다. 그 다음 배양물을 OD<sub>600</sub> 가 0.1 이 되도록 25 ml LB+ 1% 글루코오스 + 적합한 항생제 내에 희석하였다. 각 균주에 대해 2 개의 플라스크를 배정하고, 하나의 세트는 IPTG (800 μM) 로 유도하고, 제 2 세트는 유도하지 않았다. 배양물을 250 rpm 으로 진탕하면서 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 1 세트의 배양물을 1.50 시간 (샘플링 시점 1 후 즉시) 후에 유도하였다. 각 샘플링 시점에, OD<sub>600</sub> 을 측정하고, 이소프렌의 양을 실시예 1 에 기재된 바와 같이 측정하였다.

결과를 표 3 에 제시한다. 제조된 이소프렌의 양을 특정 균주에 대해 피크 제조시 양으로 나타낸다.

**표 3. E. 콜라이 균주 내 이소프렌의 제조**

균주	이소프렌 (μg/리터/OD/hr)
MCM50	23.8
MCM64	289
MCM125	ND
MCM131	미량
MCM127	874

ND: 검출되지 않음

미량: 피크는 존재하나 적분가능하지 않음.

#### IX. 메발론산의 분석

메발로노락톤 (1.0 g, 7.7 mmol) (CAS# 503-48-0) 을 물 (7.7 mL) 에 용해된 시럽으로서 Sigma-Aldrich (WI, USA) 로부터 공급받고, 메발론산의 칼륨 염을 생성하기 위해 수산화칼륨 (7.7 mmol) 으로 처리하였다. 메발론산으로의 전환을 <sup>1</sup>H NMR 분석에 의해 확인하였다. HPLC 분석용 샘플을 14,000 rpm 으로 5 분 동안 원심분리에 의해 제조하여 세포를 제거한 후, 300 μl 상청액 분취액을 900 μl 의 H<sub>2</sub>O 에 첨가하였다. 그 다음 과염소산 (70% 용액 36 μl) 을 첨가한 후 혼합하고 빙상에서 5 분 동안 냉각시켰다. 그 다음 샘플을 다시 원심분리하고 (14,000 rpm, 5 분 동안), 상청액을 HPLC 로 옮겼다. 메발론산 표준 (20, 10, 5, 1 및 0.5 g/L) 을 동일한 방식으로 제조하였다. 메발론산 (20 uL 주사 부피) 분석을, 굴절률 (RI) 검출로 0.6 mL/분에서 5 mM 황산으로 용리되는 BioRad Aminex 87-H+ 컬럼 (7.0 mm 에 의해 300 mm) 을 사용하여 HPLC 에 의해 수행하였다. 상기 조건 하에서 메발론산은 18.5 분에 락톤 형태로서 용리되었다.

X. 상위 MVA 경로 + kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 E. 콜라이 BL21 로부터의 이소프렌의 제조

메발론산 경로 폴리펩티드 + Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이의 15 L 규모 발효를 사용하여, 공급-배치식 배양액 내 세포로부터 이소프렌을 제조하였다. 상기 실험은 글루코오스 제한 조건 하에서 성장하는 세포가 2.2 g/L 의 이소프렌을 제조한다는 것을 증명한다.

배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5 g, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, 및 NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

발효를, pCL PtrcUpperPathway (도 26) 및 pTrcKKDyIkIS 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB

브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 소이 톤-효모 추출물-글루코오스 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0500] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 54 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 3.7 kg 이었다. 이소프로필-베타-D-1-티오갈락토피라노시드 (IPTG) 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm 에서의 광학 밀도 (OD<sub>550</sub>) 가 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 μM 로 하였다. OD<sub>550</sub> 이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 으로 상승시켰다. IPTG 농도를 38 시간 발효 시 100 μM 로 증가시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 54 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 2.2 g/L 로 증가되었다 (도 55). 54 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 15.9 g 이었고, 제조 시간 과정은 도 56 에 제시된다.

[0501] XI. 15 L 규모의 공급-배치식 배양물에서 성장하고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이로부터의 이소프렌 발효

[0502] 메발론산 경로 폴리펩티드 및 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이의 15 L 규모 발효를 공급-배치식 배양물 내 세포로부터 이소프렌을 제조하는데 사용하였다. 상기 실험은 글루코오스 제한 조건 하에서 성장하는 세포가 3.0 g/L 의 이소프렌을 제조한다는 것을 증명한다.

[0503] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0504] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5 g, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0505] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0506] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, 및 NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0507] pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0508] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 59 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 2.2 kg 이었다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm 에서의 광학 밀도 (OD<sub>550</sub>) 가 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 μM 로 하였다. OD<sub>550</sub> 이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 으로 상승시켰다.

시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 93 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 3.0 g/L 로 증가되었다 (도 94). 59 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 22.8 g 이었고, 제조 시간 과정은 도 95 에 제시된다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 몰 수율은 2.2% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 1.0% 였다.

[0509] XII. 15 L 규모의 공급-배치식 배양물에서 성장하고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이로부터



의 이소프렌 발효

- [0510] 메발론산 경로 폴리펩티드, 푸에라리아 로바타 (*Pueraria lobata*) 이소프렌 합성효소, 및 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 *E. 콜라이*의 15 L 규모 발효를 공급-배치식 배양물 내 세포로부터 이소프렌을 제조하는데 사용하였다. 상기 실험은 글루코오스 제한 조건 하에서 성장하는 세포가 3.3 g/L 의 이소프렌을 제조한다는 것을 증명한다.
- [0511] i) pCLPtrcUpperPathwayHGS2 의 구축
- [0512] 푸에라리아 로바타 (*Pueraria lobata*) 로부터 이소프렌 합성효소를 코딩하는 유전자를 프라이머 NsiI-RBS-HGS F (CTTGATGCATCCTGCATTCGCCCTTAGGAGG, SEQ ID NO:88) 및 pTrcR (CCAGGCAAATTCTGTTTATCAG, SEQ ID NO:89), 및 pTrcKKDyIkIS 를 주형으로서 사용하여 PCR 증폭시켰다. 그렇게 수득된 PCR 생성물을 NsiI 및 PstI 로 제한 소화시키고, 젤 정제하였다. 플라스미드 pCL PtrcUpperPathway 를 PstI 로 제한 소화시키고, 제조자의 지침에 따라 rAPid 알칼리 포스파타아제 (Roche) 를 사용하여 탈인산화시켰다.
- [0513] 상기 DNA 분절을 함께 라이게이션하고, 라이게이션 반응물을 *E. 콜라이* Top 10 화학적으로 수용능이 된 세포 (Invitrogen) 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 (50 ug/ml) 을 함유하는 L 아가 상에 플레이팅하고, 37℃ 에서 밤새 인큐베이션하였다. 플라스미드 DNA 를 Qiaquick Spin Mini-prep 키트를 사용하여 6 개의 클론으로부터 제조하였다. 플라스미드 DNA 를 제한 효소 EcoRV 및 MluI 으로 소화시켜 삽입물이 오른쪽 방향을 갖는 클론을 확인하였다 (즉, pTrc 프로모터와 동일한 방향의 유전자).
- [0514] 수득된 올바른 플라스미드를 pCLPtrcUpperPathwayHGS2 로 지정하였다. 상기 플라스미드를 본원에 기재된 상부공간 어레이를 사용하여 어레이하고, *E. 콜라이* Top 10 내 이소프렌을 제조하였음을 발견하여, 유전자의 기능성을 입증하였다. 플라스미드를 pTrcKKDyIkIS 를 함유하는 BL21(LDE3) 내로 형질전환시켜, 균주 BL21/pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS 를 산출하였다. 상기 균주는 BL21/pCL PtrcUpperMVA 및 pTrcKKDyIkIS 균주와 비교하여 이소프렌 합성효소의 추가 카피를 갖는다 (실시에 8, 파트 XI). 상기 균주는 또한 실시에 8, 파트 XI 에서 사용된 BL21/pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKDyIkIS 균주와 비교해 HMGS 의 발현 및 활성이 증가하였다.
- [0515] ii) 15 L 규모의 공급-배치식 배양물에서 성장하고 pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS 를 발현하는 *E. 콜라이*로부터의 이소프렌 발효
- [0516] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):
- [0517] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다:  $K_2HPO_4$  7.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고,  $diH_2O$  에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.
- [0518] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):
- [0519] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \*  $H_2O$  40 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30 g, NaCl 10 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g,  $ZnSO \cdot 7H_2O$  1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100 mg,  $H_3BO_3$  100 mg, 및  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100 mg. 각 성분을  $diH_2O$  에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22  $\mu$  필터로 필터 멸균하였다.
- [0520] pCLPtrcUpperPathwayHGS2 및 pTrc KKDyIkIS 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) *E. 콜라이* 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 *E. 콜라이* 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.
- [0521] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 58 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 2.1 kg

이었다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm 에서의 광학 밀도 (OD<sub>550</sub>) 가 9 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 uM 로 하였다. OD<sub>550</sub> 이 170 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 uM 으로 상승시켰다.

시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 104 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 3.3 g/L 로 증가되었다 (도 105). 58 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 24.5 g 이었고, 제조 시간 과정은 도 106 에 제시된다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 몰 수율은 2.5% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 1.2% 였다. 분석으로 이소프렌 합성효소의 활성이 CL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 BL21 (테이터는 제시되지 않음) 과 비교하여 대략 3-4 배 증가하였음을 보여주었다.

[0522] XIII. E. 콜라이 내 하위 메발로네이트 경로의 염색체 통합.

[0523] 메발로네이트 키나아제, 메발로네이트 포스페이트 키나아제, 메발로네이트 피로포스페이트 데카르복실라아제, 및 IPP 이소머라아제를 함유하는 합성 오페론을 E. 콜라이의 염색체 내에 통합시켰다. 바람직한 경우, 오페론의 상이한 프로모터 5' 를 통합시켜 발현이 변경될 수 있다.

[0524] 표 9 에는 본 실험에 사용된 프라이머를 나열한다.

[0525] 표 9. 프라이머

MCM78	통합 구축물을 위한 attTn7 업 역방향	gcatgctcgagcggccgcTTTTAATCAAACATCCTGC CAACTC (SEQ ID NO:91)
MCM79	통합 구축물을 위한 attTn7 다운 역방향	gatcgaagggcgatcgTGTCACAGTCTGGCGAAACCG (SEQ ID NO:92)
MCM88	통합 구축물을 위한 attTn7 업 정방향	ctgaattctgcagataatcTGTTTTTCCACTCTTCGTTCA CTTT (SEQ ID NO:93)
MCM89	통합 구축물을 위한 attTn7 다운 정방향	tctagagggccccAAGAAAAATGCCCGCTTACG (SEQ ID NO:94)
MCM104	GI1.2 프로모터 - MVK	Gatcgcggccgcggcccttgacgatgccacatcctgagcaataat tcaaccactaattgtgagcggataacacaaggaggaaacagctat gtcattaccgttctaacttc (SEQ ID NO:95)
MCM105	aspA 터미네이터 - yIdI	Gatcggggccccaagaaaaaggcagtcacatctgacgtgccttttt attgtgacgcggtgttatagcattcta (SEQ ID NO:96)
MCM120	attTn7 의 정방향 : attTn7 상동성, GB 마커 상동성	aaagtagccgaagatgacggtttgtcacatggagttggcaggatgt ttgattaaaagcAATTAACCTCACTAAAGGGCGG (SEQ ID NO:97)
MCM127	1.2 GI 의 역방향 보원물 : GB 마커 상동성 (예외적으로 긴), 프로모터, RBS, ATG	AGAGTGTTCCACCAAAAAATAATAACCTTTCCCG GTGCAgaagttaagaacggaatgacatagctgttcctcctgt gttatccgctcacaattagtggtgaattattgtcaggatgtggcatc gtcaagggcTAATACGACTCACTATAGGGCTCG (SEQ ID NO:98)

[0526]

[0527] i) 표적 벡터 구축

[0528] 통합을 위해 attTn7 부위를 선택하였다. 상동성 상류방향 (attTn7 업) (프라이머 MCM78 및 MCM79) 및 하류 방향 (attTn7 다운) (프라이머 MCM88 및 MCM89) 영역을 MG1655 세포로부터 PCR 에 의해 증폭시켰다. 1uL 10uM 프라이머, 3uL ddH<sub>2</sub>O, 45uL Invitrogen Platinum PCR Supermix High Fidelity, 및 MG1655 의 스크랩한 콜로니를 함유하는 50 uL 반응물을 94℃ 에서 2:00 동안 변성시키고, 25 회 (94℃ 에서 2:00, 50℃ 에서 0:30, 및 68℃ 에서 1:00) 사이클에 적용하고, 72℃ 에서 7:00 동안 확장시키고, 4℃ 로 냉각시켰다. 제조자의 지침에 따라 상기 수득된 DNA 를 pCR2.1 (Invitrogen) 내로 클로닝하여, 플라스미드 MCM278 (attTn7 업) 및 MCM252 (attTn7 다운) 를 산출하였다. MCM252 로부터 소화되고 젤 정제된 832bp ApaI-PvuI 분절을 ApaI-PvuI 소화되고 젤 정제된 플라스미드 pR6K 내로 클로닝하여, 플라스미드 MCM276 을 제작하였다. MCM278 로부터 소화되고 젤 정제된 825bp PstI-NotI 분절을 PstI-NotI 소화되고 젤 정제된 MCM276 내로 클로닝하여, 플라스미드 MCM281 을 제작하였다.

[0529] ii) 하위 경로 및 프로모터의 클로닝

[0530] 제조자의 지침에 따라 Roche Expand Long PCR System 을 사용하여 프라이머 MCM104 및 MCM105 로 pTrcKKdyIkIS 로부터 MVK-PMK-MVD-IDI 유전자를 증폭시켰다. 상기 생성물을 NotI 및 ApaI 로 소화시키고, NotI 및 ApaI 로 소화된 MCM281 내로 클로닝시키고 젤 정제하였다. 프라이머 MCM120 및 MCM127 을, Stratagene Pfu Ultra II 를 사용하여 GeneBridges FRT-gb2-Cm-FRT 주형 DNA 로부터 CMR 카세트를 증폭하기 위해 사용하였다.

4:00 동안의 95℃ 에서의 변성, 0:20 동안 95℃, 0:20 동안 55℃, 2:00 동안 72℃ 의 5 회 사이클, 0:20 동안 95℃, 0:20 동안 58℃, 2:00 동안 72℃, 10:00 동안 72℃ 의 25 회 사이클 후, 4℃ 로의 냉각의 PCR 프로그램을 1μL ~10 ng/μL 주형, 1 μL 각 프라이머, 1.25 μL 10 mM dNTPs, 5 μL 10x 완충액, 1 μL 효소, 및 39.75 μL ddH<sub>2</sub>O 를 함유하는 4 개의 50 μL PCR 반응에 사용하였다. 반응물을 수집하고, Qiagen PCR 클린업 컬럼으로 정제하고, 플라스미드 MCM296 을 함유하는 물 세정된 Pir1 세포를 전기천공하기 위해 사용하였다. 2.5V 및 200 ohms 에서 2 mM 큐벳 내에서 전기천공을 수행하였다. 30℃ 에서 3 hr 동안 LB 에서 전기천공 반응을 회복시켰다. 형질전환체 MCM330 을 CMP5, Kan50 이 있는 LA 상에서 선별하였다 (도 107 및 108A-108C).

[0531] iii) E. 콜라이 염색체 내로의 통합

[0532] MCM330 으로부터 미니프렙된 DNA (Qiaquick Spin 키트) 를 SnaBI 으로 소화시키고, GeneBridges 플라스미드 pRedET Carb 을 함유하는 BL21(DE3) (Novagen) 또는 MG1655 를 전기천공하는데 사용하였다. 세포를 30℃ 에서 ~OD1 까지 성장시킨 다음, 0.4% L-아라비노오스로 37℃ 에서 1.5 시간 동안 유도하였다. 상기 세포를 4℃ ddH<sub>2</sub>O 로 3 회 세정한 후, 2 μL 의 DNA 를 전기천공시켰다. 클로르암페니콜 (5 ug/ml) 을 함유하는 L 아가 상에서 통합체를 선별하고, 이어서 L 아가 + 카나마이신 (50 ug/ml) 상에서 성장하지 않는다는 것을 확인하였다. BL21 통합체 MCM331 및 MG1655 통합체 MCM333 을 동결시켰다.

[0533] iv) Kudzu 이소프렌 합성효소를 코딩하는 pET24D-Kudzu 의 구축

[0534] kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 pCR2.1 벡터 (Invitrogen) 로부터의 pET24d 벡터 (Novagen) 내로 서브클로닝하였다. 특히, kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 프라이머 MCM50 5'- GATCATGCAT TCGCCCTTAG GAGGTAAAAA AACATGTGTG CGACCTCTTC TCAATTTACT (SEQ ID NO:99) 및 MCM53 5'-CGGTGACGG ATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG (SEQ ID NO: 100) 을 사용하여 pTrcKudzu 주형 DNA 로부터 증폭시켰다. Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 를 사용하여 PCR 반응을 수행하였고, 수득된 PCR 반응물을 pCR2.1-TOPO TA 클로닝 벡터 (Invitrogen) 내로 클로닝하고, E. 콜라이 Top 10 화학적으로 수용능이 된 세포 (Invitrogen) 내로 형질전환시켰다. 카르베니실린 (50 μg/ml) 을 함유하는 L 아가 상에 형질전환체를 플레이트하고, 37℃ 에서 밤새 인큐베이션하였다. 카르베니실린 50 μg/ml 을 함유하는 5 ml Luria Broth 배양물을 단일 형질전환체로 접종하고, 밤새 37℃ 에서 성장시켰다. 5 개의 콜로니를 1 ml 의 액체 배양물 (Luria Broth) 로부터 단리된 플라스미드 DNA 의 서열분석에 의해 올바른 삽입물에 대해 스크리닝하고, QIAprep Spin Mini-prep Kit (Qiagen) 를 사용하여 정제하였다. MCM93 으로 지칭된 수득된 플라스미드는 pCR2.1 백본 내에 kudzu 이소프렌 합성효소 코딩 서열을 함유한다.

[0535] kudzu 코딩 서열을 PciI 및 BamHI (Roche) 로 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 제거하고, QIAquick Gel Extraction 키트 (Qiagen) 를 사용하여 젤 정제하였다. pET24d 벡터 DNA 를 NcoI 및 BamHI (Roche) 로 소화시키고, 새우 알칼리 포스파타아제 (Roche) 로 처리하고, QIAprep Spin Mini-prep Kit (Qiagen) 를 사용하여 정제하였다. kudzu 이소프렌 합성효소 분질을 Rapid DNA Ligation Kit (Roche) 를 사용하여 NcoI/BamHI 소화된 pET24d 로 5:1 분질 대 벡터 비로 총 부피 20 μL 에서 라이게이션시켰다. 라이게이션 혼합물 일부 (5 μL) 를 E. 콜라이 Top 10 화학적으로 수용능이 된 세포 내로 형질전환시키고, 카나마이신 (50 μg/ml) 을 함유하는 L 아가 상에 플레이트시켰다. 올바른 형질전환체를 서열분석에 의해 확인하고, 화학적으로 수용능이 된 BL21(λ DE3)pLysS 세포 (Novagen) 내로 형질전환시켰다. 카나마이신 (50 μg/ml) 을 함유하는 L 아가 상에 37℃ 에서 밤새 성장시킨 후 단일 콜로니를 선별하였다. pET24D-Kudzu 로서 지칭된 수득된 플라스미드의 맵을 도 109 에 제시한다. pET24D-Kudzu 의 서열 (SEQ ID NO: 101) 을 도 110A 및 110B 에 제시한다. 이 이소프렌 합성효소 활성을 상부공간 어세이를 사용하여 확인하였다.

[0536] v) 제조 균주

[0537] 균주 MCM331 및 MCM333 을 플라스미드 pCLPtrcupperpathway 및 pTrcKudzu 또는 pETKudzu 으로 공동형질전환시켜, 표 10 에 제시된 균주를 산출하였다.

[0538] 표 10. 제조 균주

배경	통합된 하위	상위 MVA 플라스미드	이소프렌 합성효소 플라스미드	제조 균주
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM343
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pET24D-Kudzu	MCM335
MG1655	MCM333	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM345

[0539]

[0540]

vi) 15 L 규모의 공급-배치식 배양물에서 성장하고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이로부터의 이소프렌 발효

[0541]

배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0542]

발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다:  $K_2HPO_4$  7.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및  $1000\times$  개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고,  $diH_2O$  에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0543]

$1000\times$  개질미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0544]

$1000\times$  개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \*  $H_2O$  40 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30 g, NaCl 10 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g,  $ZnSO \cdot 7H_2O$  1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100 mg,  $H_3BO_3$  100 mg, 및  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100 mg. 각 성분을  $diH_2O$  에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22  $\mu$  필터로 필터 멸균하였다.

[0545]

pCL PtrcUpperMVA 및 pTrcKudzu 플라스미드 및 상기 기재된 gil.2 통합된 하위 MVA 경로를 함유하는 BL21 (DE3) E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30°C 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0546]

세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 57 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 3.9 kg 이었다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 이산화탄소 증발 속도가 100 mmol/L/hr 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 100  $\mu$ M 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 111A 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다.

[0547]

이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 1.6 g/L 로 증가되었다 (도 111B). 발효 과정 동안 이소프렌의 특이적 생산성은 도 111C 에 제시되고, 1.2 mg/OD/hr 에서 피크를 이루었다. 57 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 16.2 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 몰 수율은 0.9% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 0.4% 였다.

[0548]

XIV. 탄소원으로서 글리세롤을 사용하는 kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 E. 콜라이 BL21 로부터의 이소프렌의 제조

[0549]

Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이의 15 L 규모 발효를 공급-배치식 배양물 내 글리세롤 공급된 세포로부터 이소프렌을 제조하기 위해 사용하였다. 상기 실험은 글리세롤 (글루코오스 없음) 의 존재하에서 성장하는 세포가 2.2 mg/L 의 이소프렌을 제조하였음을 증명한다.

[0550]

배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0551]

발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다:  $K_2HPO_4$  7.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, 구연산 1 수화



물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml.  
모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글리세롤 5.1 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0552] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0553] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, 및 NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0554] pTrcKudzu 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 35℃ 에서 글리세롤로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지 내로 접종하고, 35℃ 에서 성장시켰다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 600 mL 을 7.5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0555] 세포가 550 nm 에서의 광학 밀도 (OD<sub>550</sub>) 가 153 에 도달할 때까지 글리세롤을 기하급수적 속도로 공급하였다.

36 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글리세롤의 총 양은 1.7 kg 이었다. 접종 물 내의 글루코오스 외에는, 생물반응기에 글루코오스를 추가하지 않았다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. OD<sub>550</sub> 이 50 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 20 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 57 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다.

이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 2.2 g/L 로 증가되었다 (도 58). 54 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 20.9 mg 이었고, 제조 시간 과정은 도 59 에 제시된다.

[0556] XV. 탄소원으로서 전화당을 사용하는 15 L 규모에서의 공급-배치식 배양물 내에서 성장하고, 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이로부터의 이소프렌 발효

[0557] 메발론산 경로 폴리펩티드 및 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이의 15 L 규모 발효를 공급-배치식 배양물 내 전화당 공급된 세포로부터 이소프렌을 제조하기 위해 사용하였다. 상기 실험은 전화당의 존재하에서 성장하는 세포가 2.4 g/L 의 이소프렌을 제조하였음을 증명한다.

[0558] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0559] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5 g, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 전화당 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0560] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0561] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, 및 NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0562] pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 전화당으로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생물반



응기에 접종하는데 사용하였다.

[0563] 세포가 정지상에 도달할 때까지 전화당을 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 전화당 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 44 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 전화당의 총 양은 2.4 kg 이었다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm 에서의 광학 밀도 (OD<sub>550</sub>) 가 9 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25  $\mu$ M 로 하였다. OD<sub>550</sub> 이 200 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50  $\mu$ M 로 증가시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 96 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 2.4 g/L 로 증가되었다 (도 97). 44 시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 18.4 g 이었고, 제조 시간 과정은 도 98 에 제시된다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 1.7% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 0.8% 였다.

# [0564] 실시예 9. 바실러스 서브틸리스 내로의 통합을 위한 상위 및 하위 MVA 경로의 구축

## [0565] I. 바실러스 서브틸리스 내 상위 MVA 경로의 구축

[0566] 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 로부터의 상위 경로를 aprE 프로모터의 통제 하에서 B. 서브틸리스 내로 통합한다. 상위 경로는 2 개의 유전자; AACT 및 HMGR 을 코딩하는 mvaE, 및 HMGS 를 코딩하는 mvaS 로 이루어진다. 2 개의 유전자를 mvaS 앞의 RBS 부위 사이에 정지 코돈과 함께 융합하고, aprE 프로모터의 통제 하에 두었다. 터미네이터를 mvaE 유전자 뒤에 위치시켰다. 클로르암페니콜 내성 마커를 mvaE 유전자 후에 클로닝하고, 구축물을 상동성 측면 영역을 사용하여 이중 체크에 의해 aprE 유전자좌에 통합시킨다.

[0567] 4 개의 DNA 분절을 PCR 반응에 의해 서로 융합되도록 하게 할 돌출부를 함유하도록 PCR 에 의해 증폭시킨다. PCR 증폭을 제조자의 지침에 따라 헤르쿨라아제 폴리머라아제를 사용하여 실시한다.

## [0568] 1. PaprE

[0569] CF 07-134 (+) aprE 프로모터 PstI 의 출발

[0570] 5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTCTG (SEQ ID NO: 82)

[0571] CF 07-94 (-) mvaE 에 PaprE 를 융합시킴

[0572] 5'- CAATAATACTACTGTTTTCACTCTTTACCTCTCCTTTTAA (SEQ ID NO: 83)

[0573] 주형: 바실러스 서브틸리스 염색체 DNA

## [0574] 2. mvaE

[0575] CF 07-93 (+) aprE 프로모터에 mvaE 를 융합시킴 (GTG 출발 코돈)

[0576] 5'- TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO: 84)

[0577] CF 07-62 (-) 사이에 RBS 를 두고 mvaS 에 mvaE 를 융합시킴

[0578] 5'- TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTACCTCTTATTGTTTCTTAAATC

[0579] (SEQ ID NO:35)

[0580] 주형: 엔테로코쿠스 파에칼리스 염색체 DNA (ATCC 로부터)

## [0581] 3. mvaS

[0582] CF 07-61 (+) 사이에 RBS 를 두고 mvaS 에 mvaE 를 융합시킴

[0583] 5'-GATTTAAGAAAACAATAAGGAGGTAAAAAACATGACAATTGGGATTGATAAA (SEQ ID NO:36)

[0584] CF 07-124 (-) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴

[0585] 5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)

[0586] 주형: 엔테로코쿠스 파에칼리스 염색체 DNA

- [0587] 4. B. 아밀리퀘파시엔스 알칼리 세린 프로테아제 터미네이터
- [0588] CF 07-123 (+) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0589] 5'- ACCGTTTCGTTCTTATCGAAACTAAAAAACCGGCCTTGGCCCCG (SEQ ID NO:86)
- [0590] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀘파시엔스 터미네이터 BamH1 의 말단
- [0591] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0592] 주형: 바실러스 아밀리퀘파시엔스 염색체 DNA
- [0593] PCR 융합 반응
- [0594] 5. mvaS 에 mvaE 를 융합시킴
- [0595] CF 07-93 (+) aprE 프로모터에 mvaE 를 융합시킴 (GTG 출발 코돈)
- [0596] 5'- TTTAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO: 84)
- [0597] CF 07-124 (-) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0598] 5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)
- [0599] 주형: 상기로부터의 #2 및 3
- [0600] 6. aprE 프로모터에 mvaE-mvaS 를 융합시킴
- [0601] CF 07-134 (+) aprE 프로모터 PstI 의 출발
- [0602] 5'- GACATCTGCAGCTCCATTTCTCTCTGC (SEQ ID NO: 82)
- [0603] CF 07-124 (-) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0604] 5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:85)
- [0605] 주형: 상기로부터의 #1 및 #4
- [0606] 7. 터미네이터에 PaprE-mvaE-mvaS 를 융합시킴
- [0607] CF 07-134 (+) aprE 프로모터 PstI 의 출발
- [0608] 5'- GACATCTGCAGCTCCATTTCTCTCTGC (SEQ ID NO: 82)
- [0609] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀘파시엔스 터미네이터 BamH1 의 말단
- [0610] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0611] 주형: #4 및 #6
- [0612] 생성물을 제한 엔도뉴클레아제 PstI/BamH1 로 소화시키고, PstI/BamH1 로 소화된 pJM102 에 라이게이션시켰다 (Perego, M. 1993. Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*, p. 615-624. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.). 라이게이션을 E. 콜라이 TOP 10 화학적으로 수용능이 된 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 카르베니실린 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 을 함유하는 LA 상에서 선별한다. 서열분석에 의해 올바른 플라스미드를 확인하고, pJMUppperpathway2 (도 50 및 51) 로 지정한다. 정제된 플라스미드 DNA 를 바실러스 서브틸리스 aprEnprE Pxy1-comK 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 클로르암페니콜 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 을 함유하는 L 아가 상에서 선별한다. 올바른 콜로니를 선별하고, 이어서 클로르암페니콜 10, 15 및 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  을 함유하는 L 아가 상에 플레이트팅하여, 상위 경로를 함유하는 카세트의 카피 수를 증폭시킨다.
- [0613] 수득된 균주를 1% 글루코오스 및 1% 를 함유하는 LB 에서 성장시킴으로써 메발론산 제조에 대해 시험한다. 배양물을 메발론산의 제조에 대해 GC 에 의해 분석한다.
- [0614] 이어서 상기 균주를 하위 메발론산 경로의 통합을 위한 숙주로서 사용한다.
- [0615] 하기 프라이머를 상기 다양한 구축물을 서열분석하는데 사용하였다.

- [0616] 서열분석 프라이머:
- [0617] CF 07-134 (+) aprE 프로모터 PstI 의 출발
- [0618] 5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID NO: 82)
- [0619] CF 07-58 (+) mvaE 유전자의 출발
- [0620] 5'- ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID NO:38)
- [0621] CF 07-59 (-) mvaE 유전자의 말단
- [0622] 5'- ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAATAGC (SEQ ID NO:39)
- [0623] CF 07-82 (+) mvaS 유전자의 출발
- [0624] 5'- ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID NO:40)
- [0625] CF 07-83 (-) mvaS 유전자의 말단
- [0626] 5'- TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID NO:41)
- [0627] CF 07-86 (+) mvaE 내 서열
- [0628] 5'- GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID NO:42)
- [0629] CF 07-87 (+) mvaE 내 서열
- [0630] 5'- TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID NO:43)
- [0631] CF 07-88 (+) mvaE 내 서열
- [0632] 5'- GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID NO:44)
- [0633] CF 07-89 (+) 서열 mvaS
- [0634] 5'- GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID NO:45)
- [0635] 형질전환체를 5  $\mu$ g/ml 의 농도로 클로르암페니콜을 함유하는 LA 상에서 선별한다. 하나의 콜로니를 서열분석에 의해 올바른 통합을 갖는지를 확인하고, 수 일에 걸쳐 클로르암페니콜의 농도를 25  $\mu$ g/ml 의 최종 수준으로 증가시켜 함유하는 LA 상에 플레이팅한다. 이것은 관심의 유전자를 함유하는 카세트를 증폭시킨다. 수득된 균주를 CF 455: pJMupperpathway#1 X *Bacillus subtilis* aprEnprE Pxyl comK 로 지정한다 (클로르암페니콜 25  $\mu$ g/ml 을 함유하는 LA 상에서 성장시키기 위해 증폭됨).
- [0636] II. 바실러스 서브틸리스 내 하위 MVA 경로의 구축
- [0637] 유전자 mvk1, pmk, mpd 및 idi 로 이루어진 하위 MVA 경로를 B. 서브틸리스 염색체 (통합 부위) 의 nprE 영역으로부터의 측면 DNA 영역, aprE 프로모터, 및 스펙티노마이신 내성 마커 (도 28 및 29 참조) 로 이루어진 카세트에 조합한다. 상기 카세트를 DNA2.0 에 의해 합성하고, aprE 유전자좌에 통합된 상위 MVA 경로를 함유하는 B. 서브틸리스의 염색체 내에 통합한다. kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 실시예 4 에 기재된 복제 플라스미드로부터 발현시키고, 통합된 상위 및 하위 경로 모두를 갖는 균주 내로 형질전환시킨다.
- [0638] **실시예 10: 예시적 이소프렌 조성물 및 이의 제조 방법**
- [0639] I. 이소프렌 함유 발효 방출-기체의 조성 분석
- [0640] 14 L 규모 발효를 이소프레노이드 전구체 생합성에 대한 전체 메발로네이트 경로, 효모로부터의 이소프레닐 피로포스페이트 이소머라이제, 및 Kudzu 로부터의 이소프렌 합성효소를 코딩하는 2 개의 플라스미드 (pCLupperMev; pTrcKKDyIkIS) 를 함유하는 재조합 E. 콜라이 BL21 (DE3) 균주로 수행하였다. 14 L 탱크로부터의 발효 방출-기체를 피크 이소프렌 생산성 시간 (27.9 시간 경과 발효 시간, "EFT") 근처에 20 mL 상부공간 바이알 내에 수집하고, 휘발성 성분에 대해 상부공간 GC/MS 에 의해 분석한다.
- [0641] 상부공간 분석을 Agilent HP-5MS GC/MS 컬럼 (30 m  $\times$  250  $\mu$ m; 0.25  $\mu$ m 필름 두께) 이 장착된 Agilent 6890 GC/MS 시스템으로 수행하였다. 20 mL 상부공간 바이알로부터 500  $\mu$ L 분취액을 샘플링하기 위해 combiPAL 자동주입기를 사용하였다. GC/MS 방법은 헬륨을 운반 기체로서 1 mL/분의 흐름으로 이용하였다. 주입 포

트를 250℃ 에서 50:1 의 분할 비로 유지하였다. 오븐 온도를 37℃ 에서 초기 2 분 기간에서 유지한 후, 10 분의 총 방법 시간 동안 25℃/분의 속도로 237℃ 로 증가시켰다. Agilent 5793N 질량 선택 검출기는 m/z 29 에서 m/z 300 으로 스캐닝하였다. 상기 시스템의 검출 한계는 대략 0.1 ug/L<sub>기체</sub> 또는 대략 0.1 ppm 이다.

바람직한 경우, 낮은 검출 한계를 갖는 더욱 민감한 장비를 사용할 수 있다.

[0642] 방출-기체는 99.925 % (v/v) 영구 기체 (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub>), 대략 0.075% 이소프렌 (2-메틸-1,3-부타디엔) (~750 ppmv, 2100 μg/L) 및 소량 (<50 ppmv) 의 에탄올, 아세톤, 및 2 개의 C5 프레닐 알코올로 이루어졌다. 수 증기의 양은 측정하지는 않았으나, 0℃ 에서의 평형 증기압과 동일한 것으로 추정되었다. 휘발성 유기 분획의 조성을 GC/MS 크로마토그램 내 피크 하 면적의 적분 (도 86A 및 86B) 에 의해 측정하고, 표 6 에 나열한다. 에탄올 및 아세톤 표준에 대한 검정 곡선은 표준 방법을 사용하여 GC 면적의 기상 농도로의 전환 (단위 ug/L) 을 가능하게 하였다.

[0643] **표 6. 발효 방출-기체 내 휘발성 유기 성분의 조성.** 방출-기체를 이중 메탈로네이트 경로, 효모로부터의 이소프레닐 피로포스페이트 이소머라아제, 및 Kudzu 로부터의 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 균주를 사용하는 발효의 27.9 시간 시점에 분석하였다.

화합물	RT (분)	GC 면적	면적 %	농도 (ug/L)
에탄올	1.669	239005	0.84	62 +/- 6
아세톤	1.703	288352	1.02	42 +/- 4
이소프렌 (2- 메틸 -1,3- 부타디엔 )	1.829	27764544	97.81	2000 +/- 200
3-메틸-3-부텐-1-올	3.493	35060	0.12	<10
3-메틸-2-부텐-1-올	4.116	58153	0.20	<10

[0644]

II. 재조합 E. 콜라이 균주의 발효 동안 이소프렌과 동시 제조되는 미량 휘발성 유기 화합물 (VOC) 의 측정

[0645]

[0646] 14 L 규모 발효를 이소프레노이드 전구체 생합성에 대한 전체 메탈로네이트 경로, 효모로부터의 이소프레닐 피로포스페이트 이소머라아제, 및 Kudzu 로부터의 이소프렌 합성효소를 코딩하는 2 개의 플라스미드 (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS) 를 함유하는 재조합 E. 콜라이 BL21 (DE3) 균주로 수행하였다.

[0647] 발효 방출-기체를 농축을 위해 냉각 상부공간 바이알을 통해 통과시키고, 미량의 휘발성 유기 성분을 확인하였다. 상기 발효로부터의 방출-기체를 석영솜 (2 g) 으로 패킹한 20 mL 상부공간 바이알을 통해 10 분 동안 1 L/분의 속도로 샘플링하고, 드라이 아이스로 -78℃ 로 냉각시켰다. 바이알을 새로운 비닐 캡으로 다시 캡을 씌우고, 실시예 10, 파트 I 에 기재된 조건을 사용하여 트랩된 VOC 에 대해 상부공간 GC/MS 에 의해 분석하였다. 도 87A-87D 에 관찰된 화합물의 비는 발효 방출-기체, -78℃ 에서의 상대적 증기압, 및 질량분석기의 검출기 반응의 전체적 수준의 조합이다. 예를 들어, 산화된 휘발물질 (예를 들어, 아세톤 및 에탄올) 에 대한 이소프렌의 낮은 수준은 -78℃ 에서 상부공간 바이알에 축적되지 않는 정도의 상기 물질의 높은 휘발성의 작용이다.

[0648] 많은 상기 화합물의 존재는 생물학적 공급원으로부터 유도된 이소프렌 조성물에 독특한 것이다. 결과는 도 87A-87D 에 묘사되어 있고, 표 7A 및 7B 에 요약된다.

[0649] **표 7A: -78℃ 에서 저온-트랩핑 후 E. 콜라이 BL21 (DE3) (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS) 에 의해 제조된 방출-기체 내 존재하는 미량 휘발물질.**

화합물	RT (분)	GC 면적 <sup>1</sup>	면적% <sup>2</sup>	비율 % <sup>3</sup>
아세트알데하이드	1.542	4019861	4.841	40.14
에탄올	1.634	10553620	12.708	105.39
아세톤	1.727	7236323	8.714	72.26
2-메틸 -1,3-부타디엔	1.777	10013714	12.058	100.00
1-프로판올	1.987	163574	0.197	1.63
디아세틸	2.156	221078	0.266	2.21
2-메틸 -3- 부텐 -2-올	2.316	902735	1.087	9.01
2-메틸 -1-프로판올	2.451	446387	0.538	4.46
3-메틸 -1-부타날	2.7	165162	0.199	1.65
1-부타놀	2.791	231738	0.279	2.31
3- 메틸 -3- 부텐 -1-올	3.514	14851860	17.884	148.32
3- 메틸 -1-부타놀	3.557	8458483	10.185	84.47
3- 메틸 -2- 부텐 -1-올	4.042	18201341	21.917	181.76
3- 메틸 -2-부테날	4.153	1837273	2.212	18.35
3- 메틸부틸 아세테이트	5.197	196136	0.236	1.96
3- 메틸 -3- 부트 -1- 에닐 아세테이트	5.284	652132	0.785	6.51
2-헥타논	5.348	67224	0.081	0.67
2,5-디메틸피라진	5.591	58029	0.070	0.58
3- 메틸 -2- 부트 -1- 에닐 아세테이트	5.676	1686507	2.031	16.84
6-메틸-5-헥텐-2-온	6.307	101797	0.123	1.02
2,4,5-트리메틸피리딘	6.39	68477	0.082	0.68
2,3,5-트리메틸피라진	6.485	30420	0.037	0.30
(E)-3,7- 디메틸 -1,3,6-옥타트리엔	6.766	848928	1.022	8.48
(Z)-3,7- 디메틸 -1,3,6-옥타트리엔	6.864	448810	0.540	4.48
3- 메틸 -2- 부트 -1-에닐 부티레이트	7.294	105356	0.127	1.05
시트로넬랄	7.756	208092	0.251	2.08
2,3- 시클로헥테놀피리딘	8.98	1119947	1.349	11.18

[0650]

[0651] <sup>1</sup>GC 면적은 열거된 화합물에 상응하는 피크 하의 비-교정된 면적이다.

[0652] <sup>2</sup>면적 % 는 모든 화합물의 총 피크 면적에 상대적인 % 로서 표현되는 피크 면적이다.

[0653] <sup>3</sup>비율 % 는 2-메틸-1,3-부타디엔의 피크 면적에 상대적인 % 로서 표현되는 피크 면적이다.

[0654] 표 7B. -196℃ 에서 저온-트랩핑 후 E. 콜라이 BL21 (DE3) (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS) 에 의해 제조된 방출-기체 내 존재하는 미량 휘발물질.



화합물	RT (분)	GC 면적 <sup>1</sup>	면적% <sup>2</sup>	비율% <sup>3</sup>
아세트알데하이드	1.54	1655710	0.276	0.33
메탄티올	1.584	173620	0.029	0.03
에탄올	1.631	10259680	1.707	2.03
아세톤	1.722	73089100	12.164	14.43
2-메틸-1,3-부타디엔	1.771	506349429	84.269	100.00
메틸 아세테이트	1.852	320112	0.053	0.06
1-프로판올	1.983	156752	0.026	0.03
디아세틸	2.148	67635	0.011	0.01
2- 부타논	2.216	254364	0.042	0.05
2- 메틸 -3- 부텐 -2- 올	2.312	684708	0.114	0.14
에틸 아세테이트	2.345	2226391	0.371	0.44
2- 메틸 -1- 프로판올	2.451	187719	0.031	0.04
3- 메틸 -1- 부타날	2.696	115723	0.019	0.02
3- 메틸 -2- 부타논	2.751	116861	0.019	0.02
1-부타놀	2.792	54555	0.009	0.01
2-펜타논	3.034	66520	0.011	0.01
3- 메틸 -3- 부텐 -1- 올	3.516	1123520	0.187	0.22
3- 메틸 -1- 부타놀	3.561	572836	0.095	0.11
에틸 이소부티레이트	3.861	142056	0.024	0.03
3- 메틸 -2- 부텐 -1- 올	4.048	302558	0.050	0.06
3- 메틸 -2- 부테날	4.152	585690	0.097	0.12
부틸 아세테이트	4.502	29665	0.005	0.01
3- 메틸 부틸 아세테이트	5.194	271797	0.045	0.05
3- 메틸 -3- 부트-1-에닐 아세테이트	5.281	705366	0.117	0.14
3- 메틸 -2- 부트-1-에닐 아세테이트	5.675	815186	0.136	0.16
(E)-3,7-디메틸 -1,3,6-옥타트리엔	6.766	207061	0.034	0.04
(Z)-3,7- 디메틸 -1,3,6-옥타트리엔	6.863	94294	0.016	0.02
2,3-시클로헥테놀피리딘	8.983	135104	0.022	0.03

[0655]

[0656] <sup>1</sup>GC 면적은 열거된 화합물에 상응하는 피크 하의 비-교정된 면적이다.

[0657] <sup>2</sup>면적 % 는 모든 화합물의 총 피크 면적에 상대적인 % 로서 표현되는 피크 면적이다.

[0658] <sup>3</sup>비율 % 는 2-메틸-1,3-부타디엔의 피크 면적에 상대적인 % 로서 표현되는 피크 면적이다.

[0659] III. 발효로부터 유도된 이소프렌 내 C5 탄화수소 이성질체의 부재.

[0660] 발효 방출-기체에 존재하는 이소프렌의 저온-트랩핑을 액체 질소에 냉각된 2 mL 상부공간 바이알을 사용하여 수행하였다. 방출-기체 (1 L/분) 를 먼저, 2 mL 바이알 (-196°C) 내 얼음 및 고체 CO<sub>2</sub> 의 축적을 최소화하기 위해 수산화나트륨 펠렛을 함유하는 20 mL 바이알을 통해 통과시켰다. 대략 10 L 의 방출-기체를 바이알을 통해 통과시키고, 그 후 이것을 배출로 -78°C 로 가온시킨 후, 새로운 바이알 캡으로 다시 밀폐하고 GC/MS 에 의해 분석하였다.

[0661] GC/MS 상부공간 분석을 상부공간 방식으로 100 uL 기체 타이틀 주사기를 사용하는 Agilent 6890 GC/MS 시스템으로 수행하였다. Zebron ZB-624 GC/MS 컬럼 (30 m × 250 μm; 1.40 μm 필름 두께) 을 분석물 분리를 위해 사용하였다. GC 자동주입기에 기체-타이트 100 uL 주사기를 장착시키고, 바늘 높이를 조절하여 2 mL GC 바이알로부터 50 uL 상부공간 샘플을 주사하였다. GC/MS 방법은 헬륨을 운반 기체로서 1 mL/분의 흐름으로 이용하였다. 주입 포트를 200°C 에서 20:1 의 분할 비로 유지하였다. 오븐 온도를 37°C 에서 5 분 분석 기간 동안 유지하였다. Agilent 5793N 질량 선택 검출기는 m/z 55, 66, 67 및 70 에서 단일 이온 모니터링 (SIM) 방식으로 실행하였다. 상기 조건 하에서, 이소프렌은 2.966 분에 용리되는 것으로 관찰되었다 (도 88B). 석유 유도 이소프렌의 표준 (Sigma-Aldrich) 을 또한 상기 방법을 사용하여 분석하였고, 주 피크 바로 전 또는 후에 용리되고 교정된 GC 면적에 근거하여 정량화된 부가적인 C5 탄화수소 이성질체를 함유하는 것으로 발견되었다 (도 88A).

표 8A: 석유-유도 이소프렌의 GC/MS 분석

화합물	RT (분)	GC 면적	총 C5 탄화수소의 영역 %
2- 메틸-1-부텐	2.689	18.2 x 10 <sup>3</sup>	0.017%
(Z)-2-펜텐	2.835	10.6x 10 <sup>4</sup>	0.101%
이소프렌	2.966	10.4x 10 <sup>7</sup>	99.869%
1,3-시클로펜타디엔 (CPD)	3.297	12.8 x 10 <sup>3</sup>	0.012%

표 8B: 발효-유도 이소프렌 (% 총 C5 탄화수소) 의 GC/MS 분석

화합물	RT (분)	교정된 GC 영역	총 C5 탄화수소의%
이소프렌	2.966	8.1 x 10 <sup>7</sup>	100%

별도의 실험에서, 검출기 반응이 각 화합물에 대해 동일하였는지를 측정하기 위해 C5 탄화수소의 표준 혼합물을 분석하였다. 화합물은 2-메틸-1-부텐, 2-메틸- 1,3-부타디엔, (E)-2-펜텐, (Z)-2-펜텐 및 (E)-1,3-펜타디엔이었다. 이 경우, 분석을 50℃ 에서 15 분 동안 유지된 Agilent DB-Petro 컬럼 (100 m × 0.25 mm, 0.50 um 필름 두께) 상에서 수행하였다. GC/MS 방법은 헬륨을 운반 기체로서 1 mL/분의 흐름으로 이용하였다.

주입 포트를 200℃ 에서 50:1 의 분할 비로 유지하였다. Agilent 5793N 질량 선택 검출기는 m/z 19 에서 m/z 250 까지의 전체 스캔 방식으로 실행하였다. 상기 조건하에서, 각각의 표준의 100 ug/L 농도는 실험 오차 내에서 동일한 검출기 반응을 산출하였다.

IV. 고상에 흡착된 이소프렌을 포함하는 조성물.

생물학적으로 제조된 이소프렌을 활성탄에 흡착시켜 50 내지 99.9% 탄소, 0.1% 내지 50% 이소프렌, 0.01% 내지 5% 물, 및 미량 (<0.1%) 의 기타 휘발성 유기 성분을 함유하는 고상을 산출하였다.

발효 방출-기체를 0℃ 로 유지된 구리 응축 코일을 통과시킨 후, 수증기를 제거하기 위해 과립화된 실리카 건조제 필터에 적용하였다. 탈습된 방출-기체를 이소프렌의 초기흡착포화선이 GC/MS 에 의해 필터 배기관에서 검출되는 지점까지 탄소 함유 필터 (Koby Jr, Koby Filters, MA) 를 통과시켰다. 카트리지에 흡착된 이소프렌의 양은 수집 기간에 걸친 방출-기체 내 농도, 전체 흐름 속도 및 % 초기흡착포화를 계산함으로써 간접적으로 측정될 수 있다. 대안적으로는 흡착된 이소프렌은 열, 진공 또는 용매-매개 탈착에 의해 필터로부터 회수할 수 있다.

V. 응축 이소프렌의 수집 및 분석.

발효 방출-기체를 탈습시키고, 적합한 흡착제 (예를 들어, 아스카라이트) 를 통해 여과에 의해 CO<sub>2</sub> 를 제거하였다. 그 다음 수득된 방출-기체 스트림을 스트림 내 VOC 를 축합시키기 위해 액체 질소-냉각 콘덴서를 통과시켰다. 수집 용기는 수득된 이소프렌 축합물을 억제시키기 위해 t-부틸 카테콜을 함유한다. 표준 방법, 예컨대 본원에 기재된 방법을 사용하여 순도를 측정하기 위해 축합물을 GC/MS 및 NMR 에 의해 분석하였다.

VI. 발효에 의한 프레닐 알코올의 제조

Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 균주로부터의 방출-기체의 분석은 이소프렌 및 3-메틸-3-부텐-1-올 (이소프레놀) 모두의 존재하에서 밝혀졌다. 발효에 걸친 발효 방출-기체 내 2 개 화합물의 수준은 상부공간 GC/MS 에 의해 측정되는 바와 같이 도 89 에 제시된다. 획득된 이소프레놀 (3-메틸-3-부텐-1-올, 3-MBA) 의 수준은 이 실험에서 거의 10 ug/L방출기체 였다. 부가적인 실험으로 발효 방출-기체 내 대략 20 ug/L방출기체 의 수준을 제조하였다.

실시예 11: 공급-배치식 배양물에서 발효되고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 성장 및 제조의 분리

실시예 11 은 이소프렌 제조 및 메발론산으로부터의 세포 성장 분리를 나타낸다.

I. 발효 조건

- [0677] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):
- [0678] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다:  $K_2HPO_4$  7.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고,  $diH_2O$  에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.
- [0679] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):
- [0680] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \*  $H_2O$  40 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  30 g, NaCl 10 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g,  $ZnSO \cdot 7H_2O$  1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  100 mg,  $H_3BO_3$  100 mg, 및  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  100 mg. 각 성분을  $diH_2O$  에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22  $\mu$  필터로 필터 멸균하였다.
- [0681] pTrcHis2UpperPathway (또는 pTrcUpperMVA 로 불림, 도 91 및 92A-92C) (50  $\mu$ g/ml 카르바미실린) 또는 pCL PtrcUpperMVA (또한 pCL PtrcUpperPathway 로 불림 (도 26)) (50  $\mu$ g/ml 스펙티노마이신) 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 발효를 수행하였다. 이소프렌이 제조되는 실험을 위해, E. 콜라이 세포에는 또한 pTrc KKdyIkIS (50  $\mu$ g/ml 카나마이신) 플라스미드가 함유된다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30°C 에서 글루코오스로부터 메발론산 또는 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 광학 밀도 1.0 까지 성장한 후, 이것을 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.
- [0682] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 과염소산 (Sigma-Aldrich # 244252) 처리된 샘플 (0.3 M, 4°C 에서 5 분 동안 인큐베이션됨) 을 유기산 HPLC 컬럼 (BioRad # 125-0140) 에 적용하여 발효 브로쓰 내 메발론산 농도를 측정하였다. 브로쓰 메발론산 피크 크기를 D,L-메발로네이트를 형성하기 위해 과염소산이 처리된 메발로놀아세톤 (Sigma-Aldrich # M4667) 으로부터 발생하는 검정 곡선과 비교하여 농도를 측정하였다. 생물반응기로부터의 방출-기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도를 발효 브로쓰 1 리터 당 제조되는 이소프렌의 양으로서 정의한다.
- [0683] II. 150 L 규모에서 pTrcUpperMVA 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 세포로부터의 메발론산 제조
- [0684] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 BL21 (DE3) 세포를 45 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 170 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 5 시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 용액을 트립톤-효모 추출물 배지의 5 L 생물반응기로 옮기고, 배양물의  $OD_{550}$  이 1.0 에 도달할 때까지 세포를 27.5 rpm 으로 30°C 에서 성장시켰다. 5 L 의 접종물을 45 kg 의 배지를 함유하는 150 L 생물반응기 내에 시딩하였다.  $OD_{550}$  이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.1 mM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내  $OD_{550}$  프로파일을 도 60A 에 제시한다. 메발론산 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 61.3 g/L (도 60B) 으로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 60C 에 제시되어 있고, 도 60A 와의 비교는 성장과 메발론산 제조의 분리를 증명한다. 52.5 시간 발효 동안 제조된 메발론산의 총 양은 이용된 글루코오스 14.1 kg 으로부터 4.0 kg 이었다. 발효 동안 메발론산 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 34.2% 였다.
- [0685] III. 15 L 규모에서 pTrcUpperMVA 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 세포로부터의 메발론산 제조
- [0686] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 BL21 (DE3) 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30°C 에서  $OD_{550}$  이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다.  $OD_{550}$  이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.0 mM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내  $OD_{550}$  프로파일을 도 61A 에 제시한다. 메발론산 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 53.9 g/L (도 61B) 으로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 61C 에 제시되어 있고, 도 61A 와의 비교는 성장과 메발론산 제조의 분리

를 증명한다. 46.6 시간 발효 동안 제조된 메발론산의 총 양은 이용된 글루코오스 2.1 kg 으로부터 491 g 이었다. 발효 동안 메발론산 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 28.8% 였다.

[0687] IV. 15 L 규모에서 pTrcUpperMVA 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 FM5 세포로부터의 메발론산 제조

[0688] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 FM5 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다.

상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 30 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.0 mM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 62A 에 제시한다.

메발론산 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 23.7 g/L (도 62B) 으로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 62C 에 제시되어 있고, 도 62A 와의 비교는 성장과 메발론산 제조의 분리를 증명한다.

51.2 시간 발효 동안 제조된 메발론산의 총 양은 이용된 글루코오스 1.1 kg 으로부터 140 g 이었다. 발효 동안 메발론산 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 15.2% 였다.

[0689] V. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 세포로부터의 이소프렌 제조

[0690] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 BL21 (DE3) 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 μM 로 하였다.

OD<sub>550</sub> 이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 로 증가시켰다. 발효 38 시간에 IPTG 농도를 100 μM 로 상승시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 63A 에 제시한다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 2.2 g/L 브로쓰 (도 63B) 로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 63C 에 제시되어 있고, 도 63A 와의 비교는 성장과 이소프렌 제조의 분리를 증명한다. 54.4 시간 발효 동안 제조된 이소프렌의 총 양은 이용된 글루코오스 2.3 kg 으로부터 15.9 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 1.53% 였다.

[0691] VI. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 튜너 세포로부터의 이소프렌 제조

[0692] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 BL21 (DE3) 튜너 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 26 μM 로 하였다. OD<sub>550</sub> 이 175 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 로 증가시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 64A 에 제시한다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 1.3 g/L 브로쓰 (도 64B) 로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 64C 에 제시되어 있고, 도 64A 와의 비교는 성장과 이소프렌 제조의 분리를 증명한다. 48.6 시간 발효 동안 제조된 이소프렌의 총 양은 이용된 글루코오스 1.6 kg 으로부터 9.9 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 1.34% 였다.

[0693] VII. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 MG1655 세포로부터의 이소프렌 제조

[0694] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 MG1655 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 45 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 24 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 65A 에 제시한다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 393 mg/L 브로쓰로 증가시켰다 (도 65B). 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 65C 에 제시되어 있고, 도 65A 와의 비교는 성장과 이소프렌 제조의 분리를 증명한다. 67.4 시간 발효 동안 제조된 이소프렌

의 총 양은 이용된 글루코오스 520 g 으로부터 2.2 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 0.92% 였다.

[0695] VIII. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 MG1655ack-pta 세포로부터의 이소프렌 제조

[0696] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 MG1655ack-pta 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 30 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 66A 에 제시한다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 368 mg/L 브로쓰로 증가시켰다 (도 66B). 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 66C 에 제시되어 있고, 도 66A 와의 비교는 성장과 이소프렌 제조의 분리를 증명한다. 56.7 시간 발효 동안 제조된 이소프렌의 총 양은 이용된 글루코오스 531 g 으로부터 1.8 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 0.73% 였다.

[0697] IX. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 FM5 세포로부터의 이소프렌 제조

[0698] 실시예 11, 파트 I 에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 발현하는 FM5 세포를 500 mL 의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm 으로 30℃ 에서 OD<sub>550</sub> 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD<sub>550</sub> 이 15 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 27 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD<sub>550</sub> 프로파일을 도 67A 에 제시한다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 235 mg/L 브로쓰로 증가시켰다 (도 67B). 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 67C 에 제시되어 있고, 도 67A 와의 비교는 성장과 이소프렌 제조의 분리를 증명한다. 52.3 시간 발효 동안 제조된 이소프렌의 총 양은 이용된 글루코오스 948 g 으로부터 1.4 g 이었다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 0.32% 였다.

[0699] **실시예 12: 공급-배치식 배양물에서 발효되고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. 콜라이의 기하급수적 성장상 동안의 이소프렌의 제조**

[0700] 실시예 12 는 세포의 기하급수적 성장상 동안의 이소프렌의 제조를 예증한다.

[0701] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0702] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5 g, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 및 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH<sub>2</sub>O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%) 으로 pH 를 7.0 로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 \* HCl 0.1 g, 및 항생제를 첨가하였다.

[0703] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0704] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 \* H<sub>2</sub>O 40 g, MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 30 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO \* 7H<sub>2</sub>O 1 g, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg, 및 NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 100 mg. 각 성분을 diH<sub>2</sub>O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0705] pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKdyIkIS 플라스미드를 함유하는 ATCC11303 E. 콜라이 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30℃ 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37℃ 에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm 에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL 을 5 L 생



물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0706] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 50 시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 2.0 kg 이었다. IPTG 를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm 에서의 광학 밀도 ( $OD_{550}$ ) 가 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25  $\mu$ M 로 하였다.  $OD_{550}$  이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50  $\mu$ M 로 증가시켰다.

시간에 따른 생물반응기 내  $OD_{550}$  프로파일을 도 99 에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 1.4 g/L (도 100) 로 증가시켰다. 50 시간 발효 동안 제조된 이소프렌의 총 양은 10.0 g 이었다. 생물반응기 내에서 시간에 걸친 이소프렌 특이적 생산성의 프로파일은 도 101 에 제시된다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 물 수율은 1.1% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 0.5% 였다.

### [0707] 실시예 13: 이소프렌의 가연성 모델링 및 시험

#### [0708] I. 이소프렌의 가연성 모델링 및 시험 요약

[0709] 가연성 모델링 및 실험을 다양한 탄화수소/산소/질소/물/이산화탄소 혼합물에 대해 수행하였다. 상기 모델링 및 시험된 실험은 고정된 압력 및 온도에서 구체적인 스팀 및 일산화탄소 농도 하에서의 이소프렌 및 산소/질소 가연성 곡선을 규정하기 위한 것이었다. 모델 조건의 매트릭스를 표 4 에 제시하고, 수행된 실험 매트릭스를 표 5 에 제시한다.

[0710] 표 4. 모델링된 이소프렌 가연성의 요약

시리즈	온도 (°C)	압력 (psig)	스팀 농도 (중량 %)	일산화탄소 농도 (중량 %)	이소프렌 농도 (부피 %)	산소 농도 (부피 %)
A	40	0	0	0	가변적	가변적
B	40	0	4	0	가변적	가변적
C	40	0	0	5	가변적	가변적
D	40	0	0	10	가변적	가변적
E	40	0	0	15	가변적	가변적
F	40	0	0	20	가변적	가변적
G	40	0	0	30	가변적	가변적

[0712] 표 5. 이소프렌 가연성 시험의 요약

시리즈 번호	온도 (°C)	압력 (psig)	스팀 농도 (부피 %)	이소프렌 농도 (부피 %)	산소 농도 (부피 %)
1	40	0	0	가변적	가변적
2	40	0	4	가변적	가변적

#### [0714] II. 계산된 단일 불꽃 온도 (CAFT) 모델의 설명

[0715] 연소 발생에 대해 선택된 제한 불꽃 온도에 따른 계산된 단일 불꽃 온도 (CAFT) 를 이소프렌에 대한 가연성 엔벨로프를 측정하기 위해 사용하였다. 불꽃 온도를 계산하기 위해 본 연구에 사용된 컴퓨터 프로그램은 NASA Glenn Research Center CEA (Chemical Equilibrium with Applications) 소프트웨어이다.

[0716] 균질 연소 메카니즘 (연소 및 산화제 모두가 기체 상태인) 에 대한 단일 불꽃 온도 모델을 사용하는 가연성 엔벨로프를 측정하는데 5 단계가 포함된다: 바람직한 반응물의 선택, 시험 조건의 선택, 제한 불꽃 온도의 선택, 반응물의 개질, 및 계산으로부터 가연성 엔벨로프의 구축.

[0717] 상기 첫번째 단계인 바람직한 반응물의 선택에서는, 시스템에 존재할 반응물 종류 및 각각의 양으로서 결정해야만 한다. 많은 경우, 계산에 사용되는 컴퓨터 프로그램은 반응물 목록 및 제품 종류를 가지고 있다. 연구되는 종류에 대한 데이터 중 임의의 것이 프로그램에서 발견되지 않는 경우, 이들을 JANAF 표와 같은 다른 공급원 또는 인터넷으로부터 입수할 수 있다. 상기 현행 모델에서 물, 질소, 산소 및 이산화탄소에 대한 데이터는 프로그램 데이터베이스에 존재하였다. 프로그램 데이터베이스는 종류로서 이소프렌을 가지지 않았다;

그러므로 열역학적 특성은 수동으로 입력하였다.

- [0718] 다음 단계는 연소 과정이 일어나는 초기 압력 및 온도 조건을 결정하는 단계이다. 이 모델에서 압력은 1 대 기압 (절대) 이었고, 온도는 이소프렌의 비등점인 40℃ 였다.
- [0719] 연소에 대한 제한 불꽃 온도는 이론적 원리에 근거해 선택되거나 실험적으로 측정될 수 있다. 각 방법은 스스로의 제한을 갖는다.
- [0720] 이전 연구에 근거해, 탄화수소의 제한 불꽃 온도는 1000 K 내지 1500 K 범위에 놓였다. 이 모델을 위해, 1500 K 의 값을 선택하였다. 이것은 일산화탄소의 이산화탄소로의 반응 (고도의 발열 반응, 및 대부분의 비율의 불꽃 에너지를 구성함) 이 자가 유지되게 되는 온도이다.
- [0721] 일단 제한 불꽃 온도가 결정되면, 제공된 반응 혼합물 (종류 농도) 에 대해 모델 계산을 수행하고, 단일 불꽃 온도를 결정한다. 불꽃 발생은 온도가 제한 불꽃 온도보다 높은 경우에만 발생한 것으로 간주된다. 그 다음 반응 혼합물 조성을 변경시켜 발생 및 비-발생 혼합물에 대한 데이터 세트를 작성하였다.
- [0722] 상기 유형의 모델은 실험적으로 측정된 연소 한계와 양호한 일치성을 보인다. 유도된 엔벨로프 외부의 영역은 불연성이고 내부 영역은 가연성이다. 엔벨로프의 형태는 코를 형성한다. 엔벨로프의 코는 기체 연료에 대한 제한 산소 농도 (LOC) 와 관련된다.
- [0723] III. 계산된 단일 불꽃 온도 (CAFT) 모델로부터의 결과
- [0724] 도 68 내지 74 에 작성된 것은 시리즈 A 내지 G 각각에 대한 CAFT 모델 결과이다. 도면은 계산된 단일 불꽃 온도 (NASA CEA 프로그램 사용) 를 여러 산소/질소 비율 (중량) 에 대한 연료 농도 (중량) 의 함수로서 작성한다. 선택된 제한 불꽃 온도인 1500 K 초과인 곡선의 일부는, 불꽃 발생에 충분한 연료 수준을 함유한다. 결과는 도 68 내지 74 에 제시된 형태로 해석되기는 어려울 수 있다. 부가적으로는, 현행 형태는 일반적으로 부피로 제시된 실험 데이터와 비교하기 위해 수행되기에는 좋지 않다.
- [0725] 실시예로서 시리즈 A 를 사용하여 도 68 에서의 데이터를 전통적 가연성 엔벨로프의 형태로 플롯팅할 수 있다. 도 68 및 세로좌표 상의 1500 K 온도선을 가로지르는 판독을 사용하여, 교차하는 각 곡선에 대해 접선 대 가로좌표 (산소 대 질소 비) 를 떨어뜨림으로서 상기 제한 불꽃 온도에 대한 연료 농도를 측정할 수 있다. 상기 값은 제시된 중량% 의 산화제 (도 75A) 에 대한 연료의 중량% 로서 표에 나타낼 수 있다. 그 다음 연료의 조성 (100 중량% 이소프렌) 및 산화제의 조성 (물, 산소 및 질소의 상대적 함량) 을 알면 물량을 달성할 수 있다.
- [0726] 상기 물량으로부터 % 부피 농도를 계산할 수 있다. 그 다음 부피로 농도는 가연성 엔벨로프를 작성하기 위해 플롯팅될 수 있다 (도 75B). 엔벨로프에 의해 둘러싸인 면적은 폭발성 범위이고, 배제된 면적은 비-폭발성 범위이다. 엔벨로프의 "코" 는 제한 산소 농도이다. 도 76A 및 76B 는 도 69 에 제시된 데이터로부터 발생된 시리즈 B 에 대한 가연성 엔벨로프에 대해 계산된 부피 농도가 제시되어 있다. 도 70-74 에 제시된 데이터에 대해 유사한 접근법이 사용될 수 있다.
- [0727] IV. 가연성 시험 실험 장비 및 절차
- [0728] 가연성 시험 4 리터 고압 용기에서 수행하였다. 용기는 내부 직경 6" 및 내부 높이 8.625" 의, 실린더 형태였다. 용기의 온도 (및 내부 기체) 를 PID 통제기에 의해 통제되는 외부 가열기를 사용하여 유지하였다. 열 손실을 막기 위해, 압력 용기 주변에 세라믹 울과 반사 단열제를 둘러쌌다. 유형 K 열전대를 기체 공간의 온도 뿐 아니라 용기 자체의 온도를 측정하기 위해 사용하였다. 도 77 은 시험 용기를 나타낸다.
- [0729] 시험을 실시하기 전, 용기를 비우고, 질소로 퍼지하여, 이전 시험으로부터의 임의의 기체가 제거되었음을 확실히 하였다. 그 다음 용기에 진공을 적용했다. 이후 수행된 압력은 전형적으로 대략 0.06 bar(a) 였다. 질소 퍼지로 인해, 상기 초기압을 담당하는 기체가 질소인 것으로 가정하였다. 부분압을 사용하고, 물, 이소프렌, 질소, 및 산소를 적합한 양으로 첨가하여 문제의 시험 조건을 달성하였다. 용기 내의 자석으로 움직이는 혼합 팬은 기체 내용물의 혼합을 확실히 하였다. 점화 대략 1 분 전에 팬을 꺼서, 약 2 분 동안 기체가 혼합되게 하였다.
- [0730] 점화기는 타이머 회로 상의 1.5 ohm 니크롬 코일 및 AC 볼트 공급원으로 구성되었다. 오실로스코프를 사용하여, 34.4 VAC 가 3.2 초 동안 점화기에 전달된 것으로 측정되었다. 3.8 amps 의 최대 전류가 점화 사이클 내에서는 대략 절반으로 발생하였다. 그러므로, 최대 파워는 131 W 이었고, 점화 사이클에 걸쳐 제공된 총

에너지는 대략 210 J 이었다.

[0731] 데이터 습득 시스템에 연결된 가변적 자기저항 Validyne DP215 압력 전송기를 사용하여 폭연 데이터를 습득하였다. 압력 상승이 5% 이상이었을 경우 기체 혼합물이 폭연된 것으로 간주하였다.

[0732] V. 가연성 시험 결과

[0733] 첫번째 실험 시리즈 (시리즈 1) 를 스팀 없이 40℃ 및 0 psig 에서 실행하였다. 다양한 농도의 이소프렌 및 산소에서의 실험 실행으로 도 78A 에 제시된 가연성 곡선을 산출하였다. 상기 곡선에서 제시된 데이터 지점은 오직 곡선 경계에 있는 것이다. 상기 시리즈로부터 취득된 모든 데이터 지점의 상세한 목록은 도 80A 및 80B 에 제시된다.

[0734] 도 78B 는 도 78A 에서 제시된 폭발성 데이터 지점을 요약한다. 도 78C 는 CAFT 모델 예측 가연성 엔벨로프의 실험 데이터의 비교이다. 모델은 실험 데이터에 매우 잘 들어맞는다. 불일치는 시험 챔버의 비-단열 특성 및 모델의 제한으로 인한 것일 수 있다. 모델은 산화 반응에 대한 무한한 시간 수평선을 보고, 임의의 반응 동역학 제한하는 것은 고려하지 않는다.

[0735] 부가적으로는, 모델은 데이터베이스에 있는 평형 화학 종류의 수가 제한되어 있으므로, 열분해 종류를 적절하게 예측할 수 없을 것이다. 또한, 모델에 의해 개발되는 가연성 엔벨로프는 제한 불꽃 온도 (1500K) 에 대해 하나의 값을 사용한다. 제한 불꽃 온도는 반응하는 화학적 종류에 따라 1,000K 내지 1,500K 의 값의 범위일 수 있다. 화학량론적 연료/산화제 수준 초과와 연료 농도에서 형성되는 열분해 화학 종류의 착물 특성이, 이 모델이 상기 시스템에 대한 상위 가연성 제한을 정확하게 예측할 수 없는지에 대한 하나의 이유이다.

[0736] 제 2 실험 시리즈 (시리즈 2) 를 4% 의 고정된 스팀 농도로 40℃ 및 0 psig 에서 실행하였다. 다양한 농도의 이소프렌 및 산소에서의 실험 실행으로 도 79A 에 제시된 가연성 곡선을 산출하였다. 상기 곡선에서 제시된 데이터 지점은 오직 곡선 경계에 있는 것이다. 상기 시리즈로부터 취득된 모든 데이터 지점의 상세한 목록은 도 81 에 제시된다.

[0737] 시리즈 1 의 데이터와의 유사성으로 인해, 하위 가연성 제한, 제한 산소 농도, 및 상위 가연성 제한의 오직 핵심 지점을 시험하였다. 시험 혼합물에 대한 4% 스팀의 첨가는 가연성 엔벨로프의 핵심 제한을 유의하게 변경하지 않았다. 스팀/물 및 또는 기타 비활성물질의 더 높은 농도가 가연성 엔벨로프에 영향을 줄 수 있는 것을 유념해야만 한다.

[0738] 도 79B 는 도 79A 에 제시된 폭발성 데이터 지점을 요약한다. 도 79C 는 CAFT 모델 예상된 가연성 엔벨로프와 실험 데이터의 비교이다. 모델은 실험 데이터와 매우 잘 들어맞는다. 불일치는 시리즈 1 에 기재된 동일한 인자로 인한 것일 수 있다.

[0739] V. 3 대기압에서 공기 내 이소프렌의 가연성 제한 계산

[0740] 실시예 13, 파트 I 내지 IV 에 기재된 방법은 또한 3 대기압 및 40℃ 의 절대 시스템 압력에서 이소프렌의 연소 한계를 계산하기 위해 사용하였다. 상기 결과를 대기압 및 40℃ 의 절대 시스템 압력에서 실시예 13, 파트 I 내지 IV 의 것과 비교하였다. 초기 시스템 압력을 증가시켜 가연성 엔벨로프를 더 크게 확장 또는 성장시키기 때문에 더 높은 압력을 시험하였다. 연소 상한계가 가장 영향을 받았고, 그 다음 산소 조성 제한이었다. 연소 하한계는 가장 적게 영향을 받았다 (예를 들어, 특히, 연소 한계의 계산에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 "Bulletin 627 - Flammability Characteristics of Combustible Gases and Vapors" Michael G. Zabetakis 저, 이전의 US Bureau of Mines 출판 (1965) 참조).

[0741] 도 82 에서, 계산된 단열 불꽃 온도는 총 연료/질소/산소의 중량% (시스템 압력은 초기에는 3 대기압이었음) 로 표현된 이소프렌 (연료) 농도의 함수로서 작성된다. 계산된 불꽃 온도는 1 대기압 시스템에서 초기에 측정된 것과 매우 유사하다 (도 83). 그 결과, 가연성 엔벨로프가 계산된 단열 가연성 데이터를 사용하여 작성되는 경우, 곡선은 매우 유사하였다 (도 84 및 85 참조). 그러므로, 상기 이론적 계산에 근거하여, 1 대기압에서 3 대기압으로의 시스템 압력 증가는 가연성 엔벨로프의 유의한 증가/확장을 낳지는 않는다. 바람직한 경우, 상기 모델 결과는 실험 시험 (예컨대, 1 대기압에서 본원에 기재된 실험 시험) 을 사용하여 입증될 수 있다.

[0742] VII. 가연성 연구 요약

[0743] 계산된 단열 온도 모델을 40℃ 및 0 psig 에서 이소프렌/산소/질소/물/이산화탄소 시스템의 가연성 엔벨로프에

대해 개발하였다. 개발된 CAFT 모델은 상기 작업에서 수행된 시험에 의해 발생하는 실험 데이터와 잘 들어 맞는다. 시리즈 1 및 2 로부터의 실험 결과는 시리즈 A 및 B 로부터의 모델 결과를 입증하였다.

[0744] 다르게 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것들이다. 문헌 [Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York (1994), 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991)] 은 본 발명에서 사용되는 많은 용어에 대한 일반적인 정의를 제공한다.

[0745] 본 발명은 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약이 변화될 수 있으므로 이에 제한되는 것이 아닌 것으로 이해된다. 당업자는 또한 본원에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명을 실시 또는 시험하기 위해 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0746] 본원에 제공된 표제는 전체로서 본 명세서에 참고로 포함될 수 있는 발명의 다양한 양상 또는 구현예의 제한이 아니다. 본원에서 사용하기 위해 다르게 명확하게 표시되지 않는 한, 단수형 표현은 복수형 표현을 나타낸다.

[0747] 본원의 값 또는 매개변수에 대한 표현 "약" 은 자체적 값 또는 매개변수를 지시하는 구현예를 포함 (및 설명) 한다. 예를 들어, "약 X" 를 나타내는 설명은 "X" 의 설명을 포함한다. 수치적 범위는 범위를 한정하는 수치를 포함한다.

[0748] 본원에 기재된 본 발명의 양상 및 구현예에는 양상 및 구현예 "를 포함하는," "로 이루어지는," 및 "로 본질적으로 이루어지는" 것이 포함되는 것으로 이해된다.

[0749] **부록 1**

[0750] 예시적-테옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트 합성효소 핵산 및 폴리펩티드

ATH: AT3G21500(DXPS1) AT4G15560(CLA1) AT5G11380(DXPS3)  
 OSA: 4338768 4340090 4342614  
 CME: CMF089C  
 PFA: MAL13P1.186  
 TAN: TA20470  
 TPV: TP01\_0516  
 ECO: b0420(dxS)  
 ECJ: JW0410(dxS)  
 ECE: Z0523(dxS)  
 ECS: ECs0474  
 ECC: c0531(dxS)  
 ECI: UTI89\_C0443(dxS)  
 ECP: ECP\_0479  
 ECV: APECO1\_1590(dxS)  
 ECW: EcE24377A\_0451(dxS)  
 ECX: EcHS\_A0491  
 STY: STY0461(dxS)  
 STT: t2441(dxS)  
 SPT: SPA2301(dxS)  
 SEC: SC0463(dxS)  
 STM: STM0422(dxS)  
 YPE: YPO3177(dxS)  
 YPK: y1008(dxS)  
 YPM: YP\_0754(dxS)  
 YPA: YPA\_2671  
 YPN: YPN\_0911  
 YPP: YPDSF\_2812  
 YPS: YPTB0939(dxS)  
 YPI: YpsIP31758\_3112(dxS)  
 SFL: SF0357(dxS)

[0751]



SFX: S0365(dxs)  
 SFV: SFV\_0385(dxs)  
 SSN: SSON\_0397(dxs)  
 SBO: SBO\_0314(dxs)  
 SDY: SDY\_0310(dxs)  
 ECA: ECA1131(dxs)  
 PLU: plu3887(dxs)  
 BUC: BU464(dxs)  
 BAS: BUsg448(dxs)  
 WBR: WGLp144(dxs)  
 SGL: SG0656  
 KPN: KPN\_00372(dxs)  
 BFL: Bfl238(dxs)  
 BPN: BPEN\_244(dxs)  
 HIN: HI1439(dxs)  
 HIT: NTHI1691(dxs)  
 HIP: CGSHiEE\_04795  
 HIQ: CGSHiGG\_01080  
 HDU: HD0441(dxs)  
 HSO: HS\_0905(dxs)  
 PMU: PM0532(dxs)  
 MSU: MS1059(dxs)  
 APL: APL\_0207(dxs)  
 XFA: XF2249  
 XFT: PD1293(dxs)  
 XCC: XCC2434(dxs)  
 XCB: XC\_1678  
 XCV: XCV2764(dxs)  
 XAC: XAC2565(dxs)  
 XOO: XOO2017(dxs)  
 XOM: XOO\_1900(XOO1900)  
 VCH: VC0889  
 VVU: VV1\_0315  
 VVY: VV0868

[0752]

VPA: VP0686  
 VFI: VF0711  
 PPR: PBPRA0805  
 PAE: PA4044(dxS)  
 PAU: PA14\_11550(dxS)  
 PAP: PSPA7\_1057(dxS)  
 PPU: PP\_0527(dxS)  
 PST: PSPTO\_0698(dxS)  
 PSB: Psyr\_0604  
 PSP: PSPPH\_0599(dxS)  
 PFL: PFL\_5510(dxS)  
 PFO: Pfl\_5007  
 PEN: PSEEN0600(dxS)  
 PMY: Pmen\_3844  
 PAR: Psyc\_0221(dxS)  
 PCR: Pcryo\_0245  
 ACI: ACIAD3247(dxS)  
 SON: SO\_1525(dxS)  
 SDN: Sden\_2571  
 SFR: Sfri\_2790  
 SAZ: Sama\_2436  
 SBL: Sbal\_1357  
 SLO: Shew\_2771  
 SHE: Shewmr4\_2731  
 SHM: Shewmr7\_2804  
 SHN: Shewana3\_2901  
 SHW: Sputw3181\_2831  
 ILO: IL2138(dxS)  
 CPS: CPS\_1088(dxS)  
 PHA: PSHAa2366(dxS)  
 PAT: Patl\_1319  
 SDE: Sde\_3381  
 PIN: Ping\_2240  
 MAQ: Maqu\_2438

[0753]

MCA: MCA0817(dxs)  
FTU: FTT1018c(dxs)  
FTF: FTF1018c(dxs)  
FTW: FTW\_0925(dxs)  
FTL: FTL\_1072  
FTH: FTH\_1047(dxs)  
FTA: FTA\_1131(dxs)  
FTN: FTN\_0896(dxs)  
NOC: Noc\_1743  
AEH: Mlg\_1381  
HCH: HCH\_05866(dxs)  
CSA: Csal\_0099  
ABO: ABO\_2166(dxs)  
AHA: AHA\_3321(dxs)  
BCI: BCI\_0275(dxs)  
RMA: Rmag\_0386  
VOK: COSY\_0360(dxs)  
NME: NMB1867  
NMA: NMA0589(dxs)  
NMC: NMC0352(dxs)  
NGO: NGO0036  
CVI: CV\_2692(dxs)  
RSO: RSc2221(dxs)  
REU: Reut\_A0882  
REH: H16\_A2732(dxs)  
RME: Rmet\_2615  
BMA: BMAA0330(dxs)  
BMV: BMASAVP1\_1512(dxs)  
BML: BMA10299\_1706(dxs)  
BMN: BMA10247\_A0364(dxs)  
BXE: Bxe\_B2827  
BUR: Bcep18194\_B2211  
BCN: Bcen\_4486  
BCH: Bcen2424\_3879

[0754]

BAM: Bamb\_3250  
 BPS: BPSS1762(dxS)  
 BPM: BURPS1710b\_A0842(dxS)  
 BPL: BURPS1106A\_A2392(dxS)  
 BPD: BURPS668\_A2534(dxS)  
 BTE: BTH\_II0614(dxS)  
 BPE: BP2798(dxS)  
 BPA: BPP2464(dxS)  
 BBR: BB1912(dxS)  
 RFR: Rfer\_2875  
 POL: Bpro\_1747  
 PNA: Pnap\_1501  
 AJS: Ajs\_1038  
 MPT: Mpe\_A2631  
 HAR: HEAR0279(dxS)  
 MMS: mma\_0331  
 NEU: NE1161(dxS)  
 NET: Neut\_1501  
 NMU: Nmul\_A0236  
 EBA: ebA4439(dxS)  
 AZO: azo1198(dxS)  
 DAR: Daro\_3061  
 TBD: Tbd\_0879  
 MFA: Mfla\_2133  
 HPY: HP0354(dxS)  
 HPJ: jhp0328(dxS)  
 HPA: HPAG1\_0349  
 HHE: HH0608(dxS)  
 HAC: Hac\_0968(dxS)  
 WSU: WS1996  
 TDN: Tmden\_0475  
 CJE: Cj0321(dxS)  
 CJR: CJE0366(dxS)  
 CJJ: CJJ81176\_0343(dxS)

[0755]

CJU: C8J\_0298(dxS)  
 CJD: JJD26997\_1642(dxS)  
 CFF: CFF8240\_0264(dxS)  
 CCV: CCV52592\_1671(dxS) CCV52592\_1722  
 CHA: CHAB381\_1297(dxS)  
 CCO: CCC13826\_1594(dxS)  
 ABU: Abu\_2139(dxS)  
 NIS: NIS\_0391(dxS)  
 SUN: SUN\_2055(dxS)  
 GSU: GSU0686(dxS-1) GSU1764(dxS-2)  
 GME: Gmet\_1934 Gmet\_2822  
 PCA: Pcar\_1667  
 PPD: Ppro\_1191 Ppro\_2403  
 DVU: DVU1350(dxS)  
 DVL: Dvul\_1718  
 DDE: Dde\_2200  
 LIP: LI0408(dxS)  
 DPS: DP2700  
 ADE: Adeh\_1097  
 MXA: MXAN\_4643(dxS)  
 SAT: SYN\_02456  
 SFU: Sfum\_1418  
 PUB: SAR11\_0611(dxS)  
 MLO: mlr7474  
 MES: Meso\_0735  
 SME: SMc00972(dxS)  
 ATU: Atu0745(dxS)  
 ATC: AGR\_C\_1351  
 RET: RHE\_CH00913(dxS)  
 RLE: RL0973(dxS)  
 BME: BMEI1498  
 BMF: BAB1\_0462(dxS)  
 BMS: BR0436(dxS)  
 BMB: BruAb1\_0458(dxS)

[0756]



BOV: BOV\_0443(dxs)  
 BJA: blI2651(dxs)  
 BRA: BRADO2161(dxs)  
 BBT: BBta\_2479(dxs)  
 RPA: RPA0952(dxs)  
 RPB: RPB\_4460  
 RPC: RPC\_1149  
 RPD: RPD\_4305  
 RPE: RPE\_1067  
 NWI: Nwi\_0633  
 NHA: Nham\_0778  
 BHE: BH04350(dxs)  
 BQU: BQ03540(dxs)  
 BBK: BARBAKC583\_0400(dxs)  
 CCR: CC\_2068  
 SIL: SPO0247(dxs)  
 SIT: TM1040\_2920  
 RSP: RSP\_0254(dxsA) RSP\_1134(dxs)  
 JAN: Jann\_0088 Jann\_0170  
 RDE: RD1\_0101(dxs) RD1\_0548(dxs)  
 MMR: Mmar10\_0849  
 HNE: HNE\_1838(dxs)  
 ZMO: ZMO1234(dxs) ZMO1598(dxs)  
 NAR: Saro\_0161  
 SAL: Sala\_2354  
 ELI: ELI\_12520  
 GOX: GOX0252  
 GBE: GbCGDNIH1\_0221 GbCGDNIH1\_2404  
 RRU: Rru\_A0054 Rru\_A2619  
 MAG: amb2904  
 MGM: Mmc1\_1048  
 SUS: Acid\_1783  
 BSU: BG11715(dxs)  
 BHA: BH2779

[0757]

BAN: BA4400(dxS)  
 BAR: GBAA4400(dxS)  
 BAA: BA\_4853  
 BAT: BAS4081  
 BCE: BC4176(dxS)  
 BCA: BCE\_4249(dxS)  
 BCZ: BCZK3930(dxS)  
 BTK: BT9727\_3919(dxS)  
 BTL: BALH\_3785(dxS)  
 BLI: BL01523(dxS)  
 BLD: BLi02598(dxS)  
 BCL: ABC2462(dxS)  
 BAY: RBAM\_022600  
 BPU: BPUM\_2159  
 GKA: GK2392  
 GTN: GTNG\_2322  
 LMO: lmo1365(tktB)  
 LMF: LMOF2365\_1382(dxS)  
 LIN: lin1402(tktB)  
 LWE: lwe1380(tktB)  
 LLA: L108911(dxSA) L123365(dxSB)  
 LLC: LACR\_1572 LACR\_1843  
 LLM: llmg\_0749(dxSB)  
 SAK: SAK\_0263  
 LPL: lp\_2610(dxS)  
 LJO: LJ0406  
 LAC: LBA0356  
 LSL: LSL\_0209(dxS)  
 LGA: LGAS\_0350  
 STH: STH1842  
 CAC: CAC2077 CA\_P0106(dxS)  
 CPE: CPE1819  
 CPF: CPF\_2073(dxS)  
 CPR: CPR\_1787(dxS)

[0758]

CTC: CTC01575  
 CNO: NT01CX\_1983  
 CTH: Cthe\_0828  
 CDF: CD1207(dxS)  
 CBO: CBO1881(dxS)  
 CBA: CLB\_1818(dxS)  
 CBH: CLC\_1825(dxS)  
 CBF: CLI\_1945(dxS)  
 CKL: CKL\_1231(dxS)  
 CHY: CHY\_1985(dxS)  
 DSY: DSY2348  
 DRM: Dred\_1078  
 PTH: PTH\_1196(dxS)  
 SWO: Swol\_0582  
 CSC: Csac\_1853  
 TTE: TTE1298(dxS)  
 MTA: Moth\_1511  
 MPE: MYPE730  
 MGA: MGA\_1268(dxS)  
 MTU: Rv2682c(dxS1) Rv3379c(dxS2)  
 MTC: MT2756(dxS)  
 MBO: Mb2701c(dxS1) Mb3413c(dxS2)  
 MLE: ML1038(dxS)  
 MPA: MAP2803c(dxS)  
 MAV: MAV\_3577(dxS)  
 MSM: MSMEG\_2776(dxS)  
 MMC: Mmcs\_2208  
 CGL: NCgl1827(cgl1902)  
 CGB: cg2083(dxS)  
 CEF: CE1796  
 CDI: DIP1397(dxS)  
 CJK: jk1078(dxS)  
 NFA: nfa37410(dxS)  
 RHA: RHA1\_ro06843

[0759]

SCO: SCO6013(SC1C3.01) SCO6768(SC6A5.17)  
 SMA: SAV1646(dxsl) SAV2244(dxsl)  
 TWH: TWT484  
 TWS: TW280(Dxs)  
 LXX: Lxx10450(dxsl)  
 CMI: CMM\_1660(dxsl)  
 AAU: AAur\_1790(dxsl)  
 PAC: PPA1062  
 TFU: Tfu\_1917  
 FRA: Francci3\_1326  
 FAL: FRAAL2088(dxsl)  
 ACE: Acel\_1393  
 SEN: SACE\_1815(dxsl) SACE\_4351  
 BLO: BL1132(dxsl)  
 BAD: BAD\_0513(dxsl)  
 FNU: FN1208 FN1464  
 RBA: RB2143(dxsl)  
 CTR: CT331(dxsl)  
 CTA: CTA\_0359(dxsl)  
 CMU: TC0608  
 CPN: CPn1060(tktB\_2)  
 CPA: CP0790  
 CPJ: CPj1060(tktB\_2)  
 CPT: CpB1102  
 CCA: CCA00304(dxsl)  
 CAB: CAB301(dxsl)  
 CFE: CF0699(dxsl)  
 PCU: pc0619(dxsl)  
 TPA: TP0824  
 TDE: TDE1910(dxsl)  
 LIL: LA3285(dxsl)  
 LIC: LIC10863(dxsl)  
 LBJ: LBJ\_0917(dxsl)  
 LBL: LBL\_0932(dxsl)

[0760]

SYN: sll1945(dxS)  
 SYW: SYNW1292(Dxs)  
 SYC: syc1087\_c(dxS)  
 SYF: Synpcc7942\_0430  
 SYD: Syncc9605\_1430  
 SYE: Syncc9902\_1069  
 SYG: sync\_1410(dxS)  
 SYR: SynRCC307\_1390(dxS)  
 SYX: SynWH7803\_1223(dxS)  
 CYA: CYA\_1701(dxS)  
 CYB: CYB\_1983(dxS)  
 TEL: tll0623  
 GVI: gll0194  
 ANA: alr0599  
 AVA: Ava\_4532  
 PMA: Pro0928(dxS)  
 PMM: PMM0907(Dxs)  
 PMT: PMT0685(dxS)  
 PMN: PMN2A\_0300  
 PMI: PMT9312\_0893  
 PMB: A9601\_09541(dxS)  
 PMC: P9515\_09901(dxS)  
 PMF: P9303\_15371(dxS)  
 PMG: P9301\_09521(dxS)  
 PMH: P9215\_09851  
 PMJ: P9211\_08521  
 PME: NATL1\_09721(dxS)  
 TER: Tery\_3042  
 BTH: BT\_1403 BT\_4099  
 BFR: BF0873 BF4306  
 BFS: BF0796(dxS) BF4114  
 PGI: PG2217(dxS)  
 CHU: CHU\_3643(dxS)  
 GFO: GFO\_3470(dxS)

[0761]



FPS: FP0279(dxs)  
CTE: CT0337(dxs)  
CPH: Cpha266\_0671  
PVI: Cvib\_0498  
PLT: Plut\_0450  
DET: DET0745(dxs)  
DEH: cbdb\_A720(dxs)  
DRA: DR\_1475  
DGE: Dgeo\_0994  
TTH: TTC1614  
TTJ: TTHA0006  
AAE: aq\_881  
TMA: TM1770  
PMO: Pmob\_1001

[0762]

[0763] 예시적 아세틸-CoA-아세틸트랜스페라아제 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 38(ACAT1) 39(ACAT2)  
 PTR: 451528(ACAT1)  
 MCC: 707653(ACAT1) 708750(ACAT2)  
 MMU: 110446(Acat1) 110460(Acat2)  
 RNO: 25014(Acat1)  
 CFA: 484063(ACAT2) 489421(ACAT1)  
 GGA: 418968(ACAT1) 421587(RCJMB04\_34i5)  
 XLA: 379569(MGC69098) 414622(MGC81403) 414639(MGC81256)  
 444457(MGC83664)  
 XTR: 394562(acat2)  
 DRE: 30643(acat2)  
 SPU: 759502(LOC759502)  
 DME: Dmel\_CG10932 Dmel\_CG9149  
 CEL: T02G5.4 T02G5.7 T02G5.8(kat-1)  
 ATH: AT5G48230(ACAT2/EMB1276)  
 OSA: 4326136 4346520  
 CME: CMA042C CME087C  
 SCE: YPL028W(ERG10)  
 AGO: AGOS\_ADR165C  
 PIC: PICST\_31707(ERG10)  
 CAL: CaO19.1591(erg10)  
 CGR: CAGL0L12364g  
 SPO: SPBC215.09c  
 MGR: MGG\_01755 MGG\_13499  
 ANI: AN1409.2  
 AFM: AFUA\_6G14200 AFUA\_8G04000  
 AOR: AO090103000012 AO090103000406  
 CNE: CNC05280  
 UMA: UM03571.1  
 DDI: DDB\_0231621  
 PFA: PF14\_0484  
 TET: TTHERM\_00091590 TTHERM\_00277470 TTHERM\_00926980

[0764]

TCR: 511003.60  
 ECO: b2224(atoB)  
 ECJ: JW2218(atoB) JW5453(yqeF)  
 ECE: Z4164(yqeF)  
 ECS: ECs3701  
 ECC: c2767(atoB) c3441(yqeF)  
 ECI: UTI89\_C2506(atoB) UTI89\_C3247(yqeF)  
 ECP: ECP\_2268 ECP\_2857  
 ECV: APECO1\_3662(yqeF) APECO1\_4335(atoB) APECO1\_43352(atoB)  
 ECX: EcHS\_A2365  
 STY: STY3164(yqeF)  
 STT: t2929(yqeF)  
 SPT: SPA2886(yqeF)  
 SEC: SC2958(yqeF)  
 STM: STM3019(yqeF)  
 SFL: SF2854(yqeF)  
 SFX: S3052(yqeF)  
 SFV: SFV\_2922(yqeF)  
 SSN: SSON\_2283(atoB) SSON\_3004(yqeF)  
 SBO: SBO\_2736(yqeF)  
 ECA: ECA1282(atoB)  
 ENT: Ent638\_3299  
 SPE: Spro\_0592  
 HIT: NTHI0932(atoB)  
 XCC: XCC1297(atoB)  
 XCB: XC\_2943  
 XCV: XCV1401(thlA)  
 XAC: XAC1348(atoB)  
 XOO: XOO1881(atoB)  
 XOM: XOO\_1778(XOO1778)  
 VCH: VCA0690  
 VCO: VC0395\_0630  
 VVU: VV2\_0494 VV2\_0741  
 VVY: VVA1043 VVA1210

[0765]

VPA: VPA0620 VPA1123 VPA1204  
 PPR: PBPRB1112 PBPRB1840  
 PAE: PA2001(atoB) PA2553 PA3454 PA3589 PA3925  
 PAU: PA14\_38630(atoB)  
 PPU: PP\_2051(atoB) PP\_2215(fadAx) PP\_3754 PP\_4636  
 PPF: Pput\_2009 Pput\_2403 Pput\_3523 Pput\_4498  
 PST: PSPTO\_0957(phbA-1) PSPTO\_3164(phbA-2)  
 PSB: Psyr\_0824 Psyr\_3031  
 PSP: PSPPH\_0850(phbA1) PSPPH\_2209(phbA2)  
 PFL: PFL\_1478(atoB-2) PFL\_2321 PFL\_3066 PFL\_4330(atoB-2) PFL\_5283  
 PFO: Pfl\_1269 Pfl\_1739 Pfl\_2074 Pfl\_2868  
 PEN: PSEEN3197 PSEEN3547(fadAx) PSEEN4635(phbA)  
 PMY: Pmen\_1138 Pmen\_2036 Pmen\_3597 Pmen\_3662 Pmen\_3820  
 PAR: Psyc\_0252 Psyc\_1169  
 PCR: Pcryo\_0278 Pcryo\_1236 Pcryo\_1260  
 PRW: PsycPRwf\_2011  
 ACI: ACIAD0694 ACIAD1612 ACIAD2516(atoB)  
 SON: SO\_1677(atoB)  
 SDN: Sden\_1943  
 SFR: Sfri\_1338 Sfri\_2063  
 SAZ: Sama\_1375  
 SBL: Sbal\_1495  
 SBM: Shew185\_1489  
 SBN: Sbal195\_1525  
 SLO: Shew\_1667 Shew\_2858  
 SPC: Sputcn32\_1397  
 SSE: Ssed\_1473 Ssed\_3533  
 SPL: Spea\_2783  
 SHE: Shewmr4\_2597  
 SHM: Shewmr7\_2664  
 SHN: Shewana3\_2771  
 SHW: Sputw3181\_2704  
 ILO: IL0872  
 CPS: CPS\_1605 CPS\_2626

[0766]

PHA: PSHAa0908 PSHAa1454(atoB) PSHAa1586(atoB)  
 PAT: Patl\_2923  
 SDE: Sde\_3149  
 PIN: Ping\_0659 Ping\_2401  
 MAQ: Maqu\_2117 Maqu\_2489 Maqu\_2696 Maqu\_3162  
 CBU: CBU\_0974  
 LPN: lpg1825(atoB)  
 LPF: lpl1789  
 LPP: lpp1788  
 NOC: Noc\_1891  
 AEH: Mlg\_0688 Mlg\_2706  
 HHA: Hhal\_1685  
 HCH: HCH\_05299  
 CSA: Csal\_0301 Csal\_3068  
 ABO: ABO\_0648(fadAx)  
 MMW: Mmwy11\_0073 Mmwy11\_3021 Mmwy11\_3053 Mmwy11\_3097 Mmwy11\_4182  
 AHA: AHA\_2143(atoB)  
 CVI: CV\_2088(atoB) CV\_2790(phaA)  
 RSO: RSc0276(atoB) RSc1632(phbA) RSc1637(bktB) RSc1761(RS02948)  
 REU: Reut\_A0138 Reut\_A1348 Reut\_A1353 Reut\_B4561 Reut\_B4738  
     Reut\_B5587 Reut\_C5943 Reut\_C6062  
 REH: H16\_A0170 H16\_A0867 H16\_A0868 H16\_A0872 H16\_A1297  
     H16\_A1438(phaA) H16\_A1445(bktB) H16\_A1528 H16\_A1713 H16\_A1720  
     H16\_A1887 H16\_A2148 H16\_B0380 H16\_B0381 H16\_B0406 H16\_B0662  
     H16\_B0668 H16\_B0759 H16\_B1369 H16\_B1771  
 RME: Rmet\_0106 Rmet\_1357 Rmet\_1362 Rmet\_5156  
 BMA: BMA1316 BMA1321(phbA) BMA1436  
 BMV: BMASAVP1\_A1805(bktB) BMASAVP1\_A1810(phbA)  
 BML: BMA10299\_A0086(phbA) BMA10299\_A0091  
 BMN: BMA10247\_1076(bktB) BMA10247\_1081(phbA)  
 BXE: Bxe\_A2273 Bxe\_A2335 Bxe\_A2342 Bxe\_A4255 Bxe\_B0377 Bxe\_B0739  
     Bxe\_C0332 Bxe\_C0574 Bxe\_C0915  
 BVI: Bcep1808\_0519 Bcep1808\_1717 Bcep1808\_2877 Bcep1808\_3594  
     Bcep1808\_4015 Bcep1808\_5507 Bcep1808\_5644

[0767]



BUR: Bcep18194\_A3629 Bcep18194\_A5080 Bcep18194\_A5091  
 Bcep18194\_A6102 Bcep18194\_B0263 Bcep18194\_B1439  
 Bcep18194\_C6652 Bcep18194\_C6802 Bcep18194\_C6874  
 Bcep18194\_C7118 Bcep18194\_C7151 Bcep18194\_C7332  
 BCN: Bcen\_1553 Bcen\_1599 Bcen\_2158 Bcen\_2563 Bcen\_2998 Bcen\_6289  
 BCH: Bcen2424\_0542 Bcen2424\_1790 Bcen2424\_2772 Bcen2424\_5368  
 Bcen2424\_6232 Bcen2424\_6276  
 BAM: Bamb\_0447 Bamb\_1728 Bamb\_2824 Bamb\_4717 Bamb\_5771 Bamb\_5969  
 BPS: BPSL1426 BPSL1535(phbA) BPSL1540  
 BPM: BURPS1710b\_2325(bktB) BURPS1710b\_2330(phbA)  
 BURPS1710b\_2453(atoB-2)  
 BPL: BURPS1106A\_2197(bktB) BURPS1106A\_2202(phbA)  
 BPD: BURPS668\_2160(bktB) BURPS668\_2165(phbA)  
 BTE: BTH\_I2144 BTH\_I2256 BTH\_I2261  
 PNU: Pnuc\_0927  
 BPE: BP0447 BP0668 BP2059  
 BPA: BPP0608 BPP1744 BPP3805 BPP4216 BPP4361  
 BBR: BB0614 BB3364 BB4250 BB4804 BB4947  
 RFR: Rfer\_0272 Rfer\_1000 Rfer\_1871 Rfer\_2273 Rfer\_2561 Rfer\_2594  
 Rfer\_3839  
 POL: Bpro\_1577 Bpro\_2140 Bpro\_3113 Bpro\_4187  
 PNA: Pnap\_0060 Pnap\_0458 Pnap\_0867 Pnap\_1159 Pnap\_2136 Pnap\_2804  
 AAV: Aave\_0031 Aave\_2478 Aave\_3944 Aave\_4368  
 AJS: Ajs\_0014 Ajs\_0124 Ajs\_1931 Ajs\_2073 Ajs\_2317 Ajs\_3548  
 Ajs\_3738 Ajs\_3776  
 VEI: Veis\_1331 Veis\_3818 Veis\_4193  
 DAC: Daci\_0025 Daci\_0192 Daci\_3601 Daci\_5988  
 MPT: Mpe\_A1536 Mpe\_A1776 Mpe\_A1869 Mpe\_A3367  
 HAR: HEAR0577(phbA)  
 MMS: mma\_0555  
 NEU: NE2262(bktB)  
 NET: Neut\_0610  
 EBA: ebA5202 p2A409(tioL)  
 AZO: azo0464(fadA1) azo0469(fadA2) azo2172(thlA)

[0768]

DAR: Daro\_0098 Daro\_3022  
 HPA: HPAG1\_0675  
 HAC: Hac\_0958(atoB)  
 GME: Gmet\_1719 Gmet\_2074 Gmet\_2213 Gmet\_2268 Gmet\_3302  
 GUR: Gura\_3043  
 BBA: Bd0404(atoB) Bd2095  
 DOL: Dole\_0671 Dole\_1778 Dole\_2160 Dole\_2187  
 ADE: Adeh\_0062 Adeh\_2365  
 AFW: Anae109\_0064 Anae109\_1504  
 MXA: MXAN\_3791  
 SAT: SYN\_02642  
 SFU: Sfum\_2280 Sfum\_3582  
 RPR: RP737  
 RCO: RC1134 RC1135  
 RFE: RF\_0163(paaJ)  
 RBE: RBE\_0139(paaJ)  
 RAK: A1C\_05820  
 RBO: A1I\_07215  
 RCM: A1E\_04760  
 PUB: SAR11\_0428(thlA)  
 MLO: mlr3847  
 MES: Meso\_3374  
 PLA: Plav\_1573 Plav\_2783  
 SME: SMa1450 SMc03879(phbA)  
 SMD: Smed\_0499 Smed\_3117 Smed\_5094 Smed\_5096  
 ATU: Atu2769(atoB) Atu3475  
 ATC: AGR\_C\_5022(phbA) AGR\_L\_2713  
 RET: RHE\_CH04018(phbAch) RHE\_PC00068(ypc00040) RHE\_PF00014(phbAf)  
 RLE: RL4621(phaA) pRL100301 pRL120369  
 BME: BMEI0274 BMEII0817  
 BMF: BAB1\_1783(phbA-1) BAB2\_0790(phbA-2)  
 BMS: BR1772(phbA-1) BRA0448(phbA-2)  
 BMB: BruAb1\_1756(phbA-1) BruAb2\_0774(phbA-2)  
 BOV: BOV\_1707(phbA-1)

[0769]

OAN: Oant\_1130 Oant\_3107 Oant\_3718 Oant\_4020  
 BJA: bli0226(atoB) bli3949 bli7400 bli7819 blr3724(phbA)  
 BRA: BRADO0562(phbA) BRADO0983(pimB) BRADO3110 BRADO3134(atoB)  
 BBT: BBta\_3558 BBta\_3575(atoB) BBta\_5147(pimB) BBta\_7072(pimB)  
 BBta\_7614(phbA)  
 RPA: RPA0513(pcaF) RPA0531 RPA3715(pimB)  
 RPB: RPB\_0509 RPB\_0525 RPB\_1748  
 RPC: RPC\_0504 RPC\_0636 RPC\_0641 RPC\_0832 RPC\_1050 RPC\_2005  
 RPC\_2194 RPC\_2228  
 RPD: RPD\_0306 RPD\_0320 RPD\_3105 RPD\_3306  
 RPE: RPE\_0168 RPE\_0248 RPE\_3827  
 NWI: Nwi\_3060  
 XAU: Xaut\_3108 Xaut\_4665  
 CCR: CC\_0510 CC\_0894 CC\_3462  
 SIL: SPO0142(bktB) SPO0326(phbA) SPO0773 SPO3408  
 SIT: TM1040\_0067 TM1040\_2790 TM1040\_3026 TM1040\_3735  
 RSP: RSP\_0745 RSP\_1354 RSP\_3184  
 RSH: Rsph17029\_0022 Rsph17029\_2401 Rsph17029\_3179 Rsph17029\_3921  
 RSQ: Rsph17025\_0012 Rsph17025\_2466 Rsph17025\_2833  
 JAN: Jann\_0262 Jann\_0493 Jann\_4050  
 RDE: RD1\_0025 RD1\_0201(bktB) RD1\_3394(phbA)  
 PDE: Pden\_2026 Pden\_2663 Pden\_2870 Pden\_2907 Pden\_4811 Pden\_5022  
 DSH: Dshi\_0074 Dshi\_3066 Dshi\_3331  
 MMR: Mmar10\_0697  
 HNE: HNE\_2706 HNE\_3065 HNE\_3133  
 NAR: Saro\_0809 Saro\_1069 Saro\_1222 Saro\_2306 Saro\_2349  
 SAL: Sala\_0781 Sala\_1244 Sala\_2896 Sala\_3158  
 SWI: Swit\_0632 Swit\_0752 Swit\_2893 Swit\_3602 Swit\_4887 Swit\_5019  
 Swit\_5309  
 ELI: ELI\_01475 ELI\_06705 ELI\_12035  
 GBE: GbCGDNIH1\_0447  
 ACR: Acry\_1847 Acry\_2256  
 RRU: Rru\_A0274 Rru\_A1380 Rru\_A1469 Rru\_A1946 Rru\_A3387  
 MAG: amb0842

[0770]

MGM: Mmc1\_1165  
 ABA: Acid345\_3239  
 BSU: BG11319(mmgA) BG13063(yhfS)  
 BHA: BH1997 BH2029 BH3801(mmgA)  
 BAN: BA3687 BA4240 BA5589  
 BAR: GBAA3687 GBAA4240 GBAA5589  
 BAA: BA\_0445 BA\_4172 BA\_4700  
 BAT: BAS3418 BAS3932 BAS5193  
 BCE: BC3627 BC4023 BC5344  
 BCA: BCE\_3646 BCE\_4076 BCE\_5475  
 BCZ: BCZK3329(mmgA) BCZK3780(thl) BCZK5044(atoB)  
 BCY: Bcer98\_2722 Bcer98\_3865  
 BTK: BT9727\_3379(mmgA) BT9727\_3765(thl) BT9727\_5028(atoB)  
 BTL: BALH\_3262(mmgA) BALH\_3642(fadA) BALH\_4843(atoB)  
 BLI: BL03925(mmgA)  
 BLD: BLi03968(mmgA)  
 BCL: ABC0345 ABC2989 ABC3617 ABC3891(mmgA)  
 BAY: RBAM\_022450  
 BPU: BPUM\_2374(yhfS) BPUM\_2941 BPUM\_3373  
 OIH: OB0676 OB0689 OB2632 OB3013  
 GKA: GK1658 GK3397  
 SAU: SA0342 SA0534(vraB)  
 SAV: SAV0354 SAV0576(vraB)  
 SAM: MW0330 MW0531(vraB)  
 SAR: SAR0351(thl) SAR0581  
 SAS: SAS0330 SAS0534  
 SAC: SACOL0426 SACOL0622(atoB)  
 SAB: SAB0304(thl) SAB0526  
 SAA: SAUSA300\_0355 SAUSA300\_0560(vraB)  
 SAO: SAOUHSC\_00336 SAOUHSC\_00558  
 SAJ: SaurJH9\_0402  
 SAH: SaurJH1\_0412  
 SEP: SE0346 SE2384  
 SER: SERP0032 SERP0220

[0771]

SHA: SH0510(mvaC) SH2417  
 SSP: SSP0325 SSP2145  
 LMO: lmo1414  
 LMF: LMOF2365\_1433  
 LIN: lin1453  
 LWE: lwe1431  
 LLA: L11745(thiL) L25946(fadA)  
 LLC: LACR\_1665 LACR\_1956  
 LLM: limg\_0930(thiL)  
 SPY: SPy\_0140 SPy\_1637(atoB)  
 SPZ: M5005\_Spy\_0119 M5005\_Spy\_0432 M5005\_Spy\_1344(atoB)  
 SPM: spyM18\_0136 spyM18\_1645(atoB)  
 SPG: SpyM3\_0108 SpyM3\_1378(atoB)  
 SPS: SPs0110 SPs0484  
 SPH: MGAS10270\_Spy0121 MGAS10270\_Spy0433 MGAS10270\_Spy1461(atoB)  
 SPI: MGAS10750\_Spy0124 MGAS10750\_Spy0452 MGAS10750\_Spy1453(atoB)  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0123 MGAS2096\_Spy0451 MGAS2096\_Spy1365(atoB)  
 SPK: MGAS9429\_Spy0121 MGAS9429\_Spy0431 MGAS9429\_Spy1339(atoB)  
 SPF: SpyM50447(atoB2)  
 SPA: M6\_Spy0166 M6\_Spy0466 M6\_Spy1390  
 SPB: M28\_Spy0117 M28\_Spy0420 M28\_Spy1385(atoB)  
 SAK: SAK\_0568  
 LJO: LJ1609  
 LAC: LBA0626(thiL)  
 LSA: LSA1486  
 LDB: Ldb0879  
 LBU: LBUL\_0804  
 LBR: LVIS\_2218  
 LCA: LSEI\_1787  
 LGA: LGAS\_1374  
 LRE: Lreu\_0052  
 EFA: EF1364  
 OOE: OE0E\_0529  
 STH: STH2913 STH725 STH804

[0772]

CAC: CAC2873 CA\_P0078(thiL)  
 CPE: CPE2195(atoB)  
 CPF: CPF\_2460  
 CPR: CPR\_2170  
 CTC: CTC00312  
 CNO: NT01CX\_0538 NT01CX\_0603  
 CDF: CD1059(thlA1) CD2676(thlA2)  
 CBO: CBO3200(thl)  
 CBE: Cbei\_0411 Cbei\_3630  
 CKL: CKL\_3696(thlA1) CKL\_3697(thlA2) CKL\_3698(thlA3)  
 AMT: Amet\_4630  
 AOE: Clos\_0084 Clos\_0258  
 CHY: CHY\_1288 CHY\_1355(atoB) CHY\_1604 CHY\_1738  
 DSY: DSY0632 DSY0639 DSY1567 DSY1710 DSY2402 DSY3302  
 DRM: Dred\_0400 Dred\_1491 Dred\_1784 Dred\_1892  
 SWO: Swol\_0308 Swol\_0675 Swol\_0789 Swol\_1486 Swol\_1934 Swol\_2051  
 TTE: TTE0549(paaJ)  
 MTA: Moth\_1260  
 MTU: Rv1135A Rv1323(fadA4) Rv3546(fadA5)  
 MTC: MT1365(phbA)  
 MBO: Mb1167 Mb1358(fadA4) Mb3576(fadA5) Mb3586c(fadA6)  
 MBB: BCG\_1197 BCG\_1385(fadA4) BCG\_3610(fadA5) BCG\_3620c(fadA6)  
 MLE: ML1158(fadA4)  
 MPA: MAP2407c(fadA3) MAP2436c(fadA4)  
 MAV: MAV\_1544 MAV\_1573 MAV\_1863 MAV\_5081  
 MSM: MSMEG\_2224 MSMEG\_4920  
 MUL: MUL\_0357  
 MVA: Mvan\_1976 Mvan\_1988 Mvan\_4305 Mvan\_4677 Mvan\_4891  
 MGI: Mflv\_1347 Mflv\_1484 Mflv\_2040 Mflv\_2340 Mflv\_4356 Mflv\_4368  
 MMC: Mmcs\_1758 Mmcs\_1769 Mmcs\_3796 Mmcs\_3864  
 MKM: Mkms\_0251 Mkms\_1540 Mkms\_1805 Mkms\_1816 Mkms\_2836 Mkms\_3159  
       Mkms\_3286 Mkms\_3869 Mkms\_3938 Mkms\_4227 Mkms\_4411 Mkms\_4580  
       Mkms\_4724 Mkms\_4764 Mkms\_4776  
 MJL: Mjls\_0231 Mjls\_1739 Mjls\_1750 Mjls\_2819 Mjls\_3119 Mjls\_3235

[0773]



Mjls\_3800 Mjls\_3850 Mjls\_4110 Mjls\_4383 Mjls\_4705 Mjls\_4876  
 Mjls\_5018 Mjls\_5063 Mjls\_5075  
 CGL: NCgl2309(cgl2392)  
 CGB: cg2625(pcaF)  
 CEF: CE0731 CE2295  
 CJK: jk1543(fadA3)  
 NFA: nfa10750(fadA4)  
 RHA: RHA1\_ro01455 RHA1\_ro01623 RHA1\_ro01876 RHA1\_ro02517(catF)  
 RHA1\_ro03022 RHA1\_ro03024 RHA1\_ro03391 RHA1\_ro03892  
 RHA1\_ro04599 RHA1\_ro05257 RHA1\_ro08871  
 SCO: SCO5399(SC8F4.03)  
 SMA: SAV1384(fadA5) SAV2856(fadA1)  
 ART: Arth\_1160 Arth\_2986 Arth\_3268 Arth\_4073  
 NCA: Noca\_1371 Noca\_1797 Noca\_1828 Noca\_2764 Noca\_4142  
 TFU: Tfu\_1520 Tfu\_2394  
 FRA: Francci3\_3687  
 FRE: Franean1\_1044 Franean1\_2711 Franean1\_2726 Franean1\_3929  
 Franean1\_4037 Franean1\_4577  
 FAL: FRAAL2514 FRAAL2618 FRAAL5910(atoB)  
 ACE: Ace1\_0626 Ace1\_0672  
 SEN: SACE\_1192(mmgA) SACE\_2736(fadA6) SACE\_4011(catF)  
 SACE\_6236(fadA4)  
 STP: Strop\_3610  
 SAQ: Sare\_1316 Sare\_3991  
 RXY: Rxy1\_1582 Rxy1\_1842 Rxy1\_2389 Rxy1\_2530  
 FNU: FN0495  
 BGA: BG0110(fadA)  
 BAF: BAPKO\_0110(fadA)  
 LIL: LA0457(thiL1) LA0828(thiL2) LA4139(fadA)  
 LIC: LIC10396(phbA)  
 LBJ: LBJ\_2862(paaJ-4)  
 LBL: LBL\_0209(paaJ-4)  
 SYN: slr1993(phaA)  
 SRU: SRU\_1211(atoB) SRU\_1547

[0774]

CHU: CHU\_1910(atoB)  
 GFO: GFO\_1507(atoB)  
 FJO: Fjoh\_4612  
 FPS: FP0770 FP1586 FP1725  
 RRS: RoseRS\_3911 RoseRS\_4348  
 RCA: Rcas\_0702 Rcas\_3206  
 HAU: Haur\_0522  
 DRA: DR\_1072 DR\_1428 DR\_1960 DR\_2480 DR\_A0053  
 DGE: Dgeo\_0755 Dgeo\_1305 Dgeo\_1441 Dgeo\_1883  
 TTH: TTC0191 TTC0330  
 TTJ: TTHA0559  
 TME: Tmel\_1134  
 FNO: Fnod\_0314  
 PMO: Pmob\_0515  
 HMA: rrnAC0896(acaB3) rrnAC2815(aca2) rrnAC3497(yqeF)  
       rrnB0240(aca1) rrnB0242(acaB2) rrnB0309(acaB1)  
 TAC: Ta0582  
 TVO: TVN0649  
 PTO: PTO1505  
 APE: APE\_2108  
 SSO: SSO2377(acaB-4)  
 STO: ST0514  
 SAI: Saci\_0963 Saci\_1361(acaB1)  
 MSE: Msed\_0656  
 PAI: PAE1220  
 PIS: Pisl\_0029 Pisl\_1301  
 PCL: Pcal\_0781  
 PAS: Pars\_0309 Pars\_1071  
 CMA: Cmaq\_1941

[0775]

[0776]

예시적 HMG-CoA 합성효소 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 3157(HMGCS1) 3158(HMGCS2)  
 PTR: 457169(HMGCS2) 461892(HMGCS1)  
 MCC: 702553(HMGCS1) 713541(HMGCS2)  
 MMU: 15360(Hmgcs2) 208715(Hmgcs1)  
 RNO: 24450(Hmgcs2) 29637(Hmgcs1)  
 CFA: 479344(HMGCS1) 607923(HMGCS2)  
 BTA: 407767(HMGCS1)  
 SSC: 397673(CH242-38B5.1)  
 GGA: 396379(HMGCS1)  
 XLA: 380091(hmgcs1) 447204(MGC80816)  
 DRE: 394060(hmgcs1)  
 SPU: 578259(LOC578259)  
 DME: Dmel\_CG4311(Hmgs)  
 CEL: F25B4.6  
 ATH: AT4G11820(BAP1)  
 OSA: 4331418 4347614  
 CME: CMM189C  
 SCE: YML126C(ERG13)  
 AGO: AGOS\_ADL356C  
 PIC: PICST\_83020  
 CAL: CaO19\_7312(CaO19.7312)  
 CGR: CAGL0H04081g  
 SPO: SPAC4F8.14c(hcs)  
 MGR: MGG\_01026  
 ANI: AN4923.2  
 AFM: AFUA\_3G10660 AFUA\_8G07210  
 AOR: AO090003000611 AO090010000487  
 CNE: CNC05080 CNG02670  
 UMA: UM05362.1  
 ECU: ECU10\_0510  
 DDI: DDBDRAFT\_0217522 DDB\_0219924(hgsA)  
 TET: TTHERM\_00691190

[0777]

TBR: Tb927.8.6110  
 YPE: YPO1457  
 YPK: y2712(pksG)  
 YPM: YP\_1349(pksG)  
 YPA: YPA\_0750  
 YPN: YPN\_2521  
 YPP: YPDSF\_1517  
 YPS: YPTB1475  
 CBD: COXBU7E912\_1931  
 TCX: Tcr\_1719  
 DNO: DNO\_0799  
 BMA: BMAA1212  
 BPS: BPSS1002  
 BPM: BURPS1710b\_A2613  
 BPL: BURPS1106A\_A1384  
 BPD: BURPS668\_A1470  
 BTE: BTH\_III1670  
 MXA: MXAN\_3948(tac) MXAN\_4267(mvaS)  
 BSU: BG10926(pksG)  
 OIH: OB2248  
 SAU: SA2334(mvaS)  
 SAV: SAV2546(mvaS)  
 SAM: MW2467(mvaS)  
 SAR: SAR2626(mvaS)  
 SAS: SAS2432  
 SAC: SACOL2561  
 SAB: SAB2420(mvaS)  
 SAA: SAUSA300\_2484  
 SAO: SAOUHSC\_02860  
 SAJ: SaurJH9\_2569  
 SAH: SaurJH1\_2622  
 SEP: SE2110  
 SER: SERP2122  
 SHA: SH0508(mvaS)

[0778]

SSP: SSP0324  
 LMO: lmo1415  
 LMF: LMOF2365\_1434(mvaS)  
 LIN: lin1454  
 LWE: lwe1432(mvaS)  
 LLA: L13187(hmcM)  
 LLC: LACR\_1666  
 LLM: llmg\_0929(hmcM)  
 SPY: SPY\_0881(mvaS.2)  
 SPZ: M5005\_Spy\_0687(mvaS.1)  
 SPM: spyM18\_0942(mvaS2)  
 SPG: SpyM3\_0600(mvaS.2)  
 SPS: SPs1253  
 SPH: MGAS10270\_Spy0745(mvaS1)  
 SPI: MGAS10750\_Spy0779(mvaS1)  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0759(mvaS1)  
 SPK: MGAS9429\_Spy0743(mvaS1)  
 SPF: SpyM51121(mvaS)  
 SPA: M6\_Spy0704  
 SPB: M28\_Spy0667(mvaS.1)  
 SPN: SP\_1727  
 SPR: spr1571(mvaS)  
 SPD: SPD\_1537(mvaS)  
 SAG: SAG1316  
 SAN: gbs1386  
 SAK: SAK\_1347  
 SMU: SMU.943c  
 STC: str0577(mvaS)  
 STL: stu0577(mvaS)  
 STE: STER\_0621  
 SSA: SSA\_0338(mvaS)  
 SSU: SSU05\_1641  
 SSV: SSU98\_1652  
 SGO: SGO\_0244

[0779]

LPL: lp\_2067(mvaS)  
 LJO: LJ1607  
 LAC: LBA0628(hmcS)  
 LSA: LSA1484(mvaS)  
 LSL: LSL\_0526  
 LDB: Ldb0881(mvaS)  
 LBU: LBUL\_0806  
 LBR: LVIS\_1363  
 LCA: LSEL\_1785  
 LGA: LGAS\_1372  
 LRE: Lreu\_0676  
 PPE: PEPE\_0868  
 EFA: EF1363  
 OOE: OEOE\_0968  
 LME: LEUM\_1184  
 NFA: nfa22120  
 SEN: SACE\_4570(pksG)  
 BBU: BB0683  
 BGA: BG0706  
 BAF: BAPKO\_0727  
 FJO: Fjoh\_0678  
 HAL: VNG1615G(mvaB)  
 HMA: rmAC1740(mvaS)  
 HWA: HQ2868A(mvaB)  
 NPH: NP2608A(mvaB\_1) NP4836A(mvaB\_2)

[0780]



[0781] 예시적 히드록시에틸글루타릴-CoA 리덕타아제 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 3156(HMGCR)  
 PTR: 471516(HMGCR)  
 MCC: 705479(HMGCR)  
 MMU: 15357(Hmgcr)  
 RNO: 25675(Hmgcr)  
 CFA: 479182(HMGCR)  
 BTA: 407159(HMGCR)  
 GGA: 395145(RCJMB04\_14m24)  
 SPU: 373355(LOC373355)  
 DME: Dmel\_CG10367(Hmgcr)  
 CEL: F08F8.2  
 OSA: 4347443  
 SCE: YLR450W(HMG2) YML075C(HMG1)  
 AGO: AGOS\_AER152W  
 CGR: CAGL0L11506g  
 SPO: SPCC162.09c(hmg1)  
 ANI: AN3817.2  
 AFM: AFUA\_1G11230 AFUA\_2G03700  
 AOR: AO090103000311 AO090120000217  
 CNE: CNF04830  
 UMA: UM03014.1  
 ECU: ECU10\_1720  
 DDI: DDB\_0191125(hmgA) DDB\_0215357(hmgB)  
 TBR: Tb927.6.4540  
 TCR: 506831.40 509167.20  
 LMA: LmjF30.3190  
 VCH: VCA0723  
 VCO: VC0395\_0662  
 VVU: VV2\_0117  
 VVY: VVA0625  
 VPA: VPA0968  
 VFI: VFA0841

[0782]

PAT: PatI\_0427  
 CBU: CBU\_0030 CBU\_0610  
 CBD: COXBU7E912\_0151 COXBU7E912\_0622(hmgA)  
 TCX: Tcr\_1717  
 DNO: DNO\_0797  
 CVI: CV\_1806  
 SUS: Acid\_5728 Acid\_6132  
 SAU: SA2333(mvaA)  
 SAV: SAV2545(mvaA)  
 SAM: MW2466(mvaA)  
 SAB: SAB2419c(mvaA)  
 SEP: SE2109  
 LWE: lwe0819(mvaA)  
 LLA: L10433(mvaA)  
 LLC: LACR\_1664  
 LLM: llmg\_0931(mvaA)  
 SPY: SPy\_0880(mvaS.1)  
 SPM: spyM18\_0941(mvaS1)  
 SPG: SpyM3\_0599(mvaS.1)  
 SPS: SPs1254  
 SPH: MGAS10270\_Spy0744  
 SPI: MGAS10750\_Spy0778  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0758  
 SPK: MGAS9429\_Spy0742  
 SPA: M6\_Spy0703  
 SPN: SP\_1726  
 SAG: SAG1317  
 SAN: gbs1387  
 STC: str0576(mvaA)  
 STL: stu0576(mvaA)  
 STE: STER\_0620  
 SSA: SSA\_0337(mvaA)  
 LPL: lp\_0447(mvaA)  
 LJO: LJ1608

[0783]

LSL: LSL\_0224  
 LBR: LVIS\_0450  
 LGA: LGAS\_1373  
 EFA: EF1364  
 NFA: nfa22110  
 BGA: BG0708(mvaA)  
 SRU: SRU\_2422  
 FPS: FP2341  
 MMP: MMP0087(hmgA)  
 MMQ: MmarC5\_1589  
 MAC: MA3073(hmgA)  
 MBA: Mbar\_A1972  
 MMA: MM\_0335  
 MBU: Mbur\_1098  
 MHU: Mhun\_3004  
 MEM: Memar\_2365  
 MBN: Mboo\_0137  
 MTH: MTH562  
 MST: Msp\_0584(hmgA)  
 MSI: Msm\_0227  
 MKA: MK0355(HMG1)  
 AFU: AF1736(mvaA)  
 HAL: VNG1875G(mvaA)  
 HMA: rmAC3412(mvaA)  
 HWA: HQ3215A(hmgR)  
 NPH: NP0368A(mvaA\_2) NP2422A(mvaA\_1)  
 TAC: Ta0406m  
 TVO: TVN1168  
 PTO: PTO1143  
 PAB: PAB2106(mvaA)  
 PFU: PF1848  
 TKO: TK0914  
 RCI: RCIX1027(hmgA) RCIX376(hmgA)  
 APE: APE\_1869

[0784]

IHO: Igni\_0476  
 HBU: Hbut\_1531  
 SSO: SSO0531  
 STO: ST1352  
 SAI: Saci\_1359  
 PAI: PAE2182  
 PIS: Pisl\_0814  
 PCL: Pcal\_1085  
 PAS: Pars\_0796

[0785]

[0786] 예시적 메탈로네이트 키나아제 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 4598(MVK)  
MCC: 707645(MVK)  
MMU: 17855(Mvk)  
RNO: 81727(Mvk)  
CFA: 486309(MVK)  
BTA: 505792(MVK)  
GGA: 768555(MVK)  
DRE: 492477(zgc:103473)  
SPU: 585785(LOC585785)  
DME: Dmel\_CG33671  
OSA: 4348331  
SCE: YMR208W(ERG12)  
AGO: AGOS\_AER335W  
PIC: PICST\_40742(ERG12)  
CGR: CAGL0F03861g  
SPO: SPAC13G6.11c  
MGR: MGG\_06946  
ANI: AN3869.2  
AFM: AFUA\_4G07780  
AOR: AO090023000793  
CNE: CNK01740  
ECU: ECU09\_1780  
DDI: DDBDRAFT\_0168621  
TET: TTHERM\_00637680  
TBR: Tb927.4.4070  
TCR: 436521.9 509237.10  
LMA: LmjF31.0560  
CBU: CBU\_0608 CBU\_0609  
CBD: COXBU7E912\_0620(mvk)  
LPN: lpg2039  
LPF: lpl2017  
LPP: lpp2022

[0787]

BBA: Bd1027(lmbP) Bd1630(mvk)  
 MXA: MXAN\_5019(mvk)  
 OIH: OB0225  
 SAU: SA0547(mvaK1)  
 SAV: SAV0590(mvaK1)  
 SAM: MW0545(mvaK1)  
 SAR: SAR0596(mvaK1)  
 SAS: SAS0549  
 SAC: SACOL0636(mvk)  
 SAB: SAB0540(mvaK1)  
 SAA: SAUSA300\_0572(mvk)  
 SAO: SAOUHSC\_00577  
 SEP: SE0361  
 SER: SERP0238(mvk)  
 SHA: SH2402(mvaK1)  
 SSP: SSP2122  
 LMO: lmo0010  
 LMF: LMOF2365\_0011  
 LIN: lin0010  
 LWE: lwe0011(mvk)  
 LLA: L7866(yeaG)  
 LLC: LACR\_0454  
 LLM: llmg\_0425(mvk)  
 SPY: SPy\_0876(mvaK1)  
 SPZ: M5005\_Spy\_0682(mvaK1)  
 SPM: spyM18\_0937(mvaK1)  
 SPG: SpyM3\_0595(mvaK1)  
 SPS: SPs1258  
 SPH: MGAS10270\_Spy0740(mvaK1)  
 SPI: MGAS10750\_Spy0774(mvaK1)  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0753(mvaK1)  
 SPK: MGAS9429\_Spy0737(mvaK1)  
 SPF: SpyM51126(mvaK1)  
 SPA: M6\_Spy0699

[0788]

SPB: M28\_Spy0662(mvaK1)  
 SPN: SP\_0381  
 SPR: spr0338(mvk)  
 SPD: SPD\_0346(mvk)  
 SAG: SAG1326  
 SAN: gbs1396  
 SAK: SAK\_1357(mvk)  
 SMU: SMU.181  
 STC: str0559(mvaK1)  
 STL: stu0559(mvaK1)  
 STE: STER\_0598  
 SSA: SSA\_0333(mvaK1)  
 SSU: SSU05\_0289  
 SSV: SSU98\_0285  
 SGO: SGO\_0239(mvk)  
 LPL: lp\_1735(mvaK1)  
 LJO: LJ1205  
 LAC: LBA1167(mvaK)  
 LSA: LSA0908(mvaK1)  
 LSL: LSL\_0685(eRG)  
 LDB: Ldb0999(mvk)  
 LBU: LBUL\_0906  
 LBR: LVIS\_0858  
 LCA: LSEI\_1491  
 LGA: LGAS\_1033  
 LRE: Lreu\_0915  
 PPE: PEPE\_0927  
 EFA: EF0904(mvk)  
 OOE: OEEOE\_1100  
 LME: LEUM\_1385  
 NFA: nfa22070  
 BGA: BG0711  
 BAF: BAPKO\_0732  
 FPS: FP0313

[0789]



MMP: MMP1335  
 MAE: Maeo\_0775  
 MAC: MA0602(mvk)  
 MBA: Mbar\_A1421  
 MMA: MM\_1762  
 MBU: Mbur\_2395  
 MHU: Mhun\_2890  
 MEM: Memar\_1812  
 MBN: Mboo\_2213  
 MST: Msp\_0858(mvk)  
 MSI: Msm\_1439  
 MKA: MK0993(ERG12)  
 HAL: VNG1145G(mvk)  
 HMA: rmAC0077(mvk)  
 HWA: HQ2925A(mvk)  
 NPH: NP2850A(mvk)  
 PTO: PTO1352  
 PHO: PH1625  
 PAB: PAB0372(mvk)  
 PFU: PF1637(mvk)  
 TKO: TK1474  
 RCI: LRC399(mvk)  
 APE: APE\_2439  
 HBU: Hbut\_0877  
 SSO: SSO0383  
 STO: ST2185  
 SAI: Saci\_2365(mvk)  
 MSE: Msed\_1602  
 PAI: PAE3108  
 PIS: Pisl\_0467  
 PCL: Pcal\_1835

[0790]

[0791] 예시적 포스포메발로네이트 키나아제 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 10654(PMVK)  
 PTR: 457350(PMVK)  
 MCC: 717014(PMVK)  
 MMU: 68603(Pmvk)  
 CFA: 612251(PMVK)  
 BTA: 513533(PMVK)  
 DME: Dmel\_CG10268  
 ATH: AT1G31910  
 OSA: 4332275  
 SCE: YMR220W(ERG8)  
 AGO: AGOS\_AER354W  
 PIC: PICST\_52257(ERG8)  
 CGR: CAGL0F03993g  
 SPO: SPAC343.01c  
 MGR: MGG\_05812  
 ANI: AN2311.2  
 AFM: AFUA\_5G10680  
 AOR: AO090010000471  
 CNE: CNM00100  
 UMA: UM00760.1  
 DDI: DDBDRAFT\_0184512  
 TBR: Tb09.160.3690  
 TCR: 507913.20 508277.140  
 LMA: LmjF15.1460  
 MXA: MXAN\_5017  
 OIH: OB0227  
 SAU: SA0549(mvaK2)  
 SAV: SAV0592(mvaK2)  
 SAM: MW0547(mvaK2)  
 SAR: SAR0598(mvaK2)  
 SAS: SAS0551  
 SAC: SACOL0638

[0792]

SAB: SAB0542(mvaK2)  
 SAA: SAUSA300\_0574  
 SAO: SAOUHSC\_00579  
 SAJ: SaurJH9\_0615  
 SEP: SE0363  
 SER: SERP0240  
 SHA: SH2400(mvaK2)  
 SSP: SSP2120  
 LMO: lmo0012  
 LMF: LMOF2365\_0013  
 LIN: lin0012  
 LWE: lwe0013  
 LLA: L10014(yebA)  
 LLC: LACR\_0456  
 LLM: limg\_0427  
 SPY: SPy\_0878(mvaK2)  
 SPZ: M5005\_Spy\_0684(mvaK2)  
 SPM: spyM18\_0939  
 SPG: SpyM3\_0597(mvaK2)  
 SPS: SPs1256  
 SPH: MGAS10270\_Spy0742(mvaK2)  
 SPI: MGAS10750\_Spy0776(mvaK2)  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0755(mvaK2)  
 SPK: MGAS9429\_Spy0739(mvaK2)  
 SPF: SpyM51124(mvaK2)  
 SPA: M6\_Spy0701  
 SPB: M28\_Spy0664(mvaK2)  
 SPN: SP\_0383  
 SPR: spr0340(mvaK2)  
 SPD: SPD\_0348(mvaK2)  
 SAG: SAG1324  
 SAN: gbs1394  
 SAK: SAK\_1355  
 SMU: SMU.938

[0793]

STC: str0561(mvaK2)  
 STL: stu0561(mvaK2)  
 STE: STER\_0600  
 SSA: SSA\_0335(mvaK2)  
 SSU: SSU05\_0291  
 SSV: SSU98\_0287  
 SGO: SGO\_0241  
 LPL: lp\_1733(mvaK2)  
 LJO: LJ1207  
 LAC: LBA1169  
 LSA: LSA0906(mvaK2)  
 LSL: LSL\_0683  
 LDB: Ldb0997(mvaK)  
 LBU: LBUL\_0904  
 LBR: LVIS\_0860  
 LCA: LSEI\_1092  
 LGA: LGAS\_1035  
 LRE: Lreu\_0913  
 PPE: PEPE\_0925  
 EFA: EF0902  
 NFA: nfa22090  
 BGA: BG0710  
 BAF: BAPKO\_0731  
 NPH: NP2852A  
 SSO: SSO2988  
 STO: ST0978  
 SAI: Saci\_1244

[0794]

[0795] 예시적 디포스포메탈로네이트 데카르복실라아제 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 4597(MVD)  
 PTR: 468069(MVD)  
 MCC: 696865(MVD)  
 MMU: 192156(Mvd)  
 RNO: 81726(Mvd)  
 CFA: 489663(MVD)  
 GGA: 425359(MVD)  
 DME: Dmel\_CG8239  
 SCE: YNR043W(MVD1)  
 AGO: AGOS\_AGL232C  
 PIC: PICST\_90752  
 CGR: CAGL0C03630g  
 SPO: SPAC24C9.03  
 MGR: MGG\_09750  
 ANI: AN4414.2  
 AFM: AFUA\_4G07130  
 AOR: AO090023000862  
 CNE: CNL04950  
 UMA: UM05179.1  
 DDI: DDBDRAFT\_0218058  
 TET: TTHERM\_00849200  
 TBR: Tb10.05.0010 Tb10.61.2745  
 TCR: 507993.330 511281.40  
 LMA: LmjF18.0020  
 CBU: CBU\_0607(mvaD)  
 CBD: COXBU7E912\_0619(mvaD)  
 LPN: lpg2040  
 LPF: lpl2018  
 LPP: lpp2023  
 TCX: Tcr\_1734  
 DNO: DNO\_0504(mvaD)  
 BBA: Bd1629

[0796]

MXA: MXAN\_5018(mvaD)  
 OIH: OB0226  
 SAU: SA0548(mvaD)  
 SAV: SAV0591(mvaD)  
 SAM: MW0546(mvaD)  
 SAR: SAR0597(mvaD)  
 SAS: SAS0550  
 SAC: SACOL0637(mvaD)  
 SAB: SAB0541(mvaD)  
 SAA: SAUSA300\_0573(mvaD)  
 SAO: SAOUHSC\_00578  
 SAJ: SaurJH9\_0614  
 SAH: SaurJH1\_0629  
 SEP: SE0362  
 SER: SERP0239(mvaD)  
 SHA: SH2401(mvaD)  
 SSP: SSP2121  
 LMO: lmo0011  
 LMF: LMOF2365\_0012(mvaD)  
 LIN: lin0011  
 LWE: lwe0012(mvaD)  
 LLA: L9089(yeaH)  
 LLC: LACR\_0455  
 LLM: llmg\_0426(mvaD)  
 SPY: SPy\_0877(mvaD)  
 SPZ: M5005\_Spy\_0683(mvaD)  
 SPM: spyM18\_0938(mvd)  
 SPG: SpyM3\_0596(mvaD)  
 SPS: SPs1257  
 SPH: MGAS10270\_Spy0741(mvaD)  
 SPI: MGAS10750\_Spy0775(mvaD)  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0754(mvaD)  
 SPK: MGAS9429\_Spy0738(mvaD)  
 SPF: SpyM51125(mvaD)

[0797]



SPA: M6\_Spy0700  
 SPB: M28\_Spy0663(mvaD)  
 SPN: SP\_0382  
 SPR: spr0339(mvd1)  
 SPD: SPD\_0347(mvaD)  
 SAG: SAG1325(mvaD)  
 SAN: gbs1395  
 SAK: SAK\_1356(mvaD)  
 SMU: SMU.937  
 STC: str0560(mvaD)  
 STL: stu0560(mvaD)  
 STE: STER\_0599  
 SSA: SSA\_0334(mvaD)  
 SSU: SSU05\_0290  
 SSV: SSU98\_0286  
 SGO: SGO\_0240(mvaD)  
 LPL: lp\_1734(mvaD)  
 LJO: LJ1206  
 LAC: LBA1168(mvaD)  
 LSA: LSA0907(mvaD)  
 LSL: LSL\_0684  
 LDB: Ldb0998(mvaD)  
 LBU: LBUL\_0905  
 LBR: LVIS\_0859  
 LCA: LSEI\_1492  
 LGA: LGAS\_1034  
 LRE: Lreu\_0914  
 PPE: PEPE\_0926  
 EFA: EF0903(mvaD)  
 LME: LEUM\_1386  
 NFA: nfa22080  
 BBU: BB0686  
 BGA: BG0709  
 BAF: BAPKO\_0730

[0798]

GFO: GFO\_3632  
 FPS: FP0310(mvaD)  
 HAU: Haur\_1612  
 HAL: VNG0593G(dmd)  
 HMA: rrnAC1489(dmd)  
 HWA: HQ1525A(mvaD)  
 NPH: NP1580A(mvaD)  
 PTO: PTO0478 PTO1356  
 SSO: SSO2989  
 STO: ST0977  
 SAI: Saci\_1245(mvd)  
 MSE: Msed\_1576

[0799]

[0800]

예시적 이소펜테닐-디포스페이트 델타-이소머라아제 (IDI) 핵산 및 폴리펩티드

HSA: 3422(IDI1) 91734(IDI2)  
 PTR: 450262(IDI2) 450263(IDI1)  
 MCC: 710052(LOC710052) 721730(LOC721730)  
 MMU: 319554(Idi1)  
 RNO: 89784(Idi1)  
 GGA: 420459(IDI1)  
 XLA: 494671(LOC494671)  
 XTR: 496783(idi2)  
 SPU: 586184(LOC586184)  
 CEL: K06H7.9(idi-1)  
 ATH: AT3G02780(IPP2)  
 OSA: 4338791 4343523  
 CME: CMB062C  
 SCE: YPL117C(IDI1)  
 AGO: AGOS\_ADL268C  
 PIC: PICST\_68990(IDI1)  
 CGR: CAGL0J06952g  
 SPO: SPBC106.15(idi1)  
 ANI: AN0579.2  
 AFM: AFUA\_6G11160  
 AOR: AO090023000500  
 CNE: CNA02550  
 UMA: UM04838.1  
 ECU: ECU02\_0230  
 DDI: DDB\_0191342(ipi)  
 TET: TTHERM\_00237280 TTHERM\_00438860  
 TBR: Tb09.211.0700  
 TCR: 408799.19 510431.10  
 LMA: LmjF35.5330  
 EHI: 46.t00025  
 ECO: b2889(idi)

[0801]

ECJ: JW2857(idi)  
 ECE: Z4227  
 ECS: ECs3761  
 ECC: c3467  
 ECI: UTI89\_C3274  
 ECP: ECP\_2882  
 ECV: APECO1\_3638  
 ECW: EcE24377A\_3215(idi)  
 ECX: EcHS\_A3048  
 STY: STY3195  
 STT: t2957  
 SPT: SPA2907(idi)  
 SEC: SC2979(idi)  
 STM: STM3039(idi)  
 SFL: SF2875(idi)  
 SFX: S3074  
 SFV: SFV\_2937  
 SSN: SSON\_3042 SSON\_3489(yhfK)  
 SBO: SBO\_3103  
 SDY: SDY\_3193  
 ECA: ECA2789  
 PLU: plu3987  
 ENT: Ent638\_3307  
 SPE: Spro\_2201  
 VPA: VPA0278  
 VFI: VF0403  
 PPR: PBPRA0469(mvaD)  
 PEN: PSEEN4850  
 CBU: CBU\_0607(mvaD)  
 CBD: COXBU7E912\_0619(mvaD)  
 LPN: lpg2051  
 LPF: lpl2029  
 LPP: lpp2034  
 TCX: Tcr\_1718

[0802]

HHA: Hha1\_1623  
 DNO: DNO\_0798  
 EBA: ebA5678 p2A143  
 DVU: DVU1679(idi)  
 DDE: Dde\_1991  
 LIP: LI1134  
 BBA: Bd1626  
 AFW: Ana109\_4082  
 MXA: MXAN\_5021(fni)  
 RPR: RP452  
 RTY: RT0439(idi)  
 RCO: RC0744  
 RFE: RF\_0785(fni)  
 RBE: RBE\_0731(fni)  
 RAK: A1C\_04190  
 RBO: A1I\_04755  
 RCM: A1E\_02555  
 RRI: A1G\_04195  
 MLO: mlr6371  
 RET: RHE\_PD00245(ypd00046)  
 XAU: Xaut\_4134  
 SIL: SPO0131  
 SIT: TM1040\_3442  
 RSP: RSP\_0276  
 RSH: Rsph17029\_1919  
 RSQ: Rsph17025\_1019  
 JAN: Jann\_0168  
 RDE: RD1\_0147(idi)  
 DSH: Dshi\_3527  
 BSU: BG11440(ypgA)  
 BAN: BA1520  
 BAR: GBAA1520  
 BAA: BA\_2041  
 BAT: BAS1409

[0803]

BCE: BC1499  
 BCA: BCE\_1626  
 BCZ: BCZK1380(fni)  
 BCY: Bcer98\_1222  
 BTK: BT9727\_1381(fni)  
 BTL: BALH\_1354  
 BLI: BL02217(fni)  
 BLD: BLi02426  
 BAY: RBAM\_021020(fni)  
 BPU: BPUM\_2020(fni)  
 OIH: OB0537  
 SAU: SA2136(fni)  
 SAV: SAV2346(fni)  
 SAM: MW2267(fni)  
 SAR: SAR2431(fni)  
 SAS: SAS2237  
 SAC: SACOL2341(fni)  
 SAB: SAB2225c(fni)  
 SAA: SAUSA300\_2292(fni)  
 SAO: SAOUHSC\_02623  
 SEP: SE1925  
 SER: SERP1937(fni-2)  
 SHA: SH0712(fni)  
 SSP: SSP0556  
 LMO: lmo1383  
 LMF: LMOF2365\_1402(fni)  
 LIN: lin1420  
 LWE: lwe1399(fni)  
 LLA: L11083(yebB)  
 LLC: LACR\_0457  
 LLM: llmg\_0428(fni)  
 SPY: SPy\_0879  
 SPZ: M5005\_Spy\_0685  
 SPM: spyM18\_0940

[0804]

SPG: SpyM3\_0598  
 SPS: SPs1255  
 SPH: MGAS10270\_Spy0743  
 SPI: MGAS10750\_Spy0777  
 SPJ: MGAS2096\_Spy0756  
 SPK: MGAS9429\_Spy0740  
 SPF: SpyM51123(fni)  
 SPA: M6\_Spy0702  
 SPB: M28\_Spy0665  
 SPN: SP\_0384  
 SPR: spr0341(fni)  
 SPD: SPD\_0349(fni)  
 SAG: SAG1323  
 SAN: gbs1393  
 SAK: SAK\_1354(fni)  
 SMU: SMU.939  
 STC: str0562(idi)  
 STL: stu0562(idi)  
 STE: STER\_0601  
 SSA: SSA\_0336  
 SGO: SGO\_0242  
 LPL: lp\_1732(idi1)  
 LJO: LJ1208  
 LAC: LBA1171  
 LSA: LSA0905(idi)  
 LSL: LSL\_0682  
 LDB: Ldb0996(fni)  
 LBU: LBUL\_0903  
 LBR: LVIS\_0861  
 LCA: LSEI\_1493  
 LGA: LGAS\_1036  
 LRE: Lreu\_0912  
 EFA: EF0901  
 OOE: OEOE\_1103

[0805]

STH: STH1674  
 CBE: Cbei\_3081  
 DRM: Dred\_0474  
 SWO: Swol\_1341  
 MTA: Moth\_1328  
 MTU: Rv1745c(idi)  
 MTC: MT1787(idi)  
 MBO: Mb1774c(idi)  
 MBB: BCG\_1784c(idi)  
 MPA: MAP3079c  
 MAV: MAV\_3894(fni)  
 MSM: MSMEG\_1057(fni) MSMEG\_2337(fni)  
 MUL: MUL\_0380(idi2)  
 MVA: Mvan\_1582 Mvan\_2176  
 MGI: Mflv\_1842 Mflv\_4187  
 MMC: Mmcs\_1954  
 MKM: Mkms\_2000  
 MJL: Mjls\_1934  
 CGL: NCgl2223(cgl2305)  
 CGB: cg2531(idi)  
 CEF: CE2207  
 CDI: DIP1730(idi)  
 NFA: nfa19790 nfa22100  
 RHA: RHA1\_ro00239  
 SCO: SCO6750(SC5F2A.33c)  
 SMA: SAV1663(idi)  
 LXX: Lxx23810(idi)  
 CMI: CMM\_2889(idiA)  
 AAU: AAur\_0321(idi)  
 PAC: PPA2115  
 FRA: Francci3\_4188  
 FRE: Franean1\_5570  
 FAL: FRAAL6504(idi)  
 KRA: Krad\_3991

[0806]



SEN: SACE\_2627(idiB\_2) SACE\_5210(idi)  
 STP: Strop\_4438  
 SAQ: Sare\_4564 Sare\_4928  
 RXY: Rxy1\_0400  
 BBU: BB0684  
 BGA: BG0707  
 SYN: sll1556  
 SYC: syc2161\_c  
 SYF: Synpcc7942\_1933  
 CYA: CYA\_2395(fni)  
 CYB: CYB\_2691(fni)  
 TEL: tll1403  
 ANA: all4591  
 AVA: Ava\_2461 Ava\_B0346  
 TER: Tery\_1589  
 SRU: SRU\_1900(idi)  
 CHU: CHU\_0674(idi)  
 GFO: GFO\_2363(idi)  
 FJO: Fjoh\_0269  
 FPS: FP1792(idi)  
 CTE: CT0257  
 CCH: Cag\_1445  
 CPH: Cpha266\_0385  
 PVI: Cvib\_1545  
 PLT: Plut\_1764  
 RRS: RoseRS\_2437  
 RCA: Rcas\_2215  
 HAU: Haur\_4687  
 DRA: DR\_1087  
 DGE: Dgeo\_1381  
 TTH: TT\_P0067  
 TTJ: TTHB110  
 MJA: MJ0862  
 MMP: MMP0043

[0807]

MMQ: MmarC5\_1637  
 MMX: MmarC6\_0906  
 MMZ: MmarC7\_1040  
 MAE: Maeo\_1184  
 MVN: Mevan\_1058  
 MAC: MA0604(idi)  
 MBA: Mbar\_A1419  
 MMA: MM\_1764  
 MBU: Mbur\_2397  
 MTP: Mthe\_0474  
 MHU: Mhun\_2888  
 MLA: Mlab\_1665  
 MEM: Memar\_1814  
 MBN: Mboo\_2211  
 MTH: MTH48  
 MST: Msp\_0856(fni)  
 MSI: Msm\_1441  
 MKA: MK0776(lldD)  
 AFU: AF2287  
 HAL: VNG1818G(idi) VNG6081G(cert\_1) VNG6445G(cert\_2) VNG7060 VNG7149  
 HMA: rmAC3484(idi)  
 HWA: HQ2772A(idiA) HQ2847A(idiB)  
 NPH: NP0360A(idiB\_1) NP4826A(idiA) NP5124A(idiB\_2)  
 TAC: Ta0102  
 TVO: TVN0179  
 PTO: PTO0496  
 PHO: PH1202  
 PAB: PAB1662  
 PFU: PF0856  
 TKO: TK1470  
 RCI: LRC397(fni)  
 APE: APE\_1765.1  
 SMR: Smar\_0822  
 IHO: Igni\_0804  
 HBU: Hbut\_0539  
 SSO: SSO0063  
 STO: ST2059  
 SAI: Saci\_0091  
 MSE: Msed\_2136  
 PAI: PAE0801  
 PIS: Pisl\_1093  
 PCL: Pcal\_0017  
 PAS: Pars\_0051  
 TPE: Tpen\_0272

[0808]

[0809]

[0810] 예시적 이소프렌 합성효소 핵산 및 폴리펩티드

[0811] Genbank 접근 번호

AY341431

AY316691

AY279379

AJ457070

AY182241

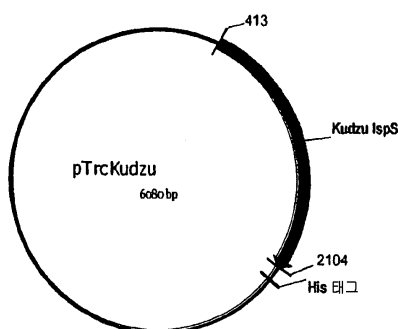
[0812]

## 도면

### 도면1

1-  
atgtgtgacgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaaact  
atcagccaaacctgtggaaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaa  
gctggaggagaaagcgaccaaacctggaggaagaagtctgctgcatgatcaacctgtagacacc  
cagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatttg  
aaaaagacatcattaaagccctggaaaaacatcgtactgctggacgaaaaacaaaagaacaaatc  
tgacctgcacgcaacgctctgtcttccgtctgctgctcagcacgggttctgagggttctcag  
gatgtttttgagcggttcaaggataaagaagggtggtttcagcggtgaactgaaagggtgacgtcc  
aaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggagga  
ggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaagggt  
gcagaacaagttagccacgacctggaaactgccatatcaccagcgtctgcacctctggaggcac  
gttggttctctggataaaatcgaaccgaaagaacgcataccagctgctgctggagctggcgaa  
gctggattttaacatggttacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgtggtgg  
accgagatgggcttgctagcaaacctggattttgtacgcgacgacctgatggaagtttatttct  
gggactgggtatggcgccagaccgagtttggatgtcgcaagctgttactaaaatgtt  
tggtctggtagacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactg  
ttcaccgatgctgtagagcgtgggaacttaacgctatttaacacctgcgggactatatgaaac  
tgtgtttctctggcactgtacaacaccttaacgacacgtcctatttctattctgaaagagaagg  
tcataacaacctgtcttatctgacgaaaaagctggcgtgaactgtgcaaacctttctgcaagag  
gcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaaacgacgcttt  
cctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttactttccgtatgccagcagcaggaaagacat  
ctccgaccacgcgctggttccctgaccgacttccatggtctggtgcttctagctgcgttatc  
ttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaatt  
ctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaaacggcccgcaagaactgcg  
taaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacctgctg  
cctaaagcgttcatggaatcgagtttaacatggcacgtgttcccaactgcacctaccagtatg  
gcgatggtctgggtcgcccgactacgcgactgaaaaacgcataaaactgctgctgattgaccc  
tttcccgattaaaccagctgatgtatgtc  
taactgcag  
(SEQ ID NO:1)

### 도면2



도면3a

1-

gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcacatcataacgggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgataaatgtgtggaattgtgagcggataaacaatttcacacag  
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattatataaaaaattaaagggtatataattaat  
gtatcgattaaataaggagggaataaaaccATGtggtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
gagcataattcccgctcgttccgcaaaactatcagcacaacctgtggaatttcgaattctctgcaat  
ccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaaagagt  
tcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagcgcgtgctcctgctggagctgatcgacgatgtg  
cagcgctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtaac  
tgctggacgaaaaacaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgctgctgt  
gcgtcagcacgggttccgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtgggt  
ttcagcgggtgaactgaaaggtgacgtccaagccctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
gtttcaggggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcaccacacctgaagaacaa  
cctgaaaagaaggcattaataccaaggttgagaaacagtgagccacgacctggaaactgccaat  
caccagcgtctgcaccgcttgaggagcacgttggttccctggataaaatcgaacccgaaagaaccgc  
atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaa  
agagctgcaagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggctagcaaaactggattttgta  
cgcgaccgctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtg  
aatgtcgcaagctgttactaaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt  
ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgct  
attaacacctgcccgaactatataaactgtgtttcctggcactgtacaacaccttaacgaca  
cgtcctattctattctgaaagagaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
tgaaactgtgcaagcccttctgcaagaggcgaatgggtccaacaacaaaattatcccggctttc  
tccaagtacctggaaaacgcccagcgtttcctcctccgggtgtagcgctgctggcgccgtcttact  
tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgaactcca  
tggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg  
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtacca  
gcgaggaaacaggcccggaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaagatgaatcg  
tgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagtttaacatggca  
cgtgtttcccaactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgccagactacgcgactgaaa  
accgcatcaaaactgctgctgattgacctttcccgatataaccagctgatgtatgtcTAActgca  
gctggtaccatattgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagagatctgaa  
tagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacgggtctccagcttggtgttttg  
gcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctgataaa  
acagaattttgcctggcgagtagcgcggtggtcccaacctgacccatgccgaactcagaagtg  
aaacgcgtagcgccgatggtagtgtgggtctcccatgcgagagtgggaactgccaggcat  
caataaaacgaaaggctcagtcgaagactgggcctttcgttttatctgtgtttgtcggtga  
acgctctcctgagtaggacaaatccgcgggagcggatttgaacgttgcaagcaacggcccg

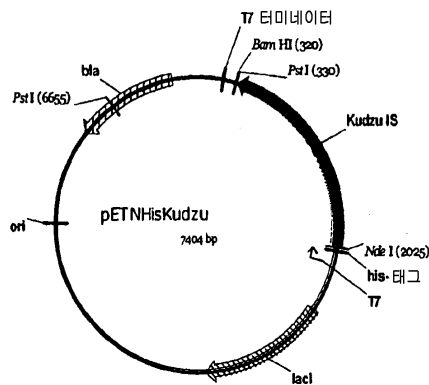
도면3b

aggggtggcgggaggagcggccgataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctg  
acggatggcctttttgctgttctacaactcctttttgttttttttctaaatcattcaaatat  
gtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataattgaaaaggagagatg  
agtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtttttg  
ctcaccagaaaacgctgggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtta  
catcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcccgaaagacgttttcca  
atgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccggttgacgcgggcaag  
agcaactcggctgcgcgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactaccagtcacaga  
aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgat  
aacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgc  
acaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc  
aaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacgttgccaaactattaaact  
ggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttg  
caggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggtttattgtcgataaatctggagccgg  
tgagcgtgggtctcgcggtatcatctgcagcactggggccagatggttaagccctcccgatcgta  
gttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag  
gtgctcactgattaaagcatttggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagatga  
tttaaaacttctttttaaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacc  
aaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaggat  
ctcttgagatccttttttctgcgctaatctgctgcttgcacacaaaaaaccccgctacc  
agcgtggtttgttttcccgatcaagagctaccaactccttttccgaaggtaactggcttcagc  
agagcgcagataccaaaactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact  
ctgtagcaccgctacatacctcgctctgctaactcgtttaccagtggctgctgccagtggcga  
taagtctgtcttaccgggttggtactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggc  
tgaacgggggggttcgtgacacagccagcgttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacc  
tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgacaggtatccggt  
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccaggggaaacgcctggtatcct  
tatagtcctgtcgggttttccgccctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg  
ggcgagcctatggaaaaacgcgacgcaacgcggccttttaccggttccgtgcttttgcgtgcc  
ttttgctcacatgttcttctcgtgtatccctgattctgtggataaccgtattaccgcttt  
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgatcagtgagcgaag  
cggaagagcgctgatgcggtatttttctccttacgcatctgtgcggtattttcacaccgcatatg  
gtgactctcagtaaatctgctctgatgcccagatagttaggccagatatacactccgctatcgc  
tacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcccagcgggc  
ttgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtcag  
agggttttaccggtcatcaccgaaacgcgcgagcgcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc  
ggcatgcatttacgttgacacatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc  
ccggaagagagtcgaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagt  
atgcccgtgtctcttatcagacggttcccgcgtgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
aacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcaca  
caactggcgggcaaacagtcgtgtgctgattggcgttgccacctccagcttgccctgcacgcgc  
cgtcgcaatttgcggcgcatataatctcgcccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtgtc  
gatggtagaacgaagcggcgatgaagcctgtaaacggcggtgcacaaatcttctcgcgcaacgc  
gtcagtgggctgatcatatactccgctggatgaccagatgccattgctgtggaagctgcct

도면3c

Gcactaatgttccggcgttatttcttgatgtcttgaccagacacccatcaacagtattatttt  
ctcccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgcattggttcaccagcaaatc  
gcgctgttagcggggccattaaagtctgtctcgccgcgtctgcgtctggctggctggcataaat  
atctcactcgcaatcaaatcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg  
ttttcaacaaacatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgatgctggttgccaac  
gatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggctgcgctgggtgcggata  
tctcggtagtggtatagcagataccgaagacagctcatgttatatccgcctgcaacacccat  
caaacaggattttcgctgctggggcaaacaccagcgtggaccgctgctgcaactctctcagggc  
caggcgggtgaagggaatcagctgttggccgtctcactgggtgaaagaaaaaacacctggcgc  
ccaatcgcgaacacgcctctcccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcagaggt  
ttccgactggaaagcggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg  
(SEQ ID NO:2)

도면4



도면5a

1-  
 ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgc  
 taacgcagtcaggcacgcgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgctcatcctcgccaccgtca  
 ccctggatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggctcttgccgggatatccg  
 gatagatttctcctcttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagaggccccaagggttatg  
 ctagtattgtctcagcgggtggcagcagccaaactcagcttcccttcgggctttgttagcagccg  
 atccctgcagttagacatacatcagctgggttaatcgggaaagggtcaatcagcagcagttgat  
 gcggttttcagtcgcgtagctcggggcagccagaccatcgccatactggttaggtgcagtgaggaa  
 acacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggaggagtcgctaacgc  
 gttcacgatttcatttttccattcggcgctcgatcagtttacgcagttcttcggggcctgttc  
 ctgcgtggtaccatcgttttcgtgcattgtagctaatgatagaattggtagctcgcacagcttc  
 agctccgcgcagaggtggccagatcgttgccagggcgaagataacgcagctagaacgcacca  
 gaccatgggaagtcggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagatgtcttctgctgctggcatac  
 ggaaagtaagacggcgccagcagcgtacacccggaggaggaaacgctggcgctttccaggtag  
 ttggagaaagccgggataattttgttggaccatttcgcctcttgcaaaaggctttgcaca  
 gttcacgcgcagcttttcgtcagataggacaggttggtatgaccttctcttcagaatagaata  
 ggacgtgtcgttaacggtgttgtagcagtgccaggaaacacagtttcatatagtcgggcagggtg  
 ttaatagcgttaacgtcccagcgtctacagcatcggtgaacagttgcagttcgtccagagtgcc  
 cataaacgtcatcacagtcacgtcatcgatgatcgtaaccagaccaaacattttagtaacagcttgcg  
 acattcaccaaaactgcgggctcggcgccatccccagtgccagaaataaacttccatcaggcgg  
 tcgcgtacaaaaaccagtttgctagccaggccatctcggtccaccagcgggacagatcttgca  
 gctctttctggtgcagggtctgtacctgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctg  
 gtgatgcggttctttcgggtcgtatttatccaggaaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgc  
 ttggtgatattggcagttccagggcggtggtcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctt  
 tcagggtgttcttcagggtgggtgatggaaaaggtagcgcgctcctccagcaggttctcacctc  
 gaaaccaggttaagacgcttcatacaggctcagcaggccttggacgtcacctttcagttcacccg  
 ctgaaaccaccttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaaccgtgct  
 gacgcagcagacggaaagacagagcgggttcggtgcaggtcagatttggtctttttgttttcg  
 cagcagtagcagattttccagggtttaaagtgatgtcttttcaaatttgtaggtcagacccagg  
 cgctgcacatcgtcgatcagctccagcaggacagcggctgggtgtctacacggttgatcagc  
 agcgaacttcttctccagtttggtcgtttctcctccagcttttccacttccaggtcgttctc  
 cagggattgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgaggaaacgaggggaatta  
 tgctcggtaattcagtaaaattgagaagggtgcacacatatgacgaccttcgatatggccgc  
 tgctgtgatgatgatgatgatgatgatggccatgggtatatctccttcttaaagttaa  
 acaaaattatttctagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgagtcgtattaa  
 ttctcggggatcgagatctcgatcctctacgccggacgcacgtggtggcgccatcacggcgcca  
 cagggtcggttgctggcgccctatatcgccgacatcacggatgggggaagatcgggctcgccactt  
 cgggctcatgagcgttggtttcggcgtgggtatggtggcagggcccggtggcgggggactgttg  
 ggcccatctccttgcatgcacattccttcggcgcggtgctcaacggcctcaacctactac  
 tgggctgcttcttaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatcccggaacacatcgaat  
 ggccgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcggcggaagagagtcattcagggtggtgaa  
 tgtgaaaccagtaacgttatcacgattgcgagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcc  
 cggtggtgaaaccagggccagccagcttctcgcaaaacggggaaaaagtggaagcggcgatgg  
 cggagctgaattacattcccaaccggtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgat  
 tggcgttgccacctccagctggtccctgcacgcgcgtcgcaaatgtcgcgggcagattaaatct

도면5b

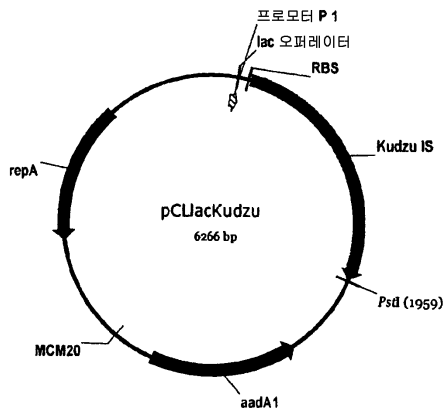
cgcgccgcatcaactgggtgccagcgtgggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcct  
gtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtggtgatcattaaactatccgct  
ggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcggtatttcttgat  
gtctctgaccagacacccatcaacagttatttctcccatgaagacggtacgcgactggcg  
tgagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaaattctgt  
ctcgcgcgctctcgctctggctggctggcataaatactcactcgcaatcaaattcagccgata  
gcggaacgggaagcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatg  
agggcatcgttccactgcgcatgctggttgcaacgatcagatggcgctggggcgaatgcgcgc  
cattaccgagtcggggtgcgctgtggtgcggatatactcggtagtgggatcgcgcataccgaa  
gacagctcatgttatatcccgcgttaaccaccatcaaacaggatttgcctgctggggcaaa  
ccagcgtggaccgcttgcctgcaactctctcagggccaggcgtggaagggcaatcagctgttgc  
cgtctcactggtgaaaaaaccacccctggcgcccaatcgcgaacccgctctcccgcgcg  
ttggccgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccgactggaagcgggcagtgagcgc  
aacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccggatctcgaccgatgcccttgagag  
ccttcaaccagtcagctccttccggtggcgcggggcatgactatcgtcgcgcgacttatgac  
tgtctctttatcatgcaactcgtaggacaggtgcgcgcgctctgggtcatttctggcgag  
gaccgcttctcgctggagcgcgacgatgatcgccctgtcgttgcggtattcggaatcttgacg  
ccctcgctcaagcctctcgctcactggtccgcgcaacaaacgttccgcgagaagcaggccattat  
cgccggcatggcgcgacgcgctgggtcactcttgcctggcgttcgcgacgcgaggtggtg  
gccttcccatatgattctctcgttccgcggcagcggatgcccgcttgacggccatgc  
tgtccaggcaggtagatgacgacatcagggaacagcttcaaggatcgtcgcggctctaccag  
cctaacttcgatcactggacgcgtgatcgtcacggcgatttgcgcctcggcgagcacatgg  
aacgggttgccatggattgtaggcgccgcccataacctgtcgtcgtcccgcttgctcgcg  
gtgcatggagccggccacctcgacctgaatggaagccggcgccactcgctaacggattcacc  
actccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgcaaaccaaccctggc  
agaacatatccatcgctccgccatctccagcagccgcgcgcgcatctcggcgagcgttgg  
gtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggggt  
tgcccttactggttagcagaatgaatcaccgatcgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgca  
aaacgtctcgacactgagcaacaacatgaatggtcttcggttccgtgttctgtaaatctgga  
aacgcggaagtgcgcgcctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggcta  
ccctgtggaacacctacatctgtatgaacgaagcgtggcattgaccctgagtgatttctct  
ggtcccgcccatccataccgcaagtgttaccctcaaacgttccagtaaacgggcatgttc  
atcatcagtaaccgctatcgtgagcatcctctcgttctcatcggtatcattacccccgaac  
agaaatcccccttacacggaggcatcagtgacaaacagggaacacccgcttaacatggccc  
gctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgggatgaaca  
ggcagacatctgtaactcgttcacgaccacgctgatgagcttaccgcagctgctcgcgcgt  
ttcggtgatgacggtgaaacacctgacacatgcagctcccgagacggtcacagcttctctgt  
aagcggtatgcgggagcagacaagccgctcagggcgcgctcagcggtgttgccgggtgcggg  
cgacgcatgacccagtcacgtacgcatagcgagtgataactggttaactatgcggcatcag  
agcagattgtactgagagtgacacatatcggtgtgtaaatccgcacagatgcgtaaggaga  
aaataccgcatcaggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggtcgttccggc  
tgccggcgagcggtatcagctcactcaagggcggttaacgggttatccacagaatcaggggataa  
cgaggaagaaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaggccgcttg  
ctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtacaga

도면5c

ggtagcgaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccgtgaagctccctcgtgcg  
ctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtg  
gcgcttctcatagctcagcgtgtaggatctcagttcggtgtaggctcgtcgtccaagctgg  
gctgtgtgcacgaaccccgctcagccgacccgctgcgccttaccgtaactatcgtcttga  
gtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcaga  
gcgaggtatgtaggcggtgtctacagagttcttgaagtgggtgcctaaactacggtacacataga  
ggacagttattggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctc  
ttgatccggcaaaacacccgctggttagcggtggttttttgttgcagcagcagattacg  
cgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtgga  
acgaaaactcaggttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttccactagatcct  
tttaattaaaaatgaagttttaaatactaaagtataataggtaaacttggtctgacagt  
taccatgcttaatacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgtcatccatagttg  
cctgactccccgtgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgc  
aatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacagccagccgga  
agggccgagcgcaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctctaatgttggc  
gggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcagg  
catcgtggtgcacgctcgtcgtttggtatggctcattcagctcgggttcccaacgatcaagg  
cgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctcctcgtcctccgatcgttg  
tcagaagtaagttggcgcaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttac  
tgtcatgcatccgtaagattgcttctgtgactggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaa  
tagtgtatcgccgcagcaggttgctcttgccggcgctcaacacgggataataccgcgccacata  
gcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaaacttcttcggggcgaaaaactctcaaggatctt  
accgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatctcagcatcttt  
actttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataa  
ggggcacacggaaatgtgaatactcatactcttcttctcaatattatgaagcatttatca  
gggtattgtctcatgagcgggatacataattgaatgtatttagaaaaataaacaataagggtt  
ccgcgacatttcccgaaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaa  
cctataaaaaataggcgatcacgaggcccttctgcttcaagaa  
(SEQ ID NO:5)



도면6



도면7a

1-  
ccgctcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagctggcagcaggtttcc  
cgactgaaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattagccaccc  
caggctttacactttatgcttccggtcgtatgttgtggaattgtgagcggataacaatttc  
acacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgcattgaaataaggaggaataaa  
ccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgctcgttcgcgaaa  
ctatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaa  
aagctggaggagaaaagcgacaaaactggaggaagaagttcgctgcattgacacccgtgtagaca  
cccagccgctgtccctgctggagctgacgacgatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatt  
tgaanaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaagaacaaa  
tctgacctgcagcaacccgctctgtcttccgctcgtcgcgtcagcacggtttcgaggtttctc  
aggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcgggtaactgaaaggtgacgt  
ccaagccctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcagagggtagaacctgctggag  
gagggcgctacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaagcattataaccaagg  
ttgcagaacaagtgcgacacccctggaactgccatcacccagcgtctgcacccgtctggaggc  
acgttgggtcctggataaatacgaacccgaaaagaacccgcatcacccagctgctgctggagctggcg  
aagctggattttaacatggtagacacccctgcaccagaaaagagctgcaagatctgtcccgtggt  
ggaccgagatgggcctggtagcaaacctggattttgtacgcgacccgctgtaggaagttatct  
ctgggacactgggtatggcgccagaccccgagtttggtagatgtcgcaagctgttactaaaatg  
tttggctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaac  
tgttcacccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctatatacacccctgcgggactatgaa  
actgtgtttcctggcactgtacaacacccgttaacgacacgtcctattctatctgaaagagaaa  
ggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaaagcctttctgcaag  
aggcgaatgggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctgaaaacgccagcgt  
ttcctcctccgggtgtagcgtgctggcgccgtcttactttccgtagtgcagcagcaggaagac  
atctccgaccacgcgtgcttccctgaccgacttccatggctggtgcttctagctgcttta  
tcttccgctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactacaa  
ttctatcattagctacatgcagaaaacgatggtaccagcaggaacagcccgcaagaactg  
cgtaaactgatgcagccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacctgc  
tgccctaaagcgttcatggaatcgagttacatggcagctgtttccactgcacctaccagta  
tgggcatgggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaaactgctgctgattgac  
cctttccgattaaacagctgatgtatgtctaactgcaggtcgactctagaggatccccgggta  
ccgagctcgaattcactggccgctgttttacaacgctcgtgactgggaaaaccctggcgttaccc  
aacttaatcgcccttgacgacatccccctttcgccagctggcgttaatagcgaagagggccgcac  
cgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgggtattttctc  
cttacgcactctgtggcgtatttcaacccgcatatggtgcaactctcagtacaattctgctgatg  
ccgcatagtttaagccagccccgacacccgcaacacccgctgacgagcttagtaaaagccctcgc  
tagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcc  
tttcatgatatactcccaatttgtgtagggttattatgcacgcttaaaaataataaaagcag  
acttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatcctaagccttgagttaaagc  
cgcgccgcgaagcggcgtcggttgaacgaattgttagacattattgcccgaactaccttggtga  
tctcgctttcacgtagtggaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcgtcttc  
ttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagatgacgggctgatactgggcccgcagggcgc  
tccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgattttgcgggttactgcgctgtacaaa  
tgccgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagccagtcggcgcgaggttccatag

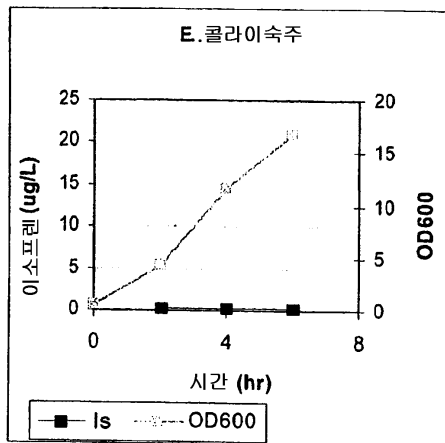
도면7b

cggttaagggtttcatttagcgccctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagtctctcc  
gccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgccttttgcagcaagatagccagatcaa  
tgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattg  
cagttcgcgcttagctggataaacgccacggaaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgactct  
acagcgcggaagaatctcgtctctccagggaagccgaagtttccaaaaggctcgttgatcaaag  
ctcgcgcggttgtttcatcaagccttacggtaaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtgg  
cttcaggcgcccatccactcggagccgtacaatgtacggccagcaacgtcgggtcgagatgg  
cgctcgatgacgccaaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgctccctca  
tgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgogtaacatcgttgctgctccataacat  
caaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgcgtgcttgatgcccgaggcatagactgtacccca  
aaaaaacagtataaacaagccatgaaaaccgcaactgcgcgcttaccaccgctcgttcggtca  
agggttcggaccagttgcgtgagcgcatagcctacttgcatcagcttacgaaccgaacaggc  
ttatgtccactgggttcgtgccttcacccgtttccacgggtgcgtcaccggcaaccttgggc  
agcagcgaagtgcaggcatttctgtcctggctggcgaaacgagcgcaagggttcggtctccacgc  
atcgtcaggcattggcgcccttgctgttcttctacggcaagggtgctgtgcacggatctgcctg  
gcttcaggagatcggaagacctcggcgctcgcggcgcttgccgggtggtgctgaccccggtgaa  
gtgggttcgcatcctcgggtttctggaaggcgagcatcgtttgttcgccagcttctgtatggaa  
cgggcatcgagatcagtgagggtttgcaactcggggtcaaggatctggatttcgatcacggcac  
gatcatcgtgcgggagggaagggtccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttgcca  
cccagcctgcgcgagcagggaatttaattcccaagggttttgctgcccgcaaacgggctgttct  
ggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgcgggctgaaagcgc  
tatttctccagaattgccatgatttttcccaagggaaggcgctcactggctcccggtgtgtcg  
gcagctttgattcgataagcagcatcgctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgt  
aacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagtgtctttgtttactggttcacctgtt  
ctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcaggtgaacagcttga  
atgcacaaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgca  
tatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtctt  
gatgttccactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttcogtatttagccagtag  
ttctctagtgtggttcggtgttttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttac  
tttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtagctgaattttgcagttaaagcatc  
gtgtagtgttttcttagtcggttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtattttg  
tcaccattcatttttatctggtgttctcaagttcgggttacgagatccatttgtctatctagt  
caacttggaaaaactcaacgtatcagtcggcgccctcgttatcaaccaccaatttcatattgct  
gtaagtgtttaaatcttacttattggtttcaaaacccattgggttaagccttttaaaactcatgg  
tagttattttcaagcattaaacatgaacttaatttcatcaaggctaactctctatatttgccttgt  
gagttttcttttgtgttagttcttttaataaaccactcataaactcctcatagagtatttgtttc  
aaaagacttaacatgttccagattatattttatgaattttttaactggaaaagataaggcaat  
atctctcactaaaaactaattctaattttgcgttgagaacttgccatagtttgtccactgga  
aaatctcaagcctttaaccaaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggt  
tgctttagctaatataccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtatttggtta  
taagtgaacgataccgtccgttcttctcttgtaggggtttcaatcgtggggttgagtagtgcca  
cacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgtagtctatt  
tgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattgggtctaggtgattttaatcactatac  
caattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttctcttgagttgtgggtatctgta

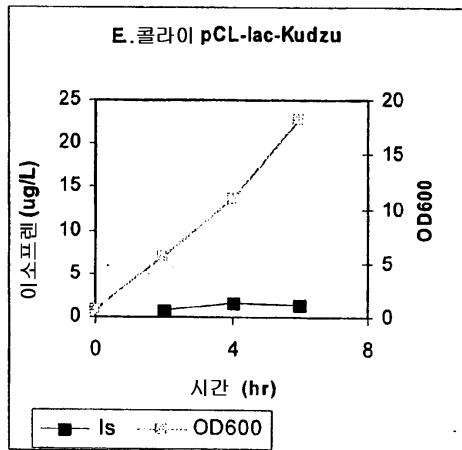
도면7c

Aattctgctagacctttgctggaaaacttgtaaatctctgctagacctctgtaaatccgctag  
acctttgtgtgtttttttgttttatattcaagtgtttataatttatagaataaaagaaagataa  
aaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttttagtcagttccgcagt  
attacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaacccctaaagg  
cttaagttagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatatctctttgtctccgaccatcag  
gcacctgagtcgctgtcttttctgtgacattcagttcgtcgcgtcacggctctggcagtgaa  
gggggttaaatggcactacaggcgcttttatggattcatgcaaggaaactaccataatacaag  
aaaagccgtcacgggcttctcaggcggttttatggcggtctgctatgtggtgctatctgact  
ttttgtgttcagcagttctcgcctctgattttccagctcgaccacttcggattatcccgta  
caggtcattcagactggctaattgcaccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:7)

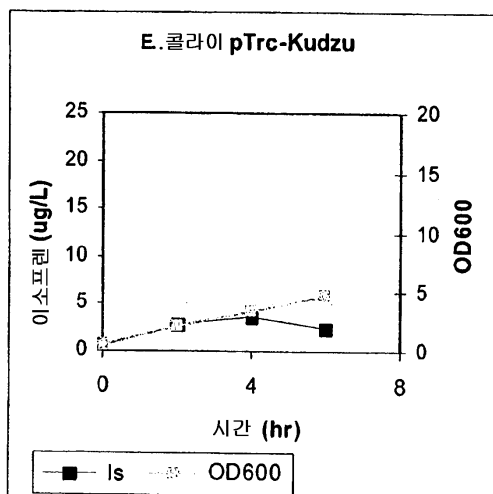
도면8a



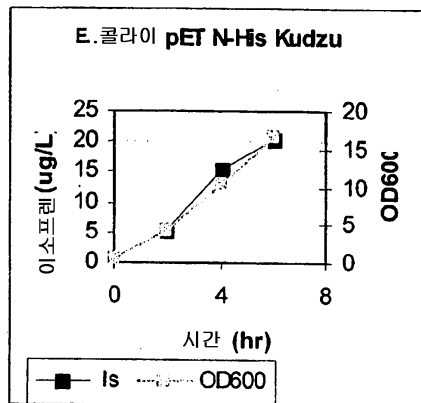
도면8b



도면8c

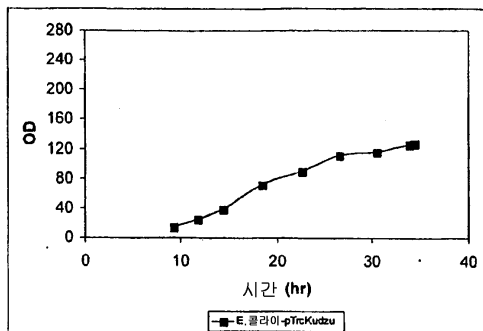


도면8d

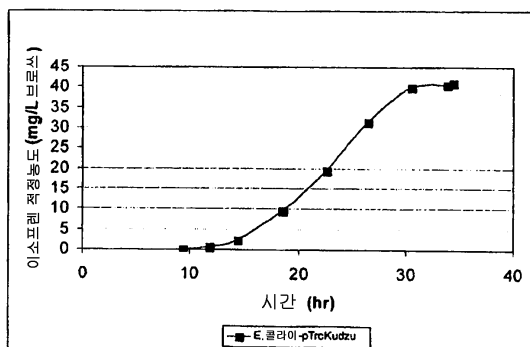


도면9

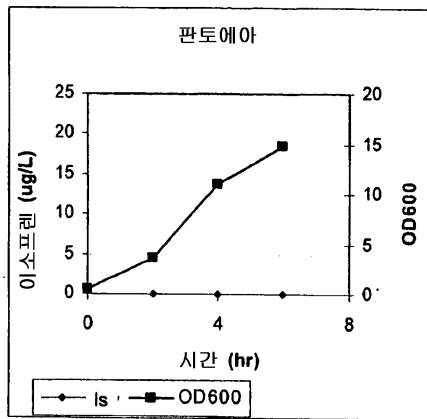
A.



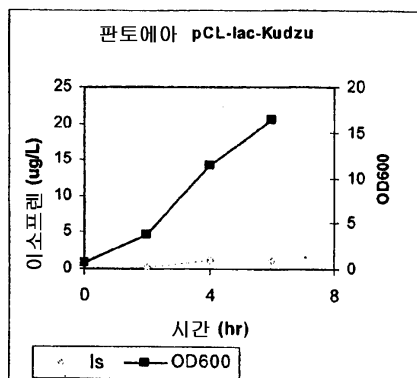
B.



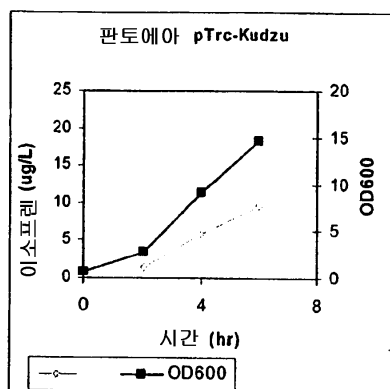
도면10a



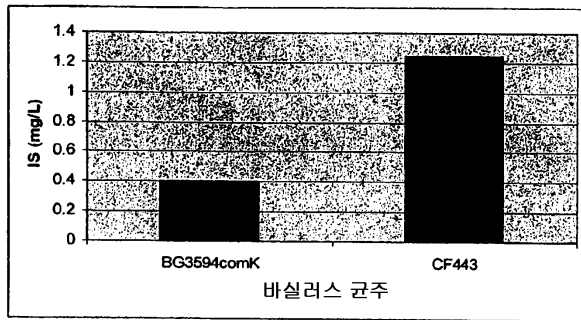
도면10b



도면10c



도면11



도면12a

1-  
gaattgctccattttcttctgctatcaaaataacagactcgtgattttccaaacgagctttcaa  
aaaagcctctgccccttgcaaatcggatgcctgtctataaaattcccgatattggttaaacagc  
ggcgcaatggcgccgcatctgatgtcttctgctggcgaatgttcatcttatttcttccctccct  
ctcaataattttttcattctatcccttttctgtaaagtattttttcagaatactttatcatc  
atgctttgaaaaatatcacgataatatccattgttctcacggaagcacacgcagggtcatttga  
acgaattttttcgacaggaatttggcgggactcaggagcatttaacctaaaaaagcatgacatt  
tcagcataatgaacatttactcatgtctattttcgttcttttctgtatgaaaaatagttatttcg  
agtctctacggaatagcgagagatgatatacctaaatagagataaaatcatctcaaaaaatg  
ggctactaaaaatatttccatctattacaataaattcacagaatagtcctttaagtaagtct  
actctgaatttttttaaaaggagagggtaaagagtgtgtgcgacctcttctcaatttactcaga  
ttaccgagcataattcccgtcgttccgcaaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcct  
gcaatccctgggagacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaactggaggaa  
gaagtctcgtgcatgatcaaccgtgtagacacccagcgcgtgtccctgctggagctgatcgacg  
atgtgcagcgctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacat  
cgtactgctggagcaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgt  
ctgctgctcagcacggtttcgagggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaag  
gtggtttcagcgggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaaagcgtctta  
cctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctacctttccatcacccacctgaag  
aacaacctgaaagaaggcatttaataccaaggttgagaacaagtgagccacgcccggaaactgc  
catatcacacgctctgcacgctctggaggcacgttggttccctggataaatacgaaccgaaaga  
accgcatcacacgctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcac  
cagaagagctgcaagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggctagcaaaactggatt  
ttgtacgcgaccgcctgatggaagtattttctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtt  
tggtgaatgtcgcaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtat  
gacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttaccgagctgtgtagagcgtgggacgtta  
acgctattaacacctgcccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacacctgtaa  
cgacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagc  
tggcgtgaactgtgcaagcctttctgcaagaggcgaatgggtccaacaacaaatttatcccg  
ctttctccaagtacctggaaaacgcccagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtc  
ttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgtgcgttccctgaccgac  
ttccatggtctggtgctgttagctgcttattctccgctgtgcaacgatctggccacctctg  
cggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatgg  
taccagcgaggaaacaggccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgcgaatggaaaaagatg  
aatcgtgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagtttaaca  
tggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgccagactacgcgac  
tgaaaaacccgatcaaaactgctgctgattgacctttcccgatcaaccagctgatgtatgtctaa  
aaaaaacccggccttggccccgcgggtttttattatttttcttccctccgcatgttcaatccgct  
ccataatcgagggtatggctccctctgaaaattttaacgagaaacggcggttgaccggctcag  
tcccgtaacggccaagtctgaaacgtctcaatcgccgcttcccgtttccggctcagctcaatg  
ccgtaacggctcgcgcgcttttctgataccgggagacggcattcgtaatcgatcctctagag  
tcgacctgcaggcatgcaagctttgcctcgcgctttcgggtgatgacggtgaaaaacctctgaca  
catgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccg  
caggcgcgctcagcgggtgttgcggggtgtcggggcgagccatgaccagctcacgtagcgata

도면12b

gcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatag  
cggtgtgaaataacgcacagatgcgtaaggagaaaaatccgcacaggcgctcttccgcttccct  
cgctcactgactcgctcgctcggtcggttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggc  
ggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaaagaacatgtgagcaaaaggccag  
caaaaggccaggaaacgtaaaaaaggccggttgcgtggcggttttccatagggtccgccccctg  
acgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagata  
ccaggcggtttcccccctggaagctccctcgctcgctctcctgttccgaccctgccgcttacggga  
tacctgtccgcttctcccttcgggaagcggtggcgcttctcaatgctcacgctgtaggtatc  
tcagttcggtgtaggtcggtcgctccaaagctgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcccgga  
ccgctgcgcttatccggtaactatcgctcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcca  
ctggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagtctt  
tgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatgtgtatctgcgctctgctgaa  
gccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaccccgctggttagc  
ggtggttttttgggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctt  
tgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcat  
gagattatcaaaaggatcgaagtcggttcagaaaaagaagatattggaatctggagctgtataa  
taaaaaaccttctcaactaacggggcgaggttagtgacattagaaaaacgactgtaaaaagtaca  
gtcggcatttatctcatattataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagt  
tcataaacaatcctgcattgataaccatcacaaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaa  
atataatgaattacctttatgaattttcctgctgtataatgggtagaaggtaattacta  
ttattattgatatattaggttaaaacccagtaaatgaagtcctatggaataatagaagagaaaaag  
cattttcaggtataggtggtttgggaacaatttaaaagaaccatttatattctctacatcaga  
aaggtataaaatcataaaactcttgaagtcattctttacaggagtcataataccagagaatggt  
ttagatacaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaactctccgt  
cgctattgtaaccaggttctaaaagctgtatttgagtttatcacccttgctcactaagaaaaataa  
tgacgggttaaaatttatatccttcttgggtttatgtttcggtataaaacactaatatcaatttct  
gtggttatactaaaagtcgtttgttgggtcaaaataatgattaaatatctctttctctccaat  
tgtctaaatcaattttatgaagttcatgtgatgcctcctaaatttttatcgaagtgaatt  
taggaggttactgtctgtcttcttctcattagaatcaatcctttttaaagtcataattactgt  
aacataaatatataatttaaaaatatccactttatccaattttcggttgggtgaactaatgggt  
gctttaggtgaagaataaagaccacattaaaaatgtggtcttttggtttttttaaaggattt  
gagcgtacgcgaaaaatccttttcttcttcttcttcttctgataataagggttaactattgccggt  
tgtccattcatggctgaactctgcttctctgttgacatgacacacatcatctcaatatccgaa  
tagggcccatcagctctgacgaccaagagagccataaacaccaatagccttaacatcatcccat  
attatccaatatctgttcttcttaatttcatgaacaatcttcatcttcttctctagtcatat  
tattggtccattcactattctcattcccttttcagataattttagatttgcttttctaaataag  
aatatttgagagcaccggttcttattcagctattataaactcgtcttctcaagcatccttcaat  
ccttttaataacaattatagcatctaacttcaacaaactggccggtttgtgaactactcttt  
aataaaaatatttttcggttcccaattccacattgcaataatagaaaaatccatcttcatcggt  
tttctgcatcatctgtatgaatcaaatcgcttcttctgtgtcatcaaggtttaaatttttat  
gtatttcttttaacaaaccataggagattaaccttttacggtgtaaaccttctccaaatc  
agacaaacggttcaaatcttttctcatcatcggtcataaaatccgtatcctttacaggtat  
tttgagtttctgtcaattgcgattgtatatccgatttatatttttccggtcgaatcattt  
gaactttacatttggtcatagtctaatctcattgcctttttccaaaattgaatccattggtt

도면12c

ttgattcacgtagttttctgttattctaaaaataagttggttccacacataccattacatgcatg  
tgctgattataagaattatctttattatttattgtcacatccgttgacgcataaaaccaacaa  
gattttttatatttttttatattgcatcattcgcgcaaatccttgagccatatctgtcaaaact  
cttattttaattcttcgcatcataaacatttttaactgttaattgtgagaacaacacgaact  
gttggcttttgtttaaatcttcagcaacaaccttttgactgaatgccatgtttcattgctc  
tctccagttgcacattggacaaagcctggatttgcaaaaccacactcgataccactttcttct  
gcctgtttcacgattttgtttatactctaattttcagcacaatcttttactctttcagccttt  
ttaaatcaagaatatgcagaagttcaaagtaatacaattagcgattttcttctctccatg  
gtctcacttttccacttttgtctgttccactaaaaccccttgatttttcatctgaataaatgct  
actatttagcacacataatattaaaagaaccccatctatttagttattgttttagtcaacttat  
aactttaacagatggggtttttctgtgcaaccaaattttaagggttttcaataactttaaacaca  
tacataccaacacttcaacgcacctttcagcaactaaaaataaaaatgacgttatctctatatgt  
atcaagataaagaagaacaggttcaaaacccatctatttagttattgttttagtcaacttat  
attttataaactcattccctgatctcgacttcttcttttttacctctcgtttatgagttagt  
tcaaatctgttctttttaggttctaaatcgtgttttcttggaaattgtgctgttttctcctta  
ccttctctcaaaaccccttaaaacggtttttaagggttttaaggcgtctgtacgttctcttaag

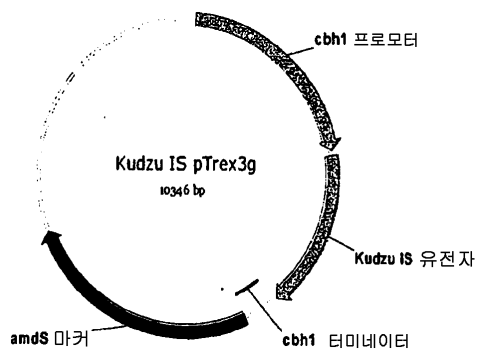
(SEQ ID NO:57)



도면13

ATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTACTCAGATTACCGAGCATAATTCTCGACGATCTGCTAACT  
 ACCAGCCGAACCTTTGGAACCTTTGAGTTTCTCCAGTCTCTCGAAAAATGACCTGAAGGTGGAAAA  
 GCTCGAGGAGAAGGCGACCAAACTCGAGGAGGAGGTGCGATGTATGATCAACAGAGTTGACACC  
 CAACCCCTGTCTTTGCTGGAGCTGATCGACGATGTGCGAGCGTTGGGTTTGACTTATAAATTG  
 AGAAGGACATTATCAAGGCACCTGGAGAACATTGTGCTCCTCGACGAGAACAAGAACAAGTC  
 TGATCTTCACGCTACCGCTCTCTCTTTCCGACTTCTTCGACAACACGGCTTCGAGGTGTGCGAG  
 GACGTCTTCGAGAGATTTAAGGACAAGGAGGAGGATTTAGCGGCGAGCTGAAGGGAGACGTTT  
 AGGGTCTTCTCTCTTGTACGAGGCGTCTACCTGGGATTTCGAGGGAGAGAACCCTCGGAGGA  
 AGCTCGTACATTTTCCATCACTCACCTTAAGAATAACCTTAAGGAGGGAATTACACCAAGGTG  
 GCCGAGCAGGTTTCTCACGCCCTGGAGCTCCCTACCACCAACGGCTCCATAGACTGGAGGCTC  
 GTTGGTTCTTGGACAAATATGAGCCAAAGGAGCCTCATCATCAGTTGCTGTTGGAGTTGGCCAA  
 GCTGGACTTCAATATGGTTTCAGACGCTGCACCAAAAGGAGTTGCAGGACCTGTCTCGATGGTGG  
 ACCGAGATGGGATTGGCCTCGAAGCTGGATTTTGTCCGTGACCGACTTATGGAGGTCTATTTT  
 GGGCCCTTGGAAATGGCGCCTGACCCCAAGTTTCGGAGAGTGCCGGAAGCGGTGACGAAGATGTT  
 CGGTCTTGTGACTATCATCGACGAGCTTACGATGTCTACGGCACACTCGACGAGTTGCAGCTG  
 TTCCTGACGCCGTCGAGCGATGGGATGTGAACGCCATTAATACTCTCCCTGACTATATGAAGC  
 TGTGCTTCTGGCTCTGTACAACACTGTCAACGATACCTCGTACTCTATCCTCAAGGAGAAGGG  
 ACACAACAATCTCTCTACTTGAACAAATCTGGCGAGAAGTGTGCAAGGCTTTTCTGCAGGAG  
 GCTAAATGGTCCAAATAACAAGATATTCTGCTTTTCTAAATACCTGGAAAATGCCTCGGTGT  
 CGAGCTCTGGCGTCGCCCTTCTGGCCCTTCTACTTCTCCGCTGCGCAGCAGCAGGAGGATAT  
 TTCCGATCATGCTCTTAGATCGCTGACCGATTTTACGGCCTCGTGCGATCTTCTGCGTGATT  
 TTTCGGTTGTGTAATGACCTTGGCGACCTCTGCTGCTGAGCTGGAACGAGGCGAGACTACAAAT  
 CCATTATTTCTTACATGCACGAAACGATGGAACATCTGAAGAACAGGCTAGAGAGGAAGTGGC  
 AAGTTGATCGACGCCGAGTGAAGAAGATGAACAGAGAGCGGGTGTCCGACTCTACCTGCTT  
 CCCAAGGCCTTCATGGAGATCGCCGTGAACATGGCTCGAGTTTCCCATTTGACTTACAGTACG  
 GTGACGGCCTGGGTCGTCCGACTACGCTACAGAGAACCGAATCAAGCTGCTGCTCATCGACCC  
 CTTCCTATCAACCAATTGATGTACGTGTAA  
 (SEQ ID NO:8)

도면14



도면15a

```

1   TCGACCGGTG AGAAGAACAG CATCGGGACA AGGGAAGGAA GAACAAAGAC AAAGAAAACA
61  AAAGAAAGCA ATTGAAAACA AAACAAAACA ATTTTCATTG CTCTCTTTAT CATTCCTTTT
121 CTTTTCTTTT CTCTCAATCA ACGCACTCCA TCGTATCCGT ATTCTCTTTA TTTTTCTCT
181 TTCTCTATAT CCAATTTCTT CTCTCTAGGT GTCTCCTCTC TCCTCTTTCA ATTTCTCTAC
241 TCCGCATTCC AACGCATCCT TCCCCCAACC TCCCATTTCC TCCTTACGGC CCGATAGCGA
301 TCGTCTTTCC CTCGCTATCA CTCGCTACCG GCCCCTCCTC TGCACCGTAA CCTCCTACGT
361 ATTTACCATA TCATAAAGTT TTTCCGAGC CTATCGCTG ACCCCCTGTC GCCCTCTAT
421 TGGCTTCCGG ATTTCTTTCT TGTCCATAAG GTGATCCATG CTTCCTGAAG ATTCGCGAAA
481 TGTGTCCACT TTGGCGGGGA ATCATTCCAT CCACTTCTTT CTCTCTCGCT TTCTCTATT
541 GCGCTCCTCC TTCCGCGTCT CATTGGTCTT CCGCTCCGTT TTTGCTTTGC CGATGTTACT
601 TTGGGAGAGG TCGGATAATC CTTTCGCAAA AACTCGGTTT GACGCTCCG ATGGTATAAA
661 TAGTGGGTGG TGGACAGGTG CCTTCGCTTT TCTTTAAGCA AGAGAATCCC ATTGCTTTGA
721 CTATCAGCAA TTCACATACA TTATGAAGAT CACGCTGTGC ATTGCCCTTT TATTCTCACT
781 TGCCTGCTGC TCACCTATTC CAGTTGCCGA TCCTGGTGTG GTTCAGTTA GCAAGTCATA
841 TGTCTGTTTC CTTCTGTTT ACCAAAGTTG GAACACTTTT GCTAATCTG ATAGACCAA
901 CCTTAAGAAG AGAAATGATA CACCTGCAAG TGGATATCAA GTTGAAGAG TCGTAATTTT
961 GTCACGTCAC GGTGTTAGGG CCCCTACAAA AATGACTCAA ACCATGCGTG ATGCTACTCC
1021 TAATACATGG CCAAGATGGC CCGTTAAAT AGGATATATT ACACCAAGAG GTCAACACTT
1081 GATATCACTT ATGGCGGGT TTTACCGTCA AAAATTCAG CAACAAGGAA TCCTTTCTCA
1141 GGGCTCTCTG CTTACTCTTA ACTCCATATA TGCTGGGCT GACCTCGATC AGCCTACTTT
1201 AAAAATCTGT GAAGCATTC TGTCTGTTT GGCACCAAA TGTGGCTTGA CAATTCATCA
1261 CCAACAAAAT CTTGAGAAAG CTGATCTCTT TTTTCATCCC GTTAAAGCTG GAACCTGCTC
1321 TATGGATAAA ACTCAAGTTC AACAACTGT TGAGAAAGAG GCACAACTC CTATAGATA
1381 TTTGAATCAA CATTACATCC CTTTTTAGC TTTAATGAAT ACAACATTAA ATTTTAGTAC
1441 TTCTGCTGGG TGCCAAAAC ACTCTGCTTA TAAATCTGT GACCTAGGTT TATCCATGCC
1501 TTCTCAATGG TCCATAAAG ATATGGTAA CAAGCTCGCA TTGGATGGAG CTATTGGTCT
1561 ATCTCTACTT TTGGCCGAGA TTTTCTTCT TGAATATGCT CAAGGCATGC CTCAGCTGCT
1621 TTGGGGTAAC ATCCACTCAG AGCAAGAGTG GCTTCTCTG CTAAGAGTGC ATAAATTTCA
1681 ATTCGATTTG ATGGCCGAA CACCTTATAT TGCTGCAGT AACGGTACT CTTTATTGCA
1741 AGCTATATCA AATGCCCTTA ATCCCAAGC CACTGAATCA AAACCTCCAG ATATTTCAAC
1801 TGATAACAAA ATATTGTTCA TTGCAGTCA TGACACAAAT ATTGCTAATA TAGCCGCGAT
1861 GTTAAATATG CTTTGGACAT TACCAGTCA ACCAGATAAT ACTCCTCCAG GTGGTGCCCT
1921 AGTATTGAA CTTCTTGCTC ATAAAGTGG AAAACAATAT GTTCTGTAT CTATGGTTTA
1981 TCAAACTACT GAACAACTT CATCACAGC TCCCTTTCT CTAATCAGC CTGCGGATC
2041 TGTCAACTT AAAATTCAG GTTGAATGA TCAACAGCC GAGGGTTACT GTCTCTTTC
2101 CACTTTTACA AGAGTTGTTT CCCAATCTGT TGAACCTGGA TGCCAACTTC AATAATGAGG
2161 ATCCAAGTAA GGAATGAGA ATCTGATCCA CTTTAAATC CTAATGAATA CATGCCATA
2221 GTTCTTTTCT TTTGTTCTTT ATCTCGTTTT TCGATGGTAC GGCCGTTGTC AATCTCAGTT
2281 TGTGTGCTTG GTTCAGCTT GGTTCAAAT CTGTTCATCT CATGAATCTT TTACCATTTT
2341 ACCACACGTT TATACCATTC TCTCATAGAA TCTTCATCAA ACCATCTCGG GGTTAGAGTG
2401 GAAGAAAGT CTTGTTCTT TATTTCCTTT TTTCATCTT CAAGGCTTTT CTTTCTTCC
2461 TCCTCTCTGT TCATCTTGAG GTTGACGTG TCTGTTTAGA ATTTGAGCT GTTGACGAT
2521 CTTATTTTTT GTTTGCGAA AACGAAGCGC TTTACTCTCT TCATCAGTTG GACGATTGTA
2581 CTTTGAATA CCAACTACTT TTGCATGTT TGTATAGAAA TCAATGATAT TAGAATCCCA
2641 TCCTTTAATT TCTTTCAAAG TAGTTGAGCT ATAGTTAAGT GTAAGGGCCC TACTCGGAAA
2701 GCATTTGCCA AGGATGTTT CATTAAATCA GAACGAAAGT TAGGGGATCG AAGACGATCA
2761 GATACCGCTG TAGTCTTAAC CATAACTAT GCCGACTAGG GATCGGGCAA TGTTCATT
2821 ATCGACTTGC TCGGCACCTT ACGAGAAATC AAAGTCTTTT GGTTCGGGGG GGAGTATGGT
2881 CGCAAGGCTG AAACCTTAAAG GAATGACGG AAGGGCACCA CATGAGAGTG GAGCCTCGGG
2941 CTTAATTTGA CTCACACGG GGAACCTCAC CAGGTCCAGA CATAGTAAGG ATTGACAGAT
3001 TGAGAGCTCT TTTCTGATTC TATGGGTGGT GGTGCATGGC CGTCTCTAGT TGGTGGAGTG
3061 ATTTGCTGCT TTAATTGCGA TAACGAACGA GACCTTAACC TGCTAAATAG TGGAGTCTG
3121 CATTTTGGCT GATCATTAGC TTCTTAGAGG GACTATTGGC ATAAAGCCAA TGGAAAGTTT
3181 AGGCAATAAC AGTCTGTGA TGCCCTTAGA TGTCTGGGC CGCACGCGCG CTACACTGAC
3241 GGAGCCAAAG AGTTGAAAAA AATCTTTTGA TTTTATATCC TTGGCGGGAA GGTCTGGGTA
3301 ATCTTTGTTAA ACTCGTCTG GCTGGGGATA GAGCATTGCA ATTTATGCGG CCGCTCCTCA
3361 ATTCGATGTT GCAGATTTTA CAAGTTTTTA AATGTATTTT CATTATTTACT TTTTATATGC
3421 CTAATAAAAA AGCCATAGTT TAATCTATAG ATAACTTTTT TTCCAGTGCA CTAACGGAGC

```

도면15b

3481 TTACATTCCC ATACAAAAC TCGTAGTTAA AGCTAAGGAA AAGTTAATAT CATGTTAATT  
3541 AAATACGCTA TTTCACATAA GACATTGAAC TCATTATATAT CGTTGAATAT GAATAACCAA  
3601 TTTACGGGAA TTTTAAACAA ACATCGTTCA CCTCGTTTAA GGATATCTTG TGTATGGGGT  
3661 GTTGAATTGC TTTATCGAAT AATTACCGTA CCTGTAAATTG GCTTGTCTGA TATAGCGGTA  
3721 GTCTAATATC TAGCAAAAAT CTTTGGGTG AAAAGGCTTG CAATTTCAGC ACACCGAATC  
3781 ATTTGTCATT TTTAATAAAG GAAGTTTCC ATAAATTCCT GTAAATCTCG GTTGATCTAA  
3841 TTGAAAAGAG TAGTTTTGCA TCACGATGAG GAGGGCTTT GTAGAAAAG A7ACGAACGA  
3901 AACGAAAATC AGCGTTGCCA TCGCTTTGGA CAAGCTCCC TTACCTGAAG AGTCAATTT  
3961 TATTGATGAA CTTATAACTT CCAAGCATGC AAACCAAAAG GGAGAACAG TAATCCAACT  
4021 AGACACGGGA ATTGGATTCT TGGATCACAT GTATCATGCA CTGGCTAAAC ATGCAGGCTG  
4081 GAGCTTACGA CTTTACTCAA GAGGTGATT AATCATGAT GATCATCACA CTGCAGAAAG  
4141 TACTGCTATT GCACTTGGTA TTGCATTCAA GCAGGCTATG GGTAACTTG CGGCGTTAA  
4201 AAGATTGGGA CATGCTTATT GTCCACTTGA CGAGCTCTT TCTAGAAAGC TAGTTGACTT  
4261 GTCCGGGACG CCCTATGCTG TTATCGATT GGGATTAAAG CGTGAAGAGG TTGGGGAATT  
4321 GTCTGTGAA ATGATCCCTC ACTTACTATA TTCTTTTCG GTAGCAGCTG GAATTACTTT  
4381 GCATGTTACC TGCTTATATG GTAGTAATGA CCATCATCGT GCTGAAGAGC CTTTAAATC  
4441 TCTGGCTGTT GCCATGCGCG CGGCTACTAG TCTTACTGGA AGTCTGAAG TCCCAAGCAC  
4501 GAAGGGAGTG TTGTAAGATG GAATTGGATT ATGTACAGAA AGAAACGACA ATTTTGCATC  
4561 CAATTTGCTC AAATTTTAGA GTTGCTGAA AACAAATAGA CCTTACTTG TTTATTAATTA  
4621 CGTTAATTAG AAGCGTTATC TCGTGAAGGA ATATAGTACG TAGCCGTATA AATTGAATTG  
4681 AATGTTTACG TTATAGAATA GAGACACTTT GCTGTTCAAT CGCTGCTCAC TTACCATACT  
4741 CACTTTAATTA TACGACTTTA AGTATAAAT CCGCGGTTAT GGTAAATTA ATGATGCACA  
4801 AACGTCGAT TCCATATGGG TACACTACAA TTAATACTT TTAAGCTGAT CCCCACACA  
4861 CATAGCTTC AAAATGTTTC TACTCCTTTT TTACTCTTCC AGATTTTCTC GGACTCCGG  
4921 CATCGCCGTA CCACTTCAA ACACCAAGC ACAGCATACT AAATTTTCCC TCITTTCTTC  
4981 TCTAGGGTGT CGTTAATTAC CGTACTAAA GGTTTGGAAA AGAAAAAGA GACCCGCTCG  
5041 TTCTTTTTC TTGCTGAAA AAGCAATAA AAATTTTAT CAGTTTCTT TTTCTTGAAA  
5101 TTTTTTTTTT TAGTTTTTTT CTCTTTCAGT GACCTCCATT GATATTTAAG TTAATAAACG  
5161 GTCTTCAATT TCTCAAGTTT CAGTTTCATT TTCTTCTTC TATTACAACT TTTTAACTT  
5221 CTGTGTCATT AGAAAGAAAG CATAGCAATC TAATCTAAGG CGGTTGTTGA CAATTAATCA  
5281 TCGGCATAGT ATATCGCAT AGTATAATAC GACAAGGTGA GGAACATAAC CATGGCCAAG  
5341 TTGACCAAGT CCGTCCCGT GCTACCGCG CGCGACSTCG CGGAGCGGT CGAGTTCTGG  
5401 ACCGACCGCG TCGGGTCTC CCGGACTTC GTGAGGACG ACTTCCCGG GTGGTCCGG  
5461 GACGACGGA CCTCTTCAT GAGCCCGGT CAGGACGAG GTGTGCGGA CAACACCTG  
5521 GCTTGGGTGT GGTGCGGGG CTGACGAG CTGTACGCG AGTGTGCGG GTGTGTCTC  
5581 ACAGAACTCC GGGACGCTC CGGGCGGGC ATGACCGAGA TCGGCGAGCA CGCTGCGGG  
5641 CGGAGTTTGC CCTCGCGGA CCGGCGGGC AACTGCGTC ACTTCTGTC CGAGGAGCAG  
5701 GACTGACAG TCCGACGCG GCGGCGGGT CCGAGGCTC GGAGATCCG CCCCCTTTC  
5761 CTTCTCGAT ATCATGTAAT TAGTTATGTC ACGCTTACAT TCACGCGCTC CCCCACATC  
5821 CCGCTTAACC GAAAGGAAG GAGTTAGACA ACCTGAAGTC TAGGTCCCTA TTTATTTTTT  
5881 TATAGTTATG TTAGTATTAA GAACGTTATT TATATTTCAA ATTTTCTTT TTTTCTGTGA  
5941 CAGACGCGAG CTCCAGTA AATGTGCAAT CTGTAGGCA GAAACGGTT CCCCCTAGG  
6001 GTCTCTCTCT TGGCTCCCT TCTAGGTCGG GCTGATTGCT CTGAAGCTC TCTAGGGGG  
6061 CTACACCAT AGGCAGATAA CGTTCCCGAC CGGCTGCGCT CGTAAGCGCA CAAGGACTGC  
6121 TCCCAAGAT CCTAGGCGG ATTTGCGGA TTTGCGCTA AAGGAACCG AACACGTAGA  
6181 AAGCCAGTCC CGAGAAACGG TGCTGACCCC GGATGAATGT CAGCTACTGG GCTATCTGGA  
6241 CAAGGGAAAA CGCAAGCGCA AAGAGAAAG AGGTAGCTTG CAGTGGGCTT ACATGGCGAT  
6301 AGCTAGACTG GCGGTTTTA TGGACAGCAA CGGAACCGGA ATTGCCAGT GGGGCGCCT  
6361 CTGTGAGGT TGGGAAGGCC TGCAAGATGA ACTGGATGCG TTTCTTGGC CCAAGGATCT  
6421 GATGGCGCAG GGGATCAAGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG  
6481 AACAAAGATG ATTGACGCA GGTCTCTCG CCGCTTGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG  
6541 AGTGGGACA ACAGACAATC GGTGCTCTG ATGCCCGCT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG  
6601 GGGCGCGGT TCTTTTGTG AAGACCGACC TGTCGGGTG CCTGAATGA CTGCAGGAGC  
6661 AGGACGCGCG GCTATCGTGG CTGCGCACGA CGGGCTTCC TTGCGCAGCT GTGCTGACG  
6721 TTGCTACTGA AGCGGGAAG GACTGGCTG TATTGGGCGA AGTCCCGGG CAGGATCTCC  
6781 TGTCATCTCG CCTTGTCTCT GCGGAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGCGCG  
6841 TGCAATACGT TGATCCGCT ACCTGCCAT TCGACACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC  
6901 GAGCAGTAT TCGGATGGA GCGGCTCTG TCGATCAGGA TGATCTGAC GAAGAGCATC  
6961 AGGGGCTGCG GCCAGCGAA CTGTTGCCA GGCTCAAGG GCGCATGCC GACGGCGAGG

도면15c

7021 ATCTCGTGT GATCCATGGC GATGCTGCT TGCGAATAT CATGTTGAA AATGGCGCT  
7081 TTTCTGGATT CAACGACTGT GCGCGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT  
7141 TGGATACCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGCGAATG GGTGACCGC TTCTCGTGC  
7201 TTTACGCTAT CGCCGCTCCC GATTGCGAGC GCATCGCTT CTATCGCTT CTGACGAGT  
7261 TCTTCTGAAT TGAAGAGGT ACCAAGTTA CTATATATA CTTTAGATT ATTTAAACT  
7321 TCATTTTTAA TTTAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT  
7381 CCCTTAACGT GAGTTTTGCT TCCACTGAGC GTACAGCCCG GTAGAAAAGA TCAAGGATC  
7441 TTTCTGAGAT CCTTTTTTC TGCGCGTAA CTGCTGCTTG CAACAAAAA AACCACCGCT  
7501 ACCAGCGGTG GTTTGTTTC GCGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTCCGA AGGTAACCTG  
7561 CTTGACGAGA GCGAGATAC CAAATACTGT CCTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA  
7621 CTTCAAGAC TCTGTAGCAC CGCTACATA CCTGCTCTG CTAATCTGT TACCAGTGGC  
7681 TGCTCCAGT GCGATAAGT CGTCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA  
7741 TAAGGCGCAG CGGTGCGGCT GAACGGGGG TTGCTGCACA GAGCCAGCT TGGAGCGAAC  
7801 GACCTACACG GAAGTGAAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCGA  
7861 AGGAGAAAG GCGGACAGT ATCCGTAAG CGGCGGGT GGAACAGGAG AGCGACGAG  
7921 GAGCTTCCA GGGGAAACG CTTGCTATCT TTAGTCTCT GTGGGTTTC GCCACCTCTG  
7981 ACTTGAGCTG CGATTTTTG GATGCTGCT AGGGGGGCG AGCCTATGGA AAAACGCCAG  
8041 CAACGCGGC TTTTACGGT TCTGGGCTT TTGCTGGCT TTTGCTACA TGTCTTTCC  
8101 TGCGTTATCC CTTGATCTG TGGATAACCG TATTACGCC TTTGAGTGA CTGATACCGC  
8161 TCGCCGACG CGAACGACG AGCGACGGA G

(SEQ ID NO:11)

도면16

```

1 GAATTCAAAA CAAAATGTGT GCAACCTCCT CCCAGTTTAC TCAGATTACC GAGCATAATT
61 CTCGACGATC TGCTAACTAC CAGCCGAACC TTTGGAACCT TGAGTTTCTC CAGTCTCTCG
121 AAAATGACCT GAAGGTGGAA AAGCTCGAGG AGAAGGCGAC CAACTCGAG GAGGAGGTGC
181 GATGTATGAT CAACAGAGTT GACACCCAAC CCCTGTCTTT GCTGGAGCTG ATCGACGATG
241 TGCAGCGGTT GGGTTTGACT TATAAATTGG AGAAGGACAT TATCAAGGCA CTGGAGAACCA
301 TTGTGCTCCT CGACGAGAAC AAGAAGAAC AGTCTGATCT TCACGCTACC GCTCTCTCTT
361 TCCGACTTCT TCGACAACAC GGCTTCGAGG TGTCCGAGSA CGTCTTCGAG AGATTAAAGG
421 ACAAGGAGGG AGGATTTAGC GCGAGCTGA AGGGAGACGT TCAGGGTCTT CTCTCTTGT
481 ACGAGGCGTC CTACCTGGGA TTCGAGGGAG AGAACCTCCT GGAGGAAGCT CGTACATTTT
541 CCACTACTCA CCTTAAGAAT AACCTTAAGG AGGGAATTAA CACCAAGGTG GCCGAGCAGG
601 TTTCTCAGCC CTTGGAGCTC CCCTACCAAC AACGGCTCCA TAGACTGGAG GCTCGTTGCT
661 TCCCTGGACAA ATATGAGCCA AAGGAGCCTC ATCATCAGTT GCTGTTGGAG TTGGCCAAGC
721 TGGACTTCAA TATGTTTCAG ACGCTGCACC AAAAGGAGTT GCAGGACCTG TCTCGATGTT
781 GGACCGAGAT GGGATTGGCC TCGAAGCTGG ATTTGTCCG TGACCCGACTT ATGGAGGTCT
841 ATTTTGGGC CCTTGAATG GCGCCTGACC CCCAGTTCGG AGAGTGGCGG AAGGCGGTGA
901 CGAAGATGTT CGGTCTTGTG ACTATCATCG ACGACGTCTA CGATGTCTAC GGCACACTCG
961 ACGAGTTGCA GCTGTTCACT GACGCGCTCG AGCGATGGGA TGTGAACGCC ATTAATACTC
1021 TCCCTGACTA TATGAAGCTG TGCTTCCTGG TCTGTACAA CACTGTCAAC GATACCTCGT
1081 ACTCTATCTC CAAGGAGAAG GGACACAACA ATCTCTCCTA CTTGACCAAA TCCTGGCGAG
1141 AACTGTGCAA GGCCTTTCTG CAGGAGGCTA AATGGTCCAA TAACAAGATC ATTCCTGCTT
1201 TTTCTAATA CTTGGAAAAT GCCTCGGTGT CGAGCTCTGG CGTCGCCCTT CTGGCCCTTT
1261 CCTACTTCTC CGTCTGCCAG CAGCAGGAGG ATATTTCGA TCATGCTCTT AGATCGCTGA
1321 CGGATTTTCA CGGCCCTCGT CGATCTTCCT GCGTGAATTT TCGGTTGTGT AATGACCTTG
1381 CGACCTCTGC TGCTGAGCTG GAACGAGGCG AGACTACAAA TTCCATTATT TCTTACATGC
1441 ACGAAACGCA TGAACATCTT GAAGAACAGG CTAGAGAGGA ACTCGCAAGG TTGATCGAGC
1501 CCGAGTGGAA GAAGATGAAC AGAGAGCGGG TGTCCGACTC TACCCTGCTT OCCAAGGCTT
1561 TCATGGAGAT CGCCGTGAAC ATGGCTCGAG TTTCCCATTT TACTTACAG TACGCTGACG
1621 GCCTGGGTGG TCCGGACTAC GCTACAGAGA ACCGAATCAA GCTGCTGCTC ATCGACCCCT
1681 TCCCTATCAA CCAATTGATG TACGTGTAAT AGCTAGAGG ATCC
(SEQ ID NO:12)

```

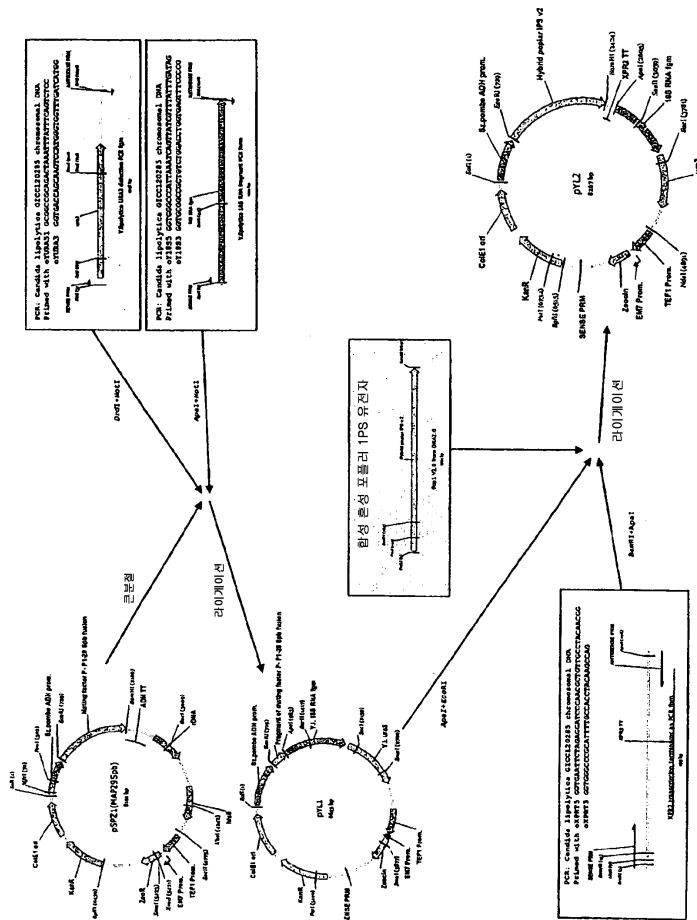
도면17

```

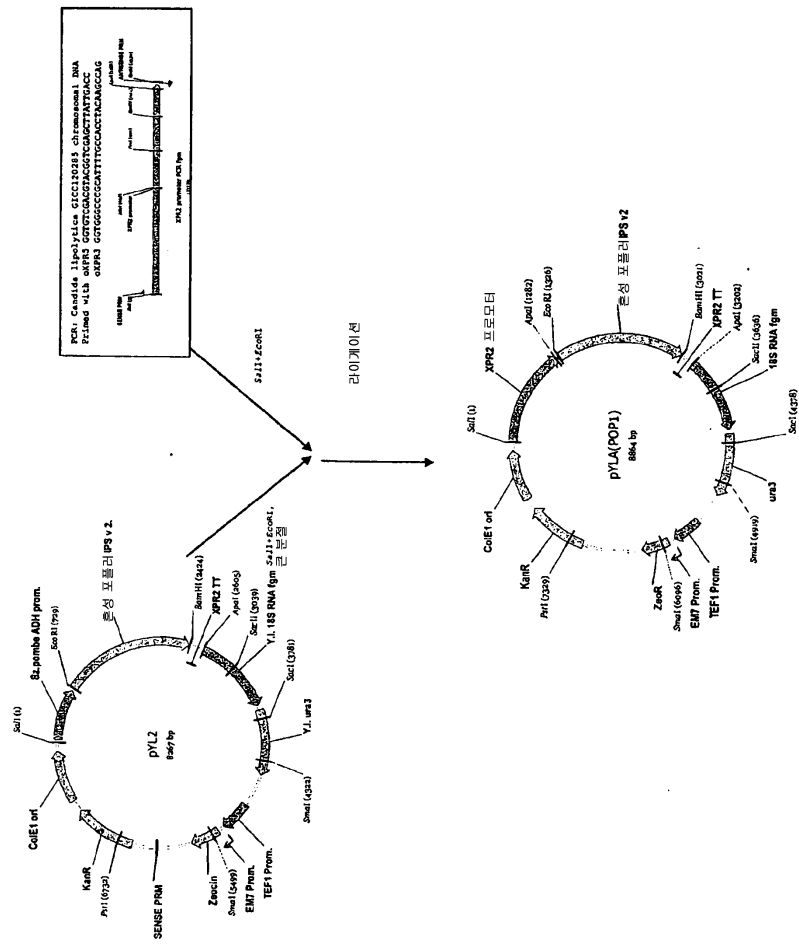
1 GAATTCAACA AAAATGTGCT CTGTTTCCAC TGAGAACGTG TCCTTTACTG AGACTGAGAC
61 TGAAGCAGCT AGAAGCGCCA ACTACGAACC CAACCTCTGG GATTATGACT TTCTGCTGTG
121 TTCTGACACC GACGAGTCGA TCGAGGTITA TAAGGATAAG GCCAAGAAAC TTGAGGCCGA
181 GGTGAGACGA GAGATTAAAC ACGAGAGGCG CGAGTTCCTG ACCCTTCTTG AGCTGATCGA
241 CAACGTTCAA CGACTTGGTC TTGGTTACCG TTTGGAATCC GATATCCGAG GTGCATTGGA
301 TCGAATTGTC TCGTCCGAGG GTTTCGATGG TGTGACTAAG ACGTCGCTGC ACGCCACAGC
361 TCTTTCTCTC AGACTGTTGC GGCAGCATGG ATTTGAGGTT TCCCAGGAAG CCTTTCTTGG
421 TTTCAAGSAT CAGAACGGAA ACTTTTGGGA GAATCTCAAG GAGGACACCA AGGCCATCCT
481 GTCGTTGTAT GAGGCCCTGT TCCTGGCTCT TGAGGGCGAG AATATTCTGG ATGAGGCTCG
541 GGTTTTCTGT ATTTGCAACC TGAAGGAGTT GTCCGAGGAA AAGATCGGAA AGGAACTGGC
601 CGAGCAGGTC AACCATGCAC TTGAACCTCC CTGCACTCGA CGTACCCAGC GACTGGAGGC
661 CGTGTGGAGC ATCGAGGCGT ACAGAAAAAA GGAGGATGCT AATCAGGTTT TGCTCGAACT
721 CGCTATCCTC GACTATAACA TGATTCAAGC CGGTATCCAG CGTGACTTGC GAGAGACAAG
781 CCGGTGGTGG CGACGGGTGG GACTGGCCAC GAAGCTCCAC TTTGCTAAG ATGATTGAT
841 TGAGTCTGTC TACTGGGCGG TGGGTGTGCG CTTTGAGCCT CAGTACTCCG ACTGCGGAAA
901 CTCCTGTGCA AAGATGTTTT CTTTGTGTC TATCATCGAC GACATCTACG ATGTTTACGG
961 CACTCTCGAT GAACTCGAAG TCTTCACGGA CGCTGTGCGA CGATGGGATG TGAATGCCAT
1021 TAATGATCTG CCAGATTATA TGAAGTGTG TTTCTTGGCG CTCTACAACA CAAATTAATGA
1081 AATTGCTTAC GACAACTCCA AGGACAAAGG AGAGAATATT CTGCCCTACC TTAATAAAGC
1141 CTGGGCGGAC CTGTGTAACG CCTTTTGGCA GGAAGCCAAG TGGCTCTATA ACAAACTTAC
1201 TCTTACATTT GATGACTACT TCGGCAACGC TTGGAAGTCT TCCAGCGGCC CTCTCCAGTT
1261 GATCTTCCCT TACTTTCGAG TGGTCCAGAA CATCAAGAAA GAGGAGATTG AGAACCTCCA
1321 GAAGTATCAC GACATCATCT CCCGACCTTC GCACATCTTT CGACTGTGCA ATGACCTTGC
1381 CTCGCCATCC GCTGAGATTG CCCGAGGAGA AACAGCCAAT TCTGTGTCTG GTTACATGCG
1441 TACAAGGGGC ATCTCCGAGG AGCTGGCTAC CGAGTCTGTG ATGAACCTGA TCGATGAAAC
1501 CTGTAAAGAG ATGAACAAAG AGAAACTGGG CGGTCTCTGT TTGCCCAAAC CATTGTGTGA
1561 AACCCGATC AATCTGGCTC GTCAGTCTCA TTGTACTTAC CATACGGGTG ACGCGCACAC
1621 TTCGCCGAC GAATTGACCC GTAAGCGTGT GCTTTCGTTG ATTACCGAGC CGATCTGCTC
1681 GTTCGAAAGA TAATAGGATC C
(SEQ ID NO:13)

```

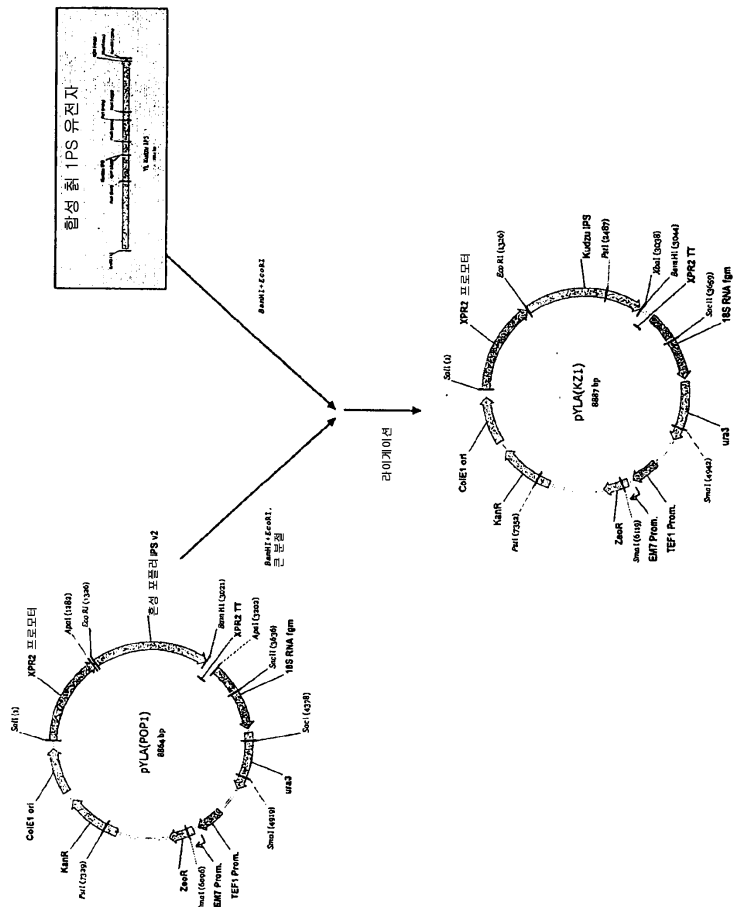
도면18a



도면18b

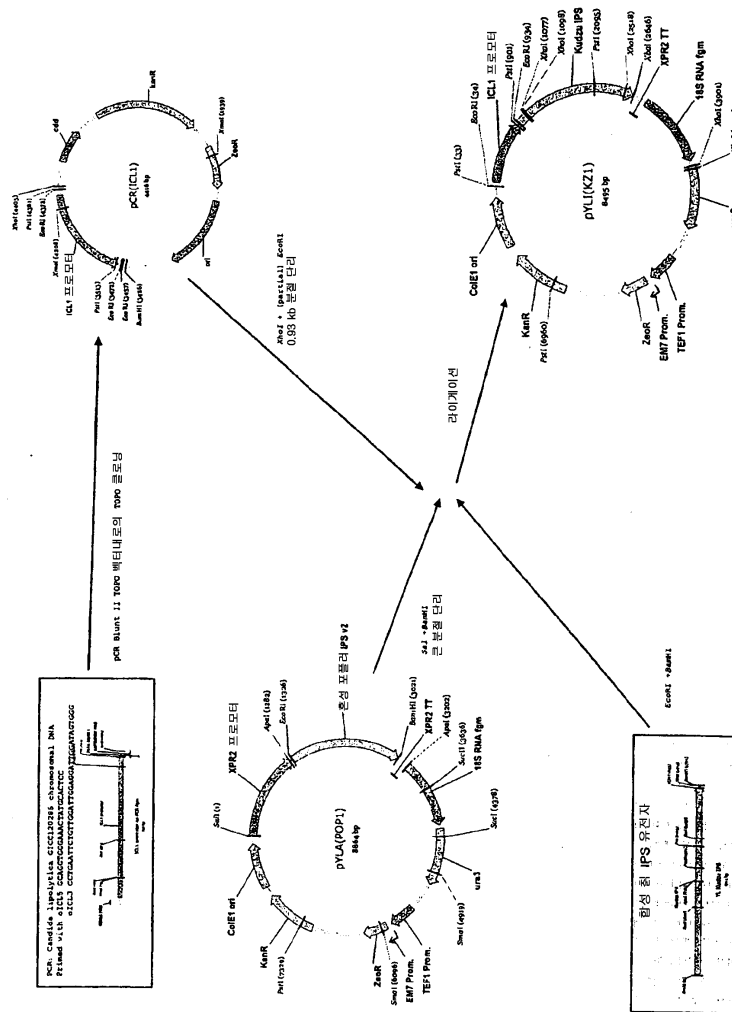


도면18c

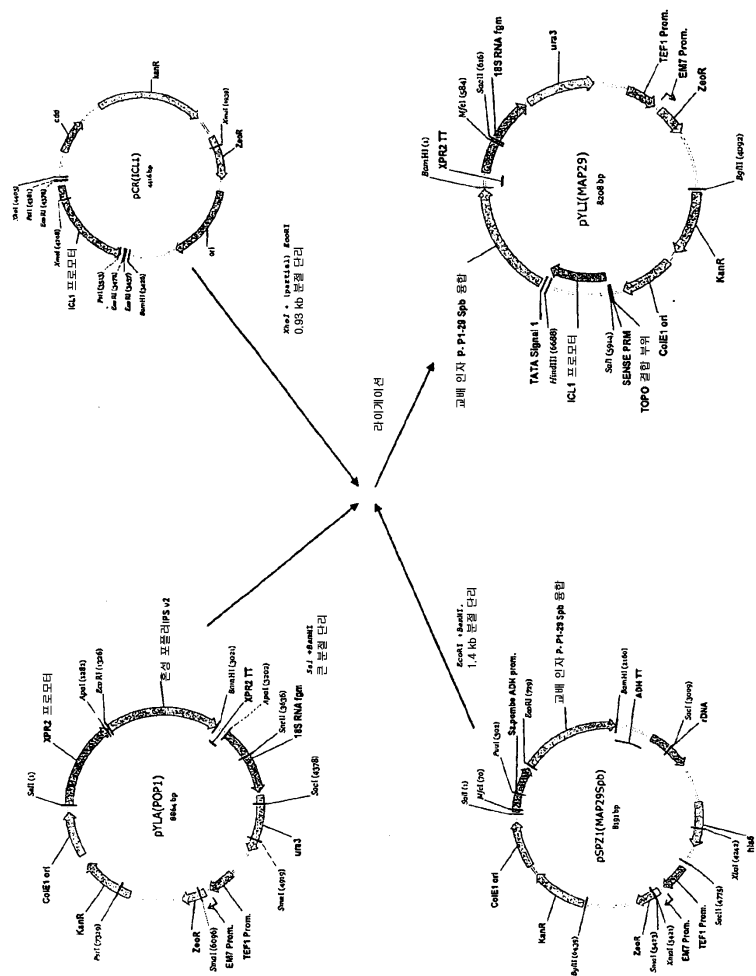




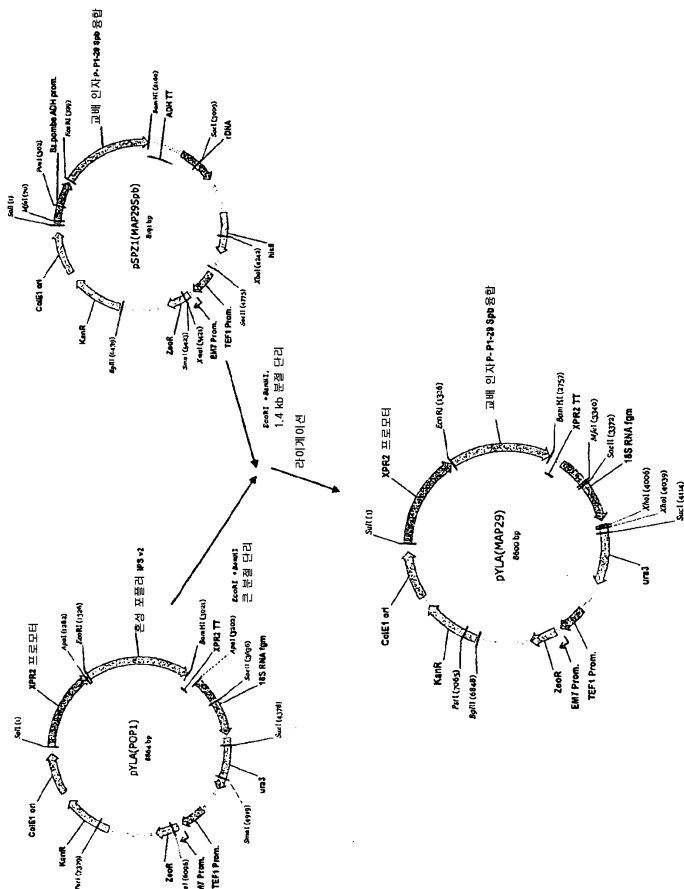
도면18d



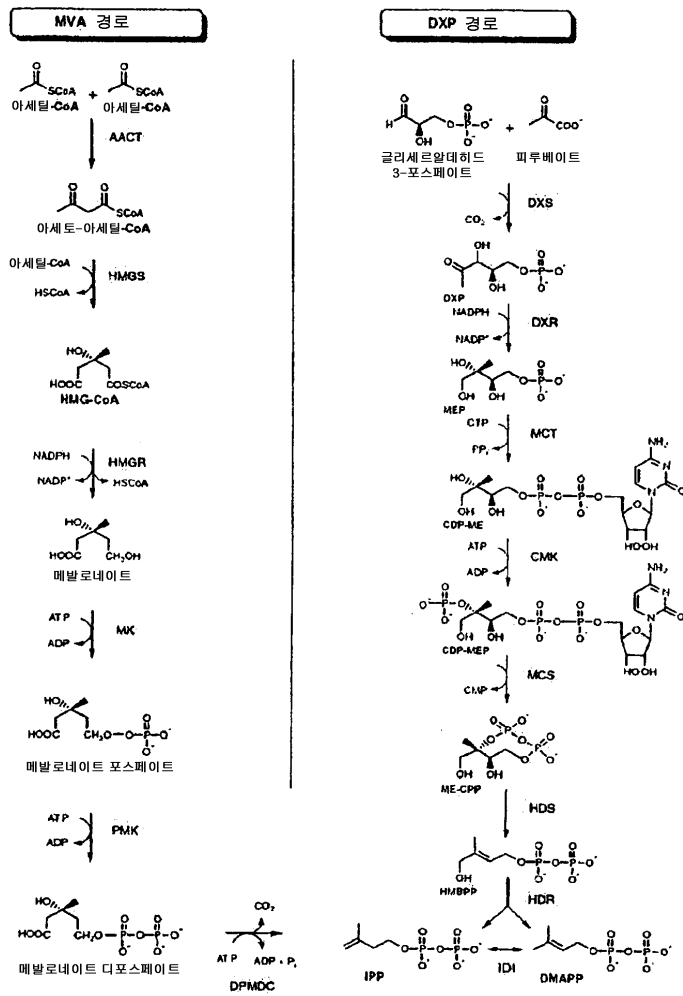
도면18e



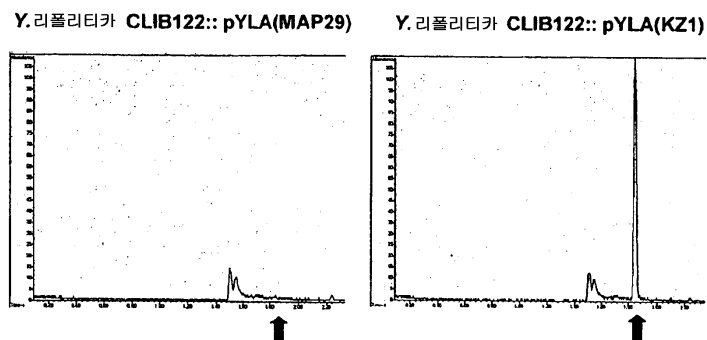
도면18f



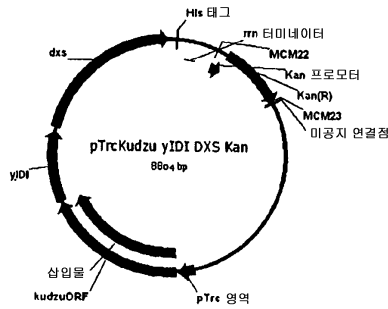
도면19



도면20



도면21



도면22a

1-

gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa  
tagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaaccggtctccagcttggtggtttt  
gcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaa  
acagaatttgcctggcgccagtagcgcggtggtccacctgaccccatgccgaactcagaagt  
aaacgcgtagcgccgtagtgtagtggtggtctcccatgcgagagtagggaactgccaggcat  
caaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcggtttatctgttgtttgtcggtga  
acgctctcctgagtaggacaaaatccgcgggagcggtattgaacgttgccaagcaacggccgg  
aggggtggggggcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaatcagaagggccatcctg  
acggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaatacattcaaata  
gtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggttaaggttggaagccctgcgaag  
taaacctggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaaga  
gacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgct  
tgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgccgccc  
tgttccggtgtcagcgagggggcgcccggttcttttgtcaagacgcagctgtccggtgccc  
gaatgaactgcaagacgagcgagcggtatcggtggtggccacgacggcggttcttgcgca  
gctgtgctcgacgttgtcactgaagcggaaggactggctgctattggcggaagtgccggggc  
aggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcg  
gcggtgcatcagcttgatccggctacctgcccatcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgag  
cgagcagctactcggaatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcagg  
ggctcgcccgccagccgaactgttcgccaagctcaaggcgagcatgccgacggcgaggatctcgt  
cgtgacccatggcgatgctgcttgcgaatatcatgggtggaataatggccgctttctggattc  
atcgactgtggccggtgggtgtggcgacccgctatcaggacatagcgttggctaccgctgata  
ttgctgaagagcttggcgccgaatgggctgacgcttctcgtgctttacggatcgccgctcc  
cgattcgacgcatcgcttctatcgcttcttgacgagttcttctgacatgacaaaaatccc  
ttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttga  
gatccttttttctgcgctaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccacccgctaccagcggtgg  
tttgtttgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgca  
gatacaaaatactgctctctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca  
ccgctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggtgctgcccagtgccgataagtcgt  
gtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgacggtcggtgtaacggg  
gggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt  
gagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgacaggtatccggttaagcgga  
gggtcggaacaggagagcgacgagggagcttccagggggaacgcttggtatctttatagtc  
tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgagc  
ctatggaaaaacgccagcaacggcgcttttacggttccctggccttttgcgtggttctgctc  
acatgttttctcgtggttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagc  
tgataccgctcgccgacgcccgaacgacggagcgagcagtgagtgagcaggaagcggaagag  
cgctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgactc  
tcagtacaatctgctctgatgccgcatagtttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgac  
tgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacggcgccctgacgggttgtctgc  
tcccgccatccgcttacagacaagctgtgacgcttccgggagctgcatgtgtcagaggttttc  
accgctatcaccgaaacgcgagcgagcgacgagatcaattcgcgcggaaggcggaagcgcatgca  
tttacgttgacaccatcgaatggtgcaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaaga

도면22b

gagtcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgtgtgcagagtatgccggt  
gtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccagctttctgcgaaaaacgcggg  
aaaaagtggaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggc  
gggcaaacagtcgttgctgatggcggttgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgtcgcaa  
attgtcgcgccgatataatctcgcccgatcaactgggtgcccagctgggtggtgtcgatggtag  
aacgaagcggcgctgaaagcctgtaaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgg  
gctgatcattaaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaat  
gttccggcgttatttctgtatgtctgtgaccagacacccatcaacagtattatttctcccatg  
aagacggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgtt  
agcggggcccataaagtctgtctcgcgcgctctgcgtctggctggctggcataaaatctcact  
cgcaatcaaatcagccgatagcgggaacgggaaggcgactggagtccatgtccggttttcaac  
aaacctgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgagtgtggttgccaaacgatcagat  
ggcgctggcgcaatgcccgcattaccgagtcggcggtgcgcgttggtgcggatctcctcgta  
gtgggatcgcagcataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccacatcaaacagg  
attttcgctgctggggcaaacacgcgtggacgcgttgcgcaactctctcagggccaggcggt  
gaagggcaatcagctgttgcgcgtctcactggtgaaagaaaaacacccctggcgcccaatcgc  
caaacgcctctcccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcaggtttcccgac  
tggaagcggcgctgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcaattgatctggtttgaca  
gcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgctcagggcagccatcggaagctgtggt  
atggctgtgaggtcgtaaatcactgcataatctgtgtcgctcaaggcgcaatcccgcttctgga  
taatgtttttgcgcgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaat  
taatcatccgctcgtataatgtgtggaattgtgagcgataacaatttcacacaggaacacgc  
gcccgtgagaaaaagcgaagcgacgactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcac  
tcgaccggaattatcgattaaactttattataaaaaattaaagaggtatataattaatgtatcgat  
taaataagaggaataaaacctgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataa  
ttcccgctcgttccgcaaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggag  
aacgacctgaaagtggaaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagtgcgtgca  
tgatcaaccgtgtagacaccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgct  
gggtctgacctacaaaatttgaaaaagacatcattaaagccctgaaaacatcgactgctggac  
gaaaacaaaagaacaaatctgacctgcacgcaacgcgtctgtcttccgctgctgctgcgtcagc  
acggtttcgaggtttctcaggtgtttttgagcgtttcaaggataaaagaagtggtttcagcgg  
tgaactgaaaggtgacgtccaagccctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgag  
ggtgagaacctgctggaggagcgctacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaag  
aaggcattaaatccaaggttgacagaacaagtgcagccacgcccggaaactgccatataccagcg  
tctgcacgctctggaggcacgttggttccctggataaaatcgaaccgaaagaaccgcatcaccag  
ctgctgctggagctggcgaagctgattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgc  
aagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgtacgcgaccg  
cctgatggaagtattttctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgc  
aaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggca  
ctctggcgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctatttaacac  
cctgcccgaactatgaaactgtgttccctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctat  
tctattctgaaagagaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaaagctggcggtgaactgt  
gcaaacctttctgcaagagggcgaatggtccaacaacaaaattatcccggtttctccaagta  
cctggaaaaacgcagcgtttctcctccggtgtagcgctgctggcgcgctcttactttccgta

도면22c

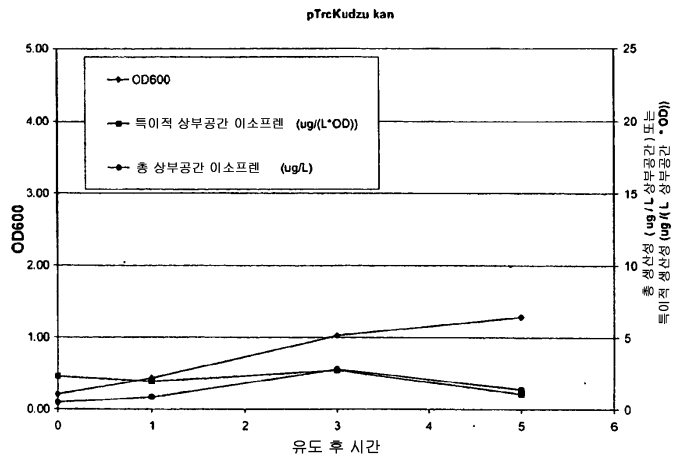
tgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggctcgtg  
tgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcgagctgga  
acgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaa  
cagggccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgcggaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcg  
ttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagttaacatggcacgtgttcc  
ccactgcacctaccagtatggcgatggctcgtgggtcgccagactacgcgactgaaaaccgcatc  
aaactgctgctgattgacctttcccgattaaaccagctgatgtatgtctaactgcacgacctt  
aggaggtaaaaaaaatgactgccgacacaatagtatgccccatggcgagtatctagttacg  
ccaaattagtgcaaaaccaaaccctgaagacattttggaagagtttccctgaaattattccatt  
acaacaaagacctaatacccgatctagtgcagcgtcaaatgcgaaagcgagaaacatgtttt  
tctggtcactgatgaggagcaaatagtttaataatgaatgaaaattgtattgttttggttgggacg  
ataatgctatttggtgccggtaccaagaaagtgtgtcatttaatggaaaaatttgaaaagggtt  
actacatcgtgcatttccgctcttattttcaatgaacaaagtgaaattacttttacaacaaaga  
gccactgaaaaaaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctcatccactatgta  
ttgatgcgaattaggtttgaagggttaagctagacgataagattaaagggcgctattactgcgc  
ggtgagaaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagcaaggggttaagt  
cactttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatgaaattg  
attacatcctattttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgctcaatga  
agttagagacttcaaatgggtttccacaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagtac  
aagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttatcaactgggtgggagcaattag  
atgacctttctgaagtggaaaaatgacaggcaaatccatagaatgctataacaacgcgctcctgca  
ttcgcccttaggaggtaaaaaaacatgagttttgatattgccaaataccgacccctggcactgg  
tcgactccacccaggagttacgactgttgcgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaact  
gcgcgctatttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcacg  
gtcgaaactgaccgtggcgctgcactatgtctacaacaccccgcttgaccaattgatttgggatg  
tggggcatcaggcttatccgcataaaaattttgaccggacgcgcgcaaaaaatcggcacctccg  
tcagaaaggcggtctgcacccgttcccggtggcgcgcaaaagcgaatatgacgtattaagcgtc  
gggcatctcatcaacctccatcagtgccggaatttggtattgctggtgctgcgaaaaagaaggca  
aaaatcgccgcgacccgtctgtgtcatggcgatggcgcataccgcaggcatggcggtttgaagc  
gatgaatcacgcggcgcatatccgtcctgatatgctgggtgattctcaacgacaatgaaatgtcg  
atttccgaaaaatgtcgcgcgctcaacaacctctggcacagctgctttccggtaagctttact  
cttcaactgcgcgaaggcggaaaaaagttttctctggcggtgcccgaattaaagagctgctcaa  
acgcaccgaagaacatatataaggcatggttagtgctggcgacgttgtttgaagagctggcgctt  
aactacatcgcccggttgacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc  
gcgacctgaaaggcccgagttcctgcatatcatgacaaaaaaggctcgtgggttatgaaccggc  
agaaaaagaccgatcactttccacgcggtgcctaaatttgatccctccagcggttgtttgccc  
aaaagtagcgcggtttgcccagctattcaaaaaatctttggcgactggttgtgcgaaacggcag  
cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagtt  
ttcacgtaaaattcccggatcgctacttcgacgtggcaattgcccagcaacacgcggtgaccttt  
gctgcgggtctggcgatttggtgggtacaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac  
gcgcctatgatcaggtgctgcatgacgtggcgattcaaaagcttccggctcctgttcgcatcga  
ccgcgcgggcatgttgggtgctgacggtcaaaacccatcaggggtgcttttgatctctcttacctg  
cgctgcataccggaaaatggtcatttatgaccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct  
ataccggctatcactataacgatggcccgctcagcggtgcgctaccgcggtggcaacgcggtcgg

도면22d

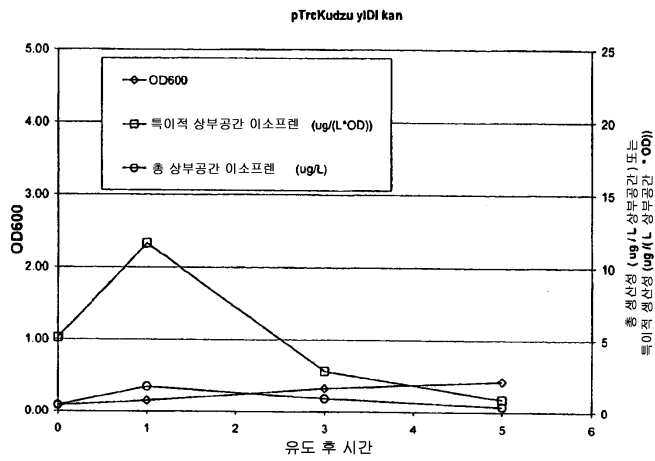
cgtggaaactgacgcgctggaaaaactaccaattggcaaggcattgtgaagcgtcgtggcgag  
aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcgcgaaagtgcggcaatcgctga  
acgccacgctggtcgatatgcgttttgtgaaacgccttgatgaagcgttaattctggaaatggc  
cgccagccatgaagcgctggtcacgtagaagaaaaacgcaattatggggcgcgaggcagcggc  
gtgaacgaagtgcgtgatggcccatcgtaaacagtagccgtgctgaacattggcctgccgact  
tctttattccgcaaggaaactcaggaagaaatgcgcgccaactcgccctcgatgccgctggtat  
ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgca  
(SEQ ID NO:20)



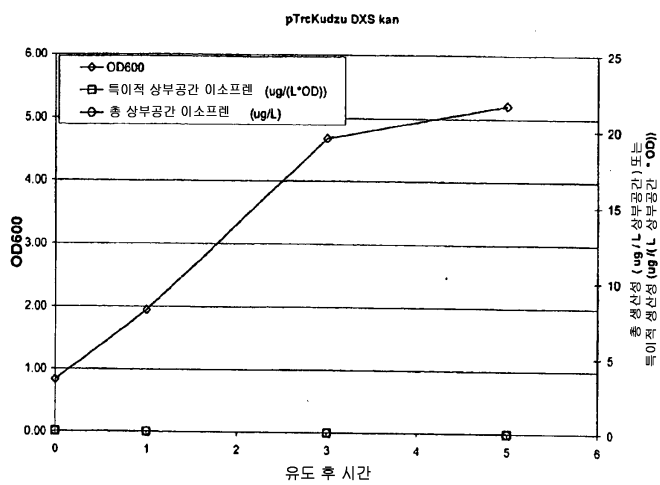
도면23a



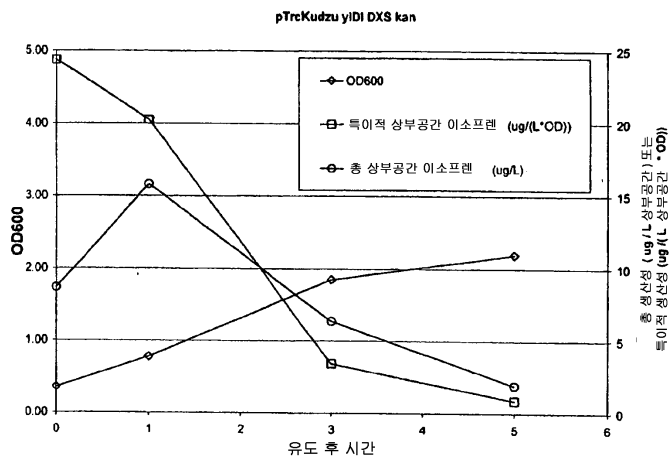
도면23b



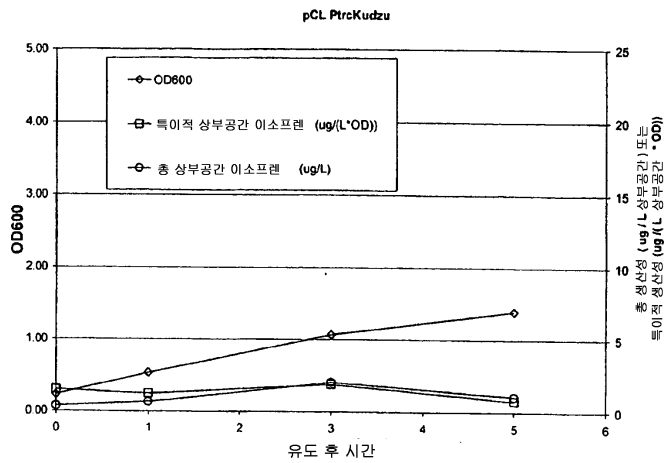
도면23c



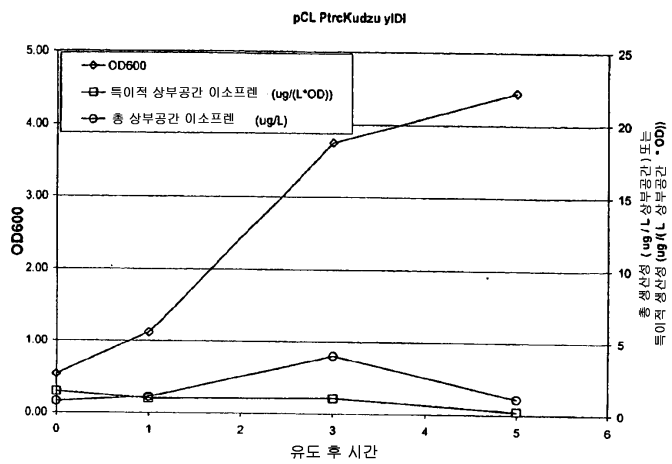
도면23d



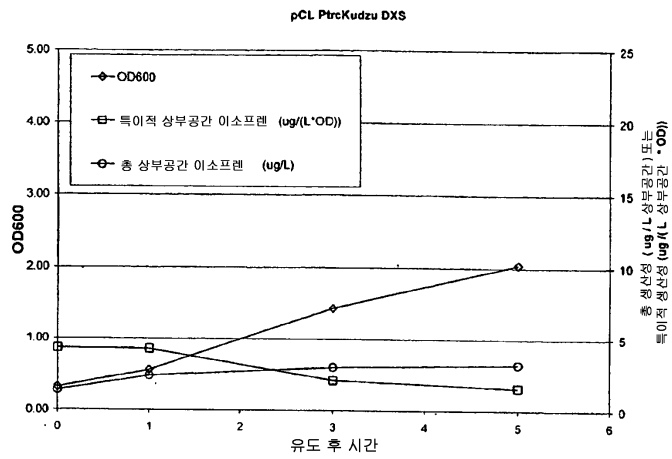
도면23e



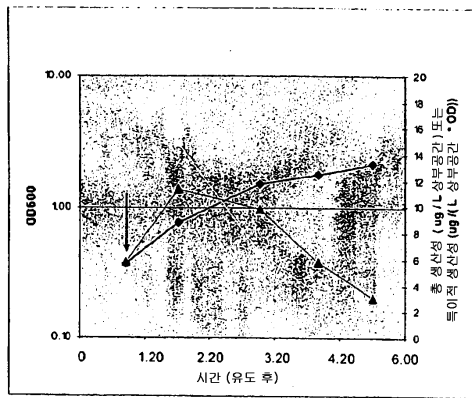
도면23f



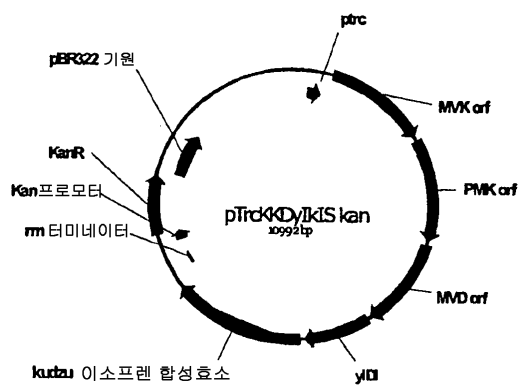
도면23g



도면23h



도면24



도면25a

5' -

gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtgggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgtcgaaggcgcactccc  
gttctggataaatgttttttgcgcccacatcataacgggtctcggaataattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataaacaatttcacacag  
gaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaattctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattttaaaaaataaagaggtatatattaat  
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcggatccactagtaacggccgcc  
agtgtgctggaattcgcccttaggaggtaaaaaacatgtcattaccggtctttaacttctgcac  
cgggaaagggttatatttttgggaacactctgctgtgtacaacaagcctgccgtcgtcgtag  
tgtgtctcgttggaaacctacctgctaataagcaggtcatctgcaccagatactattgaattg  
gacttcccggacattagctttaatcataagtggtccatcaatgatttcaatgccatcaccgagg  
atcaagtaaaactccaaaaattggccaaggctcaacaagccacgcatgggttgtctcaggaact  
cgttagtcttttggatccgttggttagctcaactatccgaatccttccactaccatgcagcgttt  
tgtttcctgtatatgtttgttgcctatgccccatgccaagaatattaagttttcttaaggt  
ctactttaccatcggtgctgggttgggctcaagcgcctctatttctgtatcactggccttagc  
tatggcctacttgggggggttaataaggatctaatagacttggaaaagctgtcagaaaacgataag  
catatagtgaaatcaatgggcttcataggtgaaaagtgtattcacgggtacccttcaggaatag  
ataacgctgtggccacttatggtaatgccctgctatttgaaaaagactcacataatggaacaat  
aaacacaaacaattttaagttcttagatgatttccagccattccaatgatcctaacctatact  
agaattccaaggctctacaaaagatcttgttgcctcggttcgtgtgttgggtcaccgagaaatttc  
ctgaagttatgaagccaattctagatgccatgggtgaatgtgccctacaaggcttagagatcat  
gactaagttaaagtaaatgtaaaggcaccgatgacgaggctgtagaaaactaataatgaactgtat  
gaacaactattggaattgataagaataaatcatggactgcttgtctcaatcggtgtttctcatc  
ctggattagaacttataaaaaatctgagcgtatgttgaagaattggctccacaaaacttacggg  
tgtgtgtggcgccgttgtctcttggactttgttacgaagagacattactcaagagcaaattgac  
agcttcaaaaagaaattgcaagatgattttagttacgagacatttgaacagacttgggtggga  
ctggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttgaataaagatcttaaaatcaaatccctagtatt  
ccaattatttgaaaaataaaactaccacaaagcaacaaattgacgatctattatggcaggaaac  
acgaatttaccatggacttcataagctaatttgcgataggcctgcacccttaaggaggaaaaaa  
acatgtcagagttgagagccttcagtgcgccagggaagcggttactagctgggtggatatttagt  
tttagatacaaaaatgaagcattttagtcggattatcggcaagaatgcatgctgtagcccat  
ccttacgggtcattgcaagggctgtgataagtttgaagtgctgtgaaaagtaacaattttaag  
atggggagtggtgtacatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggtac  
taagaaccctttcattgaaaaagtattcgctaacgtatttagctactttaaacctaacatggac  
gactactgcaatagaaaacttggctgttattgatatttctctgatgatgcctaccattctcagg  
aggatagcgttacccaacatcgtggcaacagaagattgagttttcattcgacagaattgaaga  
agttcccaaaacagggtgggctcctcggcagggttagtcacagttttaactacagctttggcc  
tcctttttgtatcggaacctggaaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttag  
cacaagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcggcggcagc  
atatggatctatcagatatagaagattcccacccgcattaatctctaatttggcagatattgga  
agtgtacttacggcagtaaaactggcgcatttgggttgatgaagaagactggaatattacgatta  
aaagtaaccatttaccctcgggattaaactttatggatgggcgatattaagaatgggttcagaaac  
agtaaaactgggtccagaaggtaaaaaattgggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaataa

도면25b

tatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttac  
acgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtcctcttgagaggaatgactgtacctg  
tcaaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacggttcccttaga  
aaaataaactaaagaattctggtgccgatatcgaaacctcccgtaaaaactagcttattggatgatt  
gccagaccttaaaaggagttcttacttgcttaataacctgggtgctgggtggttatgacgccattgc  
agtgtattactaaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatagacaaaagatttctaaag  
gttcaatggctggatgtaactcaggctgactgggggtttaggaaagaaaaagatccggaaactt  
atcttgataaaataacttaaggtagctgcagatgcagaattcgcccttaaggaggaaaaaaaatga  
ccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaacccttaagtattgggggaaaaag  
ggacacgaagtgaatctgcccaccaattctccatatacagtgactttatcgcaagatgacctc  
agaaacgttgacctctgcggtactgcacctgagtttgaacgcgacactttgtggttaaatggag  
aaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaa  
ggaaatggaatcgaaggacgcctcattgccacattatctcaatggaaactccacattgtctcc  
gaaaaataactttcctacagcagctggttttagcttccctcgctgctggctttgctgcatgtgtct  
ctgcaattgctaaagtataccaattaccacagtcacacttcagaaaatatctagaatagcaagaaa  
ggggtctggttcagcttgtagatcggtgtttggcgagatcgtggcctgggaaatgggaaaagct  
gaagatggtcatgattccatggcagtcacaaatcgacagcagctctgactggcctcagatgaaag  
cttgtgtctctagtgtgcagcgatataaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgac  
cgtggcaacctccgaactatttaagaaaagattgaacatgtcgtaccaaagagatttgagtc  
atgctaaagccattgttgaaaagatttgcgccacctttgcaaaggaaaacaatgatggattcca  
actctttccatgccacatgtttggactctttccctccaatattctacatgaatgacacttccaa  
gcgtatcatcagttggtgcccacccatttaactagttttacggagaaaacaatcgttgcatacacg  
tttgatgcaggtccaaatgctgtgtgtactacttagctgaaaatgagtcgaaactctttgcat  
ttatctataaattgtttggctctgttccctggatgggacagaaaatttactactgagcagcttga  
ggctttcaacctcaatttgaatcatctaactttactgcacgtgaattggatcttgagttgcaa  
aaggatgttgccagagtgttttaactcaagtcggttcaggcccacagaaacaaacgaatctt  
tgattgacgcaaaagactggtctaccaaaaggaataagatcaattcgctgcacgccttaggagg  
taaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaat  
tagtgcaaaaccaaacacactgaagacattttggaagagtttccctgaaattattccattacaaca  
aagacctaatccccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgtttttctggt  
catgatgaggagcaaaataggttaatgaatgaaaattgtattgttttgattgggacgataatg  
ctattggtgccggtaccaagaaaagttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactaca  
tcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaagggtgaattactttacaacaagagccact  
gaaaaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatg  
acgaattagggtttgaagggttaagctagacgataagattaaggcgctattactgcggcggtgag  
aaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggttaagtttcaacttt  
ttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaacctggggtgaacatgaaattgattaca  
tcctattttataagatcaacgcgtaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttag  
agacttcaaatgggtttcccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagttt  
acgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacc  
tttctgaagtggaaaatgacaggcaaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgcattcgcc  
cttaggaggttaaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataatt  
cccgtcgttccgcaaaactatcagccaaacctgtggaatttgcgaattcctgcaatccctggagaa  
cgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcattg

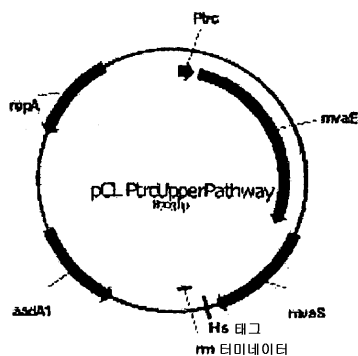
도면25c

atcaaccgtgtagacacccagccgtgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgccctgg  
gtctgacctacaaatttgaaaaagacatcatataagccctggaaaacatcgtactgctggacga  
aaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgtctgctgcgtcagcac  
ggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaagggtggtttcagcgggtg  
aactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgaggg  
tgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaa  
ggcattataaccaaggttgagaacaagtgagccacgcccctggaaactgccatatcaccagcgtc  
tgcaccgtctggaggcagcttggttccctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagct  
gctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaa  
gatctgtcccgtggtggaccgagatggcctggctagcaaaactggattttgtacgcgaccgcc  
tgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgagtttggtgaatgtcgcaa  
agctgttactaaaattgttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcact  
ctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaaacacc  
tgccggactatatgaaactgtgtttcctgacactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattc  
tattctgaaagagaaggctcataaacacctgttcctatctgacgaaagctggcgtgaactgtgc  
aaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacc  
tggaaaacgcagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttactttccgtatg  
ccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtg  
cggtctagctgcgttatcttccgctgtgcaacgatctggccacctctgcggcgagctggaaac  
gtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaaac  
ggcccgcaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgtt  
agcgactccacctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagtttaacatggcagcgtgttccc  
actgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaa  
actgctgctgattgacctttcccgattaaaccagctgatgtatgtctaactgcagctggtacca  
tatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcccgctc  
gacctcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttgccgatgaga  
gaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctgataaaacagaatttg  
cctggcgagcagtagcgcggtggtccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgcgcta  
gcgcgatggtagtggtggtctcccatgagagtagggaaactgccagggcatcaaataaaac  
gaaaggctcagtcgaagactgggcctttcgttttatctgtgtttgtcggtgaacgctctcct  
gagtaggacaaaatccgcgggagcggtttgaacgttgcaagcaacggccggaggggtggcgg  
gcaggacgcccgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcc  
ttttgcggtttctacaaactcttttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctt  
aacgggaattgccagctggggcgccctctggttaaggttgggaagccctgcaagtaaaactggat  
ggctttctcgccgccaaggatctgatggcgagggatcaagctctgatcaagagacaggatga  
ggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttggttgaga  
ggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgcccgctgttcgggt  
gtcagcgagggcgcccggttcttttgtcaagaccgacctgtccgggtgcccgtgaatgaactg  
caagacgaggcagcgcggtatcgtggctggccacgacggcggttcttgcgcagctgtgctcg  
acgttgtcactgaagcggaagggaactggctgctattggcggaagtggcgggcaggatctcct  
gtcatctcacccttgcctcctgcccagaaagtatccatcatggctgatgcaatggcgcggtgcat  
acgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaaatacgcatcgagcgagcacgta  
ctcggtggaagccggtctgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcc  
agccgaactgttcgcaaggctcaaggcgagcatgcccgcgagggatctcgtcgtgacccat

도면25d

ggcgatgcctgcttgcgaatatcatgggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtg  
gcccgtgggtgtggcggaacgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatatgtctgaaga  
gcttggcggaatgggctgaccgcttctctgctgtttacggtatcgccgctcccgattcgacag  
cgcatcgcttctatcgcttcttgacgagttctctgacgcatgacccaaatcccttaacgtg  
agttttcgttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt  
tttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaaaaaaccacgctaccagcgggtgtttgtttg  
ccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggaactggcttcagcagagcgagataccaa  
atactgtccttctagtgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctac  
atacctcgctctgctaatctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtctgtcttacc  
gggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgagcggctcgggctgaacggggggtcgt  
gcacacagcccgcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatg  
agaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcgagcaggtatccggtaagcgaggggtcgga  
acaggagagcgacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggt  
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtagtgctcgtcagggggcgagcctatggaa  
aaacgccagcaacgcggccttttacggttcttgcccttttgcgtggccttttgcctcacatgttc  
tttctgcgttatccctgatctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccg  
ctcgccgagccgaacgagcgcgagcgcagtcagtgagcaggaagcggaagagcgcctgat  
gcggtattttctcttaccgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatgggtgactctcagtaca  
atctgctctgatgccgcatagtttaagccagatacaactccgctatcgctacgtgactgggtcat  
ggctgcgccccgacaccccgccaaacaccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccgga  
tccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttcaccgtcat  
caccgaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcgccatgcatttacgtt  
gacacccatcgaaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtcatt  
tcagggtggtgaatgtgaaccagtaacgttatagcatgtcgcagagtatgccggtgtctctta  
tcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaaacgcgggaaaaagt  
gaagcgcgatggcgagctgaattacattcccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaac  
agtcgttgcgtatggcggttgccacctccagtctggccctgcacgcgcgctcgcaaatgtcgc  
ggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagc  
ggcgtcgaaacgctgtaaagcgcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgctcagtgggctgatca  
ttaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggc  
gttattttctgtatgtctctgaccagacacccatcaacagttattttctcccatgaagacggt  
acgcgactggcggtggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcc  
cattaagtctgtctcggcgcgctctgcgtctggctggctggcgataaatatctcactcgcaatca  
aattcagccgatagcgggaacgggaagcgactggagtccatgtccggttttcaacaaaccatg  
caaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgg  
gcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggtgcgcgttgggtgcggatatctcggtagtgggata  
cgacgataccgaagacagctcatgttatatccgcgctcaaccacccatcaaacaggattttcgc  
ctgctggggcaaacaggcgtggaccgcttgcgtgcaactctctcaggggccagcggtgaagggca  
atcagctgttgccgctctcactgggtgaaaagaaaaaccacctggcgcccaatacgcgaacccg  
ctctcccgcgcggttggccgattcatatgacgctggcagcagaggtttcccgactggaaagc  
ggcgagtgcgcgaacgcgaattaatgtgagtttagcgcgaattgatctg  
(SEQ ID NO:33)

도면26





도면27a

5' -

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgtt  
gacaattaatcatccggtcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacagga  
aacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaattctgtgt  
gggcactcgaccggaattatcgattaactttattatataaaaattaaagaggtatatattaatgt  
atcgattaaataaggaggaataaaacctggatccgagctcaggaggtaaaaaaacatgaaaaa  
gtagtattattatgtatgcattacgaaacaccaatttgaaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaa  
gtgccgtagacttaggaacacatgttacaacacaaacttttaaaaagacattccactatttctga  
agaaattgatcaagtaattctttggaatgtttacaagctggaatggccaaaatcccgcacga  
caaataagcaataaacacgcgtttgtctcatgaaattcccgcgaatgacggttaatgaggtctgcg  
gatcaggaatgaagggcgttatatttgccgaacaattgatcaattaggagaagcgggaagttt  
aattgctgcccgggattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaaca  
gaaagctacgatgcgccttttctagtatgatgtatgaggattaacggatgccttttagtggtc  
aggcaatgggtcttaactgctgaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaaga  
tcaattttctgtacattcacaaataaaagcagctcaagcacaaagcagaagggatattcgctgac  
gaaatagccccattagaagtatcaggaacgcttgtggagaaaagtgaagggtatcgccctaatt  
cgagcgttgagaagctaggaacgcttaaaacagtttttaagaagacgggtactgtaacagcagg  
gaatgcatcaaccattaatgatggggcttctgctttgatattgcttcacaagaatatgccgaa  
gcacacggctcttcttatttagctattatcgagacagtggtgaagtcgggtattgatccagcct  
atatgggaatttcgcccgaattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacgga  
agaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgacgaacttcaatcgtggtccaaagagaa  
ctgggtttaccagaggaaggaaggtcaacatttatggtggcgggtattcattaggtcatgcgattg  
gtgccacaggtgctcgtttatttaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaata  
tgagtggtgcttctttatgtatcggcgggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcag  
caaaaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaaacgcctggcttctcttctaatg  
aaggccagattttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaaatacggctttatcttcgagattgc  
caatcatatgatgaaaaatcaaatcagtgaaaacagaagtgcggtggtggtttacattta  
acagtgagcgaactgatattttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggtct  
tgagtaattggtgcaaaaaatgcacaaggatttaaaacagtgaaatcaacaacgcttaatgcgtgg  
acaaatcgttttttacgatgttgacagatcccgagtcattgattgataaaactacaagtaagagaa  
gcggaagttttcaacaagcagagtttaagttatccatctatcgttaaacggggcgccggttaa  
gagatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgatctgtcgactttttagtagatgttaa  
ggatgcaatgggggcaaaatcgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgttccgtgaa  
tggtttgcggagcaaaaagattttattcagtttttaagtaattatgccacggagtcggttgtta  
cgatgaaaaacggctattccagtttcacgttttaagtaaggggagcaatggccgggaaattgtgta  
aaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgggcagtcacgcataacaaa  
ggaatcatgaatggcattgaagctgtagtttttagctacaggaaatgatcacgcgctgttagcg  
cttcttgtcatgcttttgccgtgaaggaaggtcgctaccaaggcttgactagttagcgcgtgga  
tgccgcaaaactaaattgggtgaaatttcagttccgcttgctttagccacggttgccggtgccaca  
aaagctttacctaataatcgaagcagctgctgatttggtagcagtgacggatgcaaaagaactaa  
gtcgagtagtagcggctgttgggtttggcacaaaaatttagcggcgttacgggccttagtctctga  
aggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcaggttctttagcgatgacggtcggagctact  
ggtaaaagagttgagcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaacgatgaaccaagaccgag  
ccatggctatttttaaatgatttaagaaaacaataaaggaggtaaaaaaacatgacaattgggat

도면27b

tgataaaattagtttttttggtgcccccttattatattgatatgacggcactggctgaagccaga  
aatgtagaccctggaaaatttcatatttggtattgggcaagaccaaattggcggggaacccaatca  
gccaagatatgtgacatttgacgccaatgcccagagaagcgatcttgaccaaagaagataaaga  
ggccattgatatgggtgattgtcgggactgagtcagatatcgatgagtcaaaagcggcgcgagtt  
gtcttacatcgtttaattggggattcaacctttcgctcgctctttcgaaatcaaggaagcttgtt  
acggagcaacagcaggttacagtttagctaagaatcacgtagccttacatccagataaaaaagt  
cttggtcgtagcggcagatatgtcaaaaatatggcttaaattctggcgggtgagcctacacaagga  
gctggggcgggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcattttggtttaaaagaggataatg  
tgatgctgacgcaagatatctatgacttttggtcgccaacagccaccggtatcctatggtcga  
tggtccctttgtcaaacgaaaacctacatccaatctttgcccgaagtctgggatgaacataaaaa  
cgaaccgggtcttgattttgcagattatgatgcttttagcgttccatattccttacacaaaaatgg  
gcaaaaaagccttattagcaaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacaggaacgaatttttagc  
ccgttatgaagaaagtatcgctctatagtcgctgtaggaaacttgatatacgggttcactttat  
ctgggactcatttcccttttagaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatcaaatgggtttat  
tcagttatggttctggtgctgctgctgaatttttactggtgaattagtagctggttatcaaaa  
tcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcgacagaaactttctatcgctgaa  
tatgaagccatgtttgcagaaactttagacacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaa  
aatatagttttctgctatttaataatccgttcgttcttatcgaaactaagagatctgcagctg  
gtaccatatgggaaattcgagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaata  
cgccgctgacccatcatcatcatcatcttgagtttaaacggtctccagcttggtgttttggtg  
ggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcgagaagcgtctgataaaac  
agaatttgctggcggcagtagcgcggtgggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtga  
acgcccgtagcgcgagatggtagtggtggtctcccatgcgagagtagggaaactgccaggcatca  
aataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgtgtgtgtgctggtgaac  
gctctcctgagtaggacaaaatccgcccgggagcggatttgaacgttgogaagcaacggcccggag  
ggtggcgggagcagcgcgcgcataaaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgac  
ggatggcctttttgcttttctacaaaactccttttgtttatttttctaaatcatttcaaatatgt  
atccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatagcgaagaggcc  
cgccagcatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatt  
ttctccttacgcactctgtgcggtatttcacacgcgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc  
tgatgcgcgatagttaaagcagcccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagttaaagcc  
ctcgctagatttttaatgcggtatgtgagattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagc  
cagcctttcatgatatactcccaatttggttagggcttattatgcacgcttaaaaaataataaa  
agcagacttgacctgatagtttggtgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagt  
taagccgcgcgcggaagcggcgtcggttgaaacgaattgttagacattatttgccgactacctt  
ggtgatctgcctttcagctagtggaacaaattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcga  
tcttcttcttgccaagataagcctgtctagcttcaagtagacgggctgatactgggcccgcga  
ggcgtccattgcccagtcggcagcgacatccttcgggcgcattttgccggttactgcgctgta  
ccaaatgcccggacaaagtaagcactacatttcgctcatcgccagccagtcgggcccgcgagttc  
catagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaacccggatcaaaaggtt  
cctccgcccgtggactaccaagcgaacgctatgttctcttgcttttgtagcaagatagccag  
atcaatgtcgatcggtggctgctcgaagatacctgcaagaatgtcatgctgctgccatttctcca  
aattgcagttcgcgcttagctggataaacgccacggaatgatgctgctgcacacaatggtga  
cttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgat

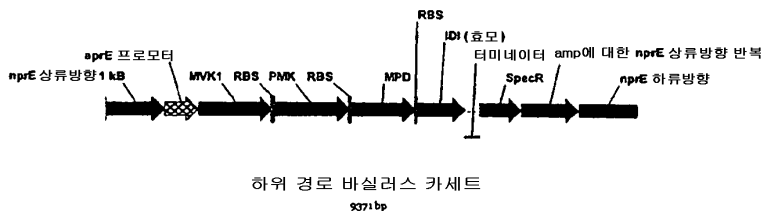
도면27c

caaagctcgcgcgttgtttcatcaagccttacggtcacgtaaccagcaaatcaatatactg  
tgtggcttcaggccgccatccactgaggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcga  
gatggcgctcgatgacgccaaactacctctgatagttagtgcgatacttcggcgatcacgccttc  
cctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgcctgctgcgtaacatcgttgctgctccat  
aacatcaaaacatcgaccacggcgtaacgcgcttgctgcttggtatgcccaggcatagactgta  
ccccaaaaaacagtcataaacaagccatgaaaaccgccaactgcgcggttaccaccgctgcgttc  
ggtaaggttctggaccagttgctgtagcgcatagcgtacttgcattacagcttacgaaccgaa  
caggcttatgtccactgggttcgtgcttccatccgtttccacgggtgctgcgtcacccggcaacct  
tgggcagcagcgaagtgcagggcatttctgctcgtggtgcgaacgagcgcaaggtttcggtctc  
cacgcatcgtcaggcattggcgcccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctg  
ccctggcttcaggagatcggaagacctcgccgctgcggcgcttgccggtggtgctgacccgg  
atgaagtgttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgccagcttctgta  
tggaacgggcatgcccagtcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac  
ggcacgcatcatcgtgcgggaggcgcaagggtccaaggatcgggccttgatgttaccgagagct  
tggcaccacgctcgcgcgagcaggggaaattaattccacgggttttgctgcccgcaaacgggct  
gttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgagatccggcttcagccggtttgcgggtgaa  
agcgctatttctccagaattgcatgatttttccacgggaggcgtaactggctcccggtg  
tgcggcgagctttgatcgataagcagcatcgctgttccaggctgtctatgtgtgactgttga  
gctgtaacaagttgctcaggtgttcaatttcatgttctagtgtgtttgtttactgggttccac  
ctgttctatagggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagc  
tttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttacaccggttttcatct  
gtgcataaggacagttttccctttgatattgaacggtgaacagttgttctactttgtttgtta  
gtccttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgatttagcca  
gtatgttctctagtgtggttcgttgtttttcggtgagccatgagaacgaaccattgagatcata  
cttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttcagttaaa  
gcacgtgtagtgtttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtta  
ttttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgcctatc  
tagttcaacttggaaaaatcaacgtatcagtcggcgccctcgcttatcaaccaccaatttcata  
ttgctgtaaggttttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaaact  
catggtagtattttcaagcattaacatgaactaaattcatcaaggctaactctatatttgc  
cttgtgagttttctttgtgttagttcttttaataaccactcataaactcctcatagagatttg  
ttttcaaaagacttaacatgttccagatttatttatgaatttttttaactggaaaagataag  
gcaatatctcttcaactaaaaactaatctaattttgccttgagaacttggcatagtttgtcca  
ctggaaaaatctcaaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagtttctgcatcagctct  
ctggttgcttttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgatt  
gggtataagtgaaacgataaccgtcgttcttccctgtagggttttcaatcgagggttgagtag  
tgccacacagcataaaattagcttgggtttcatgctccgttaagtcataggcactaatcgctagt  
tcatttgccttgaaaacaaactaatcagacatacatctcaattggtctagggtattttaatcac  
tataccaaattgagatgggctagtcgaatgataattactagtccttttcccttgagttgtgggtat  
ctgtaaatctctgctagacctttgctggaaaacttgtaaatctgctagaccctctgtaaatcc  
gctagacctttgtgtgtttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaaagaaa  
aataaaaaaagataaaaaagaatagatccagccctgtgtataactcactactttagtcagttcc  
gcagttattacaaaaggatgtcgcaaacgctgttgcctctacaaaacagaccttaaaacct  
aaaggcttaagtagcacctcgcaagctcgggcaaatcgctgaattattcctttgtctccgacc

도면27d

Atcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcag  
tgaatgggggtaaatggcactacaggcgcttttatggattcatgcaaggaaactaccataat  
acaagaaaaagccgctcacgggcttctcagggcggtttatggcggtctgctatgtggtgctatc  
tgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtcgaccacttcggattatcc  
cgtgacaggtcattcagactggctaattgcaccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:46)

도면28



도면29a

5' -

tgtaaccttttgcttttcaaatgagtagaataatgcacatccatgtttgtatcgtgcaataaag  
 tgtttcatccgtaggaaaaatgacttttagtatctgttccgctttttctgatgaaatgtgctcc  
 ccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgtacagcgaaagcagccgttccta  
 tgttatatatcggtatttaacagcaggacaaaaaacacccatgacagccatcgtcaccacttatt  
 cacacgcacataaacctttcctgacttttggaaacagatgatagctcatcaaaaatcccgcatt  
 gccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgattgggatatggcg  
 caagcagcaagacaagcagtcgcgataatcagcgtataaaaataagcctagtaagatcttatccgt  
 tctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatgaaaaacaga  
 aacacgaatgcaatcgggtccatcccatccgggtatttccttccaatacgaagaaactaaaaa  
 tcatttgtacgatcggcaaaactgacaaacagcaagggtcgaaactataaaaacttaccctttccg  
 atgatcacgcggcatcagcatatagtgaagccgtcagcagcacatatccgtataacaaaaaa  
 tgcagcagcggcagcaggttcttttccgctcctctcttaagtaagcgtgggaagtgtgtgatt  
 gcacctgggtgaataagttcaacagacactcccgccagcagcacaatccgcaatataaacccgc  
 caagaacattgtgcgctgccggtttattttgggatgatgcacaaaaagataataagcccgccaga  
 acacaattgaccattgaatcagcaggggtgctttgtctgcttaataaaaaataacggttcgaaat  
 gcaatacataatgactgaataaactccaacacgaacacaaactccatttctctgctatcaaaa  
 taacagactcgtgattttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgcccccttgcaaatcggatgc  
 ctgtctataaaattcccgatattggttaaacagcggcgcaatggcgccgcatctgatgtcttt  
 gcttggcgaatgttcatcttatttcttctcctctcaataatttttctattctatcccttttc  
 tgtaaagtattttttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatcc  
 attgttctcacggaagcacgcaggtcatttgaacgaattttttcgacaggaatttgccggga  
 ctgaggagcatttaacctaaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctat  
 tttcgttctttctgtatgaaaatagttatttcgagtcctacggaataagcagagagatgata  
 acctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaatgggtctactaaaatatttccatctattac  
 aataaattcacagaatagtccttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaggagagggtaa  
 agagtgtcattaccgttcttaacttctgcaccgggaaagggtattatttttggtgaacactctg  
 ctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgctagtgtgtctgcgttgagaaacctacctgtaataag  
 cgagtcatctgcaccagataactattgaattggacttcccggaacttagctttaatcataagtg  
 tccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaaactcccaaaaattggccaaggctc  
 aacaagccaccgatggcttgtctcaggaactcgttagctcttttgatccgttgttagctcaact  
 atccgaatccttccactaccatgcagcgttttgttctctgtatattgtttgttgcctatgcccc  
 catgccaagaatatagtttttcttaagtcactttacccatcggtgctgggttgggctcaa  
 gcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggttaataggatctaa  
 tgacttgaaaaagctgtcagaaaacgataagcataatagtaaatcaatgggccttcataggtgaa  
 aagtgtattcacggtaacccttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgccctgc  
 tatttgaaaaagactcacataatggaacaataaacacaaaacaattttaagttcttagatgattt  
 ccagccattccaatgatcctaactatactagaattccaaggtctcaaaaagatcttgttgct  
 cgcgctcggtgttggtaaccgagaaaatttctgaagttatgaagccaattctagatgccatgg  
 gtgaatgtgccctacaaggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgtaaaaggcaccgatga  
 cgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaactattggaattgataagaataaatcat  
 ggactgcttgtctcaatcggtgttctcatcctggattagaacttataaaaatctgagcgatg  
 atttgagaattgggtccacaaaacttacgggtgctgggtggcggggttgcctttgactttgtt  
 acgaagagacattactcaagagcaaattgacagcttcaaaaagaaattgcaagatgattttagt

도면29b

tacgagacatttgaacagacttgggtgggactggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttga  
ataaagatcttaaaatcaaattccctagatttccaattatttgaataaaaactaccacaaagca  
acaaattgacgatctattattgccaggaacacgaatttaccatggacttcataaaagagagg  
gtgtcagagtttgagagccttcagtgcgccagggaaagcgttactagctgggtggatatttagttt  
tagatacaaaaatgaagcattttagtcggattatcggaagaatgcatgctgtagcccatcc  
ttacggttcattgcaagggtctgataagtttgaagtgcgtgtgaaaagttaacaatttaagat  
ggggagtggtgtaccatataagtccctaaaagtggttcattcctgtttcgataggcggatcta  
agaaccctttcattgaaaaagttaacgctaacgtatttagctactttaaacctaacatggacga  
ctactgcaatagaacttgttcgttattgatatctctctgatgatgcctaccattctcaggag  
gatagcgttacccaacatcgtggcaacagaagattgagttttcattcgcacagaattgaagaag  
ttcccaaaacagggtcgttcctcggcagggttagtcacagttttaactacagctttggcctc  
cttttttgtatcggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttagca  
caagtgtctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcggcggcagcat  
atggatctatcagatatagaagattcccacccgcattaatctctaatttgccagatattggaag  
tgctacttacggcagtaaaactggcgcatttgggtgatgaagaagactggaatattacgattaaa  
agtaaccatttaccttcgggattaaactttatggatgggcgatatagaagtgttcagaaaacag  
taaaactggtccagaagggtaaaaaattggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaaaatata  
tacagaactcgatcatgcaaatcttagattttaggatggactatctaaactagatcgcttacac  
gagactcatgacgattacagcgatcagatatgttagtctcttgagaggaatgactgtacctgtc  
aaaagtatcctgaaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttctttagaaa  
aataactaaagaatctgggtccgatatcgaacctcccgtacaaactagcttattggatgattgc  
cagaccttaaaaggagttcttacttgcttaatacctgggtgctgggtgttatgacgccattgcag  
tgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatagacaaaagattttctaaggt  
tcaatggctggatgtaactcaggctgactgggggtgttaggaaagaaaaagatccggaacttat  
cttgataaaataaaggaggggtgacccgtttacacagcatccgttacgcacccgtcaacatcg  
caacccttaagtattgggggaaaaaggacacgaagtgaatctgccaccaatctgtccatatc  
agtgactttatcgcaagatgacctcagaacgttgacctctgcggctactgcacctgagtttgaa  
cgcgacactttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaatgaaagaactcaaaattgtc  
tgcgcgacctacgccaattaaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgccacattatc  
tcaatggaaactccacattgtctccgaaaaataactttcctacagcagctggtttagcttcctcc  
gctgctggctttgctgattggtctctgcaattgctaaagtataaccaattaccacagtcacatt  
cagaaatatctagaatagcaagaaagggtctggttcagcttgtagatcgtgtttggcggata  
cgtggcctgggaaatgggaaaagctgaagatggtcatgattccatggcagtaacaaatcgagac  
agctctgactggcctcagatgaaagcttggtcctagttgtcagcgatatataaaaggatgtga  
gttccactcagggtatgcaattgaccgtggcaacctccgaactatttaaagaaagaattgaaca  
tgtcgtacaaaagagatttgaaagtcagtgtaagccattgttgaaaaagatttcgccaccttt  
gcaaaaggaaacaatgatggattccaactcttccatgccacatgtttggactctttccctccaa  
tattctacatgaatgacactccaagcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagtttta  
cggagaaacaatcgttgcatcacggttgatgcagggtccaaatgctgtgttgtaactacttagct  
gaaaatgagtcgaaactctttgcatttatctataaattgtttggctctgttctggatgggaca  
agaaatttactactgagcagcttgaggctttcaaccatcaattgaaatcatctaactttactgc  
acgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttca  
ggcccaagaagaacaaacgaatctttgattgacgcaagactggtctacaaaggaaataaagg  
agaggggtgactgccgacaacaatagtatgcccattgggtgcagtatctagttacgccaattagt

도면29c

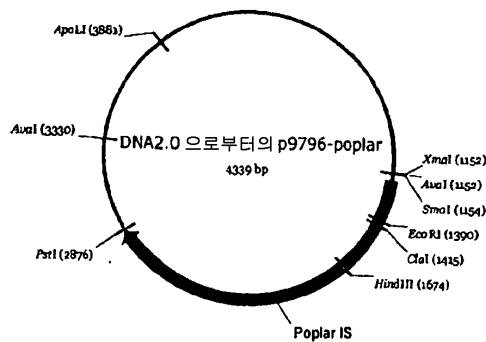
gcaaaaccaaaccctgaagacattttggaagagtttctgaaattattccattacaacaaga  
cctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaagcggagaaacatgttttctggtcatg  
atgaggagcaaatgaattgaatgaaatttgattgttttggattgggacgataatgctat  
tggtgccggtaccaagaagtttgctcatttaattgaaaaatttgaaaagggtttactacatcgt  
gcattctcgtcttttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaagagccactgaaa  
aaataactttccctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatgacga  
attaggtttgaagggtgaagctagacgataagattaaagggcgctattactgcggcggtgagaaaa  
ctagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggtaagtttcaacttttaa  
acagaatccattacatggcaccagcaatgaacatgggggtgaacatgaaattgattacatcct  
attttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagtagagac  
ttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaactatgtttgctgacccaagttaacagtttacgc  
cttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacctttc  
tgaagtggaaaatgacaggcaaatcatagaatgctataaaaaaacggccttgcccccgccg  
gttttttattttttcttccctccgcatgttcaatccgctccataatcgacggatggctccctc  
tgaaaaattttaacgagaaacggcggttgaccggctcagtcgccgtaacggccaagtctgaaa  
cgtctcaatcgccgcttccccggtttccggctcagctcaatgccgtaacggctggcgcggtttcc  
tgataccgggagacggcattcgtaatttgaatatacgaacaaatttaataaagtgaaaaaaat  
acttcggaacattttaaaaaataaccttattggtacttacatgtttggatcaggagttgagagt  
ggactaaaaacaaatagtgatcttgacttttagtcgtctgtatctgaacattgacagatcaaa  
gtaaagaaatactttatacaaaaaaattagacctatttcaaaaaaataggagataaaagcaactt  
acgatatattgaattacaattatttattcagcaagaaatggtagcgaatcatcctcccaaa  
caagaattttatttgagaaatgggtacaagagctttatgaacaaggatacattcctcagaagg  
aattaaattcagatttaaccataatgctttaccaagcaaaacgaaaaataaaagaatatacgg  
aaattatgacttagaggaattactacctgatattccattttctgatgtgagaagagccattatg  
gattcgtcagaggaatttaataagataattatcaggatgatgaacccaactctatatcaactttat  
gccgtatgatttttaactatggacacgggtaaaatcataccaaaagatttgccgggaaatgcagt  
ggctgaatcttctccattagaacataggagagaaattttggttagcagttcgtagttatcttggg  
gagaatattgaatggactaatgaaatgtaaatttaactataaactatttaataaacagattaa  
aaaaattataatgtacactttgctttcaaatgagtagaataatgacatccatgtttgtatcg  
tgcaataaaagtgtttcatccgtaggaaaaaatgacttttagtatctgttccgctttttctgatg  
aaatgtgctccccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgctggctttgatcacgcaagac  
agccgttccctatgttatatcggtttaacagcaggacaaaaaacacatgacagccatcgctc  
acccacttattcacacgcacataaacctttccctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaa  
atcccgccattgccaaaataatcgatatggcattactgcacccaatcttttgagatttgatt  
gggatatggcgcaagcagcagcaagacaagcagtcggataatcagcgtataaaataagcctagttag  
atcttatccgttctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatga  
tgaaaaacagaaacgaatgcaatcggtccatcccatccgggtattccttccaatacgaaaaa  
gaaactaaaaatcatttgtacgatcggaactgacaacagcaaggtcgaaactataaaactta  
ccctttccgcatgatcacgcggcatcagcatatagtgaagccgtcagcagcacatatccgt  
atacaaaaaatgacgagcggcagcaggtttctttccgtcctctcttaagtaagcgctggtgaa  
gtttgtgattgcacctggtgaataagttaacagacactcccgccagcagcacaatccgcaat  
ataacacccgcaagaacatttgcgctgcccgtttattttgggatgatgcacaaaagatata  
agcccgccagaacaacatttgaccattgaatcagcaggggtgctttgtctgcttaataaaaaata  
acgttcgaaatgcaatacataatgactgaataactccaacacgaacaacaaagtgcgcatttt

도면29d

Ataaaagctaatgattcagtcacacataattgatagacgaattctgctacaggtcacgtggctat  
gtgaaggatcgccgctccagtttaagagcaaaaacattgacaaaaaatttatttatgctaaaat  
ttactattaatatatttgatgtataataagattctcctggccagggaatcttattttttgtg  
gaggatcatttcatgaggaaaaatgagtcagcttaacgtctctaatttcagcttttgcccggtg  
catatcacagccgatatgacacacctcttatttttgatgattttatcgcaaaagatctcattaa  
cgaaaaagagtttatcgacatcagtaaaaaatgatttcaagaaatatcgtttttcaacaaagag  
atcgccgaacgtcttcaaaatgatcctgaaaaaatattaaaaatgggttgacaaaatccagctgt  
ctccaaacgcccctagcacgtgcttcttatttgtaaaaagtcttgacaaacgaattaatcctggg  
ggcaaaacagtatgtcattcttgagcgggactggatcttctgctttcgccatccagaatta  
gaaaaacagcttacaggttttcgaggttgatcatccggccacacagcaattgaaaaaaaataagc  
tgaaggatgcaaaatctgacaaatccgggtcatcttcatttgttctatggatttcacaaaaac  
gttttcgtatgatcctctcttagatgaaggatttaaaaacacaaaaacattctcagccttctc  
ggagtgcttattatgtaacacgggaagaaatgcaagcttgatcagcaatttattttctcatg  
tcccgctggaaagctctattgttttgattatgaggacgaacacatttttacgcaaaaaggac  
gtcgaatcgagttgaacatatggtgaagatggctgccgcaagcggggaacccgatgaaatcatgt  
ttcacttatcaagagattgaacatctg  
(SEQ ID NO:47)



도면30



도면31a

5' -

t  
tagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccat  
attttggaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgagcgcatctcataggatggc  
aagatctcgtgtatcggcttcgagttcgcactcgtccaaactcaatacaaccttaatttcccc  
tcgtcaaaaataaaggtttatacagtgagaaatcaccatgagtcagcagtgatccggtgagaatg  
gcaaaagtttatcgatttcttttcagacttggttcaaacaggcgaccattacgctcgctatcaaa  
atcattcgcatcaaccaaacccgttatttcctcgtgattcgccctgagcgaggcgaaatacgcga  
tcgctgttaaaaggacaattacaacaggaaatcgagtcgaaccggcgaggaaacatccgcagcg  
catcaacaatattttcaacctgaatcaggatattcttctaataacctggaacgctgtttttcggg  
gatcgcgatggttgagtaaacatgcatacaggaatcagggataaaatgcttgatggtcggaaatg  
ggcataaattccgtcagccagtttagtctgagcatctcatctgtatacatcatctggaacgctac  
ctttgccatgtttcagaacaactctggcgcatacgggcttcccatacaagcgatagattgtctgcg  
acctgattgcccgcacattatcgcgagcccatttataccataataatcagcatccatgttgaaat  
tttaactcgccgctcgaagcttcccggttgaatatggctcatattcttcccttttcaatatatt  
gaagcattttacagggttattgtctctgagtcgagcatatatttgaattatttagaaaaattaa  
acaaataggggtcagttgttacaaccaatttaaccaattctgaacattatcgcgagcccatttata  
cctgaaatatggctcataacacccctgtttgctctggcgcgatagcgcggtggtcccaactgcac  
cccatgccgaactcagaagtgaacgcgctgagccgcgagtggtagttggggagctcccatgcagc  
gagtagggaaactgccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgcc  
cgggctaattaggggggtctgcgccctttagtcgctgaacctgtgctctgtttctaccgagacgt  
ttctctactgagcgagaaacccaggcagctcgtagtcggaactacgagccgaattcagctggagc  
tacgatttctcgtgtcttccgatactgaagaaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaaag  
actgagggagctgaagtcgcgcggaaatttaacacgagaagaagctgaattctgactctgctgga  
cgtgataacgtcagacgccttgggtctgggttaccgcttgaacttgaatatcgtctcgcgaca  
ctggatcgtttcgtgaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaacgagcctgcacgctacgc  
cgtgtctcttcgctctgctcgtcagcagccgttcgaagtttctcaggaaagcatttctccggtt  
caagatgataaaacggttaacttctcgaaaacccctgaagaagacataaggcgatcctgagcgtt  
tatgaggcaagctttctggccctggagggtgagaacattcctgataggcgcgcgctattcgcca  
tctcccatctgaagagctgtctgtaagagaaaaatcgtgaaggaaactggcagagacaggtttaatca  
cgcatggaaactgcgcctgcactcgtctaccagcgtctggaggcggtttgggtccatcgaagc  
tacgcgaaaaaggaggtatgcataccaggttctcgtcgtgaactggccattctggaactacaacatga  
tccagttccggtttaccagcgtgatctcgtgaaacctccggttggtggcgccgtgtggccctggc  
gaccaaaactgcactcgtataaggacgcctgattgagctcttttactggcgagctcgccgttcgct  
tgcgaacctcagttattctgactcgcgtgacacgcgttgcaaaaatgttcagcttcgttacttata  
tcgacgcacatctacgacgtttacggtactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcga  
acgttgggagtgttaacgcctacaagatctcctgactacatgaaactgctctcctcgccactg  
tataacacgatacaacgaattgcatacgcacaacctgaagaacaaaggtgaaacctcctgcgt  
acctgactaaagcgtgggcgggatctgtgtaacggttttctgcaagaagcgaattggctgtataa  
caaatccactccgacctttgacgattatttcgggaactgctggaaatccagattcgtccgcctg  
caactgactctcgcttatttttcgggtgttccaaaacatcaaaaaggaggaattgaaaaactctgc  
aaaaataccacgatatcatattagcgcctctctcatacttttctgcgctgcaacgacgttgcga  
cgctccgcagagatcgacagctggcgaaacctgaactctgtttctcgtactgacgacccaag  
ggcatttccgaagaagctggcaaccggagagcgttaatgaattctgacgacgaacctgtgaagaaa  
tgaacaaagaaaaactgggtggctccctgttcgctaaacctgctgtagagactgctataaacct



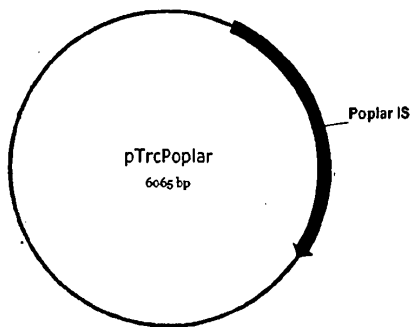
도면31b

```

ggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccgatgaactgact
cgtaaacgtgtactgtctgttatcaccgaaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagcgtc
aatcgaaagggcgacacaaaatttattctaaatgcataataaatactgataacatcttatagtt
tgtattatattttgtattatcgttgacatgtataattttgatatacaaaaactgattttcccttt
attattttcgagattttattttcttaattctctttaacaaactagaaatattgtatatcaaaaa
atcataaataatagatgaatagtttaattataggtgttcacatcaatcgaaaaagcaacgtatctt
atttaaagtgcgttgcttttttctcatttataaggttaaataattctcatatatcaagcaaagt
gacaggcgcccttaaatattctgacaaatgctctttccctaaactcccccataaaaaaaccg
ccgaagcgggtttttacgttatttgcggttaaacgattactcggttatcagaaccgcccaggggg
cccgagcttaagactggcgtcggttttacaacacagaaagagtttgtagaaacgcaaaaaggcc
atccgtcaggggcttctgcttagtttgatgcctggcagttccctactctcgcttccgcttcc
tcgctcactgactcgctgcgctcggtcggttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaag
cggtataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggcca
gcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcggttttccataggctccgccccct
gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcaggaactataaagat
accaggcggtttcccccgtgaagctccctcgctgcgtctctctgttccgacctgcccgttaccgg
atacctgtccgctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcagctgtaggtat
ctcagttcggtgtaggtcggttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccc
accgctgcgcttatccggttaactatcgctcttgatccaacccggttaagacacgacttatcgcc
actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttc
ttgaagtgtgggctaactacggtacactagaagaacagtatattggtatctgcgctctgctga
agccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccacgcgtggtag
cgggtggttttttgggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcct
ttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgacgcgcgtaactcaggttaagggtat
tttggtcatgagcttgcgcgctcccgtaagtcagcgtaaatgctctgcttt
(SEQ ID NO:48)

```

도면32



도면33a

5' -  
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgtcgaaggcgcactccc  
gttctggataatgttttttgcgcgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgt  
gtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattttaaaaattaaagaggtatatattaat  
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttact  
gagacggaaccgaggcacgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcc  
tgctgtcttccgatactgacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaaactggaggc  
tgaagtgcgcgcggaatttaaacacgagaaagctgaattcctgactctgctggagctgacgat  
aacgtacagcgcctgggtctgggttacgccttcgaatctgatctcgctcggcactggatcgtt  
tcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgacaaaacgagcctgcacgctaccgcgctgtcctt  
ccgtctgctgctgcgcacgcggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggttcaaaagatcaa  
aacggttaacttcttgaaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaa  
gcttcttgccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtattcggccatctcccatct  
gaaagagctgtctgaagagaaaaatcggttaaggaaactggcagagcaggttaatcacgcactggaa  
ctgcccgtcgtatcgtgtaaccagcgtctggagcgggttgggtccatcgaagcgtaccgcaaaa  
aggaggatgctaaccaggttctgctggaactggccatcctggactacaacatgatccagttccgt  
ttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccggttggtggcgcgtgtggcctggcgaccaaactg  
cacttcgctaaggaccgcctgattgagtccttttactgggcagtcggcgttgcgttcgaacctc  
agtatcttgactgccgttaacagcgttgcgaaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacat  
ctacgacgtttacggtaactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcgaaactgtggat  
gttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaactgtgcttccctggcactgtataacacga  
tcaacgaaattgcatacgcacaacctgaaagacaaagtgaaacatcctgccgtacctgactaa  
agcgtggcgcggtatctgttaacgctttctgcaagaagcgaatggctgtataacaaatccact  
ccgacctttgacgattatttcggcaatgctggaatccagctctggcccgtgcgaactgatct  
tcgcttattttgcggttgctcaaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgcaaaaatacca  
cgatatcatttagccgtccttctcatatcttctgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgca  
gagatcgacgctggcgaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcatttccg  
aagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaatgaacaaaga  
aaaactgggtggctccctgttcgctaaaccgttcgtagagactgctattaacctggcacgtcag  
agccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagccggatgaactgactcgtaaactgtg  
tactgtctgttatcaccgaaccgattctgcccgttcgaacgttaactgcagctggtaccatatgg  
gaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcctcgacca  
tcatcatcatcatcattgagtttaaaccggtctccagcttggtgttttggcggatgagagaaga  
ttttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctctgataaaacagaatttgcctgg  
cggcagtagcgcgggtggccacctgaacccatgccgaactcagaagtgaacgcggtagcgcg  
gatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtgggaactgccaggcatcaataaaacgaaaag  
gctcagtcgaaagactgggccttctgttttatctgttgtttgtcgggtgaacgctctcctgagta  
ggacaaatccgcgggagcggatttgaacgttgcaagcaacggcccgagggtggcgggcagg  
acgcccgcataaaactgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggcctttt  
gcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgag  
acaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggagagtatgagatttcaacatttc

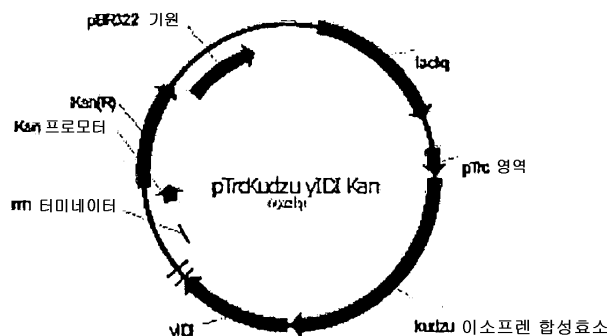
도면33b

cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgtcaccagaaaacgc  
 tgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatct  
 caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacggtttccaatgatgagcactttt  
 aaagtctctgtatgtggcgcggtattatcccggtgttgacgcccgggcaagagcaactcggtcgcc  
 gcatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaaagcatcttacgga  
 tggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaaccatgagtgataaactcgcggccaac  
 ttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcgtttttgcacaacatgggggac  
 atgtaactcgcccttgatcggtgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga  
 caccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacatttaactggcgaactacttact  
 ctagcttcccggcaacaattatagactggatggaggcggaataaagtgcaggaccacttctgc  
 gctcgcccttcggcgtggctggtttattgctgataaaatctggagccggtgagcgtgggtctcg  
 cggatcatgtgcagcactggggccagatggttaagccctcccgatcgtagttatctacacgacg  
 gggagtcaggcaactatggtgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgatta  
 agcattggtaactgtcagaccaagtgttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattt  
 ttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgcataatctcatgacaaaaatcccttaacgt  
 gagttttcggtccactgagcgtcagacccgttagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctt  
 ttttctgcgcgttaactgctgcttgcatacaaaaaaacaccgcgtaccagcgggtgtttgtt  
 gccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataacca  
 aatactgtccttctagtgtagccgttagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgccta  
 catacctcgctcgtctgaatcctgttaccagtggtgctgctgcagtgagcgaataagtcgtgtctac  
 cgggttgagactcaagacgatagttaccggataaaggcgagcgggtcgggctgaacggggggttcg  
 tgcacacagcccgcttgagcgaacgacactacaccgaactgagatacctacagcgtgagctat  
 gagaagcgcccgcttcccgaagggaagaaaggcgacaggtatccggttaagcggcagggtcgg  
 aacaggagagcgacagaggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcggg  
 tttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatgga  
 aaaaacgcagcaacgcggccttttaacggttctcgcccttttgcgtggccttttgcctacatggt  
 ttttctcgcttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgatacc  
 gctcgccgcagccgaacgacccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcggaagagcgctga  
 tgcgggtattttctccttacgcactctgtgcgggtatttcacaccgcataatggtgcactctcagtac  
 aatctgctctgatgcgcgatagtttaagccagttatcactccgctatcgctacgtgactgggtca  
 tggctgcgccccgacaccccgcccaaccccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccgcc  
 atccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgctca  
 tcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgccgcggaagcggaagcgccatgcatttacgt  
 tgacaccatcgaaatggtgcaaaaccccttcgcgggtatggcatgatagcgcccggaagagagtc  
 ttcagggtgggtgaatgtgaacacagtaacgttatagatgtgcgagagatgcccgtgtctctt  
 atcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaaacgcgggaaaaagt  
 ggaagcgcgatggcgagctgaattacattcccacccgctggcacaacaactggcgggcaaa  
 cagtcgttgctgattggcggtgcccacctccagcttgccctgcacgcgcgctcgcaaatgtgcg  
 cgcggtataaatctcgcccgatcaactgggtgccaagcgtgggtggtgctgagtgtagaacgaag  
 cggcgctgaagcctgtaaaagcgcggtgcacaatcttctcgcccaacgcgtcagtgggctgac  
 attaatatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccgg  
 cggtattttctgatgtctctgaccagacacccatcaacagttatttttctcccatgaagacgg  
 tacgcgactggcggtgagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggc  
 ccattaaagtctgtctcgccgctctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatc

도면33c

aaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgcattgctccggttttcaacaaacat  
 gcaaatgctgaatgagggcatcggtccactgcgatgctggttgcacaagatcagatggcgctg  
 ggccgaatgcgcgcattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggatatctcgtagtgggat  
 acgacgataccgaagacagctcatgttatcccgccgtcaaccacatcaaacaggattttcg  
 cctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggc  
 aatcagctgttcccgctctcactggtgaaaagaaaaaccacccctggcgcccaatacgcgaacccg  
 cctctcccgccgcttgccgcatcattaatgcagctggcagcagaggtttcccgactggaaaag  
 cggcgactgagcgcaacgaattaatgtgagttagcggaattgatctg  
 (SEQ ID NO:49)

도면34



도면35a

5' -  
 ttgtctgctcccgccatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtcag  
 aggttttcaccgtcatcaccgaacgcgcgagggcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc  
 ggcatgcattttacgttgacccatcgaaatgggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgc  
 ccggaagagagtcaattcaggggtggtgaatgtgaaccagtaacgttatacgatgtgcagagt  
 atgcccgtgtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
 aacgcgggaaaaagtggaaagcgcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcaca  
 caactggcgggcaaacagtcgtgtgattggcgttgccacctccagtcgtggccctgcacgcgc  
 cgtcgcgaattgtcgcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtc  
 gatggtagaacgaagcgcgcgtgaagcctgtaaagcgcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgc  
 gtcatgtggcgtgatcaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcct  
 gcactaatgttcgcggcgttatcttctgtatgtcttgaccagacacccatcaacagtatatttt  
 ctcccatgaagacggtacgcgactggcgtggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatc  
 gcgctgttagcggggccattaaagtctgtctcgcgcgctctcgtctggctggctggcataaat  
 atctcactcgcaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaaggcgcactggagtcccatgtccg  
 ttttcaacaacccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactggcatgctggttgccaac  
 gatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggaata  
 tctcggtagtgggatacgcagataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccacat  
 caaacaggattttcgctgctggggcaaacacagcgtggaccgcttgcgtgcaactctctcagggc  
 caggcgggtgaagggaatcagctgttgccgctctcactgggtgaaaagaaaaaccacctggcgc  
 ccaatacgcgaacccgctctcccgcgcttgcccgattcatatgacgctggcacgacaggt  
 tcccgactggaagcgggcagtgagcgcaacgcaatcaatgtgagttagcgcgaattgatctg  
 gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
 gctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactccc  
 gttctggataatgtttttgcgcgcgacatcatacgggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
 ttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
 gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcgcactgctcttaacaatttatcagacaatctgt  
 gtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattataaaaaattaaagaggtatatattaat  
 gtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
 gagcataattcccgctgttcgcgaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcttgcaat  
 ccctgggaaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaaagcgacaaactggaggaagaagt  
 tcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg  
 cagcgctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac  
 tgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgctgct  
 gcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaaagaaggtggt  
 ttacggcgtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
 gtttcgaggggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcaccacctgaagaacaa  
 cctgaaagaaggcatttaataccaaagggtgcagaacaagtgaagccacgacctggaactgccaat  
 caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttgggttcctggataaaatcgaacccgaaagaaccgc  
 atcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaa  
 agagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgta  
 cgcgaccgcctgatggaagtttatcttgggcaactgggtatggcgccagaccgcagtttgggtg  
 aatgtcgcaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt

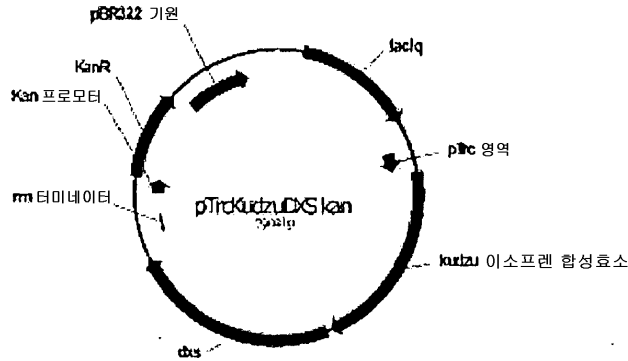
도면35b

ttagggcactctggagcaactgcaactgttcacgatgctgtagagcgtgggacgttaacgct  
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgttccctggcactgtacaacaccgttaacgaca  
cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
tgaactgtgcaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaacaaattatccccgctttc  
tccaagtacctggaaaaacgccagcgtttccctcctccgggtgtagcgtgctggcgccgttact  
ttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcttccctgaccgacttcca  
tggtctgggtgcttctagctgcttattctccgctgtgcaacgatctggccacctctgcccgcg  
gagctggaaactggcgagactaccaattctatcattagctacatgcagaaaaagatggtacca  
gcgaggaacagggcccgcaagaactgcgtaaactgatcgacgcgaatggaaaaagatgaatcg  
tgaacgcgttagcgactccacctgctgctaaagcgttcatggaaatcgagtttaacatggca  
cgtgtttccactgcacctaccagatggcgatgggtctgggtcgccagactacgcgactgaaa  
accgatcaactgctgctgattgacctttcccgattaaccagctgattgtctaaactgca  
tcgccccttaggaggttaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtagcccatgggtgcagatc  
tagttacgcccatttagtgcacaaacacacactgaagacatttggaaaggtttccctgaaatt  
attccattacaacaaagacctaatacccgatctagttagacgtcaaatgacgaaagcgagaaa  
catgtttttctgggtcatgtagggagcaaatgaatttaagtaaatgaaaattgtattgttttgg  
ttgggacgataatgctattggtgcccgtaccaagaaagtgtgtcatttaattgaaaaatttgaa  
aaggggttactacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaacaaggtgaattacttttac  
aacaagagccactgaaaaaataactttccctgatcttggactaacacatgctgctcctcc  
actatgtattgatgacgaattaggtttgaagggttaagctagacgataagattgaaggcgctatt  
actgcccgggtgagaaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagg  
gtaagtttccactttttaacagaatccattacatggcaccagcaatgaaccatggggtaaca  
tgaattgattacatcctattttataagatcaacgctaagaaaaacttgactgtcaacccaaac  
gtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacc  
caagttacaagtttacgcttgggttaagattatttgcgagaattactattcaactggtggga  
gcaattagatgacctttctgaagtggaaaaatgacagcgaattcatagaatgctataacaacgc  
gtcctgcagctgggtaccattatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagag  
gatctgaatagcgcgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttg  
ctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcgt  
ctgataaaaacagaatttgctggcgagtagcgcggtgggtccacactgaccccatgccgaact  
cagaagtgaacgcgtagcgccgatggttagtggtgggtctcccatcgagagtaggggaactg  
ccaggcatcaaaataaacgaaaggctcagtcgaagactgggctttcgttttatctgtgttt  
gtcgtgaaacgctctcctgagtaggacaaatccgcccggagcggatttgaaactgtcgaagcaa  
cgccccgaggggtgcccggcagcagcccccaataaactgccaggcatcaaatgaagcagaagg  
ccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttttgtttattttctaaatacat  
tcaaatatgtatccgcttaaccggaattgcccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagcc  
ctgcaagtaaaactggatggctttctgcgcgcaaggatctgatggcgaggggatcaagctct  
gatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggtctc  
cgccgcttgggtggagaggctatttcggtatgactgggcacacagacaaatcgctgctctga  
tgccgcggtgttccggctgtcagcgcagggggcccggttcttttgtcaagaccgacctgtcc  
gggtcccctgaatgaactgcaagacgagcagcgcggtatcgtggctggccacgacggcggttc  
cttgcgacgtgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaaggagactggctgctattgggcgaagt  
gccggggcaggatctcctgtcatctcacctgtcctgcccagaaagtatccatcatggctgat

도면35c

gcaatgcggcggtgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatc  
gcatcgagcgagcagctactcggtggaagcgggtcttgcgatcaggatgatctggacgaaga  
gcatcaggggctcgccgagccgaactgttcgcccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgag  
gatctcgtcgtgacccatggcgatgctgcttgcggaatatcatggtggaaaaatggccgctttt  
ctggattcatcgactgtggcggctgggtgtggcgagcgcgtatcaggacatagcgttggctac  
ccgtgatattgctgaagagcttggcgcgaaatgggtgaccgcttccctgctgctttacggtatc  
gccgctcccgattcgacgcgcatcgcttctatcgcttcttgacgagttcttctgacatgacc  
aaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacccgtagaaaaatcaaggat  
cttcttgagatccttttttctgcgctaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctacc  
agcgggtgggtttgttggcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggctcagc  
agagcgagataccaaatactgctcttctagttagccgttagtgccaccactcaagaact  
ctgtagcacgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggtgctgccagtggcga  
taagtctgtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgacgggtcgggc  
tgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacacggaactgagatacc  
tacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttccgaaaggagaaaggcgacaggtatccggt  
aagcggcaggggtcgaaacaggagagcgacgagggagcttccagggggaacgcctggtatctt  
tatagtcctgtcgggtttccgccacctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggg  
ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttccctggccttttgcgtggc  
ttttgctcacatgttcttctcgtgttatccctgattctgtggataacgctattaccgcttt  
gagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgacgagcgcgagtgagtgagcaggaag  
cggaagagcgcctgacgggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacacccgcatatg  
gtgacctcagtaacaatctgctgagcgcgatagttgaagccagatatacactccgctatcgc  
tacgtgactgggtcatgggtgccccgcaccccgaacaccgctgacgcgcctgacgggc  
(SEQ ID NO:50)

도면36



도면37a

5'-  
 ttgtctgctcccgccatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag  
 aggttttcacccgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagc  
 ggcattgcatttacggttgacccatcgaaatgggtgcaaaacotttcgcggtatggcatgatagcgc  
 ccggaagagagtcattcagggtgggtgaatgtgaaaccagtaacgttatcacgattgtcgagagt  
 atgcccgtgtctcttatcagaccgtttcccgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaa  
 aacgcgggaaaaagtggaaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcaca  
 caactggcgggcaaacagtcgttgcgtgatggcggtgccacctccagtcctggccctgcacgcgc  
 cgtcgcaaatgtgcgcggcgattaaatctgcgcgcgatcaactgggtgccagcgtgggtgtgtc  
 gatggtagaacgaagcggcgctgaagcctgtaaagcggcggtgcacaattctctcgcaacgc  
 gtcagtggtgctgatcattaaactatccgctggatgaccaggatgccattgtctgtggaagctgcct  
 gcactaatgttccggcgttatttctgtatgtctctgaccagacacccatcaacagttattttt  
 ctcccatgaagacggtacgcgactggcgctggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatc  
 gcgctgttagcggggccattaaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat  
 atctcactcgcaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaagggcagctggagtccatgtccgg  
 ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccaactgcgatgctggttgcacac  
 gatcagatggcgctggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggcgctgcgcgttgggtgcggata  
 tctcggtagtgggatacagcagataccgaagacagctcatgttatatccgcgcgtcaaccacat  
 caaacaggattttcgccctgctggggcaaacacagcgtggaccgcttgcgtgcaactctctcagggc  
 caggcggtgaaggggcaatcagctgttgcgcgtctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgc  
 ccaatcgcgaacccgctctcccgcgcggtggccgatcattaatgcagctggcagcagcaggt  
 tcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg  
 gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaa  
 gctgtggtatggctgtgcaggtcgttaatacactgcataattcgtgtcgtcgaaggcgactccc  
 gttctggataatgtttttgcgcgcgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg  
 ttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag  
 gaaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcgcactgctcttaacaatttatcagacaattctgt  
 gtgggcactcgaccggaattatcgattaaactttattataaaaaattaaagggtatatattaat  
 gtatcgattaaataaggagggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacc  
 gagcataattcccgctcgttccgcaaacatcagccaaacctgtggaatttcgaattcttgcatt  
 ccctggagaaacgacctgaaagtggaaaaagctggaggagaaagcgacaaacctggaggaaaggt  
 tcgctgcatgatcaaccgtgtgacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtg  
 cagcgctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtac  
 tgctggacgaaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgctcgtgct  
 gcgtcagcacggtttcgagggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggt  
 ttacgcggtgaaactgaaagggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgg  
 gtttcgagggtgagaacctgctggaggagcgctacctttccatcaccacactgaagaacaa  
 cctgaaagaaggcattaatccaagggtgcagaacaagtgaagccacgctggaactgacat  
 caccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttgggttctggataaaatcgaaccgaaagaaccgc  
 atcaccagctgctgctggagctggcgaaagctggattttaacatggtacagacctgcaccagaa  
 agagctgcaagatctgtcccgctgggtggaccgagatgggcctggctagcaaacctggattttgta  
 cgcgaccgctgatggaagtattttctgggcaactgggtatggcgccagaccgcagtttgggtg  
 aatgtcgcaagctgttactaaaaatgttggctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt  
 ttatggcactctggaacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgct



도면37b

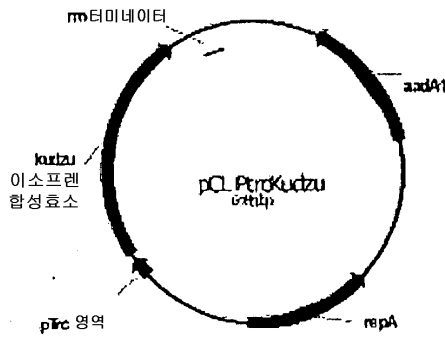
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgaca  
 cgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcg  
 tgaactgtgcaaaagcctttctgcaagaggcgaaatggccaacaacaaaatattcccgctttc  
 tccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgtgctggcgccgtcttact  
 tttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgtgcttccctgaccgacttcca  
 tgggtctgggtgcttctagctgcttattctccgctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg  
 gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcagaaaacgatggtacca  
 gcgaggaacaggcccggaagaactgcgtaaactgatcgacgcgaatggaaaaagatgaatcg  
 tgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgagtttaacatggca  
 cgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgccagactacgcgactgaaa  
 accgcatcaaaactgctgctgattgacctttcccgattaaaccagctgattgcttaactgca  
 ttccgaccttaggaggtaaaaaacatgagttttgatattgcaaaataccggacctggcgactgg  
 tgcactccaccaggaggttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaact  
 gcgcgcgtattttactgcagacgctgagccgttccagcgggcacttgcctccgggtgggcaag  
 gtcgaaactgacgctggcgctgactatgtctacaacaccccggttgaccaattgattgggatg  
 tggggcatcaggcttatccgcataaaaatttgaccggacgcgcgacaaaatcggcacccatccg  
 tcagaaaaggcgtctgcaccggttcccggtggcgcggaagcgaatagacgtattaaagctc  
 gggcatctatcaacctccatcagtgccggaattgggtattgcggttgcctgccgaaaaagaaggca  
 aaaaatcgccgcacccgtctgtgctattggcgatggcgcataccgcagcatggcggtttgaagc  
 gatgaatcacgcggggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgctc  
 atttccgaaaaatgctcgcgcgctcaacaacctctggcacagctgctttccggtaagctttact  
 ctctactgcgcgaaggcgggaaaaaagttttctctggcggtgcgcgcaattaaagagctgctcaa  
 acgcaccgaagaacatatataaaggcatggtagtcctggcagcttgtttgaagagctgggcttt  
 aactacatcgcccggtggacggtcacgatgtgctggggcttatcaccacgctaaagaacatgc  
 gcgacctgaaaggcccgagttcctgcataatcatgacaaaaaaggtcgtggttatgaaccggc  
 agaaaaagacccgatcactttccacgcggtgcctaaatttgatccctccagcggttgtttgccc  
 aaaagtagcggcggtttgcccagctattcaaaaatctttggcgactggttgcgaaacggcag  
 cgaaagacaacaagctgatggcgattactccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagtt  
 ttcacgtaaatttcccgatcgctacttcgacgtggcaattgcccagcaacacgcggtgaccttt  
 gctgcgggtctggcgattggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccactttcctgcaac  
 gcgcctatgatcaggtgctgcacgtggcgattcaaaagcttccggctcctgttcgcccacga  
 ccgcgcgggcatgttgggtgctgacggtcaaaacccatcaggggtgcttttgatctctcttaactg  
 cgctgcataccgggaatggtcattatgaccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctct  
 ataccggctatcactataacgatggcccgctcagcggtgctgctaccgcggtggcaacgcggtcgg  
 cgtggaaactgacgcgcgctggaaaaactaccaattggcaaggcattgtgaagcgtcgtggcgag  
 aaactggcgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaaagtcgccaatcgctga  
 acgcacgcgtggtcgatcgcttttggtaaacgcgttgatgaagcgttaattctggaaatggc  
 cgccagccatgaagcgctggtcaccgtagaagaaaaacgccattatgggcggcgaggcagcggc  
 gtgaacgaagtgcgtgatggcccatcgtaaaacagtagccgtgctgaacattggcctgcccgaact  
 tctttattccgcaaggaaactcagggaagaaatgcgcgcggaactcgccctcgatgcgcgtggtat  
 ggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgcagctggtaccatatgggaattcgaagctt  
 tctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcgctcgaccatcatcatcatcat  
 cattgagtttaaacggtctccagctgggtgttttgccggtgagagaagattttcagcctgat  
 acagattaaatcagaacgcagaagcgtctgataaaacagaatttgctggcgcgagtagcgcg



도면37c

gtggtccacacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgccgtagcgccgatggtagtggtg  
 ggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaag  
 actgggaccttctgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcc  
 gggagcggatttgaacggttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggaggaacgcccgcataa  
 actgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaa  
 ctctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgcttaaccggaattgccagctg  
 gggcgccctctggttaagggttgggaagccctgcaaagttaactggatggcctttctcgccccaag  
 gatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgatt  
 gaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcgctatgact  
 gggcacaacagacaatcggtctctgatgccgcggtgttccggctgtcagcgaggggcgccc  
 ggttcttttgcgaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgagcgagcgcg  
 ctatcggtggctggccacgacggcggttcccttgccgacgctgtgctcgacgtttgtcactgaagcg  
 gaagggaactggctgctattgggcgaagtgcgggggaggaatctcctgtcatctcaccttgctcc  
 tgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgttgatccggctacc  
 tgcccatcgcaccacaagcgaaacatcgcatcgagcgagcagctactcggtggaagccggtc  
 ttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgccgacccgaactgttcgcca  
 gctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgctcgtagcccatggcgatgcctgcttgccg  
 aatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcg  
 accgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattgctgaagagcttggcgcgaaatgggc  
 tgaccgcttccctcgctgttaccggtatcgccgctcccgattcgacgcatcgcccttctatcg  
 ctcttgacgagttcttctgacgcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgag  
 cgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatcttcttgagatcccttttttctgcgcgtaactg  
 ctgcttgcaaaacaaaaaaccacgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctacca  
 actcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataaccaatactgtccttctagtgt  
 agccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgctctgcta  
 cctgttaccagtggtgctgctgccagtgccgataaagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacga  
 tagttaccggataaaggcgacggctcggtgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttgg  
 agcgacacacacacgaactgagatcctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcc  
 cgaaggagaaaggcgacaggtatccggtaagcgcgagggtcggaacaggagagcgacgagg  
 gagcttccagggggaaacgcctgggtatcttatagtcctgtcggtttcgccacctctgacttg  
 agcgtcgattttgtgatgctcgtagggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcg  
 ctttttacgggttccctggccttttgcgtggccttttgcctacatgttcttccctgcttatccct  
 gattctgtggataaacgctattaccgctttgagtgagctgataccgctcgccgagccgaacga  
 ccgagcgagcagtgagtgagcgaggaagcggaagagcgctgatgcggtatttctccttac  
 gcatctgtcggtattttcacaccgcatatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgccga  
 tagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgcccgcacccc  
 gccaacaccgctgacgcgcccgtgacggg  
 (SEQ ID NO:51)

도면38



도면39a

5' -  
ctggcgttaatagcgaagaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggc  
gaatggcgctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggt  
gcactctcagtaacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagcccgacaccgccaacacc  
cgctgacgagcttagtaaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac  
tattgcgataaacaagaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttatt  
atgcacgcttaaaaaataaaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgc  
ttagtgcatacaacgcttgagtttaagccgcccgcgaagcggcgtcggttgaacgaattgtta  
gacattatttgcgactaccttggtgactctgcctttcacgtagtggaacaaattcttccaactg  
atctgcgcgagggccaagcgactcttcttctgtccaagataagcctgtctagcttcaagatg  
acgggctgataactggcggcgagggcgtccattgccagtcggcagcgacatccttcggcgcca  
ttttgcgggttactgcgctgtacaaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc  
agccagtcggcgcgaggttccatagcgttaagggtttcatttagcgctcaaatagatcctgt  
tcaggaaaccggatcaaagagttcctccgcccgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg  
cttttgcgcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaat  
gtcatttgctgctccatttctccaaattgcagtttcgctcttagctggataacgccacggaatgatg  
tcgtcgctgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggggaagccg  
aagtttccaaaaggctcggtgatcaaagctcgcccggttgtttcatcaagccttacgggtcaccgt  
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggttcaggccgccatccactcgaggagcgtacaaatgt  
acggccagcaacgctcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtgc  
atacttcggcgatcacccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgcctgctg  
cgtaacatcgttgcctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgcgtctg  
gatgcccaggcgatagactgtacccccaaaaaacagtcataacaagccatgaaaacggccactg  
cgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctactt  
gcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgctgccttcatccggtttccac  
ggtgtgcgctcaccggcgaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcga  
acgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcgcccttgctgttctctacgg  
caaggtgctgtgcacggatctgccttggttcaggagatcggaagacctcgccgctcgcgccgc  
ttgcccgtggtgctgaccccgatgaagtgggtcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatc  
gtttgttcgcccagcttctgtatggaaacgggcacgagatcagtgagggtttgcaactgcgggt  
caaggatctggatttcgatcacggcacgcatcatcgctcgggagggaagggtccaaggatcgg  
gccttgatgttacccgagagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaatttaattccacagg  
ttttgctgcccgcgaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgagatccggc  
ttcagccggtttgcggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgatttttcccccagg  
gaggcgctactggctcccgtgtgtgcggcagctttgattcgataagcagcatcgccgttttcag  
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgtcaatttcaggttctagt  
tgctttgttttactgggttccactgttctattagggtgttacatgctgttcatctgttacattgt  
cgatctgttcatggtgaacagctttgaaatgcacccaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat  
cttttttacaccgttttctctgtgcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaaca  
gttgttctactttgtttgttagtcttgatgcttactgatagatacaagagccataagaacct  
cagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtggttcgtttgttttgctgagccatg  
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttgcctcaaaactggt  
gagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgttatgtaggtaggaa  
tctgatgtaatggtgtgtgtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagtccg

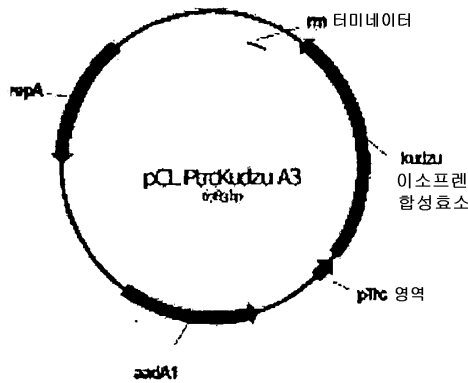
도면39b

ttagagagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcggggcgctcg  
cttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaactcttacttatggtttcaaaacc  
cattgggttaagccttttaaactcatggtagttattttcaagcattaacatgaacttaaatcat  
caaggctaactctctatatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaaccactc  
ataaatcctcatagagtatttgttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat  
ttttttaactggaaaagataaggcaatatctctcactaaaaactaattctaatttttcgcttg  
agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaagcctttaaccaaggattcctgatttc  
cacagttctcgtcatcagctctctgggtgtttagctaatacaccataaagcattttccctactg  
atgttcatcatctgagcgtatttggttataagtgaacgataccgtccgttctttccctgtagggt  
tttcaatcgtgggttgagtagtgccacacagcataaaaattagcttgggttcatgctccgttaa  
gtcatagcactcatcgaatttccgttagacctttgtgtgtttttttgttttatattcaagtggtt  
tgggtcaggtgattttaactactataccaattgagatgggctagtcattgataattactagtcct  
ttttcctttgagtttgggttatctgtaaatctgctagacctttgctggaaaacttgtaaatc  
tgctagacctctgttaaatccgctagacctttgtgtgtttttttgttttatattcaagtggtt  
ataatttatagaataaaagaaagataaaaaagataaaaaagatagatccagccctgtgtata  
actcactacttttagtcagttccgcagattacaaaaagatgtcgcaaacgctgtttgtctcctc  
acaaaacagaccttaaaacccctaaaggcttaagtacacacctcgcaagctcgggcaaatcgctg  
aatattccttttgtctccgacctcaggcacctgagtcgctgtcttttctgtgacattcagttc  
gctgcgctcagcgtctggcagtgaaatgggggttaaatggcactacaggcgcttttatggattc  
atgcaaggaaactaccctaattacaagaaaagcccgctcaggggtctcagggcggttttatggc  
gggtctgctatgtgggtctatctgacttttgcgtgtcagcagttcctgccctctgattttcca  
gtctgacctctcggttatccgtgacaggtcattcagactggctaatgcaaccagtaaggca  
gggtatcatcaacaggcttaccctcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcatatg  
cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagc  
ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgtgagaaaaagcgaagcggtgctctttaac  
aatttatcagacaattctgtgtgggcaactcgacgggaattatcgattaaactttattataaaaat  
taaagaggtatataatgtatcgattaaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttc  
caattttactcagatattccgagcataattcccgctgttccgcaaaactatcagcctaacctgtgg  
aatttcgaatttctgcaatccctgggacacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga  
ccaaactggaggagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtgacacccagcgctgtcctcgtc  
ggagctgatcgagatgtgacgagcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcatataa  
gacctggaaaacacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaaactcgcctgcacgcaaccg  
ctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgttt  
caaggataaagaaggtgtttcagcggtgaaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg  
tatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctaccttttcca  
tcaccacacctgaagaacaacctgaaagaggttaataaccaaggttgagaacaagtgaacca  
cgccctggaaactgccataacacagcgtctgcacgtctggaggcacgttgggtcctggataaa  
tacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatgg  
tacagacctgaccagaaagagctgcaagatctgtccgctgggtggaccgagatggcgctggc  
tagcaaacctggattttgtacgcgacctgagtggaagtttatttctgggcaactgggtatggcg  
ccagaccgcagtttgggtgaatgtcgaaagctgttactaaaatgtttgggtcgtgacgatca  
tgcgtgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaaactgcaactgttaccgatgctgtaga  
gcgtgggacgttaacgctatttaacacctgcgggactatataaaactgtgtttcctggcactg  
tacaacacctgtaacgacacgtcctattctattctgaaaagagaaaggtcataacaacctgtcct

도면39c

atctgacgaaaagctggcgtagactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaa  
caaaattatcccggttttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcg  
ctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgc  
gttccctgaccgacttccatgggtctggtgcttctagctgcgtttatcttccgctgtgcaacga  
tctggccacctctgcggcgagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg  
cacgaaaacgatggtagcagcaggaacagcccgcaagaactgcgtaaactgatcgacgcg  
aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgaactccacctgctgcctaaagcgttcatgga  
aatcgcagttaacatggcacgtgtttcccaactgcacctaccagttatggcgatgggtctgggtcgc  
ccagactacgcgactgaaaacccgcatcaaaactgctgctgattgacctttcccgatttaaccagc  
tgatgtatgtctaactgcagctggtagcatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactca  
tctcagaagaggatctgaatagcgcctgcacctcatcatcatcatcattgagtttaaacggt  
ctccagcttggctgttttggcggtatgagagaagatttcagcctgatacagattaaatcagaac  
gcagaagcgtctgataaaaacagaatttgcctggcgagtagcgcggtgggtccacctgaccc  
catgccgaactcagaagtgaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggtctcccatgagaga  
gtagggaactgccagcgtcaaataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactggcgctttcggttt  
atctgttgttgcgtggaacgctctcctgagtaggacaaatccgcccggagcggtattgaacg  
ttgcgaagcaacggccggaggggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccagcgtcaaat  
taagcagaaggccatctcagcgtatggccttttgcgtttctacaaactctttgtttatattt  
tctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaataat  
(SEQ ID NO:52)

도면40



도면41a

5' -  
 ccggtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatc  
 aggggtattgtctcatgagcggatatacatattgaatgtatttagaaaaataacaaaaagagtt  
 tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttgatgctggcagttt  
 atggcgggctcctgccgccaccctccgggctgtcttcgcaacgttcaaatccgctcccg  
 cggatttgcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaagataaaacgaaaggccagctct  
 ttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcacatggggagacccc  
 acactaccatcgccgctacggcgtttcacttctgagttcggcatggggtcaggtgggaccaccg  
 cgctactgccgccaggcaaatctgttttatcagaccgcttctcgtttctgatataatctgtat  
 caggctgaaaaatcttctctcatccgcaaaaacagccaagctggagaccgtttaaaactaatgat  
 gatgatgatgatggtcagcggcgtattcagatcctctctgagatgagttttgttctagaaa  
 gcttcgaattcccatatggtaccagctgcagttagacatacatcagctgggttaatcgggaaagg  
 gtaactcagcagcagtttgatgcggttttcagtcgcgtagtctgggacccagaccatcgcca  
 tactggtaggtgcagtgaggaaacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgcttaggca  
 gcagggtggagtcgctaaccgcttcacgatcctctttccattcggcgtcgatcagtttacg  
 cagttcttcgcgggcgtgttctcgtggtaccatcgttttcgtgcagtgatgtaataatgataaa  
 ttggtagtctcgccacgttcacagctccgcccagaggtggccagatcgttgacagggcggaaaga  
 taacgcagctagaaacgacccagaccatggaagtgcgtcagggaaacgcagcgcgtggtcgagat  
 gtcttctgctgctggcatacggaaaagttaagacggcgcagcagcgtacaccggaggaggaa  
 acgctggcgttttcagggtacttgagaaaagccgggataattttgttgggaccatttcgcct  
 cttgcagaaaggctttgcacagttcacgcagcgttttcgtcagataggacaggttggtatgacc  
 ttctctttcagaatagaataggacgtgtcgttaacgggtgtgtacagtgccaggaaacacagct  
 ttcatatagtcggcgagggtgttaatagcgttaacgtcccagcgtctacagcatcgggtgaaca  
 gttgcagttcgtccagagtgccataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagacaaa  
 cattttagtaaacagctttgcgacattcaccaaaactgcgggtctggcgccatacccagtgccag  
 aaataaaacttccatcaggcgttcgctacaaaatccagtttgctagccaggccatctcgggtcc  
 accagcgggacagatcttgacgctcttctcgtgacgggtctgtaccatgttaaaatccagctt  
 cgccagctccagcagcagctggtgatgcggttcttccggttcgtatttatccaggaaacacgt  
 gccctccagacgggtgcagacgctggtgatatggcagttccaggcgtggctcacttgttctgcaa  
 ccttggtatataatgccttcttcaggttgttcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctc  
 ctccagcaggttctcaccctcgaaacccaggttaagacgcttcatacaggtcagcagggccttg  
 acgtcacctttcagttcacgcgtgaaacccctctttatccttgaaacgctcaaaaacatcct  
 gagaacacctcgaaacggtgctgacgcagcagacggaagacagagcgggtgcgtgcaggtcaga  
 tttgttcttttgtttctgctccagcagtagatgtttccagggttttaatgatgtcttttca  
 aatttgtaggtcagaccaggcgtgcacatcgtcgatcagctccagcagggaagcagcggctggg  
 tgtctacacgggtgatcatgcagcgaactcttctcctcagtttggtcgcttctcctccagctt  
 ttccactttcaggtcgttctccagggtatgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatag  
 tttgcggaacgacgggaatttatgctcggtaattcagagtaaatgagaagaggtgcacacatgg  
 ttattctcctcttatttaatcgatacatataatatacctctttaatttttaataataaagtta  
 atcgataattccgggtcgagtgccacacagattgtctgataaattgttaagagcagtgccgct  
 tcgctttttctcagcggcgtgtttctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacatt  
 atacgagccggatgataattgtcaacagctcatttcagaatctggcgttaatagcgaagaggcc  
 cgcaccgatcgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtatt  
 ttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcataatggtgcactctcagtaacaatctgctc

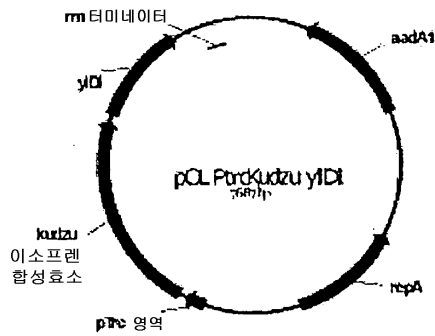
도면41b

tgatgccgcatagttaagccagccccgacccccgcaacacccgctgacgagcttagtaaaagcc  
ctcgctagatatttaagcgagtggtgagcttacttcgccaactattgcgataacaaagaaaagc  
cagccttcatgataatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaaataataaa  
agcagacttgacctgatatgttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagt  
taagccgcccgcgaagcggtcggttgaaacgaattgttagacattatttccgactacctt  
ggtagctcgcctttcacgtagtggaacaaattcttccaactgatctgcccgcgagggccaagcga  
tcttcttcttgcgaagataagcctgtctagcttcaagttagacgggctgatactgggcccgcga  
ggcgtccatttgccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgcgggttactgcgctgta  
ccaaatgccccgcaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagccagtcggggcgcgagttc  
catagcgttaagggttcatttagcgccctcaaatagatcctgttcaggaaacgggatcaaaagatt  
cctcgcgcgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgccttgcagcaagatagccag  
atcaatgtcgatcggtggtggtcggaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctcca  
aattgcagttcgcgcttagctggataacgcccacggaatgatgtcgtcgcaacaacatggtga  
cttctacagcgcgaggaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaaggctcggtgat  
caagctcgcgcgctgttctcatcaagccttacggctacccgtaaccagcaaatcaatatcactg  
tgtggttcaggccgcatccactgcccagcggtacaaatgtacggccagcaacgctcggttga  
gatggcgctcgatgacgcccactacctctgatagttagtcgatacttcggcgatcacccgcttc  
cctcatgatgtttaaactttgttttagggcgactgcctgctcggttaacatcgttgctgctccat  
aacatcaaacatcgaccacggcgtaacgcgcttgcgtgctggatgcccagggcatagactgta  
ccccaaaaaacagtcataaacaagccatgaaaacggccactgcccgttacaccgctcgcttc  
ggtaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatagcgtacttgcattacagcttacgaaccgaa  
caggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacgggtgctgcctaccccggaacct  
tgggcagcgaggaagtgcagggcatttctgtcctggctggcgaaacgagcgcaagggttcggtctc  
cacgcatcgtcaggcattgccggccttgctgttcttctacggcaagggtgctgtgcacggatctg  
ccctggcttcaggagatcggaagacctcgccgctcgccgctgctgcgggtggtgctgaccccg  
atgaagtgggttcgcatcctcggtttctggaaggcgagcatcggttgcgtccagcttctgta  
tggaacgggcatcggtatcagtgaggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcac  
ggcagcatcatcgctgcccggggcaagggtcccaaggatcgggccttgatgttaccgagagct  
tggaacccagcctgcccggagcgaggggaatttaattcccacgggtttgctgcccgaacgggt  
gttctgggtgtgctagtgttgcatacagatcgagatccggcttcagccggtttgcgggctgaa  
agcgctatttctccagaattgcatgatatttcccacggggagggcgtcactggctcccgctgt  
tgtcggcagcttgcattcgataagcagcatcgctgttccaggctgtctatgtgtgactgtga  
gctgtaacaagtgtctcagggtgttcaatttcatgttctagtgttgccttactgggttcac  
ctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagc  
ttgaaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttacaccggttctcatct  
gtgcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaacagttgttctactttgtttgtta  
gtcttgatgcttactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagcca  
gtatgttctctagtgtggttcggttgcgtgagccatgagaacgaacccatgagatcata  
cttactttgcattgctcactcaaaaatttgcctcaaaactggtagctgaattttgcagttaaa  
gcatcggttagtgttttcttagtccgttatgtaggttaggaatctgatgtaatgggtgttggtga  
ttttgtcaccattcatttctatctggttgcctcaagttcggttacgagatccatttgtctatc  
tagttcaacttgaaaaatcaacgtatcagtcggggcgccctcgcttatcaaccaccaatttcata  
ttgctgtaagtgtttaaactcttacttattggtttcaaaacccattgggttaagccttttaaact  
catggtagttattttcaagcattaacatgaacttaaatctcatcaaggctaactctctatattgc

도면41c

cttgtagttttctttgtgttagttcttttaataaccactcataaatcctcatagagtatttg  
ttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaattttttaactggaaaagataag  
gcaatatctctcactaaaaactaattctaattttcgcttgagaacttgcatagtttgtcca  
ctggaaaaatctcaaaagccttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgatcagctct  
ctgggttgccttagctaaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtatt  
ggttataagtgaacgataccgtcggttcttcccttgtaggggtttcaatcgtggggttgagtag  
tgccacacagcataaaaatagcttgggttcatgctccgttaagtcataagcactaatcgctagt  
tcatttgcctttgaaaaacaactaattcagacatacatctcaattggcttaggtgattttaatcac  
tataccaattgagatgggctagtcaatgataaattactagtccttttcccttgagttgtgggtat  
ctgtaaatttgcctagaccttgcctggaaaaacttgtaaatctgctagacctctgtaaattcc  
gctagacctttgtgtgttttttggtttatattcaagtggttataatttatagaataaaagaaag  
aataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttcc  
gcagttatcaaaaaggatgtcgcaaacgctgttgcctcctacaaaaacagaccttaaaacct  
aaaggcttaagttagccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatttccctttgtctcgacc  
atcaggcacctgagtcgctgtcttttgcgtgacattcagttcgctgcgctcagcgctctggcag  
tgaatgggggtaaatggcactacaggcgcttttatggattcatgcaaggaaactaccataat  
acaagaaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcggtctgctatgtgggtctatc  
tgacttttgcgtgttcagcagttcctgccctctgattttccagctctgaccacttcggattatcc  
cgtgacaggtcattcagactggctaatagcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:53)

도면42



도면43a

5' -  
ctggcgtaataagcgaagagggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggc  
gaatggcgccctgatgcggtattttctccttacgcattctgtgcggtatttcacaccgcataatggt  
gcactctcagtaacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgcaccccgccaacacc  
cgctgacgagcttagttaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac  
tattgcgataaacaagaaaaagccagcctttcatgatatactcccaatttggtgtagggcttatt  
atgcacgcttaaaaaataaaaaagcagacttgacctgatagtttggtctgtgagcaattatgtgc  
ttagtgcattctaaccgcttgagtttaagccgcgcgcggaagcgcgctcggttgaaacgaattgta  
gacattatttgccgactaccttggtgatctcgcccttcacgtagtggacaaattcttccaactg  
atctgcgcgcgagggccaagcgatcttcttctgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatg  
acgggctgatactgggcgcgcgagcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgga  
ttttgcccgttactgcgctgtaccaaatgcccggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc  
agccagtcgggcgcgcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgccctcaaatagatcctgt  
tcaggaaaccggtcaaagagtttctccgcgcgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttg  
ctttgtgcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaat  
gtcatttgcgctgccatttctccaaattgcagtttcgcgcttagctggataacggcacggaatgatg  
tcgtcgctgcacaacaatggtagcttctacagcgcgcgagaatctcgctctctccagggaagccg  
aagtttccaaaaggtcggtgatcaaagctcgccgcggtgttctcatcaagccttacggctcaccgt  
aaccagcaaatcaatatcactgtgtggttcaggccgcgcctccactgcggagccgtacaatagt  
acggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcg  
atacttcggcgatcacgcgttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactcccctgctg  
cgtaacatcggttgcctcctataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgccttg  
gatgcccagggcatagactgtacccccaaaaaacagtcataaacaagccatgaaaaccgccaactg  
cgccgttaccacgcgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctactt  
gcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccac  
gggtgctgcgtcaccggcgaaccttgggcagcagcgaagtcgagggcatttctgtcctggctggcg  
acgagcgcaaggtttcggttccacgcacgtcgtaggcattggcgcccttgcgtgttcttctacgg  
caaggtgctgtgcacggatctgcctgggttcaggagatcggaagacctcgccgctcgcggcgc  
ttgcccgttggtgctgaccccggtgaaggtggttcgcacccctcggttttctggaaggcgagcatc  
gtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcacatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggt  
caaggatctggtattcgatcacggcacgatcatcggtcggggagggcaagggtccaaggatcgg  
gccttgatgttaccgcagagcttggaacccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacggg  
ttttgctgcccgcgaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgagatccggc  
ttcagccgggttgccgggtgaaagcgctatttctccagaattgccatgatttttcccacgg  
gagcgctcactggctcccggtgtgtgcgcgactttgattcgataagcagcatcgccgtttcag  
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagggtgttcaatttcattgttctagt  
tgctttgttttactggtttcactgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt  
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcacaaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctat  
cttttttacaccggttttcatctgtgcataatggacagttttccctttgatatgtaacgggtgaaca  
gttgttctactttgtttgttagtcttgatgcttactgatagatacaagagccataaagaacct  
cagatccttccgtatttagccagatgttctctagtgtggttcggtgttttgcgtgagccatg  
agaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttgctcctcaaaactggt  
gagctgaatttttgagttaaagcatcggttagtgttttcttagtccggttatgtaggtaggaa  
tctgatgtaatggtgttggttatttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcgg



도면43b

ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcg  
 cttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattgggttcaaaacc  
 cattgggttaagccttttaactcatggttagttattttcaagcattaatgaacttaaatccat  
 caaggctaattctctatatttgccctgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactc  
 ataaatcctcatagagtatttgttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaat  
 ttttttaactggaaaagataaggcaatatctctcactaaaaactaatctaatttttcgcttg  
 agaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaaggattcctgatttc  
 cacagttctcgtcatcagctctctggttgccttagctaatacaccataagcattttccctactg  
 atgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttcctttaggggt  
 tttcaatcgtggtggtttagtagtgccacacagcataaaaattagcttgggttcatgctccgttaa  
 gtcatagcgactaatcgctagttcatttgccttggaaaacaactaattcagacatacatctcaat  
 tgggtcaggtgattttaatacactataccaattgagatgggctagtcgaatgataattactagtcc  
 ttttcttttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttgcctggaaaacttgtaaatc  
 tgctagacctctgtaaaattccgctagaccttgcgtgtttttttgtttatattcaagtgggt  
 ataattttagaataaaagaagaataaaaaagataaaaagaatagatccagccctgtgtata  
 actcactacttttagtcagttccgcagattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctct  
 acaaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctg  
 aatatctcttttgcctccgacctcaggcacctgagtcgctgtcttttctgtagcattcagttc  
 gctgcgctcagggctctggcagtgaaatgggggttaaaaggcactacaggcgcccttttatggattc  
 atgcaaggaaactaccataatacaagaaaagcccgctcacgggcttctcaggggcgttttatggc  
 gggctctgctatgtggtgctatctgacttttgcgtgttcagcagttcctgcctctgattttcca  
 gtctgaccacttcggattatcccgtagcaggtcattcagactggctaatagcaccagtaaggca  
 gcggtatcatcaacaggcttaccgctcttactgtcgggaattcgcggtggccgattcattaatg  
 cagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccgctcgtataatgtgtggaattgtgagc  
 ggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggaactgctcttaac  
 aatttatcagacaatctgtgtgggcaactcgaccggaattatcgattaaactttattataaaaat  
 taaagaggtatataattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttc  
 tcaatttactcagattaccgagcataattcccgctgttccgcaaacctatcagccaaacctgtgg  
 aatttcgaatttctgcaatccctggagaaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcga  
 ccaaaactggaggaaagaagttcgctgcatgatcaacgctgtagacaccagccgctgtccctgct  
 ggagctgatcgagatgtgcagcgccctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaa  
 gccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccg  
 ctctgtctttccgctctgctcgtcagcacgggttctgaggttctcaggatgtttttgagcggtt  
 caaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctg  
 tatgaagcgtcttacctgggtttcaggggtgagaacctgctggaggagcgcgctaccttttcca  
 tccccacctgaagaacaacctgaagaaggcatataaccaaggttgagaacaagttagcca  
 cgccctggaaactgccatataccagcgctctgcaccgctgtggaggcacgttgggttccggataaa  
 tacgaaccgaaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatgg  
 tacagacctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgtggtggaccgagatgggcctggc  
 tagcaaacctggattttgtacgcgaccgctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcg  
 ccagaccgcaagtttgggtgaatgtcgcaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatca  
 tcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtaga  
 gcgctgggagcttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactg  
 tacaacaccggttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaggctataacaacctgtcct



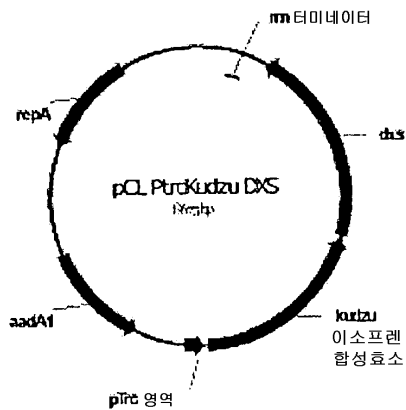
### 도면43c

```

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgggtccaacaa
caaaattatcccggctttctccaagtacctgaaaacgccagcgtttctcctccggtgtagcg
ctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgtgc
gttccctgaccgacttccatgggtctgggtgcttctagctgcgttatcttccgctgtgcaacga
tctggccacctctgctggcgagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatg
cacgaaaacgatggtaccagcgaggaacagcccgcgagaactgcgtaaaactgatcgacgccg
aatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatgga
aatcgagttaaacatggcacgtgtttccactgcacctaccagtatggcgatgggtctgggtcgc
ccagactacgcgactgaaaacccgcatcaaaactgctgctgattgacctttcccgattaccagc
tgatgtatgtctaaactgcacgcttaggaggtaaaaaaaatgactgccgacaacaatagta
tgccccatgggtgcagtatctagttacgccaatttagtgcaaaacaaacacctgaagacatttt
ggaagagtttccctgaaattatccattacaacaaagacctaatcccgatctagtgaagcgtca
aatgacgaaagcggagaaacatgttttctggctatgatgaggagcaaatgaagttaatgaatg
aaaattgtattgttttggattgggacgataatgctattgggtgccgtaccaaagaaagtttgtca
tttaattgaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttattttcaatgaa
caaggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaaaaataactttccctgatctttggacta
acacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattagggttgaagggtgaagctagacga
taagattaaaggcgctattactgcggcggtgagaaaaactagatcatgaattaggtattccagaa
gatgaaactaagacaagggtgaagtttcaactttttaaacagaatccattacatggcaccgaagca
atgaacctgggggtgaacatgaaattgattacatcctattttataagatcaacgctaaagaaaa
cttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttccacaaatgatgtg
aaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttggttttaagattatttgcgagaatt
acttattcaactgggtgggagcaatttagatgaccttctgaagtggaataatgacaggcaaatca
tagaattgctataacgacgcgtcctgcagctggtaccataatgggaattcgaagctttctagaacg
aaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtt
taaacgggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaa
atcagaacgcagaagcgggtctgataaaacagaatttgctggcgagtagcgcggtggtccca
cctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgcgtagcgccgatggtagtgtgggtctcccc
atgcgagagttagggaactgccaggcatcaataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcct
ttcgttttatctgtgtgtgtgctgggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgcccggagcgga
tttgaaagcttgcaagcaacggccggagggtggcgggcaggacgccccaataaactgccagg
catcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttttg
tttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctt
caataat
(SEQ ID NO:54)

```

### 도면44



도면45a

5' -

cccgctcttactgtcgggaattcgcggttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatc  
agggttattgtctcatgagcggatcacatattgaatgtatttagaaaaataacaaaaagagtt  
tgtagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagttt  
atggcggcgctcctgcccgccaccctccggcgcttgcttcgcaacgttcaaaccgctcccgg  
cggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaaaggccagtcct  
ttcgactgagcctttcgtttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagacccc  
acactaccatcgccgctacggcgcttccacttctgagttcgccatggggtcaggtgggaccaccg  
cgctactgccgcccaggcaaatctgttttatcagaccgcttctgcttctgatttaattctgtat  
caggctgaaaaatcttctcatccgcaaaaacagccaagctggagaccgtttaactcaatgat  
gatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctctctgagatgagttttgttctagaaa  
gcttcgaattcccatatggtagcagctgcagttatgccagccaggccttgattttggcttccat  
accagcggcatcgaggccgagttcggcgcgcatttcttctgagttccttgccgaataaagaag  
tcggcgaggccaatgttcagcacgggtactggtttacgatgggcatcagcacttcgttcacgc  
cgctgcctgcgcccataaatggcggtttcttctacggtgaccagcgcttcattggctggcggc  
catttcagaattaacgcttcatcaagcggtttcacaaaacgcataatcgaccagcggtggcggtc  
agcgattcggcgacttcggcgcttctggcatcagcgtaaccaagttaaggatcgccagtttct  
cgccacgacgcttcacaatgcctttgccaattggtagttttccagcggcgctcagttccacgcc  
gaccggttgccacggcggttagcgacccgctgacgggcatcggttatagtgatagccggtatag  
agcatctggcgacattcggtttctatcgctcggggtcataatgacatttccggtatgcagcgca  
ggtaaagagagatcaaaagcacctgatgggtttgaccgtcagcaccacaatgccgcgcggtc  
gatggcgaaacaggaccggaagcttttgaatcgccacgtcatgcagcacctgatcatagggcggt  
tgccaggaaagtggagtaaatcgcgacaatgggtttgtaccaccaatcgccagaccgcagcaa  
aggtcaccgctgttgcctggcaattgccacgtcgaagtgcgatccgggaatttacgtgaaaa  
ctcgaccatgccgaaccttcacgcacgcggagtaatcgccatcagcttgtgtctttcgct  
gccggttcgcacacccagtcgccaagatttttgaatagctcggcaaaccccgctactttctg  
gcaaacaccgctggagggtatcaaattaggcacggcggtggaagtgcaggtcttttctgc  
cggttcataaccacgacctttttggtcatgatgcaggaaactgcgggcttccaggtcgcg  
atgttctttagcgtggtgataagccccagcacatcgtgaccgtccaccgggcccagtgatgattaa  
agcccagctcttcaaacacgtgccaggcactaccatgcctttaatatgttcttcggtgcgttt  
gagcagctctttaattggcggcacgccagagaaaaactttttcccgcttcgcgagtgaaag  
taaagcttacggaaagcagctgtgccagatggttgttgagcgccgacattttcggaatcg  
acatttcatgtcgttgagaatcaccagcatatcaggacggatcgcgccgctgattcatcgc  
ttcaaacgccatgcctgcggttaatcgcgccatcgccaatgacacagacggtgcggcgattttg  
ccttcttttcggcgagcaaccgcaataccaatttcggcactgatggaggttgatgaatgccga  
cgcttaatacgtcatattcgctttcgccgcccacgggaacgggtgcagaccgcttctgacg  
gatggtgccgattttgtcgcgcgctccggtcaaaattttatcgggataagcctgatgccccaca  
tcccaaatcaattggtcaaacggggtgtttagacatagtgacgcccacggtcagttcgaccg  
tgcccagccggaggcggaagtgcggcgtgggaacggctcacgctgtcgagtaaatagcggcgag  
ttcgtcgagagtttcggtaaaactctcttcggcaacagtcgtaactcctgggtggagtcgacc  
agtgcagggtcgggtatttggaatatcaaaactcatgttttttaccctcctaagggcggaatg  
cagttagacatacatcagctggttaatcgggaaagggtcaatcagcagcagtttgatgcggttt  
tcagtcgctgagtcggcgacccagaccatcgccatactggtaggtgcagtgggaaacacgtg  
ccatgttaactcgcatttccatgaacgctttaggcagcagggtggagtcgctaaccggttcacg

도면45b

attcatctttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttctcgtcgtg  
gtaccatcgttttcgtgcatgtagctaataatgataagaattggtagctctcgccacgttccagctccg  
ccgcagaggtggccagatcgttgcacaggcggagataaacgcagctagaacgcaccagaccatg  
gaagtccgtcaggggaacgcagcgtggtcggagatgtcttctcgtcgtggcatcacggaaaag  
taagacggcgccagcagcgtacacccggaggaggaaacgctggcgttttccaggtacttggaga  
aagccgggataaattttgtgttggtgaccatttcgcctcttgcagaaaggcttgcacagttcacg  
ccagcttttctcgtcagataggacaggttgttatgacctttctcttccagaatagaataggacgtg  
tcgttaacgggtgtgtacagtgccaggaaacacagtttcatatagtcggcagggtgttaataag  
cgtaaacgtcccagcgtctacagcatcgtgaaacagttgcagttcgtccagagtgccataaac  
gtcatcacggtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacattttagtaacagcttgcgcacattca  
ccaaactcgggtctggcgccataaccagtgccagaaaataaacttccatcaggcgggtcgcgta  
caaaatccagtttgcgtacccagcccatctcgtccaccagcgggacagatcttgcagctcttt  
ctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgcagctccagcagcagctggtgatgc  
ggttcttctgggttcgtattttatccaggaaacacgtgcctccagacggtgcagacgctggtgat  
atggcagttccagggcgtggctcacttgttctgcacacctgggtattaatgcctcttccaggtt  
gttcttcagggtgggtgatggaaaaggtaacgcctctccagcaggttctcaccctcgaaaccc  
aggtaagacgcttcatacaggtccagcagccttgagcgtcaccttcagttcacgcgtgaaac  
caccttctttatccttgaacgcctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaacgctgctgacgcag  
cagacggaaagacagagcgttgcgtgcaggtcagatttgttcttttgttttgcgtccagcag  
acgatgttttccagggtttaaataatccacaggttggctgatagtttgcggaacgcagggaattatgctcgg  
taatctgagtaaatgagaagaggtcgcacacatggtttattctcctctatttaatcgatacat  
taatatatacctctttaatttttaataataaaggtaatcgataatccgggtcgagtgccacac  
agattgtctgataaatgtttaaagagcagtgccgcttcgctttttctcagcggcgtgtttctc  
gtgtgaaattgttatccgctcacaaatccacacattatacagagccggatgattaatgtcaaca  
gctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagagggccgcaccgatcgccctcccaacagttgc  
gcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcacatctgtgcggtatttc  
acaccgcataatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatgcgcgatagtttaagccagcccgga  
caccgcgaacacccgcgtgacgagcttagtaaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcg  
attacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagccttcatgatatatctccaattt  
gtgtagggttattatgcacgcttaaaaaataaaaaagcagacttgacctgatagtttggctgt  
gagcaattatgtgcttagtgcatcctaacgcttgagttaaagccgcgcggaagcggcgtcggct  
tgaacgaattgttagacattatttgcgactaccttgggtgatctcgctttcacgtagtggaca  
aattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcgatctcttcttgcctcaagataagcctgtc  
tagcttcaagtatgacgggtgatatactggcgccgagggcctccattgcccagtcggcagcgac  
atccttcggcgcgattttgcccgttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactaca  
tttcgctcatcgccagccagtcggcgcgaggttccatagcgttaagggttcatttagcgct  
caaatagatcctgttcaggaaacggatcaaagagttcctccgcccgtggacctaccaagggcaac  
gctatgttctcttgccttttgcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaag  
atacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataac  
gccacgggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctc  
tccaggggaagccgaagtttccaaaaggctcgttgatcaaagctcgccgcttgtttcatcaagc

# 도면45c

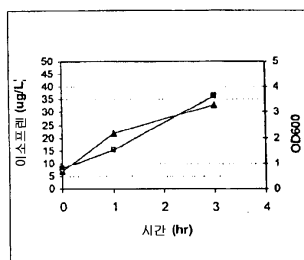
cttacgggtcacgcgaataacagcaaatcaatatcactgtgtgggttcaggccgccatccactgcgg  
agccgtacaaatgtacggccagcaacgtcgggttcgagatggcgctcgatgacgccaaactacctc  
tgatagttgagtcgatacttcggcgatcacccgttcctcatgatgtttaactttgttttaggg  
cgactgccctgctgcgtaacatcggttgcgtccataacatcaaacatcgacccacggcgtaac  
gcgcttgcgtcgttgatgccgagggcatagactgtaccccaaaaaacagtcataacaagccat  
gaaaaccgccactgcgcggttaccccgctgcgttcgggtcaaggttctggaccagttgcgtgag  
cgcatacgctacttgcatcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgcct  
tcatccgtttccacgggtgcgtcacccggcaacettgggcagcagcgaagtcgaggcatttct  
gtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcgggtccacgcgcatcgtcaggcattggcgccctg  
ctgttctctacggcaaggtgctgtgcacggatctgcctggcttcaggagatcggaagacctc  
ggcgtgcggcgcttgccgggtggtgctgaccccgatgaagtggttcgcacctcctcggttttct  
ggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatcggtatcagtgagggt  
ttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgcatcgtgcgggagggcaagg  
gctccaaggatcgggccttgatgttaccgagagcttggaacccagcctgcgcgagcaggggaa  
ttaattcccacgggttttgctgcccgcgaacgggctgttctgggtgtgctagtttgttatcaga  
atcgagatccgggttcagccggtttgcgggtgaaagcgctatttctccagaattgccatga  
ttttttcccaacgggagggcgctcactggctcccggtgtgtcggcagctttgattcgataagcagc  
atcgctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtacaaagttgtctcaggtgttcaa  
tttcagttctagtgtctgttttactgggttcacctgttctattaggtgttacatgctgttc  
atcgtttacattgctgactgttcgtggaacagctttgaaatgcacaaaaactcgtaaaagc  
tctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgcataatggacagttttccctttgata  
tgtaacggtgaacagttgttctactttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaag  
agccataagaacccctcagatcctccgctatttagccagtaatgttctcagtggttcggtgttt  
ttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttt  
gcctcaaaaactggtagctgaatttttgagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgt  
tatgtaggtaggaatctgatgtaatggtgtgtgtattttgtcaccattcattttatctgggt  
gttctcaagttcgggttacgagatccatttgtctatctagtccaacttggaatacaacgtatca  
gtcggggcgccctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtggttaaatctttactta  
ttgggttcaaaaaccatgggttaagccttttaaacctcatggtagtattttcagcatttaacat  
gaacttaaatcatcaaggctaattctctatatttgccttgtagttttctttgtgttagttct  
tttaataaacctcataaaatcctcatagagtatttgtttcaaaaagacttaacatgttccagat  
tatattttatgaatttttttaactggaagaataaggcaatatctctcactaaaaactaatc  
taatttttgccttgagaacttgcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaa  
ggattcctgatttccacagtttctcgtcatcagctctcgtgtgtttagctaatcacccataag  
cattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattgggtataagtgaacgataccgtccgttc  
ttccttgtaggggtttcaatcgtgggttgagtagtgcacacagcataaaattagcttggtt  
tcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgtagtctatttgccttgaaaacaactaatcag  
acatacatctcaattgggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatg  
ataattactagtccttttcccttgagttgtgggtatctgtaaatctgctagacctttgctgga  
aaacttgtaaatctgctagacctctgtaattccgctagacctttgtgtgtttttttgttt  
atatcgaagtgggtataaatttatagaataaagaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcc  
cagccctgtgtataactcactacttttagtcagttccgcagttattacaaaaggatgtcgcaaacg  
ctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaacctaaaggcttaagtgcacacctcgcaagct  
cgggcaaatcgtcgaatattccttttgtctccgacctcaggcacctgagtcgctgtcttttc

# 도면45d

Gtgacattcagttcgtgcgctcacggctctggcagtgaaatgggggtaaatggcactacaggcg  
ccttttatggattcatgcaaggaaactaccataatacaagaaaagcccgtaacgggtctctca  
ggcggttttatggcggtgctgctatgtggtgctatctgactttttgctgtcagcagttcctgc  
cctcgtattttcagctctgaccacttcggattatcccgtagacaggtcoattcagactggctaag  
caccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta  
(SEQ ID NO:55)

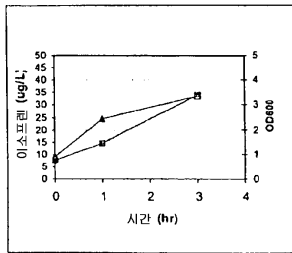
# 도면46a

A.



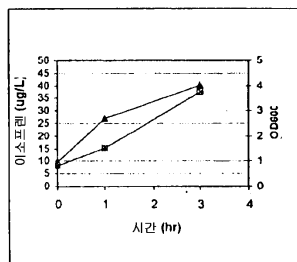
도면46b

B.



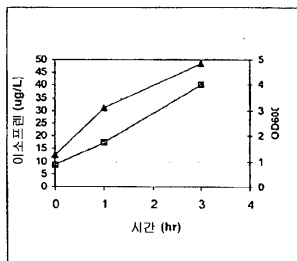
도면46c

C.



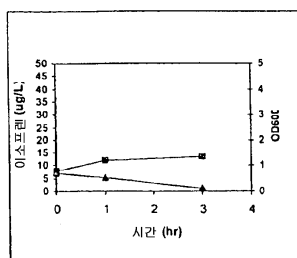
도면46d

D.

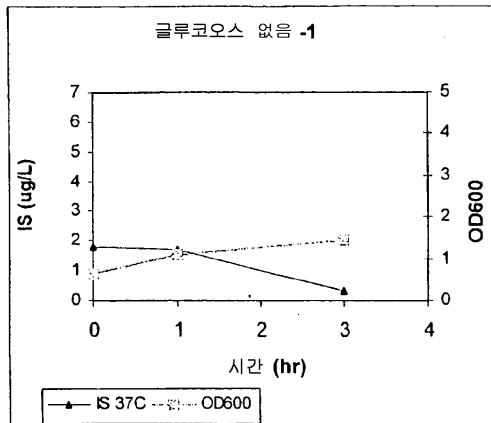


도면46e

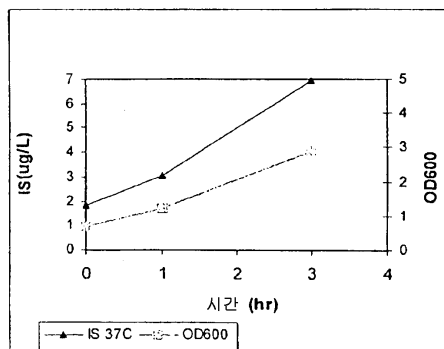
E.



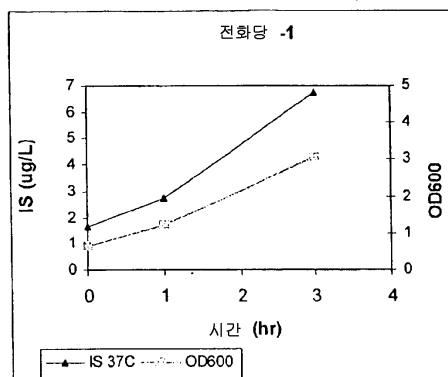
도면47a



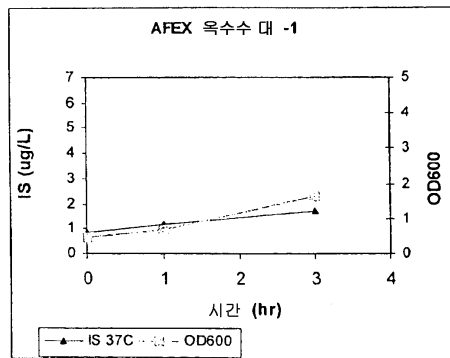
도면47b



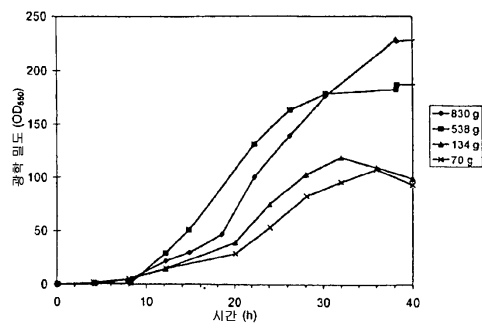
도면47c



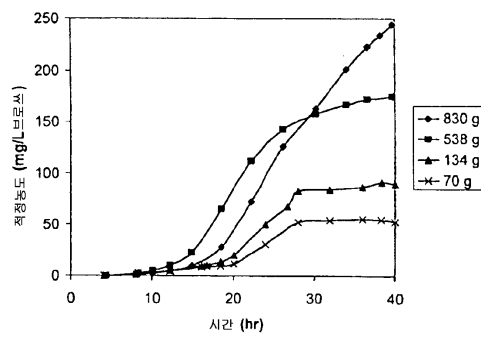
도면47d



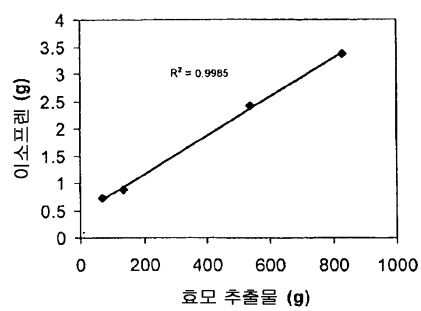
도면48a



도면48b

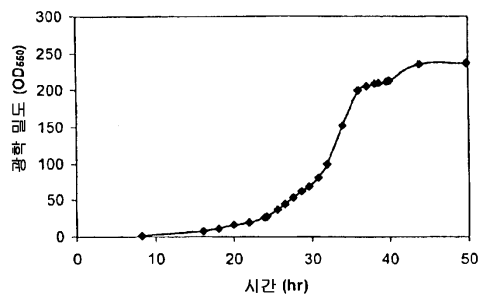


도면48c

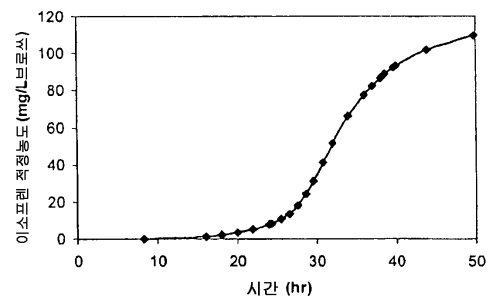




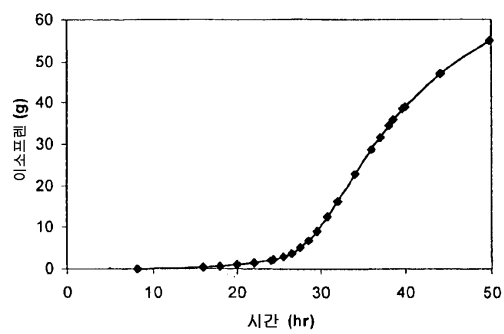
도면49a



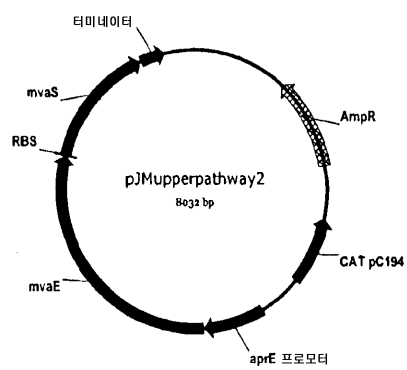
도면49b



도면49c



도면50



도면51a

5' -  
tcgctgcgctcggtcggttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaagggcggtaatacggg  
tatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaagggccagcaaaagggccag  
gaaccgtaaaaagggccgcttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcac  
aaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccgcagggactataaagataccagggcgtttc  
ccccggaaagctccctcgctgcgctctcctgttccgaccctgccgcttacccggataccgtgcgc  
ctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtagggtatctcagttcgggtg  
taggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgacgctgcgcct  
tatccggtaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc  
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtgg  
cctaactacgggtacactagaagaacagttatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacct  
tcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacacacccgctggtagcgggtggttttt  
tggttgcaagcagcagattacggcgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttct  
acgggggtcagcgtcagtggaacgaaaaactcacgttaagggtatttggtcatgagattatcaa  
aaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagttttaaatcaatctaaagtataata  
tgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgt  
ctatttcgttcacccatagttgctgactcccgctcgtgtagataaactacgatacgggagggct  
taccatctggccccagtgctgcaatgataccgagacccacgctcaccggctccagattatc  
agcaataaacagccagccgggaagggccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttatccgcctcc  
atccaggtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagtttaagtttgccca  
acgttggttgccattgctacagggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcag  
ctccgggttcccaacgatacagggcaggttacatgatcccccatggttgcaaaaaagcgggttagc  
tccttcgggtcctccgactcgttgctcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatgg  
cagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagta  
ctcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgccggcgctcaata  
cgggataaataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaaagcttcttcgg  
ggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaacccactcgtgcacc  
caactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaa  
aatgccgcaaaaaagggataaagggcgacacggaaatgttgaataactcatactcttctcttttc  
aatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcgggatacatatttgaatgtattta  
gaaaaataaacaataggggttcggcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaa  
accattattatcatgacattaaactataaaaaataggcgtatcacgagggccctttcgtctcgcg  
gtttcgggtgatgacgggtgaaaaacctctgacacatgcagctccgggagacgggtcacagcttgtct  
gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtagggcgcgtagcgggtgttgccgggtgtcgg  
ggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcccatagatctggagctg  
taataaaaaaaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaaccgactgtaaaaa  
gtacagtcggcattatctcatattataaaaagccagtcatttaggcctatctgacaattcctgaat  
agagttcataaacaatcctgcatgataaacctcacaaacagaatgatgtacctgtaaaagtagc  
ggtaaatatattgaattacctttatgaatgaattttctgctgtaataatgggtagaaggtaat  
tactattattattgatatttaagttaaacccagtaaatgaagtcctggaataatagaaagaga  
aaaagcattttcaggtataggtgttttggaacaatttccccgaaccattatatttctctaca  
tcagaaagggtataaatcataaaaactcttgaaagtcattctttacaggagtcacaaataccagaga  
atgttttagataacacatcaaaaattgtataaagtggtctaaacttatcccaataacctaactc  
ccgtcgctattgtaaccagttctaaaagctgtatttgagtttatccacctgtcactaagaaa  
ataaatgcagggtaaaaatttatatccttctgttttatgtttc

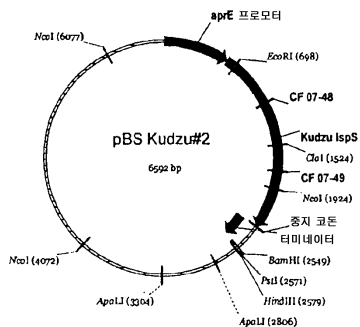
도면51b

ggataaaacactaatatcaatttctgtggttataactaaaagtcgtttgttgggtcaaataatg  
 attaaatatctcttctcttccaattgtctaaatcaattttattaaagttcatttgatatgcc  
 tcctaaattttatctaaagtgaatttaggaggttacttgtctgcttcttccattagaatcaa  
 tccttttttaaagtcgaattactgtacataaataatataattttaaaaatatccactttatc  
 caattttcgtttgttgaactaatgggtgcttttagttgaagaataaaagacctatgagggtgaa  
 ataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgca  
 actgttgggaaggcgatcggtgcgggctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatg  
 tgctgcaaggcgattaaagtgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgacg  
 gccagtgccaagcttgcatgctgcactccatttcttctgctatcaaaataacagactcgtga  
 ttttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgccccttgcaaatcggatgcctgtctataaaatt  
 cccgatatgtgttaaacagcgccgcaatggcgccgcatctgagtctttgcttggcgaaatgtt  
 catcttatcttctccctctcaataatttttcatctatcccttttctgtaaagtttattt  
 ttcagaatacttttatcatcatgctttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacgga  
 agcacacgcagggtcatttgaacgaatttttgcagaggaaatttgccgggactcaggagcattta  
 acctaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctattttcgttcttcttct  
 gtagaaaaatagttatttcgagttctctacggaatagcgagagatgataacctaaatagagat  
 aaaaatcatctcaaaaaatgggtctactaaaaatatttccatctattacaataaattcacaga  
 atagtcttttaagtaagtcactctgaattttttaaaggagagggtaaaagagtgaataacagt  
 agttattatgatgcattacgaacaccaattggaaaaatataaaggcagcttaagtaagtaag  
 gccgtagacttaggaacacatgttacaacacacacttttaaaagacattccactatttctgaag  
 aaattgatcaagtaattcttggaaatgtttacaagctggaaatggccaaaatcccgacagaca  
 aatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgaagggttaatgaggtctgcgga  
 tcaggaatgaaggccgttatgttgccgaaacaattgatcaattaggagaagcggaagtttaa  
 ttgctgcggggattgagaatatgtccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaacaga  
 aagctacgatgcgccttttctagtatgatgatgatggattaaaggatgcctttagtgtcag  
 gcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaagatc  
 aattttctgtacattcacaaatataaaagcagctcaagcacaaagcagaagggaatttcgctgacga  
 aatagccccattagaagatcaggaacgcttggtggagaaagatgaagggttcgcctaatcgc  
 agcgttgagaagctaggaacgcttaaaacagtttttaagaagacgggtactgtaacagcaggga  
 atgcatcaaccattaatgatgggcttctgctttgatattgcttcacaagaatatgccgaagc  
 acacggctcttcttatttagctattatcagagacagtggtgaagtcggtattgatccagcctat  
 atgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacggaag  
 aaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgacgcaactcaatcgtggtccaaagagaact  
 ggctttaccagaggaaggtcaacatttatggtggcggtatttcattaggtcatgcatgtgtg  
 gccacaggtgctcgtttattaaacaggtttaaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatg  
 gagtggcttctttagtatcgcggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcagca  
 aaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaacgcctggcttcttctttaatgaa  
 ggccagattttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaaatcggctttatcttcgcagattgcca  
 atcatatgattgaaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatggcggttggtttacatttaac  
 agtggacgaaactgatttttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggtttg  
 agtaatggtgcaaaaatagcacaaaggattttaaacagtgaaatcaacaacgcttaatgctggac  
 aaatcgtttttacgatgttgacagatcccgagtcatttgattgataaaactacaagtaagagaagc  
 ggaagttttcaacaagcagagttaagttatccatctatcgttaaacggggcgcggttaaga  
 gatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgatctgtcgacttttagtagatgttaagg  
 atgcaatgggggcaaatatcgttaacgctatgttggaaggtgtg

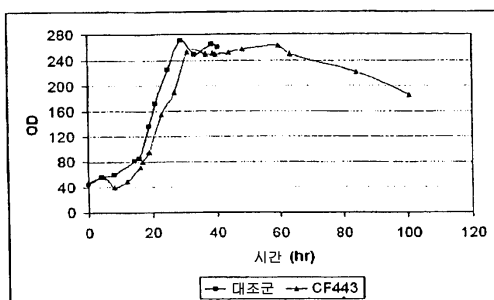
## 도면51c

gccgagttgttccgtgaatgggttgcggagcaaaagattttattcagtatTTtaagtaattatg  
ccacggagtcggttggttacgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaaggggagcaa  
tgcccgggaaatttgctgaaaaaattgttttagcttccagctatgcttcattagatccttatcgg  
gcagtcacgcataaacaagggaatcatgaatggcattgaagctgtagtttttagctacaggaaatg  
atacacgcgctgttagcgcttctgtcatgcttttgcgggaaggaaggtcgctaccaaggctt  
gactagttggacgctggatggcgaacaactaattgggtgaaatttcagttccgcttgcttttagcc  
acggttggcgggtgccacaaaagtcttacctaaatctcaagcagctgctgatttggtagcagtga  
cggatgcaaaagaactaagtcgagtagtagcggtgttggttggcacaaaatttagcgcggtt  
acgggccttagctctgaaggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcagcttcttttagcg  
atgacggctcggagctactggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaa  
cgatgaaccaagaccgagccatggctattttaaatgatttaagaaaacaataaaaggagaggggt  
gacaattgggatttgataaaattagttttttgtgcccccttattatattgatatgacggcactg  
gctgaagccagaaatgtagacctggaaaatttcattatgggtattgggcaagaccaatggcggt  
tgaccccaattcagccaaagtattgtgacatttgacgcaatgccgcagaagcgatcttgaccaa  
agaagataaaggagccattgatattggtgattgtcgggactgagtcagatcgatgagtcacaaa  
gcgccgcagctgtcttacatcgtttaattggggattcaacctttcgctcgctctttcgaaatca  
aggaagcttgggttacgggagcaacagcaggcttacagtttagctaagaatcacgtagccttacatcc  
agataaaaaagctcttggctgtagcggcagatattgcaaaaataggcttaaatctctggcggtgag  
cctacacaaggagctggggcggttgcaatgttagttgcttagtgaaaccgcgcattttggttttaa  
aaggagataatgtgatgctgacgcaagatatctatgacttttgcggtccaacaggccaccgta  
tcctatggtcgatggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatctttgccaagtctgggat  
gaacataaaaaacgaaccggtcttgattttgcagattatgatgcttttagcgttccatattcctt  
acacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacagga  
acgaatttttagccgcttatgaagaaagtatcgtctatagtcgctcgctaggaaacttgtatagc  
gggtcactttatctgggactcatttcccttttagaaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatc  
aaattgggtttattcagtttatgggtctgctgctgaatttttactggtgaatttagtagc  
tggttatcaaaatcatttacaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaactt  
tctatcgctgaatatgaagccatgtttgcagaaacttagacacagacattgatcaaacggttag  
aagatgaattaaaatatagttatttctgctatttaataataccggttcggttcttatcgaaactaaaa  
aaaaccggccttgccccgcgggtttttattattttcttctccgcatgttcaatccgctcc  
ataatcgacggatgggtcctctgaaaattttaacgagaaacggcggttgaccgggtcagtc  
ccgtaacgggccaaagtccgaaacgctcctcaatcgccgcttcccggttccggtcagctcaatgcc  
gtaacggctcggcggttttctgataccgggagacggcatcgtaatcgggatccccgggtac  
cgagctcgaattcgtaatcatgtcatagctgttccctggtgaaattgttatccgctcacaatt  
ccacacaacatacagcggcggagcacaagtgtaaacgctggggtgcctaatgagtgagctaac  
tcacattaatcggttgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgca  
ttaatgaatcggccaacgcgggggagagcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttccctg  
ctcactgac  
(SEQ ID NO:56)

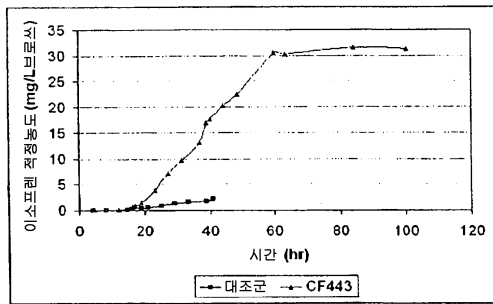
## 도면52



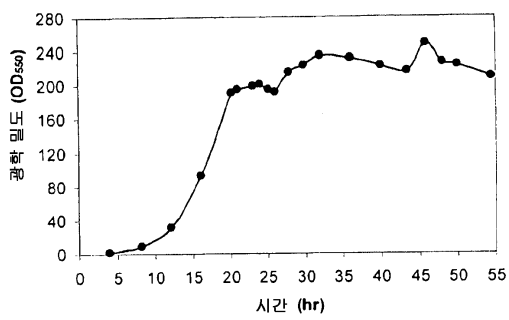
## 도면53a



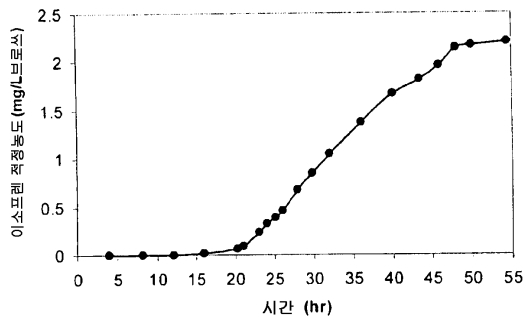
도면53b



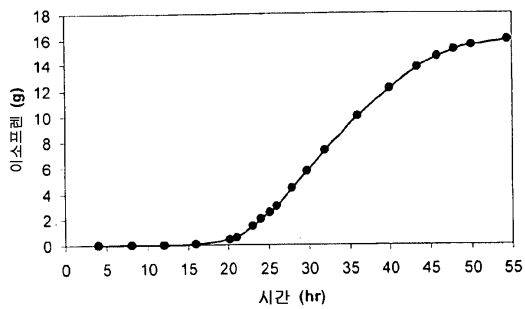
도면54



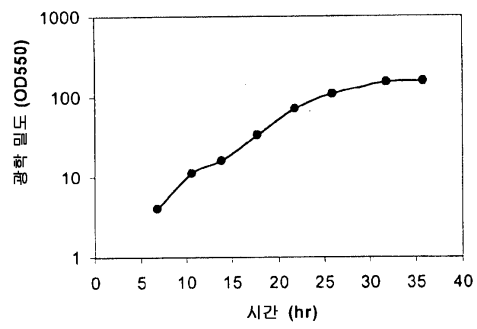
도면55



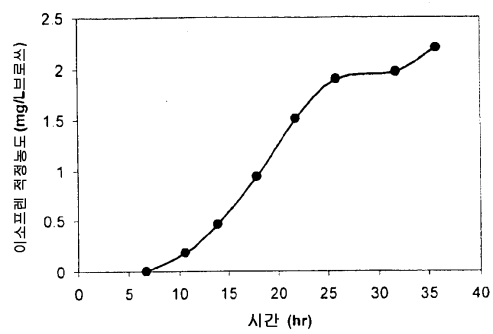
도면56



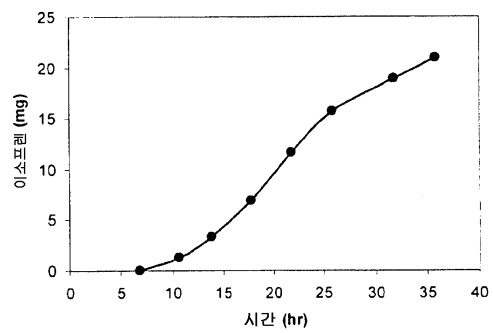
도면57



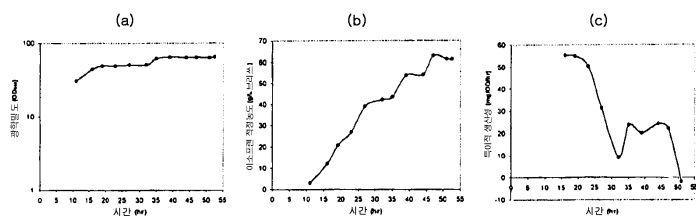
도면58



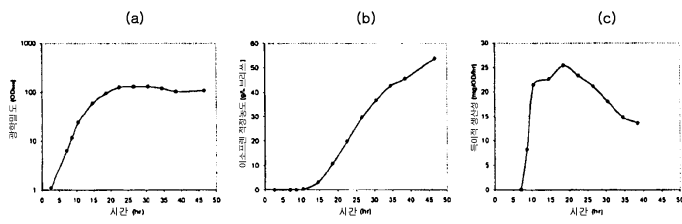
도면59



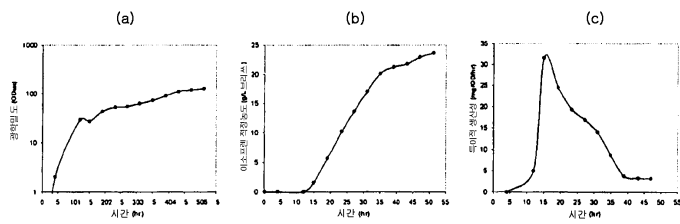
도면60



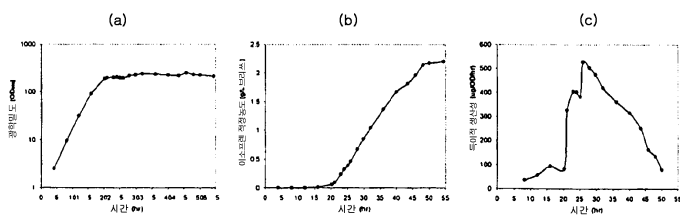
도면61



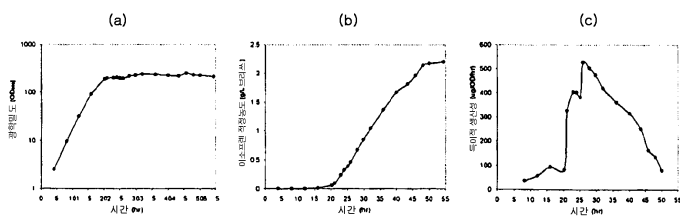
도면62



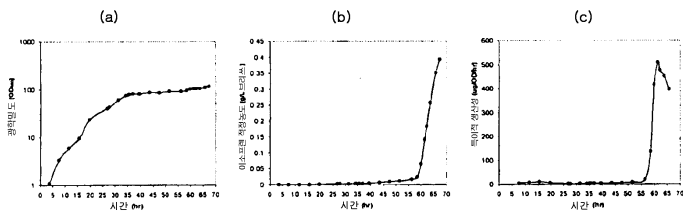
도면63



도면64

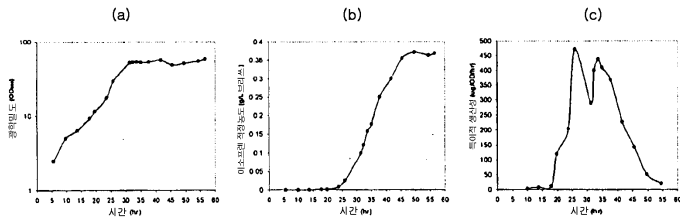


도면65

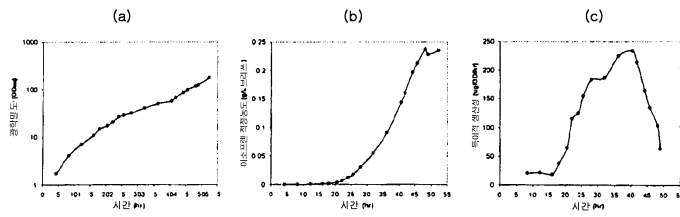




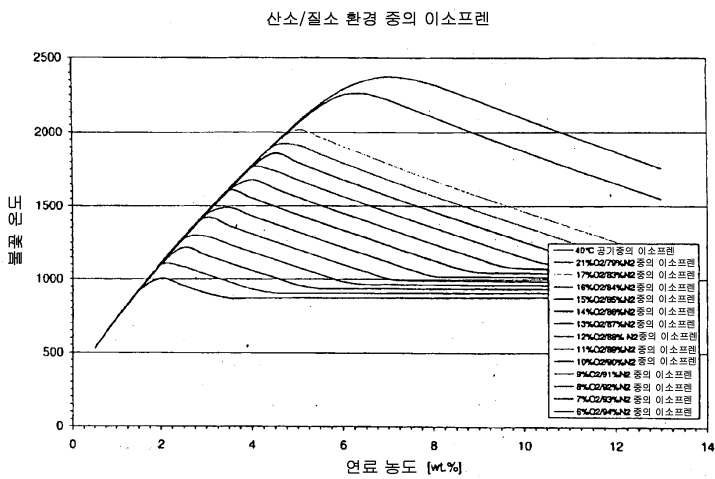
도면66



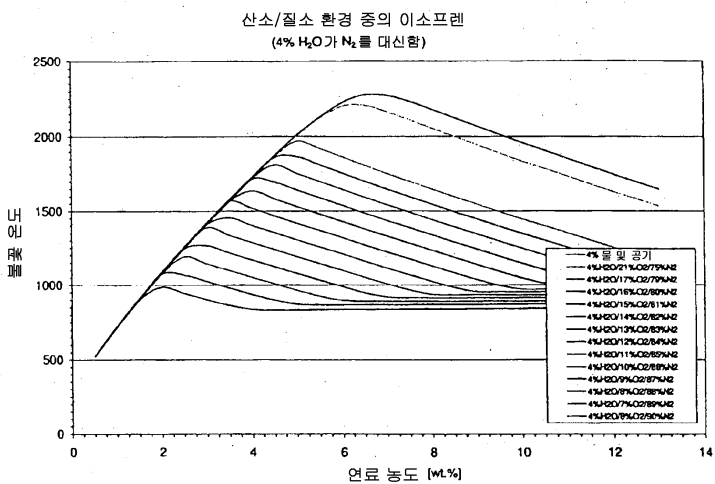
도면67



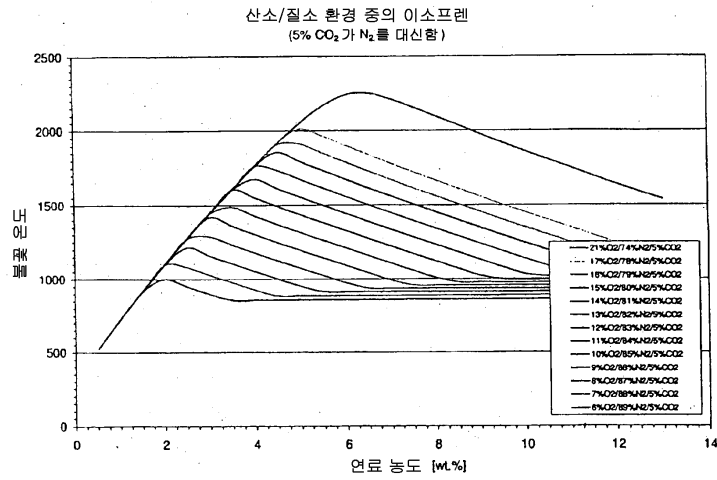
도면68



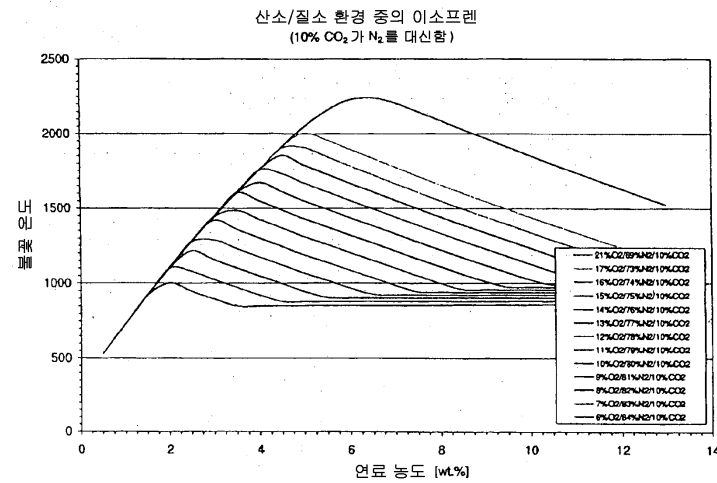
도면69



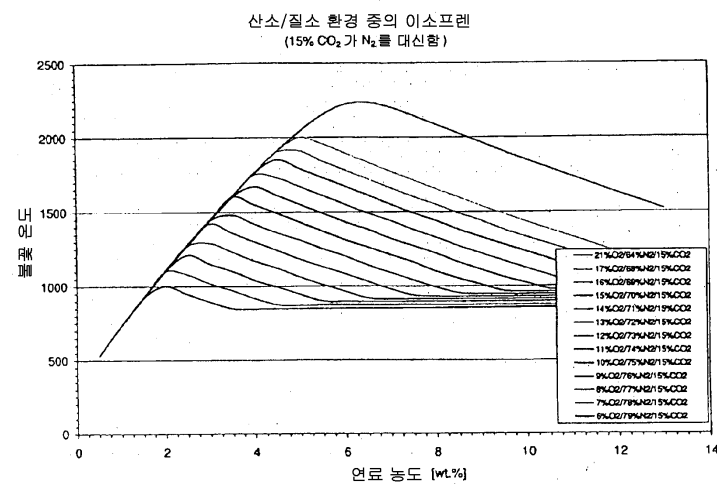
도면70



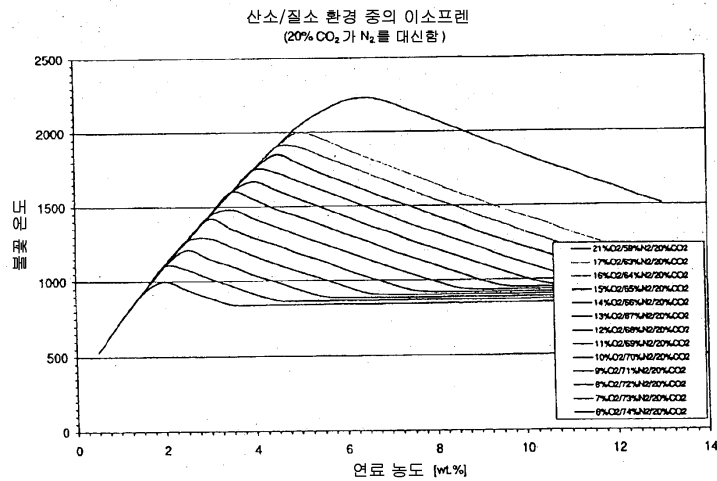
도면71



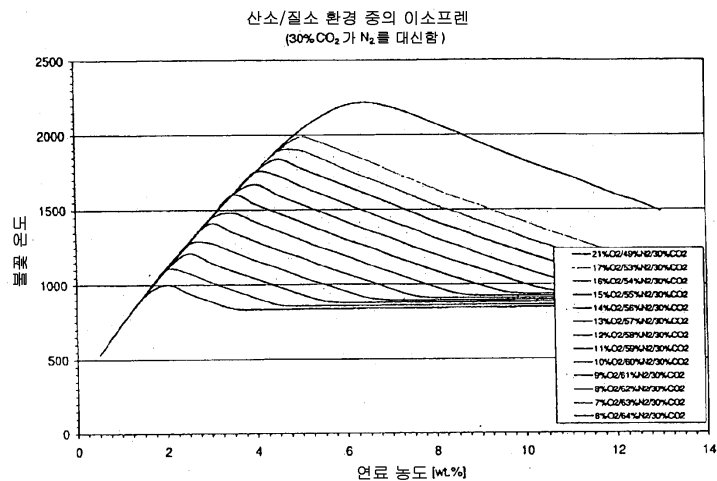
도면72



도면73



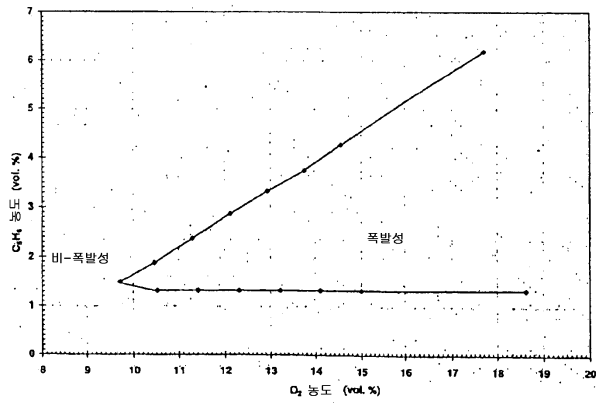
도면74



도면75a

폭연시 농도														
연료 구성		산화제 구성			샘플 100g에 대한 몰 농도									
연료 농도 (wt.%)	산화제 농도 (wt.%)	이소프렌 (wt.%)	H <sub>2</sub> O (wt.%)	O <sub>2</sub> (wt.%)	N <sub>2</sub> (wt.%)	이소프렌 (mole)	H <sub>2</sub> O (mole)	O <sub>2</sub> (mole)	N <sub>2</sub> (mole)	전체 (mole)	이소프렌 (wt.%)	O <sub>2</sub> (wt.%)	N <sub>2</sub> (wt.%)	H <sub>2</sub> O (wt.%)
3.10	96.90	100	0	12	88	4.56	0.00	36.34	304.54	345.44	1.32	10.52	88.16	0.00
3.10	96.90	100	0	13	87	4.56	0.00	39.37	301.08	345.01	1.32	11.41	87.27	0.00
3.10	96.90	100	0	14	86	4.56	0.00	42.39	297.62	344.57	1.32	12.30	86.37	0.00
3.10	96.90	100	0	15	85	4.56	0.00	45.42	294.16	344.14	1.32	13.20	85.48	0.00
3.10	96.90	100	0	16	84	4.56	0.00	48.45	290.70	343.71	1.33	14.10	84.58	0.00
3.10	96.90	100	0	17	83	4.56	0.00	51.48	287.24	343.28	1.33	15.00	83.68	0.00
3.10	96.90	100	0	21	79	4.56	0.00	63.59	273.40	341.55	1.33	18.62	80.05	0.00
3.50	96.50	100	0	11.1	88.9	5.15	0.00	33.47	306.39	345.01	1.49	9.70	88.81	0.00
4.40	95.60	100	0	12	88	6.47	0.00	35.85	300.46	342.78	1.89	10.46	87.65	0.00
5.50	94.50	100	0	13	87	8.09	0.00	38.39	293.63	340.10	2.38	11.29	86.33	0.00
6.60	93.40	100	0	14	86	9.71	0.00	40.86	286.87	337.44	2.88	12.11	85.01	0.00
7.60	92.40	100	0	15	85	11.18	0.00	43.31	280.50	334.99	3.34	12.93	83.73	0.00
8.50	91.50	100	0	16	84	12.50	0.00	45.75	274.50	332.75	3.76	13.75	82.49	0.00
9.60	90.40	100	0	17	83	14.12	0.00	48.03	267.97	330.11	4.28	14.55	81.18	0.00
13.50	86.50	100	0	21	79	19.85	0.00	56.77	244.05	320.67	6.19	17.70	76.11	0.00

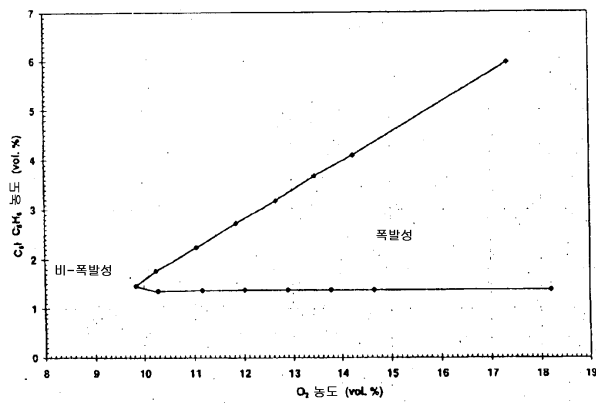
도면75b



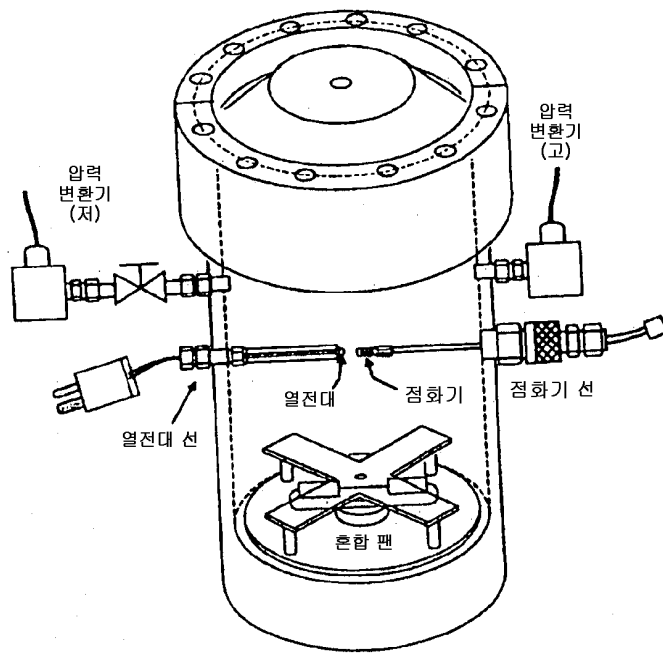
도면76a

폭발성 농도															
		연료 구성	산화제 구성			샘플 100g에 대한 몰 농도					이상기체 법칙에 근거한 체적 농도				
연료 농도	산화제 농도	이소프렌	H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	이소프렌	H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	전체	이소프렌	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	
(wt. %)	(wt. %)	(wt. %)	(wt. %)	(wt. %)	(wt. %)	(mole)	(mole)	(mole)	(mole)	(mole)	(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)	
3.252	96.748	100	4	12	84	4.78	21.50	36.28	290.24	352.81	1.36	10.28	82.27	6.09	
3.274	96.726	100	4	13	83	4.81	21.49	39.29	286.72	352.33	1.37	11.15	81.38	6.10	
3.290	96.710	100	4	14	82	4.84	21.49	42.31	283.22	351.86	1.38	12.02	80.49	6.11	
3.288	96.712	100	4	15	81	4.84	21.49	45.33	279.77	351.43	1.38	12.90	79.61	6.12	
3.286	96.714	100	4	16	80	4.83	21.49	48.36	276.33	351.01	1.38	13.78	78.72	6.12	
3.284	96.716	100	4	17	79	4.83	21.49	51.38	272.88	350.58	1.38	14.66	77.84	6.13	
3.276	96.724	100	4	21	75	4.82	21.49	63.48	259.08	348.87	1.38	18.19	74.26	6.16	
3.500	96.500	100	4	11.5	84.5	5.15	21.44	34.68	291.22	352.49	1.46	9.84	82.62	6.08	
4.200	95.800	100	4	12	84	6.18	21.29	35.93	287.40	350.79	1.76	10.24	81.93	6.07	
5.300	94.700	100	4	13	83	7.79	21.04	38.47	280.72	348.03	2.24	11.05	80.66	6.05	
6.400	93.600	100	4	14	82	9.41	20.80	40.95	274.11	345.28	2.73	11.86	79.39	6.02	
7.400	92.600	100	4	15	81	10.88	20.58	43.41	267.88	342.74	3.18	12.66	78.16	6.00	
8.500	91.500	100	4	16	80	12.50	20.33	45.75	261.43	340.01	3.68	13.46	76.89	5.98	
9.400	90.600	100	4	17	79	13.82	20.13	48.13	255.62	337.71	4.09	14.25	75.69	5.96	
13.300	86.700	100	4	21	75	19.56	19.27	56.90	232.23	327.95	5.96	17.35	70.81	5.87	

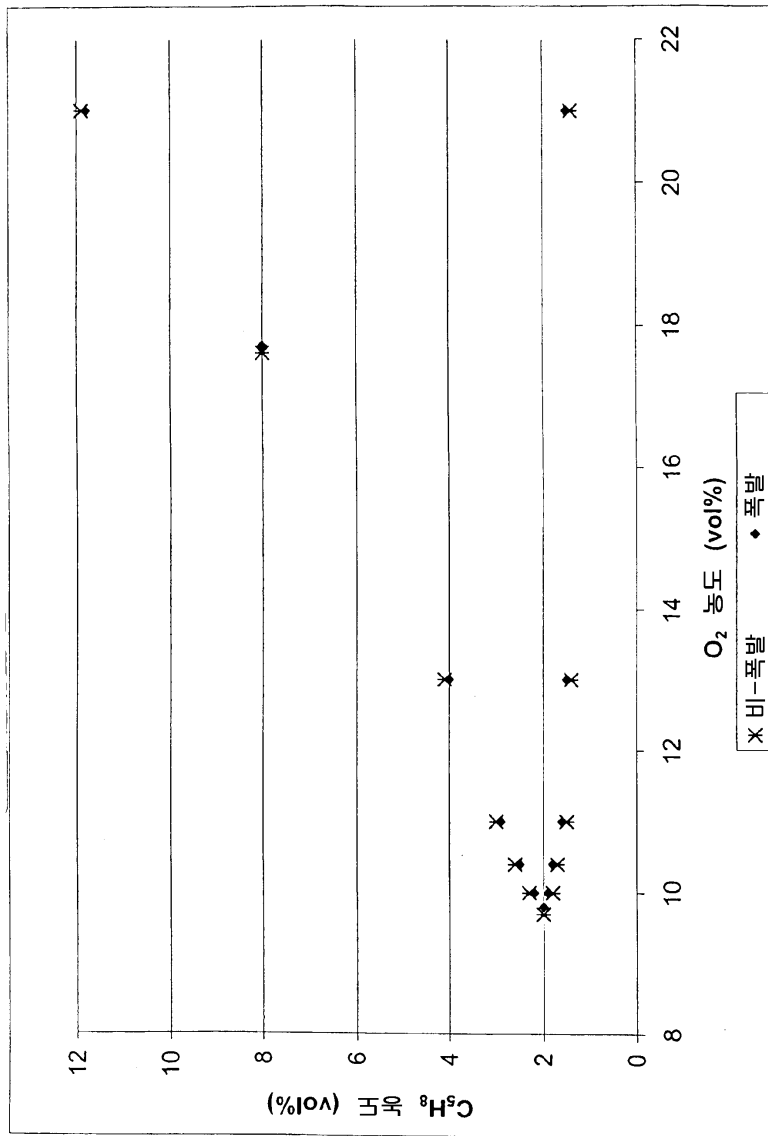
도면76b



도면77



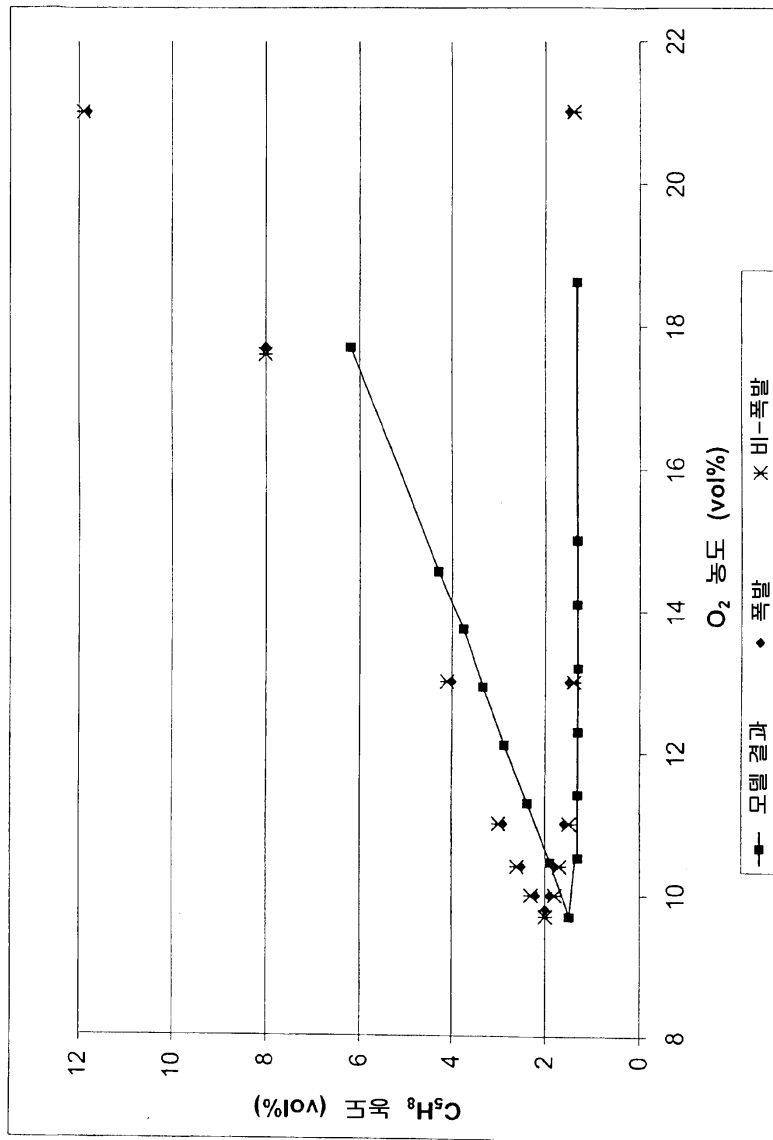
도면78a



도면78b

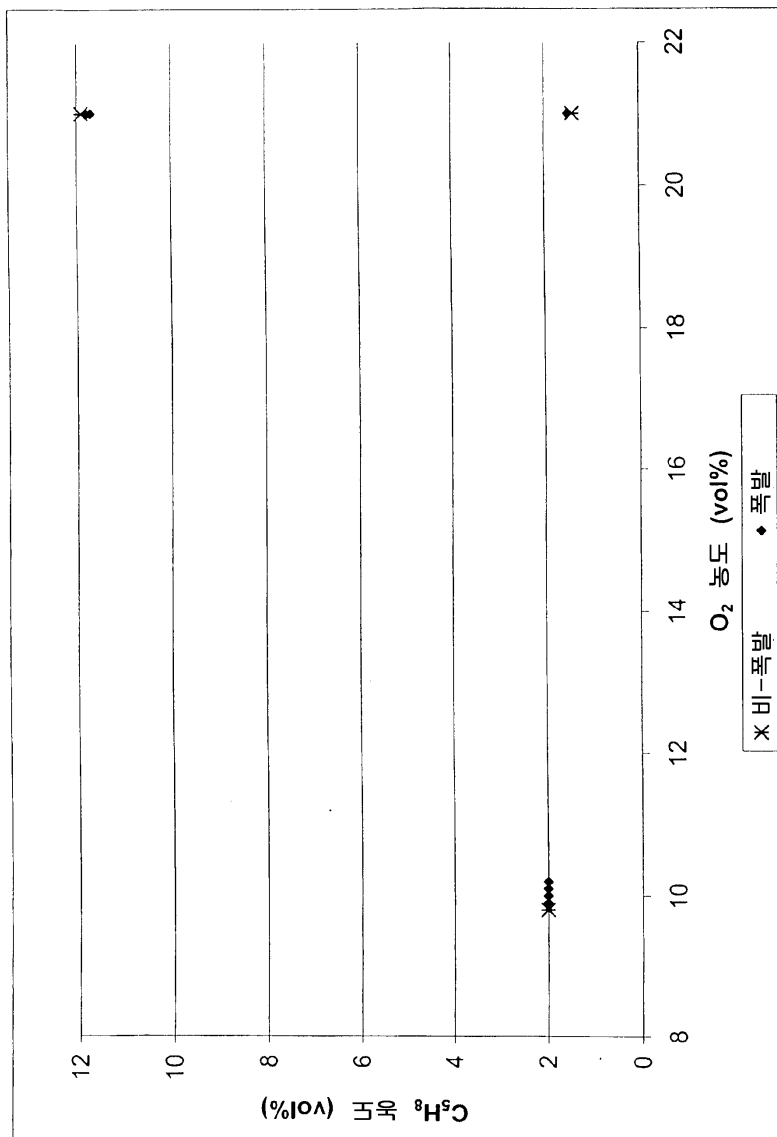
폭발		비폭발	
$O_2$ 농도 (vol. %)	$C_5H_8$ 농도 (vol. %)	$O_2$ 농도 (vol. %)	$C_5H_8$ 농도 (vol. %)
21.0	1.5	21.0	1.4
13.0	1.5	13.0	1.4
11.0	1.6	11.0	1.5
10.4	1.8	10.4	1.7
10.0	1.9	10.0	1.8
9.8	2	9.7	2
10.0	2.2	10.0	2.3
10.4	2.5	10.4	2.6
11.0	2.9	11.0	3.0
13.0	4.0	13.0	4.1
17.7	8.0	17.6	8.0
21.0	11.8	21.0	11.9

도면78c





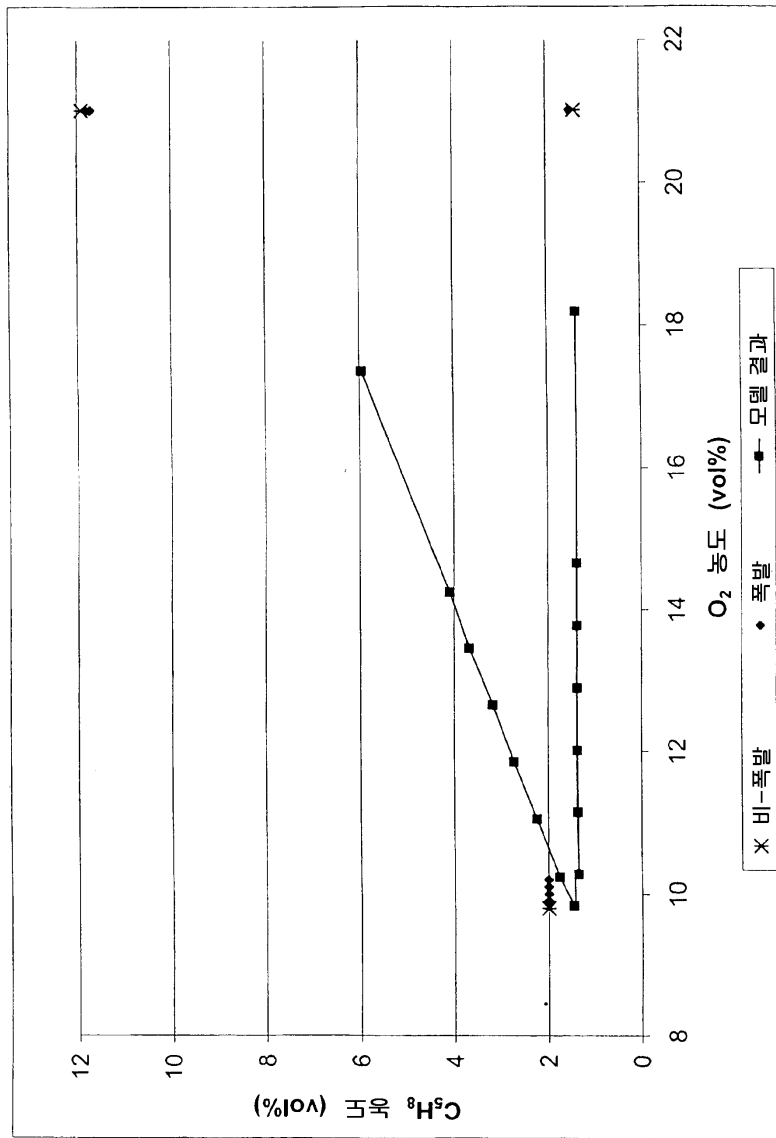
도면79a



도면79b

폭발		비폭발	
O <sub>2</sub> 농도 (vol. %)	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> 농도 (vol. %)	O <sub>2</sub> 농도 (vol. %)	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> 농도 (vol. %)
21.0	11.7	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	1.5	21.0	1.4
21.0	1.5	21.0	1.4
10.2	2.0	21.0	1.4
10.1	2.0	9.8	2.0
10.0	2.0	9.8	2.0
9.9	2.0	9.8	2.0

도면79c



도면80a

시험 시리즈 1

시험	데이터 파일명	온도 ℃	초기압 bara	부분압			농도			결과	Pex bara
				C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> mbar	N <sub>2</sub> mbar	O <sub>2</sub> mbar	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> vol. %	N <sub>2</sub> vol. %	O <sub>2</sub> vol. %		
1	T11120700	40	1.012	12	787	213	1.2	77.8	21.0	비-폭발	1.05
2	T11120701	40	1.016	16	787	213	1.6	77.5	21.0	폭발	5.5
3	T11120702	40	1.015	14	788	213	1.4	77.6	21.0	비-폭발	<1.02
4	T11120703	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	비-폭발	<1.02
5	T11120704	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	폭발	4.31
6	T11120705	40	1.017	18	785	214	1.8	77.2	21.0	폭발	5.47
7	T11120706	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	폭발	4.51
8	T11120707	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	비-폭발	<1.02
9	T11120708	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	비-폭발	1.05
10	T11120709	40	1.015	102	700	213	10.0	69.0	21.0	폭발	1.45
11	T11120710	40	1.014	102	699	213	10.1	68.9	21.0	폭발	1.39
12	T11120711	40	1.014	106	695	213	10.5	68.5	21.0	폭발	1.34
13	T11120712	40	1.014	113	688	213	11.1	67.9	21.0	폭발	1.29
14	T11120713	40	1.014	122	679	213	12.0	67.0	21.0	비-폭발	<1.02
15	T11120714	40	1.014	117	684	213	11.5	67.5	21.0	폭발	1.32
16	T11120715	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	비-폭발	1.08
17	T11130700	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	폭발	1.09
18	T11130701	40	1.014	121	680	213	11.9	67.1	21.0	비-폭발	1.07
19	T11130702	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	비-폭발	1.06
20	T11130703	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	비-폭발	1.07
21	T11130704	40	1.015	30	853	132	3.0	84.0	13.0	폭발	1.61
22	T11130705	40	1.014	36	846	132	3.6	83.4	13.0	폭발	1.28
23	T11130706	40	1.014	39	843	132	3.8	83.1	13.0	폭발	1.12
24	T11130707	40	1.015	41	842	132	4.0	83.0	13.0	폭발	1.09
25	T11130708	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0	비-폭발	1.06
26	T11130709	40	1.015	42	841	132	4.1	82.9	13.0	비-폭발	1.06
27	T11130710	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0	비-폭발	1.05
28	T11130711	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0	비-폭발	1.03
29	T11130712	40	1.014	16	866	132	1.6	85.4	13.0	폭발	4.81
30	T11130713	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0	폭발	4
31	T11130714	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	비-폭발	1.03
32	T11130715	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	비-폭발	<1.02
33	T11130716	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	비-폭발	1.03
34	T11130717	40	1.015	20	883	112	2.0	87.0	11.0	폭발	1.7
35	T11130718	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	비-폭발	1.08
36	T11130719	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	비-폭발	1.08
37	T11130720	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	폭발	1.13
38	T11130721	40	1.015	29	874	112	2.9	86.1	11.0	비-폭발	1.08
39	T11130722	40	1.014	29	873	112	2.9	86.1	11.0	폭발	1.1

도면80b

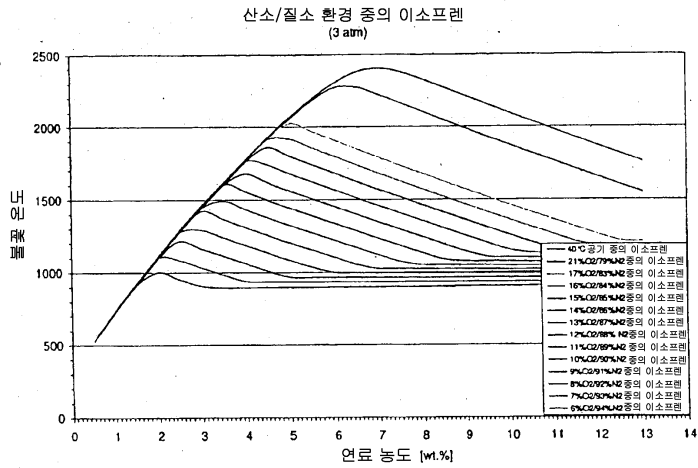
시험	데이터 파일명	온도 ℃	초기압 bara	부분압			농도			결과	Pex bara
				C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> mbar	N <sub>2</sub> mbar	O <sub>2</sub> mbar	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> vol. %	N <sub>2</sub> vol. %	O <sub>2</sub> vol. %		
40	T11130723	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.08
41	T11130724	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.05
42	T11130725	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.05
43	T11130726	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	비-폭발	<1.02
44	T11130727	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	비-폭발	<1.02
45	T11140700	40	1.014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	비-폭발	<1.02
46	T11140701	40	1.014	17	885	112	1.7	87.3	11.0	폭발	1.81
47	T11140702	40	1.014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	폭발	1.54
48	T11140703	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	비-폭발	<1.02
49	T11140704	40	1.015	20	899	96	2.0	88.6	9.5	비-폭발	1.05
50	T11140705	40	1.014	20	898	96	2.0	88.6	9.5	비-폭발	1.05
51	T11140706	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	비-폭발	1.05
52	T11140707	40	1.015	23	886	106	2.3	87.3	10.4	폭발	1.19
53	T11140708	40	1.014	25	884	105	2.5	87.2	10.4	폭발	1.09
54	T11140709	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	비-폭발	1.05
55	T11140710	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	비-폭발	1.06
56	T11140711	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	비-폭발	1.07
57	T11140712	40	1.014	20	889	105	2.0	87.7	10.4	폭발	1.21
58	T11140713	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	비-폭발	1.04
59	T11140714	40	1.014	18	891	105	1.8	87.9	10.4	폭발	1.21
60	T11140715	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	비-폭발	1.03
61	T11140716	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	비-폭발	1.03
62	T11140717	40	1.014	21	890	103	2.1	87.8	10.2	폭발	1.1
63	T11140718	40	1.014	21	891	102	2.1	87.9	10.1	폭발	1.09
64	T11140719	40	1.014	21	892	101	2.1	88.0	10.0	폭발	1.09
65	T11140720	40	1.014	22	891	101	2.2	87.9	10.0	폭발	1.1
66	T11140721	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	비-폭발	1.06
67	T11140722	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	비-폭발	1.08
68	T11140723	40	1.014	19	894	101	1.9	88.2	10.0	폭발	1.12
69	T11140724	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	비-폭발	1.06
70	T11140725	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	비-폭발	1.03
71	T11140726	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	비-폭발	1.04
72	T11140727	40	1.014	20	895	99	2.0	88.3	9.8	비-폭발	1.08
73	T11140728	40	1.014	20	895	99	2.0	88.3	9.8	폭발	1.1
74	T11140729	40	1.014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	비-폭발	1.06
75	T11140730	40	1.014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	비-폭발	1.08
76	T11140731	40	1.014	20	896	98	2.0	88.4	9.7	비-폭발	1.07
77	T11140732	40	1.014	81	761	172	8.0	75.0	17.0	비-폭발	1.04
78	T11140733	40	1.014	81	750	183	8.0	74.0	18.0	폭발	1.3
79	T11140734	40	1.014	81	754	179	8.0	74.4	17.7	폭발	1.24
80	T11140735	40	1.014	81	757	176	8.0	74.7	17.4	비-폭발	1.03
81	T11140736	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	비-폭발	1.05
82	T11140737	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	비-폭발	1.03
83	T11140738	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	비-폭발	1.03

도면81

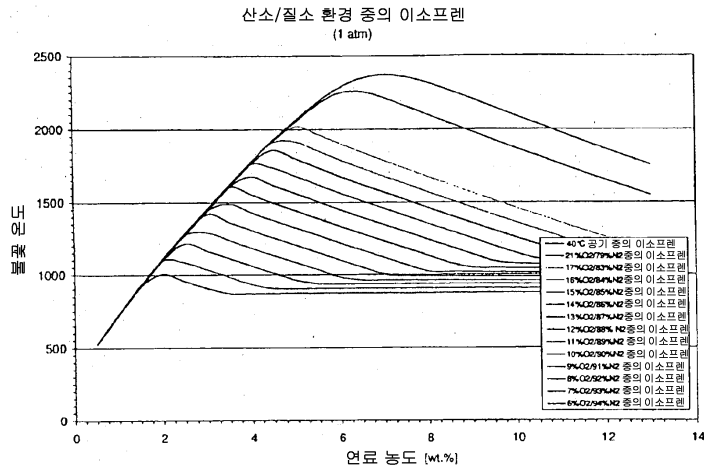
시험 시리즈 2

시험	데이터 파일명	온도 ℃	초기압 bara	부분압				농도				결과	Pex bara
				H <sub>2</sub> O mbar	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> mbar	N <sub>2</sub> mbar	O <sub>2</sub> mbar	H <sub>2</sub> O vol. %	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> vol. %	N <sub>2</sub> vol. %	O <sub>2</sub> vol. %		
1	T11150700	40	1.014	41	119	641	213	4.0	11.7	63.2	21.0	폭발	1.33
2	T11150701	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	비-폭발	1.07
3	T11150702	40	1.014	41	120	640	213	4.0	11.8	63.1	21.0	폭발	1.09
4	T11150703	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	비-폭발	1.06
5	T11150704	40	1.014	40	120	641	213	3.9	11.8	63.2	21.0	폭발	1.09
6	T11150705	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	비-폭발	1.08
7	T11150706	40	1.014	40	15	746	213	3.9	1.5	73.6	21.0	폭발	4.68
8	T11150707	40	1.014	41	15	745	213	4.0	1.5	73.5	21.0	폭발	5.27
9	T11150708	40	1.014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	비-폭발	1.03
10	T11150709	40	1.014	42	14	745	213	4.1	1.4	73.5	21.0	비-폭발	1.03
11	T11160700	40	1.014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	비-폭발	1.03
12	T11160701	40	1.014	41	20	850	103	4.0	2.0	83.8	10.2	폭발	1.11
13	T11160702	40	1.014	41	20	851	102	4.0	2.0	83.9	10.1	폭발	1.11
14	T11160703	40	1.014	41	20	852	101	4.0	2.0	84.0	10.0	폭발	1.09
15	T11160704	40	1.014	41	20	853	100	4.0	2.0	84.1	9.9	폭발	1.09
16	T11160705	40	1.014	41	20	854	99	4.0	2.0	84.2	9.8	비-폭발	1.07
17	T11160706	40	1.014	40	20	855	99	3.9	2.0	84.3	9.8	비-폭발	1.06
18	T11160707	40	1.014	41	20	854	99	4.0	2.0	84.2	9.8	비-폭발	1.08

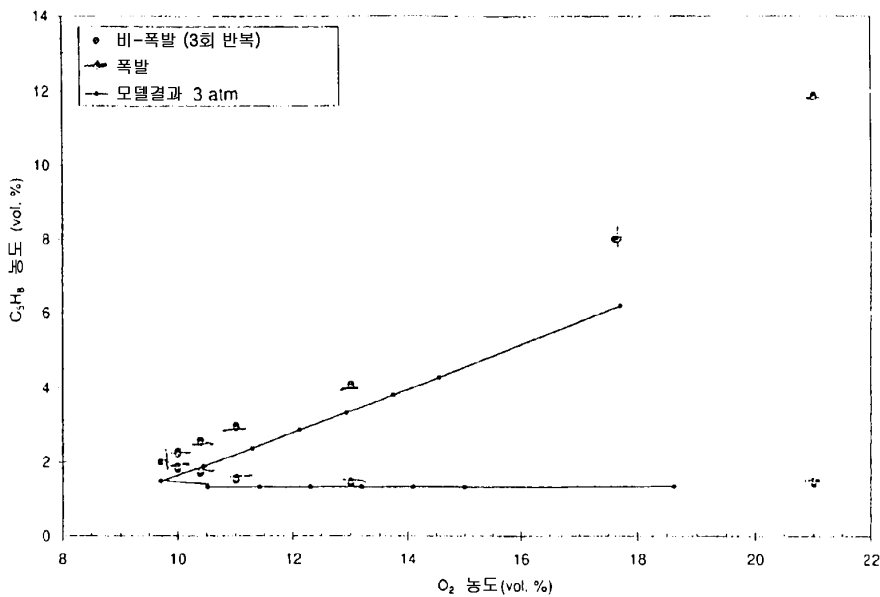
도면82



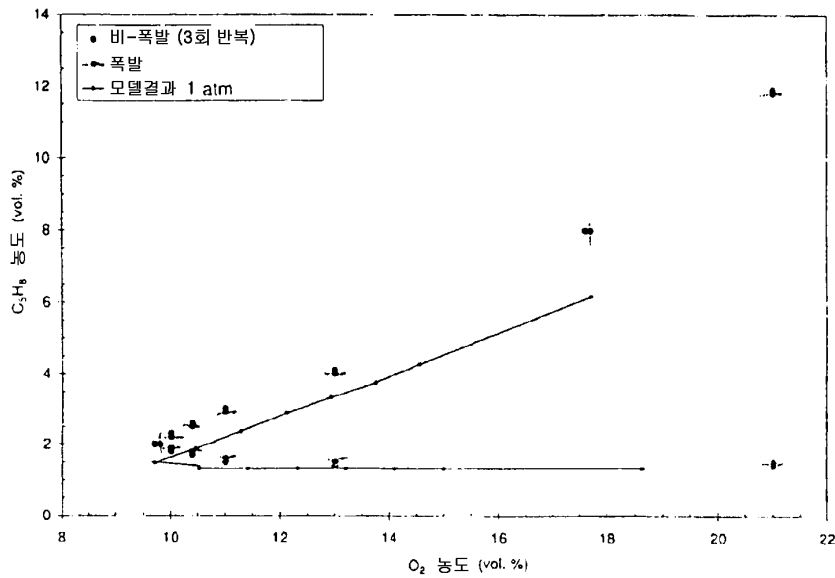
도면83



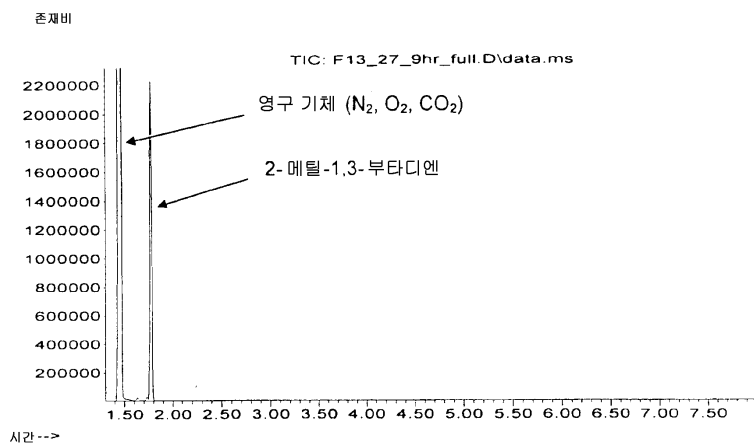
도면84



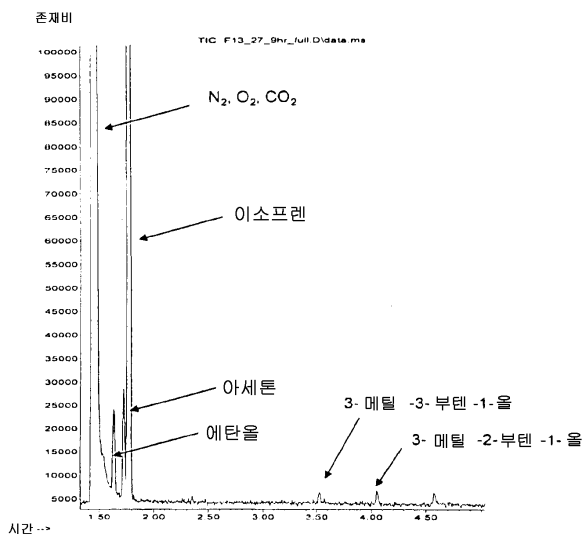
도면85



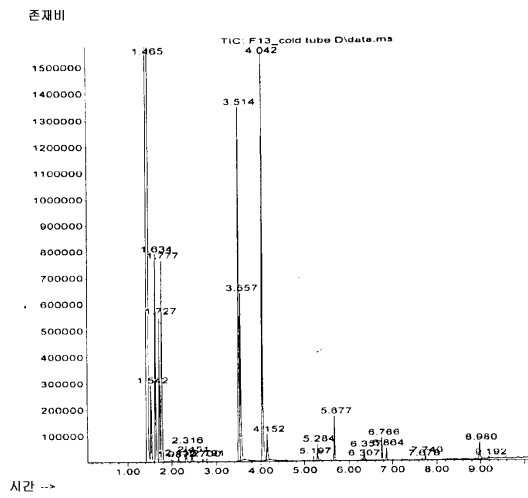
도면86a



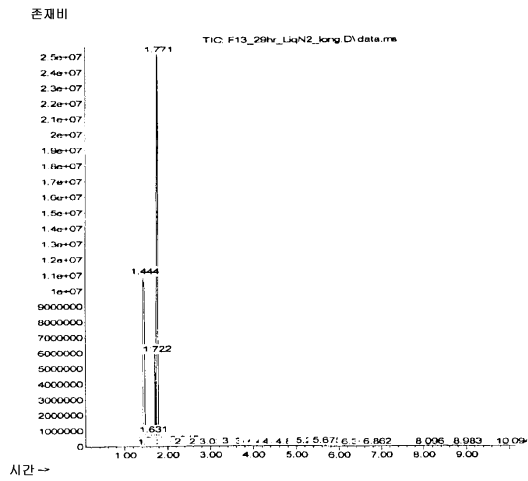
도면86b



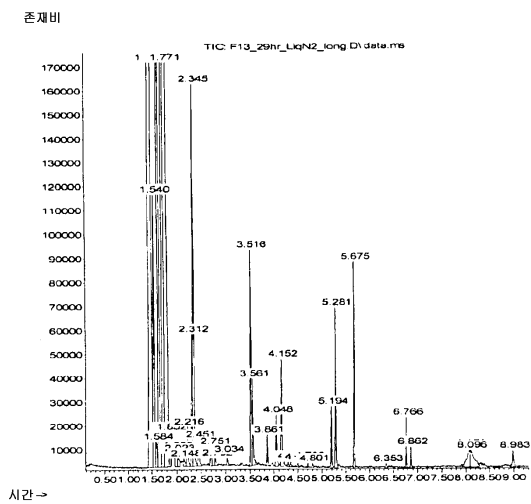
도면87a



도면87b

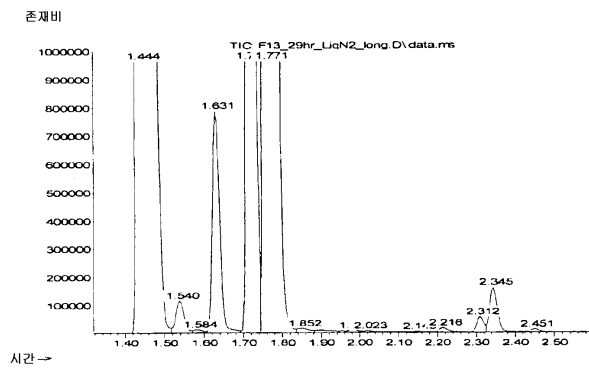


도면87c

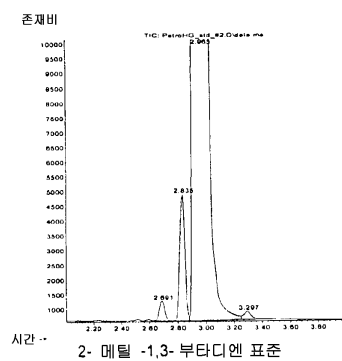




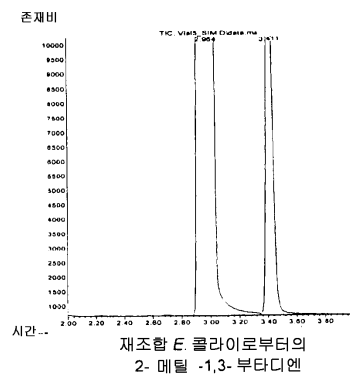
도면87d



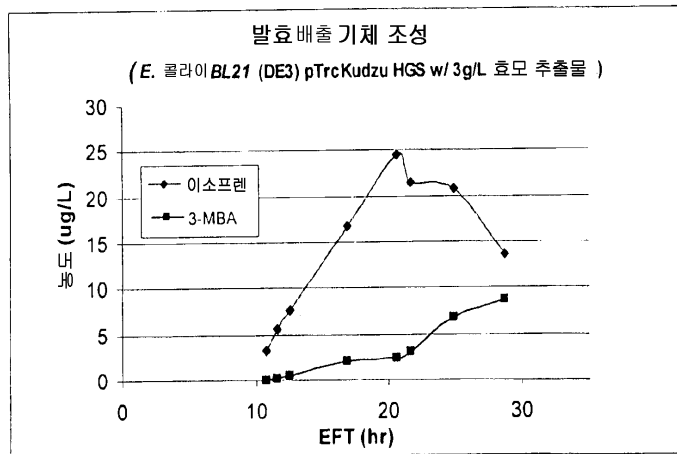
도면88a



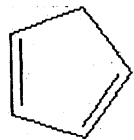
도면88b



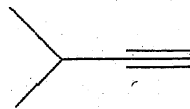
도면89



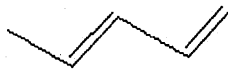
도면90



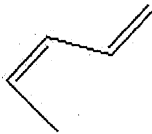
시클로펜타디엔



"이소프렌" = 3- 메 -1- 부틴



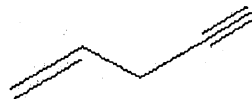
트랜스-피페릴렌



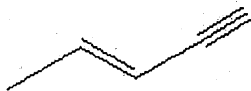
시스-피페릴렌



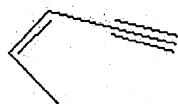
1- 펜틴



펜트 -4- 엔 -1- 인

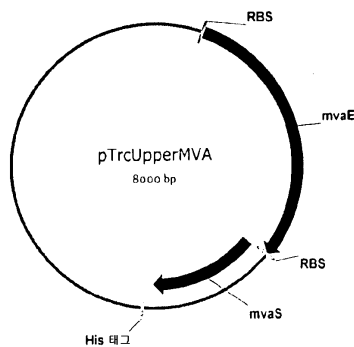


트랜스-펜트-3- 엔 -1- 인



시스-펜트-3- 엔 -1- 인

도면91

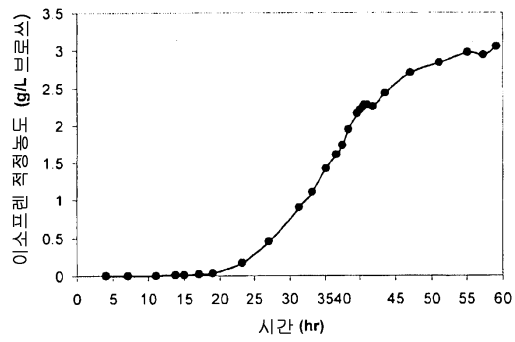


도면92a

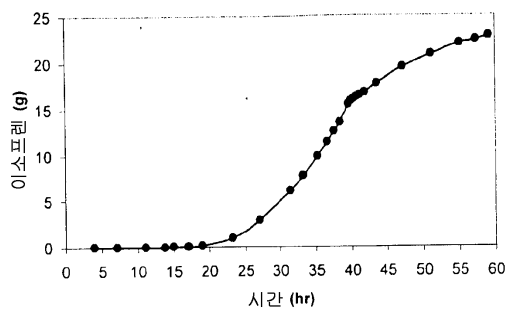
1-  
 gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatgctgtgcagg  
 tcgtaaatcactgcataatcgtgtcgtcaaggcgcactccgttctggataatgtttttgcgcgacatcataacggttctggca  
 aatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgttggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaac  
 agcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgttggcactcgaccggaattatcgat  
 taactttatttataaaataaaggaggtatataatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcaggaggta  
 aaaaacatgaaacagtagttattatgtatgcattacgaacccaattggaaaataaaaggcagcttaagtaagtaagtgcg  
 tagacttaggaacacatgttacacacaacttttaaaaagacattccactatttctgaagaaattgatcaagtaattcttggaaatgtt  
 tacaagctggaaatggccaaaatccgcacgacaataagcaataaacagcggttgtctcatgaaattccgcaatgacgggtaa  
 tgaggctcgcggatcaggaaatgaaggccgttatttggcgaacaattgattcaattaggagaagcgggaagttaattgctggcg  
 ggattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaacagaaagctacgatcgcccttttctagtatgatgat  
 gatggattaacggatgaccttttagtggtcaggcaatgggcttaactgctgaaaaatgtggccgaaaaatcatgtaactagagaag  
 agcaagatcaattttctgacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaaggatattcgtgacgaaatagccccatta  
 gaagtacaggaaacgcttggggaagaaatgaagggttcgccctaatcagcgttgagaagctagggaacgcttaaaacagttt  
 taaagaaagcggtagctgaacagcagggaatgcatcaaccattaatgatggggcttctgctttgattattgtctcacaagaatag  
 ccgaagcacacggctctcctatttagctattatcagagacagtggtgaagtcgggtattgaccagcctatatgggaatttcggcat  
 taaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaactactacgggaagaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgcagcaa  
 ctcaatcgtgtgccaaagagaactggctttaccagaggaagaaaggtcaacattatgggtggcggtatttcataggctacgcgattg  
 gtgccacaggtgctcgttttaftaacgagtttaagttalcaattaaatcaaaaagaaaaaataatggagtggtcttcttatgtatcgcg  
 gggtgcttaggactcgtatgctactagagagacctcagcaaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaacgc  
 ctggtcttcttcttaaggaagccagatttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaaatacggcttlatcttcgagattgccaatcat  
 atgattgaaatcaaatcagtgaaacagagtgccgatggcggttgcttacattaaacagtgagcaaaactgattatttggtagca  
 atggcgacagaagagccctcagttattgcccgtttgagtaatgggtcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaaatcaacaac  
 gcttaattgctggacaatcgtttttacgatgttgagatcccgagtcattgattgataaactacaagtaagagaagcgggaattt  
 tcaacaagcagaggttaagtatcatctatctgttaaacggggcgccggttaagagatttgcaatctgtacttttgatgaatcattg  
 tatctgacgttttttagtagatgtaaggatgcaatggggcgaatatcgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgttccg  
 tgaattggttggcggaagcaaaagattttatcagatatttaagtaattatgccagggagtcggtttgacgatgaaaacggctattccag  
 ttacaggttaagtaaggaggcaatggccgggaattgctgaaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgg  
 gcagtcacgcatacaaaaggaatcatgaatggcattgaagctgtatgttttagctacaggaaatgatacacgcgctgttttagcgcttc  
 ttgtcatgcttttgggtgaagggaaggtcgtacccaaggcttgactagttggagcgtggatggcgaacaactaattggtgaatttc  
 agttccgcttgccttagccacgggtggcggtgcccaaaaagcttaccataatcicaagcagctgctgattttagcagtgacgga  
 tgcaaaagaactaagtcgagtagtagcggtgtgtttggcacaaaatttagcgcggtacggcgcttagctctgaaaggaaatc  
 aaaaaggacacatggctctacaagcagcttcttagcgtacgggtcggagctactggtaaagaagttgagggagtcgctcaac  
 aattaaaacgtcaaaaaacgatgaaccagaccgagccatggctattttaaattgatttaagaaaaacaataaaggaggtaaaaaa  
 catgacaattgggattgataaaattgatttttggcccccattatattatgatagacggcactggctgaagccagaatgtagacc  
 ctggaaaatttcataatggtattgggcaagaccaaatggcggtgaaccacatcagccaagatattgacatttgcagccaatgcc  
 gcagaagcgtatgtgacaaaagataaaggagccattgatgttgattgicgggacagtgatccagatcgatgagtcacaaa  
 gcggccgagttgtcttaccatcgttaattggggattcaacctttcgctcgtctttcgaaatcaagggaagcttgtagcgagcaaca  
 gcaggcttacgttagctaaagaatcacgtagccttacatccagataaaaaagtccttggtcgtagcggcagatattgcaaaatagg  
 cttaatttgcgggtgagcctacacaaggagctggggcggttgcaatgttagttgtagtgaaacgcgcaatttggcctttaaag  
 aggataatgtgatgctgacgcgaagatatctatgacttttggcgtccaaaggccaccgtaacccatgtgctgagtgctctttgtcaa  
 acgaaacctacatccaatttttcccaagctgggatgaacataaaaaacgaaccggcttctgattttgcagattatgatgcttttagc  
 gtccatttctcttacaaaaatgggcaaaaagccttattagcaaaaatcctcgacaaactgaagcagaacagggaacgaattt  
 tagcccggtatgaagaagatctgctatagtcgctgtaggaactgtataggggttcattatctgggactatcttcccttttag  
 aaaaatgcaacgactttaaccgaggcaatcaaatgggtttattcagttatggttctggtgctgctgctgaattttcactggtgaattag



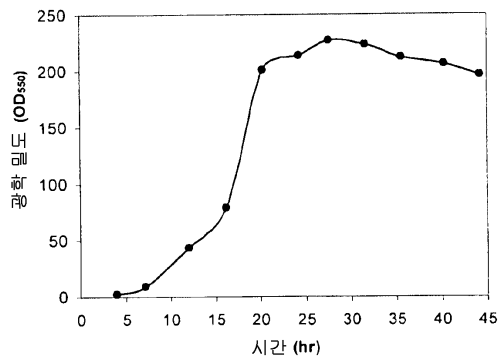
도면94



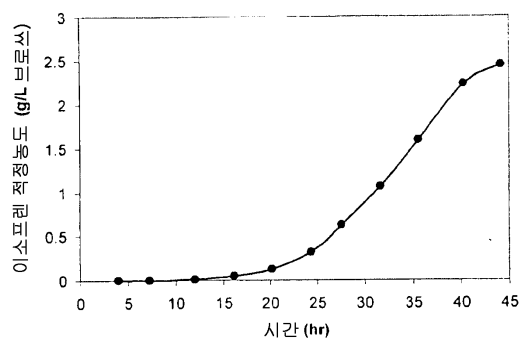
도면95



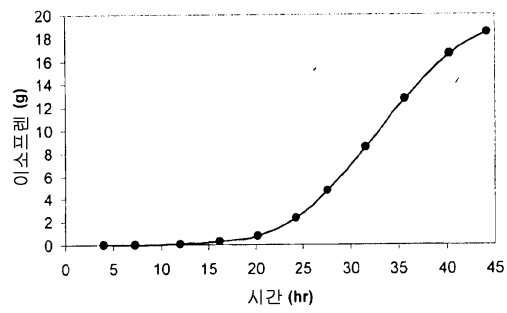
도면96



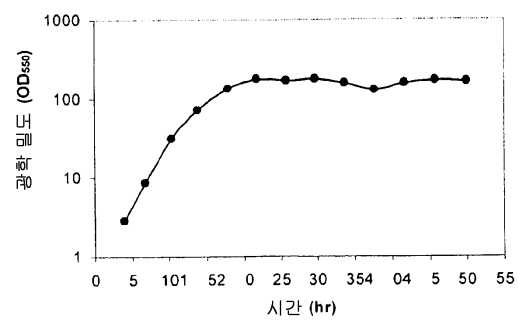
도면97



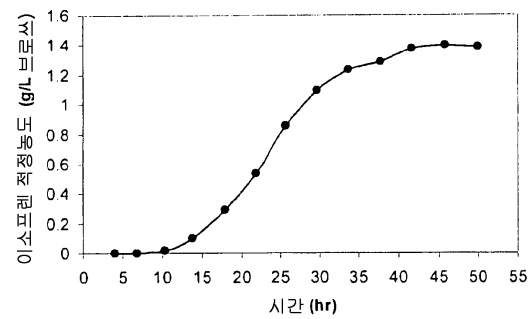
도면98



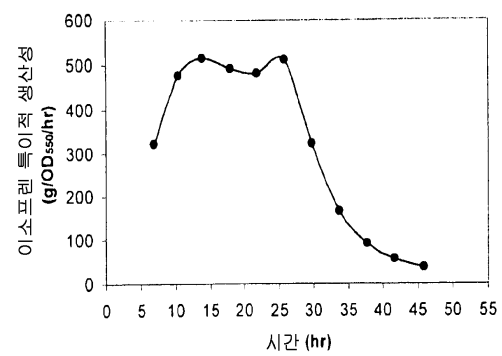
도면99



도면100



도면101







도면103b

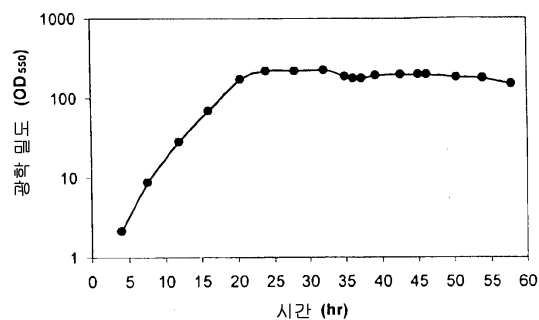
gaagatgaattaaatatagtatttctgtatttaataatccgttcgttctatcgaactaaagatctgcatcctgcattcgcccttag  
gaggtaaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcttccgcaaacatcagccaaa  
cctgttggaatttcgaattcctgcaatccctggagacacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaagcgaccaaacctggagg  
aagaagtctgctgcatgatcaacggtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgacgacgatgtgcagcgccctgggtc  
tgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaaaagaaacaaatctgacct  
gcacgcaaccgctctgtcttccgtctgctgctgacgacggttctgagggttctcaggaatgttttggagcgtttcaaggataaagaa  
gggtgttccagcggtgaactgaagggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttaccgtgggttcgagggtgaga  
acctgtgtggaggagcgcgctaccttttccatcacccacctgaaagaacaacctgaaagaaggcalttaataccaagggttcagaaac  
aagtggaccacgcccctggaactgccatcacccagcgtctgcaccgctcggaggcacgttggttctggataaacgaaccga  
aagaaccgcatcacccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagacccctgcaccagaagagctgcaa  
gatctgtcccgctggtgaccgagatgggctggctagcaaacgtgattttgtacgacccgctgagtggaagtatttcttgggc  
actgggtatggcgccagaccgagtttggatgtcgaagctgttactaaatgttggctgtgacgatcatcgatgacg  
tgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttaccgatgctgtagagcgtgggacgttaacgctattaacacctg  
ccggactatagaaactgttttctgctgactgtacaacacggttaacgacacgtcttatttattctgaaagagaagggtcataac  
aacctgtctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaagcccttctgcaaggcgcaaatgttccaacacaaaattatcc  
cgcttcttccaagtaacctggaaaacgcccagcgtttcttcccggtgtagcgtgctgctgcccgttcttcttccgtatgccagc  
agcaggagaacatctccgaccacgctgctgcttccctgaccgacttccatggtctgtgctgcttagctgcttattctgcctg  
tgcacacgatctggccacctctgctggcagctggacgtgctgagactaccatcttctatctgaaagagaagggtcataac  
ggtaccagcgagggaacagggcccggaagaactgctgaactgacgacccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgctgta  
gcgacttccacctgctgctgaagcgttcatggaaatcgagttaacatggcacgtgttctccacgtgacacctaccgatgacg  
ggtctgggtgctgcccagactacgctgactgaaacccgcatcaaacgtgctgctgattgaccttctccgattaacagctgagatgt  
ctaactgacgctggtaccatagggaaattcgaagctggcccgaaacaaactatctcagaagaggatcgaatagcgccgt  
cgacatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagctggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacaga  
ttaaatcagaacgcagaagcggctgataaaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggttccacctgaccccatgccg  
aactcagaagtgaacgcccgtagcgcgcatggtgtagtgggtctcccatgagagtagggaactgccagcgcacataaataa  
aacgaaaggctcagtgaaagactgggcttctgtttatctgtttgtgctggtgaacgctcctctgagtaggacaatacggccgg  
gagcggatttgaaactgtgcgaagcaacggcccgagggtggcggcgaggacgcccgcataaactgccaggcatacaatta  
agcagaaggccatctgacggatggcctttttgctgttclacaaactcttttgtttttttaaatacattcaaatatgtatccgtca  
tgagacaataacccatgataatgcttcaataatctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgacgtcccttcccaacagttgctgc  
agcctgaatggcgaatggcgcctgatgctgtattttctcttacgcatctgtgcgtatttcacacgcgcatatggtgcactctcagta  
caatctgctctgctgacccgatgtaagccagcccgaccccgccaacacccgctgacgagcttagtaagccctcgcctagat  
tttaatgggagtgctgattacttcccaactattgctgataaacaagaaagccagccttcatgatatactcccaattgtgtagg  
gcttattatgcacgcttaaaaaataaaaagcagactgacctgatatttggctgtgagcaattatgtcttagtgcatctaacgctt  
gagttaaaggccgcccgcgaagcgctcggcttgaacgaattgttagacattatttgcgactacccttggatctcgcctttcac  
gtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgagggccaagcgaatcttcttcttccaagataagcctgtctagctcaagat  
gacgggctgatactggcggcgagcgctcattgccagctggcagcgacatccttgcgcgattttgccggttactgcgct  
gtaccaaagcgggacaaagtaagcaactatttcgctacgcagcccgagtcggcgggcgagttccatagcgttaagggtttca  
tttagcgctcaaatagatcctgttcagggaaccggatcaagaggttctcccgctggacatcaagggcaacgctatgttctctt  
gcttttgcagcaagatagccagatcaatgtcgtatcgtggtcgtcgaagatcctgcaagaatgtcattgctgctccatttcca  
aattgcagttcgcgttagctggataaacgccacggaatgatgtcgtgcacaaacatggtgacttctacagcgcggaagaatct  
cgctctccaggggaagccgaagtttccaaaagggtgttgatcaaaagctgcccgtgtttcatcaagccttacgggtcaccgta  
accagcaaatcaatatcactgtgtgcttcaggccgcatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcgttgc  
agatggcgtcgtgatgacgcaactacctgtatagttgagtcgatactcggcgatcacgcttccctcatgatgtttaaactttgttt  
agggcgactgcccgtgctgtaataatcgttgcgtcgtcataacatcaaacatcgaccacggcgtaacgcttgcgtgcttgat

도면103c

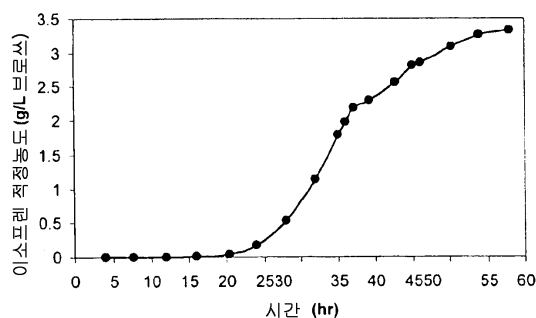
gcccaggccatagactgtaccccaaaaaaacagtatacaagccatgaaaaccgccactgcgcggttaccaccgctgcgttc  
ggctcaaggtcttgcgacagtgctgcagcgcatacgtclactgtcattaccagcttaccgaacccagcgcttattgccactgggttc  
gtgctcttaccctgtttccacggttgctgcgtaccggccaactctgggcagcagcgaagtcgagcgcttctcgtgcggcgaa  
cgagcgcgaaggttctcgtctccacgcatcgtcagcagatggcgccgttcgtcttctacggcaaggtgctgtgcacgcatct  
ccctggcttcagagatcgggaagacctggccgtcgcggcgcttgccgggttgctgcaccgccgatgaagtgttgcacatct  
cgtgtttctggaagcgagacatgtgttttcgcccgactgtgtaaggacggcgatcgatcagtagaggggttgcaactgcgg  
tcaaggtgtgatttcgcatcgcgcagcatcatcgtcggggaggcggaagggctcaaggatggcgcttgattaccgcg  
gagctgtgcaccacgcctcgcgcagcaggggaataattccacggttctgcgcccaacggcgctgtgtgtgtgtctgtag  
ttgttatcagaatcgagatccggcttcacgcggtttgccggctgaaagcgctattcttcagaattgccatgattttccccacg  
ggagcgctcactgtccgccgtgtgttcggcagcttgtagatgataagcagcatcgcgttttcagcgtctcgtatgtgactgtga  
cgctgataaagttgttcacggtgttcacattcatgtctagtctgtttgttttacggtttaccgttctatttagtggtatcatctgtatc  
ctgtttacatctgcatctgttatgttgacaacctgtgaagcaccaaaaactglaaaagctctgatgtatcatctttttacacggt  
ttcatctgtcatatggacagtttcccttgatagtaacggtggaacagttgttctactttgtttgttagtctgtatgcttcacatgatagat  
acaagacgcataagaaactcagatccctccgatttaggcagatgattctctagtgtggctgtgttttgcgtgagcagcagagac  
gaacattgagatcatcatctttgcatcgtactcaaaaaatttgcccaaaactggtagcgtgaattttgcagttaaagcctgtgt  
agtttttttagtcggttatgttagtggaactctgataagttggtgtgtattttccacattttatctgtgtgtgttcacagttc  
gggtacgagatccattgtctatcagttcaacttgaaaaaacacgtalcagtcggcgccctcgtataccaccaatttcataat  
tgcgtgaagtgtttaaacttacttactgtgttcaaaaaccgtgtggaagccgtttaaactcalgtgattattttcaagcataaactatga  
actaaattcatcaaegctaatctctatatattgcttgcagttttcttttgtagttatcttttaaacacacataaactctataagatt  
ttgtttcaaaagacctaactatgtccagataattttatgaatttttaactggaagaataagccaatactctctactaaaaaataat  
tctaattttcgttgagaactggcatagttgtctaccgtggaataactcaagcccttaaccaaaggattcgtattccacagttctc  
gtcatccgtctctgtgttctctgtaggtctataatcacataaagcatttccactagtgttcatactcagtcgattgggataagtgaac  
gacatccgtctctgttctctgtagggttttcaactgtggggtgagtagtcacacagcataaaaattgagctgtgttcactgcctggt  
aagtacatgcactaatcgtagtctgattgtgttgaaaacactaatcagcactataaactggtcaggtgatttaatacatat  
accaattgagatgggctagtcataatgataattcagtccttttctgtgagttgggtatctgtaaaactcgtacacgttctgtgtaa  
aactgttaattctcgtagacagctgtgtaattcctgtagacatctgtgtatctttttttttatattcaaggtgtataatttatagaataaa  
gaaaggataaaaaaagataaaagataaacccagccctgtgtataactcactactatttagtcagcttcgagatttacaagaagga  
tgcgcaaacgcctgttgctctctcaataaacacgtttaaaccctaaagccttaagttagcaccctcgcagctcgggcaaatc  
gclgaatattctttgtctccgaccalcagcgcactgagtcgtctgttttctgtagattcagttcgtcgtctacggctcggca  
gtgaatggggtaaalgcactacagcgccctttatgactcatcgcaaggaaactcaataaataagaagaagccgttcacg  
ggctctcagggcctttatggcggtcgtctatgltgctgatactgtgtgttcgacaggttctgcctctgatttccagct  
gacatccggttaccgtgcagagtcattcagctgactgaatcaccagtgaagcagcgggtatcacaagcgtta

(SEQ ID NO:87)

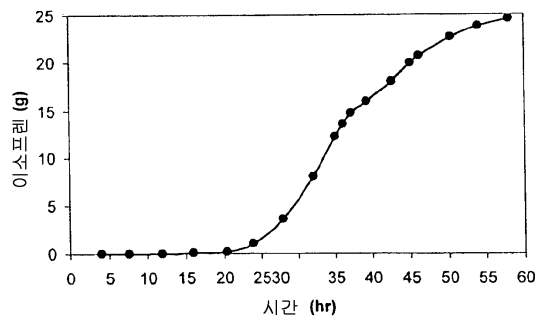
도면104



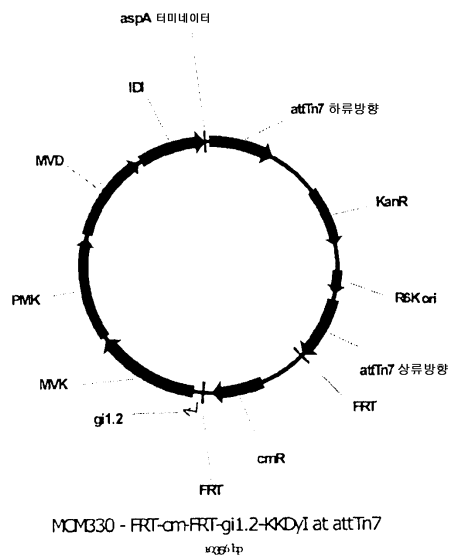
도면105



도면106



도면107



도면108a

1-  
caagaaaaatgccccgttacgcaggccatccatttattactcaaccgtaaccgattttccagggttacgcggctggtcaacgtcg  
gtgctttgatcagcgcgacatggttaagccagcagctgcagcgggaacggtgtagaagatcggtagcaatcacttctccacatgc  
ggcalctcgaatgatgtgcatgttalcgtacttcaaaaaccgcacatcgtalccggaagacatacaactgaccgccacgcgcgc  
gaacttctcaatgttggtttcagcaattcgttttcgggtgcaacaacaataaccggcatacggcalcaattagcgcgc  
agcggaccgtgtttcagttccagcagcgtaggtctcagcgtgaatglaagagatctcttcaacttcaatgcgccttcagcgc  
gattgggtactgacgccacggccaggaacagcgcgtgatgtttgtagagaatcttccagcgccttcaatgcgtttgtct  
gagacagcatcgtcaatcagcgtcggcagcgcctgcagaccatgcacgatgtcatgttcaatggaggcatccagacccttca  
ggcgagacagcttccaccagcatcaacgacagttaacgtggtggaatgctttagtgatgccacgccgatttctgtacc  
cgctgttgctcattagcgcagatcggattcgcgcaccagagagaacccggaacgttacagattgccagtgaaccaaggtaac  
ccagctctttcagacagcagccagccaggggtatccgcggtttccagacgtgtgacacgacgcccttcccaacagttgcg  
cagcctatcgtacgcaggttaaggtttacacctataaaagagagagccgttatcgtctgtttgtggtatgacaggtgataatt  
gacacgccggggcagcgtggtgatccccctggccagtgacgctgtctgtcagataaagctccccgtagaacttaccgggtg  
gtgcatacggggatgaaagctggcgcagtgatgaccaccgatatggccagtggtgcgtctccgttatcggggaagaaagtggct  
gatcagccaccgccgaaagacatacaaaaacgccattaacctgatgttctggggaataaagtgacggcatgagattacaaa  
aaggatcttccactagatcgttttccagctagaaagccagtcgcgagaacgggtgctgacccgggatgaatgtagctactgggct  
atctggacaagggaaaacgcaagcgaagagaaaagcaggtagcttgcagtggtgcttacctgagcagatagactgggcg  
gttttatgagacagaacggaacgggaattgcccagctggggcgccctctggtgaaggttggaagccctgcaagtaaacgtgat  
gagctttcgcggccaagatctgatggcagggggtcaagctctgatcaagagacagggatgaggatcgtttgcatgattga  
acaagatggattgacagcaggttttccggccgttgggtggagaggttattcgctatgactgggcacacagacaatcgct  
gctctgatccgccgtgttgcggctgtcagcgcagggggcgcccggttctttgtcaagaccgacctgtccgtgcccgtgaatga  
actgcaagacgagggcagcgcggctatcgtgctggccagcagggcgcttcttgcgacgtgtgctcagactgtgactgagc  
cgggaaggagactggctgtattggcggaagtgccggggcagggatctctgtcatcctaccttgcctcgcgagaaagtatcca  
tcatggctgatgcaatgcggcgctgcatacgttgatccggctacgtgccattcgaccacaaagcgaacatcgcatcgagc  
gagcacgtactcgtatggaagccgtcttctgcatcaggatgatctggacgaagcatcaggggctcgcggcagccgaact  
gttcgccaggtcaaggcagcatgccgacggcgagagatctcgtgtgacctgagcgtgctgtgcccgaataatcatggt  
ggaaaatggcgcttttctggtatcagcagctgtggcggtgggtggtggcgagccgtatcagagacatagcgttggctacccgt  
gatattgctgaagagcttggcgcggaatgggctgaccgttctcgtgtttacggtatcgcggctcccgatcgcagcgcacg  
ccttctatcgccttctgacgagttcttgaattattaacgcttacaatttctgatgcggtattttctctacgcatctgtgcggtatt  
cacaccgcatacaggtggcacttttggggaatgtgcgcgggaacccctattgttttttctaaatacatcaataatgtaaccg  
tcatgagacaataaccctgataaatgcttaataatgacagtgaggaggggccaccatggccaagtgaccagtgccgttccggt  
gtcaccgcgcgcagctgccggagcgtcgtgagttctggaccgaccggctcgggttctccctagtaacggccgccaggtgt  
gtcgtgaatcagcaggttcaacctgttgatagctactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgtttaacgtactaagct  
ctcatgtttaacggaactaaacctcatggcctaaccgtactaagctctcatgttcaagctactaagctctcatgtttcacgtactaagctc  
tcatgtttgaacaataaaaataataaatcagcaacttaaatagcccttaaggttttaagttttataagaaaaaagaataataaagg  
cttttaagcttttaaggttttaacggttgggacaacaaaggccagggatgtaacgactgagaagcccttagagcccttcaaaagcaa  
ttttcagtgacacaggaacacttaacggctgacagccgtgaattctgcagatatctgttttccacttctgttcaacttccaggttag  
ctgggtgaagacgaagggaagtcgggagccatctgcgcggctactacagcaatgtttgtgaaggcagtttcagaccggatc  
agtttggcgtatgcttcatcaccacttctgattttgccaggtagatgtcggcaggggtttaccatccagcaccagttcggcag  
acttcagccctggaatgttaaccgccagcaccacgcccaatcaggtgcggaaactggaacagaccttctgagccagttttc  
gtcagacagcggcgctcagaggcaccaaaatcaacggtattagcgataatctgttttacgccaccgggaagaccgataccctg  
gtagtttaactttattaccggtttcttctgttaagtgtcagcccatgttgcatcacccggcgaggggaaggttgacactgcacctgtc  
aggcttcttctgcaaacacagagaagcactcagcagataaggtcggcgacaacagttgcgacggtggttacgcataactt  
ataatgtctcctggggaggttcatgaagcattgtttgtgctacgagaagcaaaataggacaacaggtgacagttatagtgaag  
gaatatgacagtttatgacagagataaagcttctcagctgtatttaataagcgttgattatcagtcgaattacaacattaataacg

도면108b

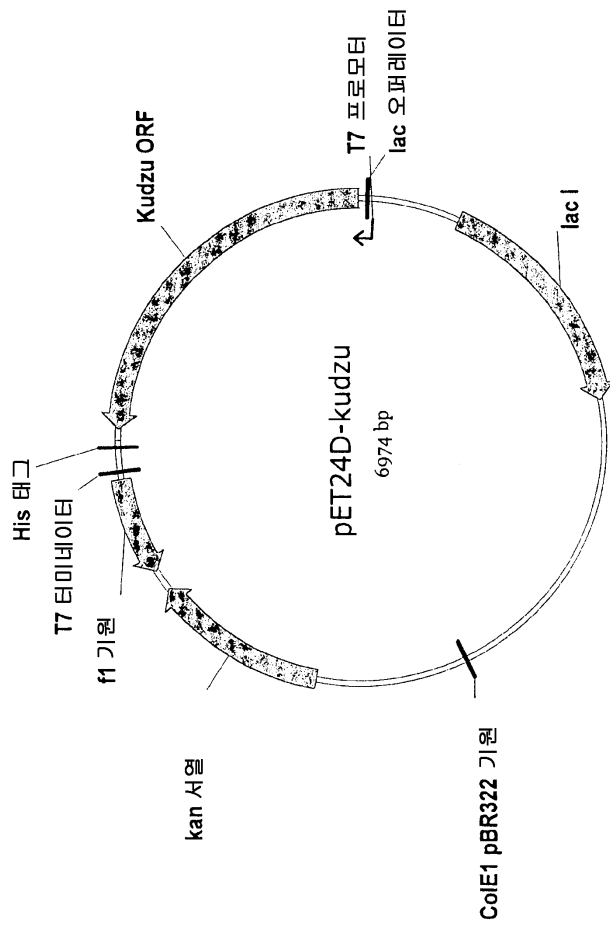
aagagatgacagaaaaatttctattctgtgacagagaaaaagtagccgaagatgacggtttgtcacatggagttggcaggatgttt  
gattaaaaagcaattaacctcactaaaggcgccggaagtcttattctctagaaagtaggaacttattctaccgggtagg  
ggagggcgcttttccaaaggcagctctggagcagcgttttagcagcccgctgggacattggcgctacacaaagtggcctctggcc  
tcgacacattccacatccaccggtagggcgccaaccggctccgttttgggtggcccttcgcgccacettccactctcccttag  
tcaggaaagttcccccccgcccgagctcgcgtctgtgagggacgtgacaaatggaaagtagcacgtctcactagctcgtgacag  
atggacagcaccgctgagcaatggaagcggttagggcctttggggcagcgccaatagcagctttcctctcgtttctgggct  
cagaggctgggaaagggtgggtcggggcgccgagggcggtcagggcgggcgggcgcccgccgaaaggctctcc  
ggagggccggcattctgcagcgtcaaaaagcgacgtctgcccgcgtgttctctctctctcctccgggctttcgacctgcag  
cagcagcgtttgacaattaatcatcgccatagatatacggcagtagtataatagacaaggtagggaactaaaccatggagaaaaa  
aatcactggatataccaccgttgatatacccaatggcagtcgtaaaagacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctata  
accagaccgttcagctggatattacggcctttttaaagaccgtaaaagaaaaataagcacaaagtttatccggccttattcacattctt  
gcccgcctgtagatgctatccggaattccgtagtgaatgaaagacggtagctggtgatatgggagtagtttaccctgtta  
caccgttttccatgagcaaaactgaaacgttttcatcgtctggagtgaaatccacgacgatttcggcagttttcacacataattcg  
caagatgtggcggtgacgggtaaaacgtggcctatttccctaaagggtttattgagaatafgttttcgtcagcgaatccctgggt  
gagtttaccaggtttgatttaaacgtggccaatattggacaactcttcccccgttttaccatgggcaaatattatccgaaaggc  
gcaagggtgctgtagcgcgtggcgattcagggttcacatgcgtttgtagtggcttccatgctggcagaatcttaagtaattaca  
cagtagtgcgtagtggcagggcgggcgtaagcgggacgtctggggttcgaataagaccgaccaagcgacgtctgagag  
ctccctggcgaaattcggtaccataaaagagctttatttcatcgtggtggtttttgtgctggcgcggaagtctcattctcta  
gaaagtagggaactctcagccctatagtagtcgtattagccctgacgtagccacatctgagcaaaataatcaaccacta  
attgtgagcggataacacaaaggaggaacacagctatgctattaccgttttaactctgcaccgggaaagggttatttttgggtaac  
actctgctgtgtacacaagcctgcgtcgtctgtagtctgctgtagagaacctacgtcctaataagcgagtcacgtgcacca  
gatactattgaaattggacttccggacattagctttaatacataagtggtccatcaatgattcaatgccatcaccgaggtcaagtaa  
actcccaaaaattggcgaagcctcaacaagccaccgtagtggctgtcaggaactcgttagtcttttgatcgtttgtagtcaac  
tatccgaactctccactaccatgcagcgtttgttctctgtatattgtttgttgcctatgcccccatgccaagaatattaagttttcttaa  
agtctactttaccacatcggtgctgggttgggctcaagcgccctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggtt  
aataggtatctaatgacttggaaagcgtgcagaaaaagataagcatatagtgaaatgaatggccttcataggtgaaaaagtgtattc  
acggtacccttcagggaatagataacgctgtggccactatgtaagccctgctaattgaaaaagactcacataatggaacaata  
aacacaaaactttaagtcttagatgatttccagccattccaatgaltcctaactatactagaattccaaggtctacaaaagatctt  
gttgcctgcgttcgtgttggcaccgagaatttctgaagttatgaagccaattctagatgccatgggtgaatgtgccctacaa  
ggcttagagatcatgactaaagttaagttaagttaaaaggcaccgtagcagggcgtgtagaaactaataatgaactgtatgaacact  
attggaattgataagaataaatcatggacgtgtgtctcaatcggtgttctcactcgtgattagaactttataaaaatctgagcgatga  
tttgagaattggctccacaaaacttaccgggtgctgtggcgccgggtgtctttgactttgttacgaagagacattactcaagagca  
aattgacagctcaaaaagaattgcaagatgatttttagttacgagacatttgaacagacttgggtgggactggctgctgtttgtta  
agcgcaaaaattgaaataaagatcttaaaatcaaatccctagtttcaattatttgaataaaaactaccacaaagcaacaaattg  
acgacttatttccagggaacacgcaatttaccatggacttcataagctaatgtcgataggcctgcacccttaaggaggaaaaa  
aacatgtcagagttgagagccctcagtgccccagggaagcggttactagctgttgatatttttagatacaaaaatagaagc  
attgtagtcggattatcggcagaatgcatgctgtagccatccttacggttcattgcaagggtctctgataagtttgaaagtgcgtgtg  
aaaaagtaacaatttaagatggggagtggtgtgtaccatataagtcctaaagtggttcttctgtttcgtatagcgcgatcaag  
aaccttttattgaaaaagtatcgctaacgtatttagctactttaaacctaactggacgactactgcaatagaactgttctgtatt  
gatattttctgtatgcttaccattctcaggaggtatgcttaccgaacatcgttgcaacagaagattgagttttcattcgcaca  
gaattgaagaagtcccaaacaggcgtgggctcctcggcaggttttagtcacagtttttaactacagctttggcctcctttttgtatc  
ggacctggaaaataatgtagacaaatagagaaagtattcataatttagcacaagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattgg  
aagcgggtttgtagtgcggcgagcatatggatctatcagatataagaagattccacccgcattaatctcaatttgcagatat  
tggaagtgtacttaccggcagtaaacgtggcgctttgtgtgtagaagaagactggaattattacgattaaaagtaaccatttaccctc

도면108c

gggataactttatggatggggcgatattaagaagtggttcagaacacgtaaaactggtcagaaggtgaaaaaattggtagtgc  
atagccgagaagaacttgaaaaatataacagaaactgcgatcatgcaaatcttagatttagtgatggacatttaaacatagactgcttaca  
cgagactatgcgataacgcgcagcatgattgactgctcttgtaggaagatgactgactgctcaaaagtatcctgaaaccacag  
aagtttagatgcagttgccacaattagactgtctctttagaaaaataataagaagacttggtgcgatcgaacctccctgataca  
actagcttatggatgattccagaccttaaaaggaggttcttactgctaataacctgggtcgtgggttatgacgccaatgctgat  
tactaagccaagatgttgactttagggctcaaacctcgaatgacaaaagaftttcgaaggttcaattggctggaatgaactcaggctga  
ctgggggttttaggaagaagaagaatcgggaacctgcgaacttcttgataaataaacttaaggtagtgcgcagcaattccgctaagga  
gaaaaaaaatgagcgtttaccagcatccgtttaccgttcacatcgcgaaccttaagtattgggggaaaaaggacacg  
aagttgaatctgccaccaattctccatcatcagtcactttatcgcaagatgacctcagaacctgtagcttgcctgactgcacct  
gagttgaacgcgcacactttgttgtaattggagaacacacagatcgacaattgaagaacatacaaaattgtctcgcgacctac  
gccaatatggagaagaaatggaaactgaaggagcgccatctgccacatttcgaatggaaactccacattgtctccgaaaataa  
cttctacagcagctgtgttagcttccctcgtctgctgttctgactgtgtctcgaattgctgaattgataccatccacagtc  
aacttcagaatatctagaatagcaagaagaagggtctgttcagctgttagatcgtttgttggcggatcgtgctctgggaaatgg  
gaaaagcttgaaatggttcgatgtccatctgatacaaatcgacagacagcttgaactggcctcagatgaagaagttgtctctagt  
tcgcgcgatataaaaaaggatgttgatgtccactcagggttgcattgacatccgtgcgaacctccgaactatttaagaagaattga  
acatgtcttaccaaaagaagattgaagtcagtcgtaaggcattgtgaaaaagattgcgaaccttgcgaagggaacaatgattg  
attccaactctttccatgccaatgtttggactctttccctcaatattcagaatgaatgcacttccaagcgatatcatagttggtgcc  
acaccgaactcgtttttacggagaacaactgttgcgatacacggtttgatgcaggctcaaaatgctgtgttactacttagctgaaaaat  
gagtcgaaactcttgcattttataaaattgttggctctgttctctgtagtcgacaagaatttactactgagcagcttgaggcttcc  
aacatcaattgaaatcttaacttactgcagctgaattggatctgagttgcgaanaagattgtccagagtgatttaaacatcaagt  
cggttcaggccccagaagaacaacgaalctttgattgcgcaaaagactggtctaccaaaaggataaagatcaattcgtgcatac  
cccttaggggtgaaaaaaaatgactgcgcagacaatagatgtccccctgacagctatctatgacccaattagtgcga  
ccaaacacctgaagacatttgggaagagtttctgaaattattcattacaacgaactccgcatctgtgagatgcgcga  
tgacgaagcgcggaacactgttttctgctgcatagtgaggagcaaaattgaattgaatgaataaattgtttgttgatgggac  
gataatgctattggtgccgttacaagaagtgttgcatttaattgaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcattctcgtctt  
atttccatgaaccaagtgtaattacttttacaagaagcgaacctgaaaaataatcttccctgatcttgcactaacacatgctctc  
tctcaacttatgttagtgacgaattgggttgaagggtgaagctagacataagaattaaaggccttactctcggcggtgagaa  
aactagatcatgaattgactgtatccagaagatgaactaaagacaggggttaagtttcaattttaaacagatccattacatgcgac  
caagcaatgaacctggggtgaacatgaaattgattacatcctattttataagataacgcgtaagaagaaacttgactgtcaaccaa  
acgtcaatgaagttagagacattcaaatgtttgttccacaaatgattgaaacattgttgcgcacgaatttacaagtttacgccttg  
gttgaagattatfctggcaattacttttaactggtgggagcaattgagatgccttctgaagttgggaaattgacaggcaattcata  
gaatgctatacaacgcgtctacaaaataaaaaaggcgactcagatgcgctgctcttttctggggcc

(SEQ ID NO:90)

도면109





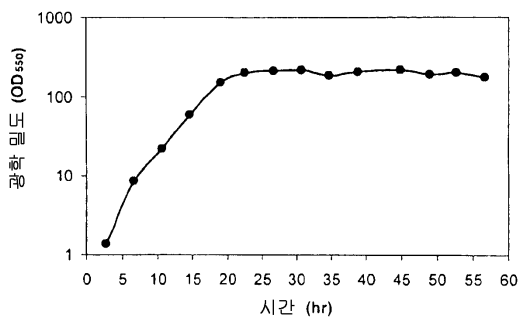
도면110a

1-  
gtgcggccgaagcttgacggagctcgaattcggatccctgcagttagacatacatcagctgggtaacgggaaagggtca  
atcagcagcagtttgatgcgggttttcagtcgcgtagcttgggcgaccagaccalcgccalactggtaggtgcagtgaggaaaca  
cgtgccatgtaactgcgatttccatgaacgcttaggcagcagggtggagtcgctaaccgcttacgattcatttttccattcgg  
cgctgatcagtttacgcagttcttcggggcctgttccctcgtggtaccatcgttttcgcatgtagctaataatgtagtgc  
tcgccacgttccagctccgccgagagggtggccagatcgttcacaggcggagataacgcagctagaacgcaccagaccat  
ggaaagtcggtcagggaacgcagcgcgtgggtggagatgtcttctcgtcgtggccatcggaaaagtaagacggcgccagcag  
cgctacacgggagggaaacgcgtggcgttttcaggtaacttggagaaagccgggataatttggttggaccatttcgcctctt  
gcagaaaggctttgcacagttcacgcccagcttttcgtcagataggacaggtgttatgacctttctttcagaatagaataggacgt  
gtcgttaacgggtgttacagtcgccaggaacacagttcatatagtcggcagggtgtaatagcgttaacgtccagcgtctta  
cagcatcgggtgaacagttgcagttcgtccagagtgccataaacgtcalacacgtcatcgtatgcgtcaccagaccaaacalltta  
gtaacagctttgcacattaccacaatgcctgggtcgtggccataccagtgcccagaataaacctccatcagggcgtgcgt  
acaaaatccagttgtagccggcccatctcgggtccaccaggggacagatctgcagctctttcgtgagggctgtgtaccat  
gttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctgggtgatcgggttcttccgttctattatccaggaaaccaagtcgctccag  
acgggtgcagacgctgtgatagtcaggttccaggcgtggctcacttcttgcacacttggtatattacgtcttcttccaggtgttct  
tcagtggtgtgatggaaaggtaacgtccctcctccagcaggttctcaccctgaaacccaggtagacgttccatcaggtcga  
gcaggccttggagtcacctttcagttaccgctgaaccaccttcttacccttgaacgctcaaaaacatcctgagaacctcga  
aacctgtcgtcagcagcagcaggaaagacagcgggttgcgtgcagtcagattgttcttcttcttccagcagtcagtcagtg  
tttccagggtttaaagtgatgttttcaaaatttaggtcagaccaggcgtgcacatcgtcagtcagtcagtcagtcagtcagtc  
ggctgggtgtctacacggttgatcagtcagcgaacttcttccagtttggtcgttctcctccagcttttccacttccagtcgttc  
tccagggttgaggaaatccaaatccaggttggctgatgttgcggaaacgacgggaattatgctcgttaactgagtaaa  
ttgagaagaggtgcacacatgtatcttcttctttaaagttaaacaaaatttctagagggggaattgtatccgtcacaattcc  
cctatagtgatcgtatatttccgggtatcagatcgtatcctacgccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccac  
agggtcgtgtgtcggccctatctgcgcacatcaccgatggggaagatcgggctcggcacttccggctcatgagcgttgttcc  
ggcgtgggtatgtggcaggcccggtggccggggactgttggcgccatctccttgcatgcaccattccttggcgggcggt  
gctcaacggcctcaactacttgggtgttcttctaatgcaggagtcgataaggagagcgtcagatccggacaccatc  
gaaatggcgcaaaacttttcgggtatgcatgatagcggcggaaagagtgcaattcagggtggtgaatgtgaaacagtaac  
gttatagatgtcgagagatggtccgtgtcttctatcagaccgtttccgctgtgtgaaccaggccagccaggtttctgcgaaaa  
cgccgggaaaaagtggaagcggcgtatggcgagctgaattacatcccaaccgctggcgcaacaactggcgggcaacaagt  
cgttgcgtatggcgttgcacacctcagctggccctgcacgcggcgtcgaattgtcggcggaattaatctcgcgccgatca  
actgggtccagcgtgggtgtgtagtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaagcggcggtgcacaatcttctcgcgc  
aacgcgtcagtggtgcatcattaactaccgctggatgaccaggatgccattgcttggaaagtcgctgcactaatgttccggc  
gttatttctgtatctctgaccagacaccatcaacagtattatttctccatgaagacggtagcgcacttggcggtgagcatctg  
gtcgcattgggtccaccagcaaatgcgtgttagcggggccattagttctgtcggcgctgtcgtcgtggtggtggtgcata  
aatatctactcgcataaattcagccgatagcggaaagggaagggcactggagtgccatgtccggtttcaacaaccatgc  
aaatgctgaatgaggatcgttccactgcgtgctgttgcgaacgatcagatggcgttggcgcaatgcgcgccattaccg  
agtcggggtcgcgtgtgtggtgcgatactcgtgtatgggtacgacgataccgaagacagctcatgttatccgccgttaac  
caccatcaaacaggattttcgctgtggggcaaacagcgtggaccgttgcgaactctcagggccaggcgggtgaagg  
gcaatcagctgttcccgctcactgtgtgaaaaaaccaccctggcgcccaatcgcgaaccgcttctcccgcggttg  
gccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccgactggaaagcggcgagtgagcgcaacgcaattaatgtaagttagct  
cactcattaggcaccgggtatcgcaccgatcccttgagagccctcaaccagtcagctccttccgggtggcgcggggcatgac  
tatcgtcggcgcaattatgactgttcttctatcagcaactcgtaggacaggtgcccgaagcgtcgttgggtcatttccggcgagg  
ccgcttctcgtgagcgcgacgatgacggcctgtcgttgcgttattcgggaatctgcacgccctcgtcgaagccttctcactg  
gtccccccacaaacttttcggcgagaagcaggccattatcggcgatggcgccccacgggtgcgcatgctgtcgtcgt

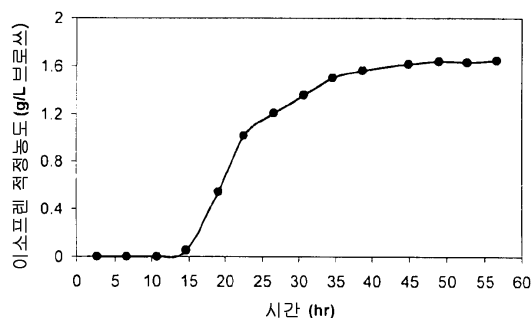
# 도면110b

tcgttgaggaccggctaggctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcga  
ctgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttgggttccgtgttctgtaaagtctgaaacgcgggaagt  
cagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgaggatgctgctggctacccctgtggaaacacacacatctgtattaacgaag  
cgctggcattgacctgagtgattttctgtgcccgcgcacatccatccagctgtttaccctcacaacgttcagtaaccgg  
gcatgttcacatcagtaaccggtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcatlaccctcagaacagaaatcccccttaca  
cggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaacgcccttaacatggcccgtttatcagaagccagacattaacgcttctggag  
aaactcaacgagctggacgaggatgaacaggcagacatctggaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctg  
cctcgcgctgttgggtgagtgacgggtgaaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctgtaagcggatgc  
cgggagcagacaaggccgctcagggcgctcagcgggtgttggcggtgtcggggcgcgagccatgaccagtcacgtagcgcg  
atagcggagtgatatactgcttaactatggcgcacagagcagattgtactgagagtgaccacatatatgggtgtaataaccgc  
acagatgctgaaggagaaataaccgcatcaggcgctcttccgcttccctgcacactgactcgtcgctcgtgcttggctgctg  
gcgagcgtatcagctcactcaagcgcggaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagca  
aaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatca  
caaaatcagcgtcaagctcagaggtgcggaacccgacaggactataaagataccagcggttccccctggaagctccctg  
tgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatcctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcac  
gctgtaggtatctcagttcgtgtaggtcgttccgctccagctgggtgtgtgcacgaacccccgttcagccccgaccgctgcgc  
cttatccgtaatactatcgtttagtccaacccggtaagacagacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagc  
agagcggagtgatagcggtgtctacagagttctgaagtgtggtgcctaactacgctacactagaagggacagatttgggtatct  
gcgctctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaacaccaccgctggtagcgggtgtt  
ttttttgcaagcagcagattacgcgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgtcagtg  
gaacgaaaaactcacgttaagggttttggatgaacaataaaactgtctgttacataaacagtaatacaagggtgttatgagc  
catattcaacgggaaacgtctgtctagccgcgattaaftccaacatgtagctgatttatagggtataaatggctcgcgat  
aatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcattgtatgggaagccgatgcgcagagttgtttcgaacatggcgaaggta  
gcgttgcaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaattatgctcttccgaccatcaagcattttatcc  
gtactcctgatgatgatgttactcaccactgcgatccccgggaaaaacagcattccagtgattagaagaatatcctgattcaggt  
gaaaatattgtgatgcgtggcagtgctcgcgggttgctcattcgtttgttaattgtccttttaacagcgtatcgctatttc  
gtctgcctcagcgcaatcaggaatgaataacggtttgtgtatgcgagtgattttagacgagcgtaatggctggcctgttga  
caagctcggaaagaaatcataaacttttgcatttcaccggattcagctgcacatcagtgatttctacattgataacctttttg  
acgaggggaaattataggtgttattgatgttgacagtgctggaatcgcagaccgataccaggtcttggcctcctatggaacg  
cctgggtgagttttctcttcttattacagaacggccttttcaaaatatgtattgataatcctgatatgaataattgacgtttcattga  
tgctcgtatgagtttttcaagaattattcatgagcggatcacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcac  
atttccccgaaagtgcacacctgaaattgtaaacgttaataatttgttaaaattcgcgttaaaatttgttaaatcagctcatttttaacca  
atagccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgattgttccagtttggaacaagat  
ccactataaagaaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaacccgtatcaggggcgatggccactacgtgaaccatcacc  
ctaatcaagtttttgggtcaggtggcgtlaaagcactaaatcggaacccataagggaagcccccgttttagagcttgacgggga  
aagccggcgaacgtggcgagaaggaaggaagaaagcgaagggagcggcgctaggggcgctggcaagttagcggtc  
acgctgcgctgaaccaccaccccgccgcttaatgcgcgctacagggcgctccattcgccaatccggatatagttcctc  
ctttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagaggcccaagggttatgctagtattgtcagcggtggcagcagccaactc  
agcttcttccggcgtttgtagcggcgtatcagtggtggtggtggtgctcga

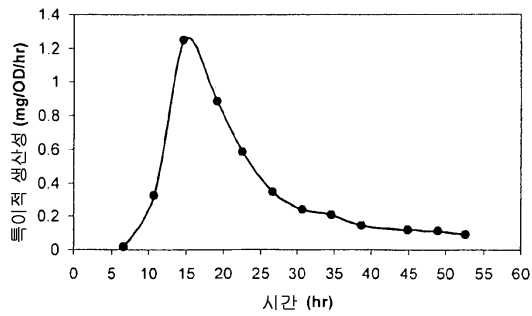
# 도면111a



# 도면111b



### 도면111c



### 서열 목록

- <110> Danisco US Inc.  
 The Goodyear Tire & Rubber Company  
 CALABRIA, Anthony Rudolf  
 CERVIN, Marguerite A.  
 CHOTANI, Gopal K.  
 MCAULIFEE, Joseph C.  
 MILLER, Michael Charles  
 SABO, Timothy Alan  
 WEBSTER, Erin Lynne  
 SANFORD, Karl J.  
 LA DUCA, Richard  
 WHITED, Gregory M.
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING ISOPRENE FREE OF C5  
 HYDROCARBONS UNDER DECOUPLING CONDITIONS AND/OR SAFE OPERATING  
 RANGES
- <130> 643842000449
- <140> Not Yet Assigned
- <141> 2009-07-01
- <150> PCT/US2009/049429
- <151> 2009-07-01
- <150> US 61/134,011
- <151> 2008-07-02
- <150> US 61/133,947
- <151> 2008-07-02

<150> US 61/134,094  
 <151> 2008-07-02  
 <160> 102  
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 1701  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 1

atgtgtgcga cctcttctca atttactcag attaccgagc ataattcccg tcgttccgca 60  
 aactatcagc caaacctgtg gaatttcgaa ttcttgcaat ccctggagaa cgacctgaaa 120

gtggaaaagc tggaggagaa agcgacccaaa ctggaggaag aagttcgctg catgatcaac 180  
 cgtgtagaca ccagccgct gtcctgctg gagctgatcg acgatgtgca gcgcctgggt 240  
 ctgacctaca aatttgaaaa agacatcatt aaagccctgg aaaacatcgt actgctggac 300  
 gaaaacaaaa agaacaatc tgacctgcac gcaaccgctc tgtctttccg tctgctgcgt 360  
 cagcacggtt tcgaggtttc tcaggatgtt ttgagcgtt tcaaggataa agaagggtgt 420  
 ttccagcggtg aactgaaagg tgacgtccaa ggctgtctga gcctgtatga agcgtcttac 480  
 ctgggtttcg aggttgagaa cctgctggag gaggcgcgta ccttttccat caccacctg 540

aagaacaacc tgaagaagg cattaatacc aagttgcag aacaagttag ccacgccctg 600  
 gaactgcca atcaccagcg tctgcaccgt ctggaggcac gttggttcct ggataaatac 660  
 gaaccgaaag aaccgcatca ccagctgctg ctggagctgg cgaagctgga ttttaacatg 720  
 gtacagacc tgcaccagaa agagctgcaa gatctgtccc gctggtggac cgagatgggc 780  
 ctggctagca aactggattt tgtacgcgac cgcctgatgg aagtttattt ctgggcactg 840  
 ggtatggcgc cagaccgcga gtttggtgaa tgcgcaaag ctgttactaa aatgtttggt 900  
 ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac gtttatggca ctctggacga actgcaactg 960

ttcaccgatg ctglagagcg ctgggacgtt aacgtatata acaccctgcc ggactatatg 1020  
 aaactgtgtt tcttgccact gtacaacacc gtttaacgaca cgtcttatc tattctgaaa 1080  
 gagaaaggtc ataacaacct gtcctatctg acgaaaagct ggctggaact gtgcaaagcc 1140  
 tttctgcaag aggcgaaatg gtccaacaac aaaattatcc cggctttctc caagtacctg 1200  
 gaaaacgcca gcgtttctc ctccggtgta gcgtgctgg cgccgtctta cttttccgta 1260  
 tgccagcagc aggaagacat ctccgaccac gcgtgctgtt ccctgaccga ctccatggt 1320

ctggtgcgtt ctactgcgt tatcttccgc ctgtgcaacg atctggccac ctctgcggcg 1380

gagctggaac gtggcgagac taccaattct atcattagct acatgcacga aaacgatggt 1440

accagcgagg aacaggcccg cgaagaactg cgtaaactga tcgacgccga atggaaaaag 1500

atgaatcgtg aacgcgttag cgactccacc ctgctgccta aagcgttcat ggaaatcgca 1560

gttaaatcgtg cactgttttc ccaatgcacc taccagtatg gcgatgttct gggtcgccca 1620

gactacgcga ctgaaaaccg catcaaacctg ctgctgattg accctttccc gattaaccag 1680

ctgatgtatg tctaactgca g 1701

<210> 2

<211> 6080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggcg caccaatgct tctggcgta ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180

tgaatgagc ttttgacaat taatcatccg gctcgataaa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300

caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360

aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgtgtgc 420

gacctttct caatttactc agattaccga gcataattcc cgtcgttccg caaactatca 480

gccaaacctg tggaatttcg aattcctgca atccctggag aacgacctga aagtggaaaa 540

gctggaggag aaagcgacca aactggagga agaagtccg tgcatgatca accgtgtaga 600

caccagccg ctgtccctgc tggagctgat cgacgatgtg cagcgctgg gtctgacctc 660

caaatttgaa aaagacatca ttaaagccct ggaaaacatc gtactgctgg acgaaaacaa 720

aaagaacaaa tctgacctgc acgcaaccgc tctgtctttc cgtctgctgc gtcagcacgg 780

tttcgaggtt tctcaggatg tttttgagcg tttcaaggat aaagaagggtg gtttcagcgg 840

tgaactgaaa ggtgacgtcc aaggcctgct gagcctgtat gaagcgtctt acctgggttt 900

cgagggtgag aacctgctgg aggaggcgcg taccttttcc atcaccacc tgaagaacaa 960

cctgaaagaa ggcattaata ccaaggttgc agaacaagtg agccacgccc tggaactgcc 1020

atatcaccag cgtctgcacc gtctggaggc acgttggttc ctggataaat acgaaccgaa 1080

agaaccgcat caccagctgc tgctggagct ggccaagctg gatTTTaaca tggTAcagac	1140
cctgcaccag aaagagctgc aagatctgtc ccgctggTgg accgagatgg gcctggctag	1200
caaactggat tttgtacgcg accgcctgat ggaagtttat ttctgggcac tgggtatggc	1260
gccagacccg cagtttggTg aatgtcgaa agctgttact aaaatgtttg gtctggTgac	1320
gatcatcgat gacgtgtatg acgtttatgg cactctggac gaactgcaac tgttcaccga	1380
tgctgtagag cgctgggacg ttaacgctat taacaccctg ccggactata tgaaactgtg	1440
tttcttgga ctgtacaaca ccgttaacga cacgtcctat tctattctga aagagaaagg	1500
tcataacaac ctgtcctatc tgacgaaaag ctggcgtgaa ctgtgcaaag cttttctgca	1560
agaggcgaaa tggTccaaca acaaaaattat cccggctttc tccaagtacc tggaaaacgc	1620
cagcgTttcc tcttccggtg tagcgtgtct ggcgccgtct tacttttccg tatgccagca	1680
gcaggaagac atctccgacc acgcgtgtcg ttcctgacc gacttccatg gtctggTgcg	1740
ttctagctgc gttatcttcc gcctgtgcaa cgatctggcc acctctgcgg cggagctgga	1800
acgtggcgag actaccaatt ctatcattag ctacatgcac gaaaacgatg gtaccagcga	1860
ggaacaggcc cgcgaagaac tgcgtaaact gatcgacgcc gaatggaaaa agatgaatcg	1920
tgaacgcgtt agcgactcca ccctgtgcc taaagcgttc atggaaatcg cagttaacat	1980
ggcacgtgtt tcccactgca cctaccagta tggcgatggt ctgggtcgcc cagactacgc	2040
gactgaaaac cgcatcaaac tgctgtgat tgaccctttc ccgattaacc agctgatgta	2100
tgtctaactg cagctggTac catatgggaa ttcgaaagctt tctagaacaa aaactcatct	2160
cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg	2220
tctccagctt ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc	2280
agaacgcaga agcggTctga taaaacagaa ttTgcctggc ggCagtagcg cggTggtccc	2340
acctgacccc atgccgaact cagaagtgaac acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc	2400
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag	2460
actgggcctt tctttttatc tgtttttgt cggTgaacgc tctcctgagt aggacaaatc	2520
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg agggTggcgg gcaggacgcc	2580
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg	2640
cgTttctaca aactcttttt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgtcat	2700
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca	2760
acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctg tttttgctca	2820

cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta	2880
catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt	2940
tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc	3000
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc	3060
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtctgc	3120
cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa	3180
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga	3240
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat	3300
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca	3360
attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc	3420
ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat	3480
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag	3540
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa	3600
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca	3660
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc	3720
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc	3780
ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc	3840
agcgttggtt tgtttgccg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt	3900
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagttag ccgtagttag gccaccactt	3960
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	4020
tgccagtggc gataagtctg gtcttaccgg gtggactca agacgatagt taccgataa	4080
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac	4140
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggcacgc ttcccgaagg	4200
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga	4260
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact	4320
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg gggcgagagc ctatggaaaa acgccagcaa	4380
cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc	4440
gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgtcgc	4500
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggag agcgcctgat	4560

gcggtatttt ctccctacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag 4620  
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac 4680  
tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcc aaccccgctg acgcgccctg acgggcttgt 4740  
ctgctcccg gcatccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 4800  
aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg 4860  
aagcgcatg catttacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat 4920  
gatagcgccc ggaagagagt caattcaggg tggatgaatgt gaaaccagta acgttatacg 4980

atgtcgaga gtatgccgt gtctcttctc agaccgtttc ccgctgggtg aaccaggcca 5040  
gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca 5100  
ttccaacgc cgtggcaca caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca 5160  
cctccagtct ggcctgcac gcgcctgcg aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgcg 5220  
atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta 5280  
aagcggcgtg gcacaatctt ctgcgcgaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc 5340  
tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatctc 5400

ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatctt ctcccatgaa gacggtagcg 5460  
gactgggcgt ggagcatctg gtcgattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc 5520  
cattaagtctc tgctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcaactcga 5580  
atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac 5640  
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg ttccactgc gatgctggtt gccaacgac 5700  
agatggcgct gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtcagg gctgcgcgtt ggtgcggata 5760  
tctcggtagt gggatagcag gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgtcaacca 5820

ccatcaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct 5880  
ctcagggccg ggcggatgaag ggcaatcagc tgttgcccgt ctcaactggtg aaaagaaaaa 5940  
ccacctggc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc 6000  
agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg 6060  
agttagcgcg aattgatctg 6080

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 3



cgtagatca tatgtgtcgc acctcttctc aatttac	37
<210> 4	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 4	
cggtcgacgg atccctgcag ttagacatac atcagctg	38
<210> 5	
<211> 7404	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 5	
ttctcatgtt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaaa	60
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatcctcgg	120
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg ctgggttatg ccggtactgc cgggcctctt	180
gcgggatatc cggatatagt tctcctttc agcaaaaaac ccctcaagac cgttttagag	240
gccccaaagg gttatgctag ttattgctca gcggtggcag cagccaactc agcttccttt	300
cgggctttgt tagcagccgg atccctgcag ttagacatac atcagctggt taatcgggaa	360
agggtcaatc agcagcagtt tgatgcggtt ttcagtcgcg tagtctgggc gaccagacc	420
atgccatac tggtaggtgc agtgggaaac acgtgccatg ttaactgcga ttccatgaa	480
cgcttttaggc agcagggtgg agtcgctaac gcgttcacga ttcattcttt tccattcggc	540
gtcgatcagt ttacgcagtt cttcgcgggc ctgttcctcg ctggtaccat cgttttcgtg	600
catgtagcta atgatagaat tggtagtctc gccacgttcc agtccgcgcg cagaggtggc	660
cagatcgttg cacaggcgga agataacgca gctagaacgc accagaccat ggaagtcggt	720
cagggaacgc agcgcgtggt cggagatgtc ttctgtctgc tggcatacgg aaaagtaaga	780
cggcgccagc agcgctacac cggaggagga aacgtggcg ttttcaggt acttgagaa	840
agccgggata atttgttgt tggaccattt cgctcttgc agaaaggctt tgcacagttc	900
acgccagctt ttcgtcagat aggacagtt gttatgacct ttctctttca gaatagaata	960
ggacgtgtcg ttaacggtgt tgtacagtgc caggaaacac agtttcatat agtccggcag	1020

gggtgtaata gcgttaacgt cccagcgcgc tacagcatcg gtgaacagtt gcagttcgtc	1080
cagagtgccaa taaacgtcat acacgtcatc gatgatcgtc accagaccaa acattttagt	1140
aacagctttg cgacattcac caaactgcgg gtctggcgcc ataccagtg cccagaaata	1200
aacttccatc aggcggctgc gtacaaaatc cagtttgcta gccaggccca tctcgggtcca	1260
ccagcgggac agatcttgca gctctttctg gtgcagggtc tgtaccatgt taaaatccag	1320
cttcgccagc tccagcagca gctggtgatg cgtttcttcc ggttcgtatt tatccaggaa	1380
ccaacgtgcc tccagacggt gcagacgcig gtgatatggc agttccaggg cgtggctcac	1440
ttgttctgca accttgggat taatgccttc tttcaggttg ttcttcaggt gggatgatgga	1500
aaaggtaacg gcctcctcca gcaggttctc accctcgaaa cccaggtaag acgttcata	1560
caggctcagc aggccttggg cgtcaccttt cagttcaccg ctgaaaccac cttctttatc	1620
cttgaaacgc tcaaaaacat cctgagaaac ctcgaaaccg tgcagacgca gcagacggaa	1680
agacagagcg gtgcgtgca ggtcagattt gttctttttg ttttcgtcca gcagtacgat	1740
gttttccagg gctttaatga tgtcttttcc aaattttagt gtcagacca ggcgctgcac	1800
atcgtcgatc agctccagca gggacagcgg ctgggtgtct acacggttga tcatgcagcg	1860
aacttcttcc tccagtttgg tcgctttctc ctccagcttt tccactttca ggtcgttctc	1920
cagggattgc aggaattcga aattccacag gtttggctga tagtttgcgg aacgacggga	1980
attatgctcg gtaatctgag taaattgaga agaggtcgca cacatatgac gaccttcgat	2040
atggccgctg ctgtgatgat gatgatgatg atgatgatga tggcccatgg tatatctcct	2100
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagag gggaattgtt atccgctcac aattccccta	2160
tagtgagtgc tattaatttc gcgggatcga gatctcgatc ctctacgccg gacgcatcgt	2220
ggccggcatc accggcgcca caggcgcggt tgcctggcgcc tatacgcgcc acatcaccga	2280
tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct tgtttcggcg tgggtatggt	2340
ggcaggcccc gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc	2400
ggcggcgggtg ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttcctaatgc aggagtgcga	2460
taaggagag cgctcgatgc ccggacacca tcgaatggcg caaaaccttt cgcggtatgg	2520
catgatagcg cccggaagag agtcaattca ggttggtgaa tgtgaaacca gtaacgttat	2580
acgatgtcgc agagtatgcc ggtgtctctt atcagaccgt ttcccgcgtg gtgaaccagg	2640
ccagccacgt ttctgcgaaa acgcgggaaa aagtggaagc ggcatggcg gagctgaatt	2700
acattcccaa ccgcgtggca caacaactgg cgggcaaaca gtcgttgctg attggcgttg	2760
ccacctccag tctggccctg cagcgccgt cgcaaattgt cgcggcgatt aaatctcgcg	2820
ccgatcaact gggtgccagc gtgggtggtg cgatggtaga acgaagcggc gtcgaagcct	2880

gtaaagcggc ggtgcacaat cttctcgcgc aacgcgtcag tgggctgac attaatatc	2940
cgctggatga ccaggatgcc attgctgtgg aagctgcctg cactaatgtt ccggcggtat	3000
ttcttgatgt ctctgaccag acacccatca acagtattat tttctcccat gaagacggta	3060
cgcgactggg cgiggagcat ctggctcgc tgggtcacca gcaaatcgcg ctgttagcgg	3120
gcccattaag ttctgtctcg gcgcgtctgc gtctggctgg ctggcataaa tatctcactc	3180
gcaatcaaat tcagccgata gcggaacggg aaggcgactg gagtgccatg tccggttttc	3240
aacaaacct gcaaatgctg aatgagggca tcgttccac tgcgatgctg gttgccaacg	3300
atcagatggc gctgggcgca atgcgcgcca ttaccgagtc cgggctgcgc gttggtgcgg	3360
atatctcggt agtgggatac gacgataccg aagacagctc atgttatatc ccgccgttaa	3420
ccaccatcaa acaggatttt cgcctgctgg ggcaaaccag cgtggaccgc ttgctgcaac	3480
tctctcaggg ccaggcggtg aagggaatc agctgttgcc cgtctcactg gtgaaaagaa	3540
aaaccacctt ggcgccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgcc gattcattaa	3600
tgcagctggc acgacaggtt tcccactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat	3660
gtaagttagc tcaactatta ggcaccggga tctcgaccga tgccttgag agccttcaac	3720
ccagttagct ccttccggtg ggcgcggggc atgactatcg tcgccgact tatgactgtc	3780
ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg ccggcagcgc tctgggtcat ttccggcgag	3840
gaccgctttc gctggagcgc gacgatgac ggctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg	3900
cacgcctcgc ctcaagcctt cgtcactggt cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag	3960
gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcg ctgggctacg tcttctggc gttcgcgacg	4020
cgaggctgga tggccttccc cattatgatt cttctcgtt ccggcggcat cgggatgccc	4080
gcgttgacgg ccatgctgtc caggcaggta gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga	4140
tcgtcgcgg ctcttaccag cctaacttcg atcactggac cgtgatcgt cacggcgatt	4200
tatgccgcct cggcgagcac atggaacggg ttggcatgga ttgtaggcgc cgcctatac	4260
cttgtctgcc tccccgcgtt gcgtcgcgtt gcatggagcc gggccacctc gacctgaatg	4320
gaagccggcg gcacctcgt aacggattca cactccaag aattggagcc aatcaattct	4380
tgccggagaac tgtaatgcg caaaccaacc ctggcagaa cataccatc gcgtccgcca	4440
tctccagcag ccgcacgcgg cgcctctcgg gcagcgttgg gtcttgccca cgggtgcgca	4500
tgatcgtgct ccgtcgttg aggaccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc	4560
agaatgaatc accgatacgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaa acgtctgcga	4620
cctgagcaac aacatgaatg gtcttcggtt tccgtgttcc gtaaagtctg gaaacgcgga	4680
agtcagcgcc ctgcaccatt atgttccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct	4740

gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc gctggcattg accctgagtg atttttctct	4800
ggccccgcg catccataacc gccagttgtt tacctcaca acgttccagt aaccgggcat	4860
gttcacatc agtaaccggt atcgtgagca tctctctcgt tttcatcggt atcattaccc	4920
ccatgaacag aaatccccct tacacggagg catcagtgac caaacaggaa aaaaccgccc	4980
ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga cattaacgt tctggagaaa ctcaacgagc	5040
tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgt gatgagcttt	5100
accgcagctg cctcgcgct ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc	5160
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg	5220
cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgaatagc	5280
gagtgatatac tggtttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat	5340
atgcggtgtg aaataaccga cagatgcgta aggagaaaa accgcatcag gcgctcttcc	5400
gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	5460
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	5520
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctttgct ggcgtttttc	5580
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	5640
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	5700
cctgttccga cctgccgct taccggatac ctgtccgctt tctcccttc gggaagcgtg	5760
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	5820
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgccttacc cggtaactat	5880
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	5940
aggattagca gagcgaggta tgtaggcgt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac	6000
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc	6060
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt	6120
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	6180
ttttctacgg ggctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggt tttggcatg	6240
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca	6300
atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtaggca	6360
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag	6420
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac	6480

ccacgtcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 6540  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 6600  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc 6660  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 6720  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgac 6780  
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 6840  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 6900

tcatctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat 6960  
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 7020  
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 7080  
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 7140  
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc 7200  
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 7260  
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaataa ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagt 7320

ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 7380  
acgaggccct ttcgtcttca agaa 7404

<210> 6  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR Primer  
<400> 6  
catatgaaag ctgtatcga ttaaataagg aggaataaac c 41  
<210> 7  
<211> 6266  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic Construct  
<400> 7  
cccgtcttac tgcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt 60  
ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcaatcatt 120  
aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg 180

gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gtatcgatta	240
aataaggagg aataaacat gtgtgcgacc tcttctcaat ttactcagat taccgagcat	300
aattcccgtc gttccgcaaa ctatcagcca aacctgtgga atttcgaatt cctgcaatcc	360
ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg gaggagaaag cgaccaaact ggaggaagaa	420
gttcgctgca tgatcaaccg tgtagacacc cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac	480
gatgtgcagc gcctgggtct gacctacaaa tttgaaaaag acatcattaa agccctggaa	540
aacatcgtag tgctggacga aaacaaaaag aacaaatctg acctgcacgc aaccgctctg	600
tctttccgtc tgctgcgtca gcacggtttc gaggtttctc aggatgtttt tgagcgtttc	660
aaggataaag aagggtggtt cagcggtgaa ctgaaagggt acgtccaagg cctgctgagc	720
ctgtatgaag cgtcttacct gggtttcgag ggtgagaacc tgctggagga ggccgctacc	780
ttttccatca cccacctgaa gaacaacctg aaagaaggca ttaataccaa ggttgcagaa	840
caagtgagcc acgccctgga actgccatat caccagcgtc tgcaccgtct ggaggcacgt	900
tggttccctgg ataaatacga accgaaagaa ccgcatacc agctgctgct ggagctggcg	960
aagctggatt ttaacatggt acagacctg caccagaaag agctgcaaga tctgtcccgc	1020
tggtggaccg agatgggctt ggctagcaaa ctggattttg tacgcgaccg cctgatggaa	1080
gtttatttct gggcactggg tatggcgcca gacccgcagt ttggtgaatg tcgcaaagct	1140
gttactaaaa tgtttggctt ggtgacgac atcgatgacg tgtatgacgt ttatggcact	1200
ctggacgaac tgcaactgtt caccgatgct gtagagcgtt gggacgttaa cgctattaac	1260
acctgccgg actatatgaa actgtgtttc ctggcactgt acaacaccgt taacgacacg	1320
tcctattcta ttctgaaaga gaaaggatcat aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg	1380
cgtgaactgt gcaaagcctt tctgcaagag gcgaaatggt ccaacaaca aattatcccg	1440
gctttctcca agtacctgga aaacgccagc gtttctctct ccggtgtagc gctgctggcg	1500
ccgtcttact ttccgtagt ccagcagcag gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc	1560
ctgaccgact tccatggtct ggtgcgttct agctgcgtta tcttccgct gtgcaacgat	1620
ctggccacct ctgcggcgga gctggaacgt ggcgagacta ccaattctat cattagctac	1680
atgcacgaaa acgatggtac cagcgaggaa caggcccgcg aagaactgcg taaactgac	1740
gagccgaat ggaaaaagat gaatcgtgaa cgcgttagcg actccacct gctgcctaaa	1800
gcgttcatgg aaatcgcat taacatggca cgtgtttccc actgcaccta ccagtatggc	1860
gatggtctgg gtcgcccaga ctacgcgact gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac	1920
cctttccga ttaaccagct gatgtatgtc taactgcagg tcgactctag aggatccccg	1980
ggtaccgagc tcgaattcac tggccgtcgt tttaaacgt cgtgactggg aaaacctgg	2040

cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga	2100
agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca gttagcgagc ctgaatggcg aatggcgctt	2160
gatgcggtat tttctcetta cgcactcttg cggtatttca caccgcatat ggtgcactct	2220
cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc	2280
tgacgagctt agtaaagccc tcgctagatt ttaatgcgga tgttgcgatt acttcgcca	2340
ctattgcgat aacaagaaaa agccagcctt tcatgatata tctcccaatt tgtgtagggc	2400
ttattatgca cgcttaaaaa taataaaagc agacttgacc tgatagttag gctgtgagca	2460
attatgtgct tagtgcactt aacgcttgag ttaagccgag ccgcaagcg gcgtcggtt	2520
gaacgaattg ttagacatta ttgcccact accttggtga tctcgcttt cacgtatgg	2580
acaaattctt ccaactgatc tgcgcgcgag gccaaagcat cttcttcttg tccaagataa	2640
gcctgtctag cttaagtat gacgggctga tactgggccc gcaggcgctc cattgcccag	2700
tcggcagcga catccttcgg cgcatcttg ccggttactg cgctgtacca aatgcgggac	2760
aacgtaagca ctacatttcg ctcatcgcca gccagtcgg gcggcgagtt ccatagcgtt	2820
aaggtttcat ttagcgctc aaatagatcc tgttcaggaa ccgcatcaaa gagttcctcc	2880
gccgctggac ctaccaaggc aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagca gatagccaga	2940
tcaatgtcga tcgtggctgg ctgcaagata cctgcaagaa tgtcattgag ctgccattct	3000
ccaaattgca gttagcgctt agctggataa cgccacggaa tgatgtcgtc gtgcacaaca	3060
atggtgactt ctacagcgag gagaatctcg ctctctccag gggaaagcga agtttccaaa	3120
aggtcgttga tcaaagctcg ccgctgtgtt tcatcaagcc ttacgggtcac cgtaccagc	3180
aaatcaatat cactgtgtgg cttaggccc ccatccactg cggagccgta caaatgtacg	3240
gccagcaacg tcggttcgag atggcgctcg atgacgcaa ctacctctga tagttgagtc	3300
gatacttcgg cgatcacgcg ttccctcatg atgtttaact ttgttttagg gcgactgccc	3360
tgctgcgtaa catcgttgct gctccataac atcaaacatc gaccacggc gtaacgcgt	3420
tgctgcttgg atgcccagg catagactgt accccaaaaa aacagtcata acaagccatg	3480
aaaaccgcca ctgcgccgtt accaccgtg cgttcggtca aggttctgga ccagttgcgt	3540
gagcgcatc gctacttgca ttacagctta cgaaccgaac aggcctatgt cactgggtt	3600
cgtgccttca tccgtttcca cgggtgtgct caccggaac ccttgggcag cagcgaagtc	3660
gaggcatttc tgcctggct ggcaacgag cgcaaggttt cggctccac gcatcgtcag	3720
gcattggcgg ccttgctgtt cttctacggc aaggtgctgt gcacggatct gccctggctt	3780

caggagatcg gaagacctcg gccgtcgcgg cgcttgccgg tggctgtgac cccggatgaa	3840
gtggttcgca tcctcggttt tctggaaggc gagcatcggt tgttcgcca gcttctgtat	3900
ggaacgggca tgcggatcag tgagggtttg caactgcggg tcaaggatct ggatttcgat	3960
cacggcacga tcatcgtcgc ggagggaag ggctccaagg atcgggcctt gatgttacct	4020
gagagcttgg caccagcct gcgcgagcag gggaattaat tcccacgggt ttgtctgccc	4080
gcaaacgggc tgttctggtg ttgctagttt gttatcagaa tcgcagatcc ggcttcagcc	4140
ggtttgccgg ctgaaagcgc tatttcttcc agaattgcca tgatttttc cccacgggag	4200
gcgtcactgg ctcccggtt gtcggcagct ttgattcgat aagcagcatc gcctgtttca	4260
ggctgtctat gtgtgactgt tgagctgtaa caagtgtct cagggtttca atttcatgtt	4320
ctagtgtctt tgttttactg gtttcacctg ttctattagg tgttacatgc tgttcatctg	4380
ttacattgtc gatctgttca tggatgaacag ctttgaatgc accaaaaact cgtaaaagct	4440
ctgatgtatc tatctttttt acaccgtttt catctgtgca tatggacagt ttccctttg	4500
atatgtaacg gtgaacagtt gttctacttt tgtttgttag tcttgatgct tcaactgatag	4560
atacaagagc cataagaacc tcagatcctt ccgtatttag ccagtatgtt ctctagtgtg	4620
gttcgttgtt ttgctgtgag ccatgagaac gaaccattga gatcatactt actttgcatg	4680
tcaactcaaaa atttgcctc aaaactggtg agctgaattt ttgcagttaa agcatcgtgt	4740
agtgtttttc ttagtccgtt atgtaggtag gaatctgatg taatggttgt tggatatttg	4800
tcaccattca tttttatctg gttgttctca agttcggtta cgagatccat ttgtctatct	4860
agttcaactt ggaaaatcaa cgtatcagtc gggcggcctc gcttatcaac caccaatttc	4920
atattgctgt aagtgtttaa atctttactt attggtttca aaaccattg gttaaagcctt	4980
ttaaactcat ggtagtattt ttcaagcatt aacatgaact taaattcacc aaggctaate	5040
tctatatttg ccttgtgagt tttcttttgt gttagttctt ttaataacca ctcataaate	5100
ctcatagagt atttgttttc aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaatttt	5160
tttaactgga aaagataagg caatatctct tcaactaaaa ctaattctaa tttttcgtt	5220
gagaacttgg catagtgtgt ccactggaaa atctcaaagc ctttaaccaa aggattcctg	5280
atttccacag ttctcgtcat cagctctctg gttgcttttag ctaatacacc ataagcattt	5340
tcctactga tgttcatcat ctgagcgtat tggttataag tgaacgatac cgtccgttct	5400
ttccttgtag ggttttcaat cgtggggttg agtagtgcca cacagcataa aattagcttg	5460
gtttcatgct ccgttaagtc atagcgacta atcgctagtt catttgcttt gaaaacaact	5520



aattcagaca tacatctcaa ttggcttagg tgattttaat cactatacca attgagatgg 5580  
gctagtcaat gataattact agtccttttc ctttgagtgg tgggtatctg taaattctgc 5640  
tagacctttg ctggaaaact tgtaaattct gctagaccct ctgtaaatc cgctagacct 5700  
ttgtgtgttt tttttgttta tattcaagtg gttataattt atagaataaa gaaagaataa 5760  
aaaaagataa aaagaataga tcccagccct gtgtataact cactacttta gtcagttccg 5820  
cagtattaca aaaggatgtc gcaaacgtg tttgtcctc tacaaaacag accttaaac 5880  
cctaaaggct taagtagcac cctcgcaagc tcgggcaaat cgctgaatat tccttttgc 5940

tccgaccatc aggcacctga gtcgtgtct ttttcgtgac attcagttcg ctgcgtcac 6000  
ggctctggca gtgaatgggg gtaaatggca ctacaggcgc cttttatgga ttcattgcaag 6060  
gaaactaccc ataatacaag aaaagcccg caggggcttc tcagggcgtt ttatggcggg 6120  
tctgctatgt ggtgctatct gactttttgc tgttcagcag ttctgcctc ctgattttcc 6180  
agtctgacca cticggatta tcccgtaga ggtcattcag actggctaata gcaccagta 6240  
aggcagcggg atcatcaaca ggctta 6266

<210> 8

<211> 1695

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 8

atgtgtgcaa cctcctccca gtttactcag attaccgagc ataattctcg acgatctgct 60  
aactaccagc cgaacctttg gaactttgag tttctccagt ctctcgaaaa tgacctgaag 120  
gtggaaaagc tcgaggagaa ggcgaccaa ctcgaggagg aggtgcatg tatgatcaac 180  
agagttgaca cccaaccct gtctttgctg gagctgatcg acgatgtgca gcggttgggt 240  
ttgacttata aattcgagaa ggacattatc aaggcactgg agaacattgt gtcctcgcac 300  
gagaacaaga agaacaagc tgatcttcac gctaccgctc tctctttccg acttcttcga 360

caacacggct tcgagggtgc gcaggacgtc ttcgagagat ttaaggacaa ggaggaggga 420  
tttagcggcg agctgaaggg agacgttcag ggtcttctct cttgtacga ggcgtcctac 480  
ctgggattcg agggagagaa cctcctggag gaagctcgta cattttccat cactcacctt 540  
aagaataacc ttaaggaggg aattaacacc aagggtggcg agcaggtttc tcacgcctg 600  
gagctccct accaccaacg gctccataga ctggaggctc gttggttcct ggacaaatat 660  
gagccaaagg agcctcatca tcagttgctg ttggagtgg ccaagctgga cttcaatatg 720  
gttcagacgc tgcacaaaaa ggagttgcag gacctgtctc gatggtggac cgagatggga 780

ttggcctcga agctggattt tgtccgtgac cgacttatgg aggtctatctt ttgggcctt 840  
 ggaatggcgc ctgaccccca gtccggagag tgccggaagg cggtagacga gatgttcggt 900  
 ctgtgacta tcatcgacga cgtctacgat gtctacggca cactcgacga gtgacagctg 960  
 ttactgacg ccgtcgagcg atgggatgtg aacgccatta atactctccc tgactatatg 1020  
 aagctgtgct tcttggctct gtacaacact gtcaacgata cctcgtactc tatectcaag 1080  
 gagaaggac acaacaatct ctctacttg accaaatcct ggcgagaact gtgcaaggct 1140  
 ttctgcagg aggctaaatg gtccaataac aagatcattc ctgctttttc taaatacctg 1200

gaaaatgcct cggtagtcgag ctctggcgtc gcccttcttg ccccttecta ctctccgtc 1260  
 tgccagcagc aggaggatat ttccgatcat gctcttagat cgctgaccga ttttcacggc 1320  
 ctctgctgat ctctctgctg gatttttcgg ttgtgtaatg acctgacga ctctgctgct 1380  
 gagctggaac gaggcgagac tacaaattcc attatttctt acatgcacga aaacgatgga 1440  
 acatctgaag aacaggctag agaggaactg cgaaagtga tcgacgccga gtggaagaag 1500  
 atgaacagag agcgggtgtc cgactctacc ctgcttccca aggccttcac ggagatcgcc 1560  
 gtgaacatgg ctcgagtctc ccattgtact taccagtacg gtgacggcct gggtcgtccg 1620

gactacgcta cagagaaccg aatcaagctg ctgctcatcg accccttccc tatcaacaa 1680  
 ttgatgtacg tgtaa 1695

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 9

gcttatggat ccctagact attacacgta catcaattgg 40

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 10

caccatgtgt gcaacctcct cccagtttac 30

<210> 11

<211> 8190

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

tcgaccggtg agaagaacag catcgggaca agggaaggaa gaacaaagac aaagaaaaca	60
aaagaaagca attgaaaaca aaacaaaaca attttcattc cttctcttat cattcctttt	120
cttttctttt ctctcattca acgcactcca tcgtatccgt attcctctta tttttctct	180
ttctctatat ccatttcttt ctctctaggt gtgtcctctc tctctcttca atttctctac	240
tccgcattcc aacgcatacct tcccccaacc tcccatttcc tccttacggc ccgatagcga	300
tcgtctttcc ctgctatca ctgctaccg gccctctctc tgcaccgtaa cctcctacgt	360
atttaccata tcataaagtt ttttccgacg cttatcgtg accccctgtc gccctctat	420
tggtttccgg attatcttct tgtccataag gtgatccatg cttcctgaag attcccgaaa	480
tgtgtccact ttggcgggga atcattccat ccatttcttt ctctctcgct ttctcattc	540
ggcgctcccc ttccgctct catttggtctt ccgctccgtt tttgctttgc cgatgttact	600
tggggagagg tgcgataatc ctttcgcaaa aactcggttt gacgcctccc atggataaaa	660
tagtggttgg tggacaggtg ctttcgcttt tctttaagca agagaatccc attgtcttga	720
ctatcacgaa ttcacataca ttatgaagat caccgtgtc attgcccttt tattctcact	780
tgtctgtgcc tcacctattc cagttgccga tcttgggtgtg gtttcagtta gcaagtcata	840
tgtctgattc cttcgtgttt accaaagttg gaacactttt gctaatectg atagacccaa	900
ccttaagaag agaaatgata cacctgcaag tggatatcaa gttgaaaaag tcgtaatttt	960
gtcacgtcac gggttaggg cccctacaaa aatgactcaa accatgcgtg atgtcactcc	1020
taatacatgg ccagaatggc ccgttaaat aggatatatt acaccaagag gtgaacactt	1080
gatatacatt atgggcgggtt ttaccgtca aaaattccag caacaaggaa tcctttctca	1140
gggtcctgt cctactccta actccatata tgtctgggtg gacgtcgatc agcgtacttt	1200
aaaaactggt gaagcattcc ttgttggttt ggcaccacaa tgtggcttga caattcatca	1260
ccaacaaaat ctigagaaag ctgatcctct ttttcatccc gttaaagctg gaacctgctc	1320
tatggataaa actcaagttc aacaagctgt tgagaaggag gcacaaactc ctatagataa	1380
tttgaatcaa cattacatcc ctttttagc tttaatgaat acaacattaa attttagtac	1440
ttctgcctgg tgccaaaaac actctgctga taaatcctgt gacctaggtt tatccatgcc	1500
ttctaaattg tccataaaag ataatggtaa caaggtcgca ttggatggag ctattggtct	1560
atcctctact ttggccgaga tttttcttct tgaatatgct caaggcatgc ctcaagctgc	1620

ttgggtaac atccactcag agcaagagtg ggcttccttg ctaaagttgc ataattgtca	1680
attcgatttg atggcccgaa cacttatat tgctcgacat aacggtactc ctttattgca	1740
agctatatca aatgccctta atcccaacgc cactgaatca aaacttcag atatttcacc	1800
tgataacaaa atattgttca ttgcaggtca tgacacaaat attgctaata tagccggcat	1860
gttaaatatg cgttggacat taccaggtca accagataat actcctccag gtggtgccct	1920
agtatttgaa cgtcttgctg ataaaagtgg aaaacaatat gtttctgtat ctatggttta	1980
tcaaacacta gaacaacttc gatcacagac tcccccttct ctaaatcagc ctgccggatc	2040
tgttcaactt aaaattccag gttgcaatga tcaaacagcc gagggttact gtcctctttc	2100
cacttttaca agagtgtttt cccaatctgt tgaacctgga tgccaacttc aataatgagg	2160
atccaagtaa gggaatgaga atgtgatcca cttttaattc ctaatgaata catgcctata	2220
gttcttttct tttgttcttt atgtcgtttt tcgatggtac ggccgttgtc aatctcagtt	2280
tgtgtgcttg gttgcagctt ggtttcaaat ctgttcatct catgaatctt ttaccatttc	2340
accacacgtt tataccattc tctcatagaa tcttcatcaa accatctcgg ggtagagtg	2400
gaaagaaagt cttgttcttt tatttccttt ttccatctt caaggctttt cttttcttcc	2460
tcctcctcgt tcatcttgag gtttgacgtg tctgtttaga attttgagct gttgcagcat	2520
cttatTTTTT gttttgcgaa aacgaagcgc ttactctct tcatcagttg gacgattgta	2580
cctttgaaaa ccaactactt ttgcatgttt tgtatagaaa tcaatgatat tagaatccca	2640
tcctttaatt tctttcaag tagttgagct atagttaaagt gtaagggccc tactgcgaaa	2700
gcatttgcca aggatgtttt cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagacgatca	2760
gataccgtcg tagtcttaac cataaactat gccgactagg gatcgggcaa tgtttcattt	2820
atcgacttgc tcggcacctt acgagaaatc aaagtctttg ggttccgggg ggagtatggt	2880
cgcaaggctg aaacttaag gaattgacgg aagggcacca caatggagtg gagcctgcgg	2940
cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga catagtaagg attgacagat	3000
tgagagctct tcttgattc tatgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tgggtgagtg	3060
atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc tgctaaatag ctggatcagc	3120
cattttggct gatcattagc ttcttagagg gactattggc ataaagccaa tggaagtttg	3180
aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacactgac	3240
ggagccaacg agttgaaaaa aatcttttga ttttttatcc ttggccggaa ggtctgggta	3300
atcttgtaa actccgtcgt gctggggata gagcattgca attattgcgg ccgctcctca	3360
attcgatgtt gcagatttta caagttttta aaatgtatit cattattact ttttatatgc	3420
ctaataaaaa agccatagtt taatctatag ataacttttt ttccagtgc ctaacggacg	3480

ttacattccc atacaaaact gcgtagttaa agctaaggaa aagttaatat catgttaatt	3540
aaatacgcta tttaacaata gacattgaac tcatttatat cgttgaatat gaataaccaa	3600
tttcagcgaa tttttaacaa acatcgttca cctcgtttaa ggatatcttg tgtatggggt	3660
gttgacttgc tttatcgaat aattaccgta cctgtaattg gcttgctgga tatagcggta	3720
gtctaataatc tagcaaaaaat cttttgggtg aaaaggcttg caatttcacg acaccgaact	3780
atttgcatt ttttaataag gaagttttcc ataaattcct gtaattctcg gttgatctaa	3840
ttgaaaagag tagttttgca tcacgatgag gagggctttt gtagaaagaa atacgaacga	3900
aacgaaaatc agcgttgcca tcgctttgga caaagctccc ttacctgaag agtcgaattt	3960
tattgatgaa cttataactt ccaagcatgc aaacaaaaag ggagaacaag taatccaagt	4020
agacacggga attggattct tggatcacat gtatcatgca ctggctaacc atgcaggctg	4080
gagcttacga ctttactcaa gaggtgattt aatcatcgat gatcatcaca ctgcagaaga	4140
tactgtctatt gcacttggtg ttgcattcaa gcaggctatg ggtaactttg cggcggttaa	4200
aagatttgga catgcttatt gtccacttga cgaagctctt tctagaagcg tagttgactt	4260
gtcgggacgg cctatgctg ttatcgattt gggattaaag cgtgaaaagg ttggggaatt	4320
gtcctgtgaa atgatccctc acttactata ttcttttcg gtagcagctg gaattacttt	4380
gcatgttacc tgcttatatg gtagtaatga ccatcatcgt gctgaaagcg cttttaaatc	4440
tctggctgtt gccatgcgcg cggctactag tcttactgga agttctgaag tcccaagcac	4500
gaagggagtg ttgtaaagat gaattggatt atgtcaggaa aagaacgaca attttgcac	4560
caaattgtct aaattttaga gttgcttgaa aacaatagaa ctttacttgc tttataatta	4620
cgttaattag aagcgttacc tcgtgaagga atatagtacg tagccgtata aattgaattg	4680
aatgttcagc ttatagaata gagacacttt gctgttcaat gcgtcgtcac ttaccatact	4740
cactttatta tacgacttta agtataaact ccgcggttat ggtaaaatta atgatgcaca	4800
aacgtccgat tccatatggg tactactaaa ttaataactt ttaagctgat cccccacaca	4860
ccatagcttc aaaaatgttc tactcctttt ttactcttcc agattttctc ggactccgcg	4920
catcgccgta ccacttcaaa acaccaagc acagcatact aaattttccc tctttcttcc	4980
tctagggtgt cgtaattac ccgtactaaa ggtttggaaa agaaaaaaga gaccgcctcg	5040
tttctttttc ttcgtcgaaa aaggcaataa aaatttttat cacgtttctt tttcttgaaa	5100
tttttttttt tagttttttt ctctttcagt gacctcatt gatatttaag ttaataaacg	5160
gtcttcaatt tctcaagttt cagtttcatt tttcttggtc tattacaact tttttactt	5220
cttggttcatt agaaagaaag catagcaatc taatctaagg gcggtgttga caattaatca	5280

tcggcatagt atatcgcat agtataatac gacaaggtga ggaactaaac catggccaag	5340
ttgaccagtg ccgttccggt gctcaccgcg cgcgacgtcg ccggagcggg cgagtcttgg	5400
accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccgg tgtggtccgg	5460
gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tggcgccgga caacaccctg	5520
gcctgggtgt gggcgcgcgg cctggacgag ctgtacccg agtggtcgga ggtcgtgtcc	5580
acgaacttcc gggacgcctc cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg	5640
cgggagttcg ccctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag	5700
gactgacacg tccgacggcg gccacgggt cccaggcctc ggagatccgt ccccttttc	5760
ctttgtcgat atcatgtaat tagttatgtc acgcttacat tcacgcctc cccccacatc	5820
cgctctaacc gaaaaggaag gagttagaca acctgaagtc taggtcccta tttatTTTT	5880
tatagttagt ttagtattaa gaacgttatt tatattcaa atttttcttt tttttctgta	5940
cagacgcgag ctccccagta aatgtgccat ctctaggca gaaaacggtt cccccgtagg	6000
gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctagggggg	6060
ctcacacat aggcagataa cggtccccc cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc	6120
tcccaaagat cctaggcggg attttccga tttcggccta aaggaaccgg aacacgtaga	6180
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga	6240
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat	6300
agctagactg ggcggtttta tggacagca gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt	6360
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct	6420
gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcattggtg	6480
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg	6540
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgagg	6600
ggcggccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg	6660
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg	6720
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tatgggcga agtgccgggg caggatctcc	6780
tgtcatctcg ccttgtcct gccagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc	6840
tgcatagct tgatccggtt acctgccc atcgaccacca agcgaaacat cgcacgagc	6900
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc	6960
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg	7020

atctctgctg gatccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct	7080
tttctggatt caacgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt	7140
tggatacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaatg ggctgaccgc ttctctgtgc	7200
tttacgggat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgccct ctatcgccct cttgacgagt	7260
tcttctgaat tgaaaaaggt accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact	7320
tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat	7380
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	7440
ttcttgagat ctttttttgc tgccgtaat ctgctgcttg caaacaataa aaccaccgct	7500
accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcga aggttaactgg	7560
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca	7620
cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	7680
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga	7740
taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	7800
gacctacac gaactgagat acctacagcg tgagcatga gaaagcgcca cgcttcccga	7860
aggagaaaag gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	7920
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg	7980
acttgagcgt cgatttttgt gatgctctgc agggggcgag agcctatgga aaaacgccag	8040
caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc	8100
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	8160
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcgagcga	8190
<210> 12	
<211> 1724	
<212> DNA	
<213> Yarrowia lipolytica	
<400> 12	
gaattcaaaa caaatgtgt gcaacctcct ccagttttac tcagattacc gagcataatt	60
ctcgacgac tgctaactac cagccgaacc ttgggaactt tgagttttct cagtctctcg	120
aaaatgacct gaaggtggaa aagctcgagg agaaggcgac caaactcgag gaggaggtgc	180
gatgtatgat caacagagtt gacaccaac cctgtcttt gctggagctg atcgacgatg	240
tcgagcggtt gggtttgact tataaattcg agaaggacat tatcaaggca ctggagaaca	300
ttgtgtcct cgacgagaac aagaagaaca agtctgatct tcacgctacc gctctctctt	360

tccgacttct tcgacaacac ggcttcgagg tgcgcagga cgtcttcgag agatttaagg 420  
acaaggaggg aggatttagc ggcgagctga agggagacgt tcagggtctt ctctccttgt 480  
acgaggcgtc ctacctggga ttcgagggag agaacctcct ggaggaagct cgtacatitt 540  
ccatcactca ccttaagaat aaccttaagg aggggaattaa caccaagggt gccgagcagg 600  
tttctcacgc cctggagctc ccctaccacc aacggctcca tagactggag gctcgttggt 660  
tcctggacaa atatgagcca aaggagcctc atcatcagtt gctgttggag ttggccaagc 720  
tggacttcaa taiggttcag acgtcgcacc aaaaggagtt gcaggacctg tctcgatggt 780

ggaccgagat gggattggcc tcgaagctgg attttgtccg tgaccgactt atggaggtct 840  
attttgggc ccttggaaat gcgcctgacc cccagtccgg agagtgccgg aaggcggatga 900  
cgaagatgtt cggctcttgc actatcatcg acgacgtcta cgatgtctac ggcacactcg 960  
acgagttgca gctgttctact gacgccgtcg agcgatggga tgtgaacgcc attaatactc 1020  
tccctgacta taigaagctg tgcttcctgg ctctgtacaa cactgtcaac gatacctcgt 1080  
actctatcct caaggagaag ggacacaaca atctctccta cttgaccaa tcttggcgag 1140  
aactgtgcaa ggcttttctg caggaggcta aatggtccaa taacaagatc attcctgctt 1200

tttctaataa ccigggaaaat gcctcgggtg cgagctctgg cgtcgccctt ctggccctt 1260  
cctacttctc cgtctgccag cagcaggagg atatttccga tcatgctctt agatcgtga 1320  
ccgattttca cggcctcgtg cgatcttctt gcgtgatttt tcggttgtgt aatgaccttg 1380  
cgacctctgc tgctgagctg gaacgaggcg agactacaaa ttccattatt tcttacatgc 1440  
acgaaaacga tggaacatct gaagaacagg ctagagagga actgcgaaag ttgatcgacg 1500  
ccgagtggaa gaagatgaac agagagcggg tgcgcgactc taccctgctt cccaaggcct 1560  
tcatggagat cgcctgaac atggctcgag tttccatttg tacttaccag tacggtgacg 1620

gcctgggtcg tccggaactac gctacagaga accgaatcaa gctgctgctc atcgaccctt 1680  
tccctatcaa ccaattgatg tacgtgtaat agtctagagg atcc 1724

<210> 13

<211> 1701

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

gaattcaaca aaaaatgtgt ctgtttccac tgagaacgtg tcttttactg agactgagac 60  
tgaagcacgt agaagcgcca actacgaacc caactcctgg gattatgact ttctgctgtc 120



ttctgacacc gacgagtcga tcgaggttta taaggataag gccaaagaaac ttgaggccga	180
ggtcagacga gagattaaca acgagaaggc cgagttcctg acccttcttg agctgatcga	240
caacgttcaa cgacttggtc ttggttaccg tttcgaatcc gatatccgac gtgcattgga	300
tcgatttgc tcgtccggag gtttcgatgg tgtgactaag acgtcgtgc acgccacagc	360
tctttccttc agactgttc ggcagcatgg atttgaggtt tcccaggaag cttttctg	420
tttcaaggat cagaacggaa actttttgga gaatctcaag gaggacacca aggccatcct	480
gtcgttgtat gaggcctcgt tcctggctct tgaggcgag aatattctgg atgaggctcg	540
ggttttcgt atttcgcacc tgaaggagtt gtcggaggaa aagatcggaa aggaactggc	600
cgagcaggtc aaccatgcac ttgaacttcc cctgcatcga cgtaccacgc gactggaggc	660
cgtgtggagc atcgaggcgt acagaaaaa ggaggatgct aatcaggttc tgctcgaact	720
cgctatcctc gactataaca tgattcagag cgtgtaccag cgtgacttgc gagagacaag	780
ccggtggtag cgacgggtgg gactggccac gaagctccac tttgctaaag atcgattgat	840
tgagtgttc tactgggcag tgggtgtggc ctttgagcct cagtactccg actgccgaaa	900
ctcgttgca aagatgtttt cttttgtcac tatcatcgc gacatctacg atgtttacgg	960
cactctcgat gaactcgaac tcttcacgga cgtgtcgcg cgatgggatg tgaatgcat	1020
taatgatctg ccagattata tgaagtgtg tttcttggcg ctctacaaca caattaatga	1080
aattgcctac gacaacctca aggacaaggg agagaacatt ctgccctacc ttactaaagc	1140
ctgggccgac ctgtgtaacg cttttttgca ggaagccaag tggctctata acaaacttac	1200
tcctacattt gatgactact tcggcaacgc ttggaagtct tccagcggcc ctctccagtt	1260
gatcttcgt tactttgcag tggccagaa catcaagaaa gaggagattg agaacctcca	1320
gaagtatcac gacatcatc cccgacctc gcacatcttt cgactgtgca atgaccttgc	1380
ctccgcatcc gctgagattg cccgaggaga aacagccaat tctgtgtcgt gttacatgcg	1440
tacaaagggc atctccgagg agctggctac cgagtctgtg atgaacctga tcgatgaaac	1500
ctgtaagaag atgaacaaag agaaactggg cggttctctg ttcgccaac catttgttga	1560
aaccgcgac aatctggctc gtcagtctca ttgtacttac cataacggtg acgcgcacac	1620
ttcgccggac gaattgacct gtaagcgtgt gctttcggtg attaccgagc cgatcctgcc	1680
gttcgaaaga taataggatc c	1701
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PCR Primer	
<400>	14	
gatcaagctt aaccggaatt gccagctg		28
<210>	15	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	15	
gatccgatcg tcagaagaac tcgtcaagaa ggc		33
<210>	16	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	16	
catcaatgca tcgcccttag gaggtaaaaa aaaatgac		38
<210>	17	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	17	
ccttctgcag gacgcgttgt tatagc		26
<210>	18	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	18	
gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgagtt ttgatattgc caaataccg		60
		60
<210>	19	

<211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 19  
 catgctgcag ttatgccagc caggccttga t 31  
 <210> 20  
 <211> 8803  
 <212> DNA  
 <  
 213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 20  
 gctggtacca tatgggaatt cgaagctttc tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc 60  
 tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt ttaaaccgtc tccagcttgg 120  
 ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 180  
 cggctcgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtgggccac ctgaccccat 240  
 gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc ccatggtagt gtggggtctc cccatgcgag 300  
 agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc 360  
 gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 420  
 atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccgag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg 480  
 ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa 540  
 ctctttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc ggaattgcca 600  
 gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag cctgcaaag taaactggat ggctttctcg 660  
 ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgac aagagacagg atgaggatcg 720  
 ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 780  
 ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 840  
 ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 900  
 gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca 960  
 gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 1020  
 gggcaggatc tctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga aagtatccat catggtgat 1080  
 gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaag 1140

catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg	1200
gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg	1260
cccgaaggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcatgcct gcttgccgaa tatcatggtg	1320
gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat	1380
caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac	1440
cgcttcctcg tgccttacgg tategccgt cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc	1500
cttcttgacg agttcttctg acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttcactg	1560
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt	1620
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggttttgtt tgccggatca	1680
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgaga taccaaatac	1740
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac	1800
atacctcgt ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct	1860
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg	1920
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca	1980
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt	2040
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcttgta	2100
tctttatagt ccgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc	2160
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc	2220
cttttctgg ccttttctc acatgttctt tctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa	2280
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgtcgcgcg agccgaacga ccgagcgag	2340
cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatt	2400
gtgcggtatt tcacaccga tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata	2460
gttaagccag tatacactcc gctatcgta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac	2520
ccgcaaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgtttacaga	2580
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacctc atcacgaaa	2640
cgcgcgaggc agcagatcaa ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca	2700
ccatgaatg gtgcaaaacc tttcgggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat	2760
tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgtgt cgcagagtat gccggtgtct	2820
cttatcagac cgtttccgc gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg	2880

aaaaagtgga agcggcgatg gcgagctga attacattcc caaccgctg gcacaacaac	2940
tggcgggcaa acagtctgtg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc	3000
cgtcgcaaat tgtcgggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg	3060
tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg	3120
cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg	3180
tggaagctgc ctgcactaat gtccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca	3240
tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg	3300
cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggccatt aagtctctgc tcggcgctc	3360
tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaa	3420
gggaaggcga ctggagtcc atgtccggtt ttcaacaac catgcaaatg ctgaatgagg	3480
gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg	3540
ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata	3600
ccgaagacag ctcatgttat atcccgcgt caaccacat caaacaggat ttctgcctgc	3660
tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaaggga	3720
atcagctgtt gccgctctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa	3780
ccgcctctcc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	3840
tggaaagcgg gcagtgcgc caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctggttt	3900
gacagcttat catgcactgc acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca gccatcggaa	3960
gctgtggtat ggctgtgcag gtcgtaaatc actgcataat tcgtgtcgt caaggcgac	4020
tcccgttctg gataatgttt ttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa	4080
atgagctgtt gacaattaat catccgctc gtataatgtg tggaattgtg agcggataac	4140
aatttcacac aggaaacgc gccgtgaga aaaagcgaag cggcactgct cttaacaat	4200
ttatcagaca atctgtgtgg gcactcgacc ggaattatcg attaacttta ttattaaaa	4260
ttaaagaggt atatattaat gtatcgatta aataaggagg aataaaccat gtgtgcgacc	4320
tcttctcaat ttactcagat taccgagcat aattccgctc gttccgcaa ctatcagcca	4380
aacctgtgga atttgaatt cctgcaatcc ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg	4440
gaggagaaa cgaccaaact ggaggaagaa gtctgctgca tgatcaaccg ttagacacc	4500
cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac gatgtgcagc gcctgggtct gacctacaaa	4560
tttgaaaaag acatcattaa agccctggaa aacatcgtac tgctggacga aaacaaaaag	4620
aacaaatctg acctgcacgc aaccgctctg tctttcgtc tgctgcgtca gcacggtttc	4680
gaggtttctc aggatgtttt tgagcgtttc aaggataaag aaggtggttt cagcgttgaa	4740

ctgaaagggtg acgtccaagg cctgctgagc ctgtatgaag cgtcttacct gggttttcgag	4800
gggtgagaacc tgctggagga ggcgcgtagc ttttccatca cccacctgaa gaacaacctg	4860
aaagaaggca ttaataccaa ggttgcagaa caagttagcc acgccctgga actgccatat	4920
caccagcgtc tgcaccgtct ggaggcacgt tggttcctgg ataaatacga accgaaagaa	4980
ccgcatacc agctgctgct ggagctggcg aagctggatt ttaacatggt acagaccctg	5040
caccagaaag agctgcaaga tctgtccgc tggtaggacc agatgggcct ggctagcaaa	5100
ctggattttg tacgcgaccg cctgatggaa gtttatttct gggcactggg tatggcgcca	5160
gaccgcagct ttgtgaatg tcgcaaagct gttactaaaa tgtttggtct ggtgacgac	5220
atcgatgacg tgiatgacgt ttatggcact ctggacgaac tgcaactgtt caccgatgct	5280
gtagagcgct gggacgttaa cgctattaac accctgccgg actatatgaa actgtgtttc	5340
ctggcactgt acaacaccgt taacgacacg tcctattcta ttctgaaaga gaaaggtcat	5400
aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg cgtgaactgt gcaaagcctt tctgcaagag	5460
gcgaaatggt ccaacaacaa aattatcccg gctttctcca agtacctgga aaacgccagc	5520
gtttctctct ccggtgtagc gctgctggcg ccgtcttact tttccgtatg ccagcagcag	5580
gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc ctgaccgact tccatggtct ggtgcgttct	5640
agctgcgtta ttttccgcct gtgcaacgat ctggccacct ctgcggcgga gctggaacgt	5700
ggcgagacta ccaattctat cattagctac atgcacgaaa acgatggtac cagcgaggaa	5760
caggcccgcg aagaactgcg taaactgac gacgccgaat ggaaaaagat gaatcgtgaa	5820
cgcgtagcg actccacct gctgcctaaa gcgttcatgg aaatcgagc taacatggca	5880
cgtgtttccc actgcaccta ccagiatggc gatggtctgg gtcgcccaga ctacgcgact	5940
gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac cttttccga ttaaccagct gatgtatgtc	6000
taactgcatc gcccttagga ggtaaaaaaa aatgactgcc gacaacaata gtatgcccc	6060
tggtgcagta tctagttagc ccaaatagc gcaaaacaa acacctgaag acattttgga	6120
agagtttctt gaaattattc cattacaaca aagacctaat acccgatcta gtgagacgtc	6180
aaatgacgaa agcggagaaa catgtttttc tggatcatgat gaggagcaaa ttaagttaat	6240
gaatgaaaat tgtattgttt tggattggga cgataatgct attggtgccg gtaccaagaa	6300
agtttgtcat ttaattgaaa atattgaaaa gggtttacta catcgtgcat tctccgtctt	6360
tattttcaat gaacaagggtg aattactttt acaacaaga gccactgaaa aaataacttt	6420
ccctgatctt tggactaaca catgctgctc tcattcacta tgtattgatg acgaattagg	6480
tttgaagggt aagctagacg ataagattaa gggcgctatt actgcggcgg tgagaaaact	6540
agatcatgaa ttaggtattc cagaagatga aactaagaca aggggttaagt ttcacttttt	6600

aaacagaatc cattacatgg caccaagcaa tgaacatgg ggtgaacatg aaattgatta	6660
catcctatatt tataagatca acgctaaaga aaacttgact gtcaaccaa acgtcaatga	6720
agtttagagac ttcaaatggg ttccaccaa tgatttgaaa actatgtttg ctgaccaag	6780
ttacaagtatt acgccttggg ttaagattat ttgcgagaat tacttattca actgggtggga	6840
gcaattagat gacctttctg aagtggaaaa tgacaggcaa attcatagaa tgctataaca	6900
acgcgtcctg cattcgccct taggaggtaa aaaaacatga gttttgatat tgccaaatac	6960
ccgaccttgg cactggctga ctccaccag gagttacgac tgttgccgaa agagagtta	7020
ccgaaactct gcgacgaact gcgccgtat ttactcgaca gcgtgagccg ttccagcggg	7080
cacttcgcct ccgggctggg cacggctgaa ctgacctgg cgctgacta tgtctacaac	7140
accccgtttg accaattgat ttgggatgtg gggcatcagg cttatccga taaaattttg	7200
accggacgcc gcgacaaaa ccgcaccatc cgtcagaaag gcggtctgca cccgttcccg	7260
tggcgcggcg aaagcgaata tgacgtatta agcgtcgggc attcatcaac ctccatcagt	7320
gccggaattg gtattgcgtg tgctgccgaa aaagaaggca aaaatcgccg caccgtctgt	7380
gtcattggcg atggcgcatg taccgcaggc atggcgtttg aagcgatgaa tcacgcgggc	7440
gatatccgtc ctgatatgct ggtgattctc aacgacaatg aaatgtcgat ttccgaaaat	7500
gtcggcgcgc tcaacaacca tctggcacag ctgctttccg gtaagcttta ctcttcactg	7560
cgcaaggcgc ggaaaaaagt ttctctggc gtgccgcaa ttaagagct gctcaacgc	7620
accgaagaac atattaaagg catggtagtg cctggcacgt tgtttgaaga gctgggcttt	7680
aactacatcg gcccggtgga cggtcacgat gtgctggggc ttatcaccac gctaaagaac	7740
atgcgcgacc tgaaaggccc gcagttcctg catatcatga ccaaaaaagg tcgtggttat	7800
gaaccggcag aaaaagacc gatactttc cagccgtgc ctaaaattga tccctccagc	7860
ggttgtttgc cgaaaagtag cggcggtttg ccgagctatt caaaaatctt tggcgactgg	7920
ttgtgcgaaa cggcagcgaa agacaacaag ctgatggcga ttactccgcg gatgcgtgaa	7980
ggttccggca tggctgagtt ttacgtaaa ttcccggatc gctacttca cgtggcaatt	8040
gccgagcaac acgcggtgac ctttctgctg ggtctggcga ttggtgggta caaacccatt	8100
gtcgcgattt actccattt cctgcaacgc gcctatgatc aggtgctgca tgacgtggcg	8160
attcaaaagc ttccggtcct gtccgccatc gaccgcggg gcattgttgg tgctgacggt	8220
caaacccatc aggttgcttt tgatctctt tacctgcgt gcataccgga aatggtcatt	8280
atgaccccga gcgatgaaaa cgaatgtgc cagatgctt ataccggcta tcactataac	8340

gatggcccggt cagcgggtgcg ctaccgcggt ggcaacgcgg tcgggtggaa ctgacgccgc 8400  
 tggaaaaact accaattggc aaaggcattg tgaagcgtcg tggcgagaaa ctggcgatcc 8460  
 ttaactttgg tacgtgatg ccagaagcgg cgaaagtcgc cgaatcgctg aacgccacgc 8520  
 tggtcgatat gcgttttttg aaaccgcttg atgaagcgtt aattctggaa atggccgcca 8580  
 gccatgaagc gctggtcacc gtagaagaaa acgccattat gggcggcgca ggcagcggcg 8640  
 tgaacgaagt gctgatggcc catcgtaaac cagtaccggt gctgaacatt ggcctgccgg 8700  
 acttctttat tccgcaagga actcaggaag aaatgcgcgc cgaactcggc ctcgatgccg 8760

ctggtatgga agccaaaatc aaggcctggc tggcataact gca 8803

<210> 21  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer

<400> 21  
 aggaggtaaa aaaacatgtc attaccgttc ttaacttctg c 41

<210> 22  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer

<400> 22  
 atggctgcag gcctatcgca aattagctta tgaagtccat ggtaaattcg tg 52

<210> 23  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213>  
 > Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer  
 <400> 23

gaattcgccc ttctgcagct acc 23  
 <210> 24

<211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220><223>	PCR Primer	
<400>	24	
cgactggtgc acccttaagg aggaaaaaa catgtcag		38
<210>	25	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	25	
gtgctggaat tcgcccttct gcagc		25
<210>	26	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	26	
gtagatgcat gcagaattcg cccttaagga gg		32
<210>	27	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	27	
ccttctgcag gacgcgttgt tatagc		26
<210>	28	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	28	
catcaatgca tcgcccttag gaggtaaaaa aaaatgac		38
<210>	29	
<211>	25	

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 29  
 gtgtgatgga tatctgcaga attcg 25  
 <210> 30  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 30  
 catcaatgca tcgcccttag gaggtaaaaa aacatg 36  
 <210> 31  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 31  
 gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgtgtg cgacctcttc tcaatttact 60  
 60  
 <210> 32  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 32  
 cggtcgacgg atccctgcag ttagacatac atcagctg 38  
 <210> 33  
 <211> 10992  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 33  
 gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc	120
gcactcccggt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaataatc	180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga	240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa	300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta	360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc	420
gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgccctta ggaggtaaaa	480
aaacatgtca ttaccgttct taacttctgc accgggaaag gttattatit ttggtgaaca	540
ctctgctgtg tacaacaagc ctgccgtcgc tgctagtgtg tctgcgttga gaacctacct	600
gctaataagc gagtcatctg caccagatac tattgaattg gacttcccgg acattagctt	660
taatcataag tgggccatca atgatttcaa tgccatcacc gaggatcaag taaactccca	720
aaaattggcc aaggctcaac aagccaccga tggcttgtct caggaactcg ttagtctttt	780
ggatccgttg ttagctcaac taccgaatc ctccactac catgcagcgt tttgtttcct	840
gtatatgttt gtttgcctat gcccctatgc caagaatatt aagttttctt taaagtctac	900
tttaccctac ggtgctgggt tgggctcaag cgcctctatt tctglatcac tggccttagc	960
tatggcctac ttgggggggt taataggatc taatgacttg gaaaagctgt cagaaaacga	1020
taagcatata gtgaatcaat gggccttcat aggtgaaaag tgtattcacg gtacccttc	1080
aggaatagat aacgctgtgg ccacttatgg taatgcctg ctatttgaaa aagactcaca	1140
taatggaaca ataaacacaa acaattttta gttcttagat gatttcccag ccattccaat	1200
gatacctaacc tatactagaa ttccaaggic tacaaaagat cttgttgctc gcgttcgtgt	1260
gttggtcacc gagaaatttc ctgaagttaa gaagccaatt ctatagcca tgggtgaatg	1320
tgccctacaa ggcttagaga tcatgactaa gtttaagtaaa tgtaaaggca ccgatgacga	1380
ggctgtagaa actaataatg aactgtatga acaactattg gaattgataa gaataaatca	1440
tggactgctt gtctcaatcg gtgtttctca tctggatta gaacttatta aaaatctgag	1500
cgatgatattg agaattggct ccacaaaact taccggtgct ggtggcggcg gttgctcttt	1560
gactttgtta cgaagagaca ttactcaaga gcaaatgac agcttcaaaa agaaattgca	1620
agatgatattt agttacgaga catttgaaac agacttgggt gggactggct gctgtttgtt	1680
aagcgcaaaa aatttgaata aagatcttaa aatcaaatcc ctagtattcc aattatttga	1740
aaataaaaact accacaaagc aacaaattga cgatctatta ttgccaggaa acacgaattt	1800

accatggact tcataagcta atttgcgata ggcctgcacc ctttaaggagg aaaaaaacat	1860
gtcagagttg agagcccttca gtgccccagg gaaagcgta ctagctggtg gatatttagt	1920
tttagataca aaatatgaag cattttagt cggattatcg gcaagaatgc atgctgtagc	1980
ccatccctac gggtcattgc aagggtctga taagtttgaa gtgcgtgtga aaagtaacaa	2040
atttaagat ggggagtggc tgtaccatat aagtcctaaa agtggcttca ttcctgtttc	2100
gatagcgga tctaagaacc ctttcattga aaaagttatc gctaactgat ttagctactt	2160
taaacctaac atggacgact actgcaatag aaacttggtc gttattgata ttttctctga	2220
tgatgcctac cattctcagg aggatagcgt taccgaacat cgtggcaaca gaagattgag	2280
ttttcattcg cacagaattg aagaagttcc caaacagggt ctgggctcct cggcaggttt	2340
agtcacagtt ttaactacag ctttggcctc cttttttgta tcggacctgg aaaataatgt	2400
agacaaatat agagaagtta ttcataattt agcacaagtt gctcattgtc aagctcagg	2460
taaaattgga agcgggtttg atgtagcggc ggcagcatat ggatctatca gatatagaag	2520
attcccacc gcattaatct ctaatttgcc agatattgga agtgctactt acggcagtaa	2580
actggcgcat ttggttgatg aagaagactg gaatattacg attaaaagta accatttacc	2640
ttcgggatta acittatgga tgggcgatat taagaatggt tcagaaacag taaaactggt	2700
ccagaaggta aaaaattggt atgattcgca tatgccagaa agcttgaaaa tatatacaga	2760
actcgatcat gcaaattcta gatttatgga tggactatct aaactagatc gcttacacga	2820
gactcatgac gattacagcg atcagatat ttagtctctt gagaggaatg actgtacctg	2880
tcaaaagtat cctgaaatca cagaagttag agatgcagtt gccacaatta gacgttcctt	2940
tagaaaaata actaaagaat ctggtgccga tatcgaacct cccgtacaaa ctagcttatt	3000
ggatgattgc cagaccttaa aaggagttct tacttgctta atacctggtg ctggtggtta	3060
tgacgccatt gcagtgatta ctaagcaaga tgttgatctt agggctcaaa ccgctaatga	3120
caaaagattt tctaagggtc aatggctgga tgtaactcag gctgactggg gtgttaggaa	3180
agaaaaagat ccggaaactt atcttgataa ataacttaag gtactgcat gcagaattcg	3240
cccttaagga ggaaaaaaa atgaccgttt acacagcatc cgttaccgca cccgtcaaca	3300
tcgcaacctt taagtattgg gggaaaagg acacgaagtt gaatctgccc accaattcgt	3360
ccatatcagt gactttatcg caagatgacc tcagaacgtt gacctctgcg gctactgcac	3420
ctgagtttga acgcgacact ttgtggttaa atggagaacc acacagcatc gacaatgaaa	3480
gaactcaaaa ttgtctgctg gacctacgcc aattaagaaa ggaaatggaa tcgaaggacg	3540
cctcattgcc cacattatct caatggaaac tccacattgt ctccgaaaat aactttccta	3600
cagcagctgg ttagcttcc tccgtgctg gctttgctgc attggtctct gcaattgcta	3660

agttatacca attaccacag tcaacttcag aaatatctag aatagcaaga aaggggtctg	3720
gttcagcttg tagatcgttg tttggcggat acgtggcctg ggaaatggga aaagctgaag	3780
atggtcatga ttccatggca gtacaaatcg cagacagctc tgactggcct cagatgaaag	3840
cttgtgtcct agttgtcagc gatattaaaa aggatgtgag ttccactcag ggtatgcaat	3900
tgaccgtggc aacctccgaa ctatttaaag aaagaattga acatgtcgta ccaaagagat	3960
ttgaagtcac gcgtaaagcc attgttgaaa aagatttcgc cacctttgca aaggaaacaa	4020
tgatggattc caactctttc catgccacat gtttggactc tttccctcca atattctaca	4080
tgaatgacac ttccaagcgt atcatcagtt ggtgccacac cattaatcag ttttacggag	4140
aaacaatcgt tgcatacacg tttgatgcag gtccaaatgc tgtgtgttac tacttagctg	4200
aaaatgagtc gaaactcttt gcatttatct ataaattgtt tggctctgtt cctggatggg	4260
acaagaaatt tactactgag cagcttgagg ctttcaacca tcaatttgaa tcacttaact	4320
ttactgcacg tgaattggat cttgagttgc aaaaggatgt tgccagagtg attttaactc	4380
aagtcggttc aggcccacaa gaaacaaacg aatctttgat tgacgcaaag actggcttac	4440
caaaggaata agatcaattc gctgcatcgc ccttaggagg taaaaaaaaa tgactgccga	4500
caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtcg aaaaccaaac	4560
acctgaagac attttggag agtttctga aattattcca ttacaacaaa gacctaatc	4620
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgtttttctg gtcgatga	4680
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg ataatgctat	4740
tggtgccggt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg gtttactaca	4800
tcgtgcattc tccgtcttta ttttcaatga acaaggtaga ttacttttac aacaaagagc	4860
cactgaaaaa ataactttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc atccactatg	4920
tattgatgac gaattaggtt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg gcgctattac	4980
tgcggcgggt agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag	5040
gggtaagttt cactttttta acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg aacctgggg	5100
tgaacatgaa attgattaca tcctatttta taagatcaac gctaaagaaa acttgactgt	5160
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaag atttgaaaac	5220
tatgtttgct gacccaagtt acaagtttac gccttggttt aagattatit gcgagaatta	5280
cttattcaac tgggtgggagc aattagatga cttttctgaa gtggaaaatg acaggcaaat	5340
tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca ttgcacctta ggaggtaaaa aaacatgtgt	5400
gcgacctctt ctcaatttac tcagattacc gagcataatt cccgtcgttc cgcaaatat	5460
cagccaaacc tgttgaattt cgaattcctg caatccctgg agaacgacct gaaagtggaa	5520

aagctggagg agaaagcgac caaactggag gaagaagttc gctgcatgat caaccgtgta	5580
gacaccagc cgctgtccct gctggagctg atcgacgatg tgcagcgctt gggtctgacc	5640
tacaaatttg aaaaagacat cattaagacc ctggaaaaca tcgtactgct ggacgaaaac	5700
aaaaagaaca aatctgacct gcacgcaacc gctctgtctt tccgtctgct gcgtcagcac	5760
ggtttcgagg tttctcagga tgtttttgag cgtttcaagg ataaagaagg tggtttcagc	5820
ggtgaactga aaggtgacct ccaaggcctg ctgagcctgt atgaagcgtc ttacctgggt	5880
ttcgagggtg agaacctgct ggaggaggcg cgtacctttt ccatcaccca cctgaagaac	5940
aacctgaaag aaggcattaa taccaaggtt gcagaacaag tgagccacgc cctggaactg	6000
ccatatcacc agcgtctgca ccgtctggag gcacgttggg tccctggataa atacgaaccg	6060
aaagaaccgc atcaccagct gctgctggag ctggcgaagc tggattttta catggtacag	6120
acctgcacc agaaagagct gcaagatctg tcccgtggg ggaccgagat gggcctggct	6180
agcaaactgg attttgtacg cgaccgcctg atggaagttt atttctgggc actgggtatg	6240
gcgccagacc cgcagtttgg tgaatgtcg aaagctgtta ctaaatgtt tggcttggtg	6300
acgatcatcg atgacgtgta tgacgtttat ggcaactctg acgaactgca actgttcacc	6360
gatgctgtag agcgtctggga cgttaacgct attaacaccc tgccggacta tatgaaactg	6420
tgtttcctgg cactgtacaa caccgttaac gacacgtcct attctattct gaaagagaaa	6480
ggtcataaca acctgtccta tctgacgaaa agctggcgtg aactgtgcaa agcctttctg	6540
caagaggcga aatggtccaa caacaaaatt atcccggctt tctccaagta cctggaaaac	6600
gccagcgttt cctcctccgg tgtagcgtg ctggcgccgt cttacttttc cgtatgccag	6660
cagcaggaag acatctccga ccacgcgtg cgttccctga ccgacttcca tggcttggtg	6720
cgttctagct gcgttatctt ccgctgtgc aacgatctgg ccacctctgc ggcggagctg	6780
gaacgtggcg agactacaa ttctatcatt agctacatgc acgaaaacga tgggtaccagc	6840
gaggaacagg cccgcgaaga actgcgtaaa ctgatcgacg ccgaatggaa aaagatgaat	6900
cgtgaacgcg ttagcgactc caccctgctg cctaaagcgt tcattgaaat cgcagttaac	6960
atggcacgtg ttccccactg cacctaccag tatggcgatg gtctgggtcg cccagactac	7020
gcgactgaaa accgcatcaa actgctgctg attgacctt tcccattaa ccagctgatg	7080
tatgtctaac tgcagctggg accatatggg aattcgaagc tttctagaac aaaaactcat	7140
ctcagaagag gatctgaata gcgccgtcga ccatcatcat catcatcatt gagtttaaac	7200
ggtctccagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa	7260

tcagaacgca gaagcggctc gataaaacag aatttgctg gcggcagtag cgcggtggtc	7320
ccacctgacc ccatgccga ctcagaagt aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg	7380
tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa	7440
agactggggc tticgtttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa	7500
tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc ggagggtggc gggcaggacg	7560
cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt	7620
tgcgtttcta caaactcttt ttgtttatit ttctaaatac attcaaatat gtatccgctt	7680
aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact	7740
ggatggcttt ctgcgccca aggatctgat ggcgaggagg atcaagctct gatcaagaga	7800
caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg	7860
cttgggtgga gaggtctatt ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg	7920
ccgccgtgtt ccggtgttca gcgcaggggc gcccggttct tttgtcaag accgacctgt	7980
ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg	8040
gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg tctactgaagc gggaaggggac tggctgctat	8100
tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat	8160
ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgttga tccggctacc tgccattcg	8220
accaccaagc gaaacatgc atcgagcgag cagtgactcg gatggaagcc ggtcttgtcg	8280
atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc	8340
tcaaggcgag catgcccgc ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc	8400
cgaatatcat ggtggaaaaa ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg	8460
tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg	8520
gcgaatgggc tgaccgttc ctctgtcttt acggtatgc cgctcccgat tcgcagcgca	8580
tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgacgat gacaaaaac ccttaacgtg	8640
agttttcgtt ccaactgagc tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc	8700
ctttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg	8760
tttgtttgc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag	8820
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact	8880
ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg	8940
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc	9000
ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg	9060
aactgagata cctacacgt gagctatgag aaagcgcac gcttccgaa gggagaaagg	9120

cggacaggta tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag	9180
ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttagcgcgc	9240
gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct	9300
ttttacgggtt cciggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc	9360
ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgage tgataccgct cggcgcagcc	9420
gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagec aggaagcgga agagcgccctg atgcggtatt	9480
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct	9540
gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat	9600
ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgtctcc	9660
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc	9720
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagca gatcaattcg gcgcggaagg cgaagcgga	9780
tgcatttacg ttgacacat cgaatggtgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc	9840
ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca	9900
gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt	9960
tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtgggaagc gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac	10020
cgcgtggcac acaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt	10080
ctggccctgc acgcgccgc gcaaatgtc gcggcgatta aatctcgcg cgatcaactg	10140
ggtgccagcg tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg	10200
gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac	10260
caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc	10320
tctgaccaga caccatcaa cagtattatt ttctccatg aagacggtac gcgactgggc	10380
gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgcg tgttagcggg cccattaagt	10440
tctgtctcgg cgcgtctcgc tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt	10500
cagccgatag cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg	10560
caaatgctga atgaggcat cgttccact gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg	10620
ctgggcgcaa tgcgcgcat taccgagtc gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggt	10680
gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc cgccgtcaac caccatcaa	10740
caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc	10800
caggcggatga agggcaatca gctgttccc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccaccctg	10860
gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca	10920
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagcg	10980



cgaattgattc tg

10992

<210> 34

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 34

gagacatgag ctcaggaggt aaaaaaacat gaaaacagta gttattattg

50

<210> 35

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 35

tttatcaatc ccaattgtca tggtttttta cctcctttat tgttttctta aatc

54

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 36

gatttaagaa aacaataaag gaggtaaaaa aacatgacaa ttgggattga taaa

54

<210> 37

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 37

gacatgacat agatcttttag ttctgataag aacgaacggt

40

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	PCR Primer	
<400>	38	
atgaaaacag tagttattat tgatgc		26
<210>	39	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	39	
atgttattgt ttctttaa at catttaaa at agc		33
<210>	40	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	40	
atgacaattg ggattgataa aattag		26
<210>	41	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	41	
ttagtttcga taagaacgaa cggt		24
<210>	42	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	42	
gaaatagccc cattagaagt atc		23
<210>	43	
<211>	24	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	43	
	ttgccaatca tatgattgaa aatc	24
<210>	44	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	44	
	gctatgcttc attagatcct tatcg	25
<210>	45	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	45	
	gaaacctaca tccaatcttt tgccc	25
<210>	46	
<211>	8703	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	46	
	cccgtcttac tgcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagattc tgaaatgagc	60
	tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc	120
	acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa caatttatca	180
	gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta aaaattaaag	240
	aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc gagctcagga	300
	ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca attggaaaat	360
	ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt acaacacaac	420
	ttttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt ggaaatgttt	480

tacaagctgg aaatggccaa aatcccgac gacaaatagc aataaacagc ggtttgtctc	540
atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag gccgttattt	600
tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc gggattgaga	660
atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc tacgatgcgc	720
ctttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag gcaatgggct	780
taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa gatcaatttt	840
ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc gctgacgaaa	900
tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggtt cgcctaatt	960
cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagtttttaa agaagacggt actgtaacag	1020
cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg ctctgcttt gattattgct tcacaagaat	1080
atgccgaagc acacggtctt ccttatttag ctattatcg agacagtgtg gaagtcggtg	1140
ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg ttagcgcgca	1200
atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt gcagcaactt	1260
caatcgtggt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt tatggtggcg	1320
gtatttcatt aggtcatcg attggtgcca caggtgctcg tttattaacg agtttaagtt	1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatatg gagtggcttc tttatgtatc ggcgggtggt	1440
taggactcgc tatgctacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaaa	1500
tgagtctga ggaacgcctg gcttctcttc ttaatgaagg ccagatttct gctgatacaa	1560
aaaaagaatt tgaataacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg attgaaaatc	1620
aatcagtgaa aacagaagtg ccgatgggag ttggcttaca tttaacagtg gacgaaactg	1680
attatttggt accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg agtaatggtg	1740
caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg	1800
ttttttacga tgttcagat cccgagtcac tgattgataa actacaagta agagaagcgg	1860
aagtttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc ggcggcttaa	1920
gagatttgca atatcgtact ttgatgaat catctgtatc tgtcgacttt ttagtagatg	1980
ttaaggatgc aatgggggca aatatcgta acgctatgtt ggaagggtgt gccgagttgt	2040
tccgtgaatg gtttgcggag caaaagattt tattcagtat ttttaagtaat tatgccacgg	2100
agtcggttgt tacgatgaaa acggctattc cagtttcacg ttttaagtaag gggagcaatg	2160
gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta gatccttate	2220
gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt ttagctacag	2280
gaaatgatac acgcgctgtt agcgcttctt gtcatgcttt tgcggtgaag gaaggtcgct	2340

accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggtgaa atttcagttc	2400
cgcttgcttt agccacggtt ggcggtgccca caaaagtctt acctaatct caagcagctg	2460
ctgatttggt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtcg agtagtagcg gctgttggtt	2520
tggcacaaaa tttagcggcg ttacgggcct tagtctctga aggaattcaa aaaggacaca	2580
tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa gaagttgagg	2640
cagtcgctca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc atggctatct	2700
ttaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaacat gacaattggg attgataaaa	2760
ttagtttttt tgtgccccct tatttatattg atatgacggc actggctgaa gccagaaatg	2820
tagaccctgg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcggtg aacccaatca	2880
gccaagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc aaagaagata	2940
aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtccag tatcgatgag tcaaaagcgg	3000
ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgctct ttcgaaatca	3060
aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagttagc taagaatcac gtagccttac	3120
atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatatgac aaaatatggc ttaaattctg	3180
gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatggt agttgctagt gaaccgcgca	3240
ttttggcttt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgcaaga tatctatgac ttttggcgtc	3300
caacaggcca cccgtatcct atggctgatg gtcctttgtc aaacgaaacc tacatccaat	3360
cttttgccca agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt gcagattatg	3420
atgcttttagc gttccatatt ctttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta ttagcaaaaa	3480
tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaatttttagc ccgttatgaa gaaagtatcg	3540
tctatagtcg tcgcgttaga aacttgata cgggttact ttatctggga ctcatctccc	3600
ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggtttatc agttatggtt	3660
ctggtgctgt cgctgaattt ttactggtg aattagtagc tggttatcaa aatcatttac	3720
aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcgacaga actttctatc gctgaatatg	3780
aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa gatgaattaa	3840
aatatagtat ttctgctatt aataataccg ttctgtctta tcgaaactaa gagatctgca	3900
gctggtacca tatgggaatt cgaagcttgg gcccgacaaa aaactcatct cagaagagga	3960
tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaaccg tctccagctt	4020
ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga	4080

agcggctctga taaaacagaa ttgacctggc ggcagtagcg cgggtggccc acctgacccc	4140
atgccgaact cagaagtga acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc tccccatgcg	4200
agagtaggga actgccaggc atcaataaaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt	4260
tcgttttatac tgttgtttgt cgggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc cgccgggagc	4320
ggatttgaac gttgcgaagc aacggccccg aggggtggcgg gcaggacgcc cgccataaac	4380
tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggctttttg cgtttctaca	4440
aactcttttt gttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa	4500
ccctgataaa tgcttcaata atctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt	4560
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgctgat gcggtatttt ctccttacgc	4620
atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg	4680
catagttaag ccagccccga caccgccaa caccgctga cgagcttagt aaagccctcg	4740
ctagatttta atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc	4800
cagcctttca tgatatact cccaatttgi ttagggctta ttatgcacgc ttaaaaaataa	4860
taaaagcaga cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcattctaac	4920
gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgta gacattattt	4980
gccgactacc ttggtgatct cgctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc	5040
gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac	5100
gggctgatac tgggcccga ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat cttcggcgcc	5160
gattttgccg gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc	5220
atgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa	5280
tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttctccgcc gctggacctt ccaaggcaac	5340
gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc	5400
gaagatacct gcaagaatgt cattgcgtg ccatttcca aattgcagtt cgcgcttagc	5460
tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcgag	5520
aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg	5580
cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt	5640
caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg	5700
gcgtcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgttc	5760
cctcatgatg ttttaacttg ttttagggcg actgcctgc tgcgtaacat cgttgctgct	5820
ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttgatg cccgaggcat	5880
agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc	5940

accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgatacgt acttgcat	6000
cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcaccc gtttcacgg	6060
tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc	6120
gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt	6180
ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcgaa gacctcgcc	6240
gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcaccc tcggtttct	6300
ggaaggcgag catcggttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcacgc ggatcagtga	6360
gggtttgcaa ctgcgggtca aggatctgga ttctgatcac ggcacgatca tcgtgcggga	6420
gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttaccgag agcttggcac ccagcctgcg	6480
cgagcagggg aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctgggttg	6540
ctagtttgtt atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggtg aaagcgtat	6600
ttcttcaga attgccatga tttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgtgtc	6660
ggcagctttg attcgataag cagcatgcc tgttcaggc tgtctatgtg tgactgtga	6720
gctgtaacaa gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt ttactggtt	6780
tcacctgttc tattagggtg tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcacgg	6840
tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat cttttttaca	6900
ccgttttcat ctgtgcatat ggacagtttt ccttttgata tgtaacggtg aacagtgtt	6960
ctacttttgt ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca	7020
gaccttccg tatttagcca gtatgttctc tagtgtggtt cggtgtttt gcgtgagcca	7080
tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa	7140
actggtgagc tgaattttg cagttaaagc atcgtgtagt gtttttctta gtccgttatg	7200
taggtaggaa tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctggtt	7260
gttctcaagt tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga aaatcaacgt	7320
atcagtcggg cggcctcgt tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc	7380
tttacttatt ggtttcaaaa cccattggtt aagcctttta aactcatggt agttattttc	7440
aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaactctt atatttcctt tgtgagtttt	7500
cttttgtgtt agttctttta ataaccactc ataaatctc atagagtatt tgttttcaaa	7560
agacttaaca tgttccagat tatattttat gaattttttt aactggaaaa gataaggcaa	7620
tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttcgcttgag aacttggcat agtttgtcca	7680
ctggaaaatc tcaaagcctt taaccaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag	7740
ctctctgggt gctttagcta atacaccata agcattttcc ctactgatgt tcatcatctg	7800

agcgtattgg ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt tttcaatcgt	7860
ggggttgagt agtgccacac agcataaaat tagcttgggt tcattgctccg ttaagtcata	7920
gcgactaatc gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg	7980
gtctagggtga ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt	8040
ccttttctct tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag acctttgctg gaaaacttgt	8100
aaattctgct agacctctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat	8160
tcaagtgggt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc	8220
cagccctgtg tataactcac tacttttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca	8280
aacgctgttt gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa gtagcacctt	8340
cgcaagctcg ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc	8400
gctgtctttt tcgtgacatt cagttcgctg cgtcacggc tctggcagtg aatgggggta	8460
aatggcacta caggcgcttt ttatggattc atgcaaggaa actaccata atacaagaaa	8520
agcccgctac gggtcttctca gggcgtttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac	8580
tttttctgt tcagcagttc ctgccctctg attttccagt ctgaccactt cggattatec	8640
cgtgacaggt cattcagact ggctaatagca ccagtaagg cagcggtatc atcaacaggc	8700
tta	8703
<210> 47	
<211> 9371	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 47	
tgtaaccttt gctttcaaat gagtagaaat aatgcacatc catgtttgta tcgtgcaaat	60
aaagtgtttc atccgtagga aaaaatgact ttagtatctg ttccgctttt tctgatgaaa	120
tgtgtcctcc gacaaaattg aatgaatcat ggacatttgc tggttttgat acagcgaaag	180
cagccgttcc tatgttatat atcggattta acagcaggac aaaaaacacc atgacagcca	240
tcgtcaccca cttattcaca cgcacataaa cttttctga cttttggaac agatgatagc	300
tcatcaaaaa tcccgccatt gccaaataaa tcgtatatgg cattactgca ccataatctt	360
ttgagatttg attgggatat ggcgcaagca gcaagacaag cagtccgata atcagcgtat	420
aaaataagcc tagtaagatc ttatccgttc tccaatacag cttgaaaaac actacattca	480
acgcaatggg aagagtgatg atgaaaaaca gaaacacgaa tgcaatcggc tccatcccat	540



ccgggtattc cticcaatac gaaaagaaac taaaaatcat ttgtacgac ggcaaaactga	600
caacagcaag gtcgaacgta taaaacttac cctttccgcc atgacacgc ggcatcagca	660
tatagtgaag agccgtcagc agcacatata cgtataacaa aaaatgcagc agcggcagca	720
gttcttttcc gtctctcttt aagtaagcgc tggagaagt ttgtgattgc acctggtgaa	780
taagttcaac agacactccc gccagcagca caatccgcaa tataacaccc gccagaacaa	840
ttgtgcgctg ccggtttatt ttgggatgat gcacaaaag atataagccc gccagaacaa	900
caattgacca ttgaatcagc aggggtgcttt gtctgcttaa tataaaataa cgttcgaaat	960
gcaatacata atgactgaat aactccaaca cgaacaacaa ctccattttc ttctgctatc	1020
aaaataacag actcgtgatt ttccaaacga gctttcaaaa aagcctctgc cccttgcaaa	1080
tcggatgcct gtctataaaa ttcccagat tggtaaacaa gcggcgcaat ggccggccgca	1140
tctgatgtct ttgcttggcg aatgttcac ttattttctc ctccctctca ataatttttt	1200
cattctatcc cttttctgta aagtttattt ttccagaatac ttttatcacc atgctttgaa	1260
aaaatatcac gataatatcc attgttctca cggaagcaca cgcagggtcat ttgaacgaat	1320
tttttcgaca ggaatttgcc gggactcagg agcatttaac ctaaaaaagc atgacatttc	1380
agcataatga acattttact atgtctattt tcgttctttt ctgtatgaaa atagttattt	1440
cgagtctcta cggaatatgc gagagatgat atacctaaat agagataaaa tcatttcaaa	1500
aaaatgggtc tactaaaata ttattccatc tattacaata aattcacaga atagtctttt	1560
aagtaagtct actctgaatt tttttaaaag gagagggtaa agagtgatcat taccgttctt	1620
aacttctgca ccgggaaagg ttattatttt tggagaacac tctgctgtgt acaacaagcc	1680
tgccgtcgtc gctagtgtgt ctgcgttgag aacctacctg ctaataagcg agtcatctgc	1740
accagatact attgaattgg acttcccagg cattagcttt aatcataagt ggtccatcaa	1800
tgatttcaat gccatcaccg aggatcaagt aaactccaa aaattggcca aggtcaaca	1860
agccaccgat ggcttgtctc aggaactcgt tagtcttttg gatccgttgt tagctcaact	1920
atccgaatcc ttccactacc atgcagcgtt ttgtttcttg tatatgtttg ttgcctatg	1980
ccccatgcc aagaatatta agttttcttt aaagtctact ttacccatcg gtgctgggtt	2040
gggtcaagc gcctctattt ctgtatcact ggccttagct atggcctact tgggggggtt	2100
aataggatct aatgacttg aaaagctgtc agaaaacgat aagcatatag tgaatcaatg	2160
ggccttcata ggtagaaagt gtattcacgg tacccttca ggaatagata acgctgtggc	2220
catttatggt aatgccctgc tatttgaaaa agactcacat aatggaacaa taaacacaaa	2280

caattttaag ttcttagatg atttcccagc cattccaatg atcctaacct atactagaat	2340
tccaaggtct acaaaagatc ttgttgctcg cgttcgtgtg ttggtcaccg agaaatttcc	2400
tgaagttatg aagccaattc tagatgccat gggatgaatgt gccctacaag gcttagagat	2460
catgactaag ttaagtaaat gtaaaggcac cgaatgacgag gctgtagaaa ctaataatga	2520
actgtatgaa caactatttg aattgataag aataaatcat ggactgcttg tctcaatcgg	2580
tgtttctcat cctggattag aacttattaa aaatctgagc gatgatttga gaattggctc	2640
cacaaaactt accgggtgctg gtggcggcgg ttgctctttg actttgttac gaagagacat	2700
tactcaagag caaattgaca gcttcaaaaa gaaattgcaa gatgatttta gttacgagac	2760
atttgaaca gacttgggtg ggactggctg ctgtttgtta agcgcaaaaa atttgaataa	2820
agatcttaaa atcaaatccc tagtattcca attatttgaa aataaaacta ccacaaagca	2880
acaaattgac gatctattat tgccaggaaa cacgaattta ccatggactt cataaaagga	2940
gagggtgtca gattgagag ccttcagtgc ccagggaaa gcgttactag ctgggtggata	3000
tttagtttta gatacaaaat atgaagcatt ttagtcgga ttatcgcaa gaatgcatgc	3060
tgtagcccat ccttacggtt cattgcaagg gtctgataag tttgaagtgc gtgtgaaaag	3120
taaacaattt aaagatgggg agtggctgta ccatataagt cctaaaagtg gcttcattcc	3180
tgtttcgata ggcggatcta agaacccttt cattgaaaaa gttatcgcta acgtatttag	3240
ctactttaaa cctaacatgg acgactactg caatagaaac ttgttcgtta ttgatatttt	3300
ctctgatgat gcctaccatt ctcaggagga tagcgttacc gaacatcgtg gcaacagaag	3360
attgagtttt cattcgaca gaattgaaga agtcccaaa acagggtcgg gctcctcggc	3420
aggtttagtc acagttttta ctacagcttt ggctccttt ttgtatcgg acctggaaaa	3480
taatgtagac aaatatagag aagttattca taatttagca caagttgctc attgtcaagc	3540
tcagggtaaa attggaagcg ggtttgatgt agcggcggca gcatatggat ctatcagata	3600
tagaagattc ccaccgcat taatctctaa ttgccagat attggaagtg ctacttacgg	3660
cagtaaaactg gcgcatttgg ttgatgaaga agactggaat attacgatta aaagtaacca	3720
tttaccttcg ggattaactt tatggatggg cgatattaag aatggttcag aaacagtaaa	3780
actggtccag aaggtaaaaa attggtatga ttgcatatg ccagaaagct tgaaaatata	3840
tacagaactc gatcatgcaa attctagatt tatggatgga ctatctaaac tagatcgctt	3900
acacgagact catgacgatt acagcgatca gatatttgag tctcttgaga ggaatgactg	3960
tacctgtcaa aagtatcctg aaatcacaga agttagagat gcagttgcca caattagacg	4020

ttcctttaga aaaataacta aagaatctgg tgccgatatc gaacctcccg tacaaactag	4080
cttattggat gattgccaga ccttaaaagg agttcttact tgcttaatac ctgggtctgg	4140
tggttatgac gccattgcag tgattactaa gcaagatgtt gatcttaggg ctcaaaccgc	4200
taatgacaaa agattttcta aggttcaatg gctggatgta actcaggctg actgggggtg	4260
taggaagaa aaagatccgg aaacttatct tgataaataa aaggagaggg tgaccgttta	4320
cacagcatcc gttaccgcac ccgtcaacat cgcaaccctt aagtattggg ggaaaaggga	4380
cacgaagtgg aatctgcca ccaattcgtc catatcagtg actttatcgc aagatgacct	4440
cagaacgttg acctctgcgg ctactgcacc tgagtttgaa cgcgacactt tgtggttaaa	4500
tggagaacca cacagcatcg acaatgaaag aactcaaaat tgtctgcgcg acctacgcca	4560
attaagaaag gaaatggaat cgaaggacgc ctcatgtccc acattatctc aatggaaact	4620
ccacattgtc tccgaaaata actttcctac agcagctggg ttagcttcct ccgtgctgg	4680
ctttgctgca ttggtctctg caattgctaa gttataccaa ttaccacagt caacttcaga	4740
aatatctaga atagcaagaa aggggtctgg ttcagcttgt agatcgttgt ttggcggata	4800
cgtggcctgg gaaatgggaa aagctgaaga tggtcatgat tccatggcag tacaaatcgc	4860
agacagctct gactggcctc agatgaaagc ttgtgtccta gttgtcagcg atattaaaa	4920
ggatgtgagt tccactcagg gtatgcaatt gaccgtggca acctccgaac tatttaaga	4980
aagaattgaa catgtcgtac caaagagatt tgaagtcatg cgtaaagcca ttgttgaaaa	5040
agatttcgcc acctttgcaa aggaacaat gatggattcc aactctttcc atgccacatg	5100
tttggactct ttcctccaa tattctacat gaatgacact tccaagcgta tcatcagttg	5160
gtgccacacc attaatcagt tttagcgaga aacaatcgtt gcatacacgt ttgatgcagg	5220
tccaaatgct gtgtgtact acttagctga aatgagtcg aaactcttg catttatcta	5280
taaattgttt ggcctctgtc ctggatggga caagaaattt actactgagc agcttgaggc	5340
tttcaacat caatttgaat catctaactt tactgcacgt gaattggatc ttgagttgca	5400
aaaggatgtt gccagagtga ttttaactca agtcgggtca ggcccacaag aaacaaacga	5460
atctttgatt gacgcaaaga ctggcttacc aaaggaataa aaggagaggg tgactgccga	5520
caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtgc aaaaccaa	5580
acctgaagac attttgaag agtttcctga aattattcca ttacaacaaa gacctaatc	5640
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgtttttctg gtcacgatga	5700
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg ataatgctat	5760
tggtgccggt accaagaaag ttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg gtttactaca	5820
tcgtgcattc tccgtcttta tttcaatga acaagtgaa ttacttttac aacaaagagc	5880

cactgaaaaa ataactttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc atccactatg	5940
tattgatgac gaattaggtt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg gcgctattac	6000
tgcgcggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag	6060
gggtaagttt cactttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg aaccatgggg	6120
tgaacatgaa attgattaca tcctatttta taagatcaac gctaaagaaa acttgactgt	6180
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaag atttgaaaac	6240
tatgtttgct gacccaagtt acaagtttac gccttgggtt aagattattt gcgagaatta	6300
cttattcaac tggtagggagc aattagatga cttttctgaa gtggaaaaatg acaggcaaat	6360
tcatagaatg ctataaaaaa aaccggcctt ggccccgccg gttttttatt atttttcttc	6420
ctccgcatgt tcaatccgct ccataatcga cggatggctc cctctgaaaa ttttaacgag	6480
aaacggcggg ttgaccgggc tcagtcccgt aacggccaag tcctgaaacg tctcaatcgc	6540
cgcttcccgg tticcggcca gctcaatgcc gtaacggctc gcggcggttt cctgataccg	6600
ggagacggca ttcgtaattt gaatacatc gaacaaatta ataaagtga aaaaatactt	6660
cggaaacatt taaaaataa ccttatiggt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt	6720
ggactaaaac caaatagtg tcttgacttt ttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat	6780
caaagtaaag aaatacttat acaaaaaatt agacctattt caaaaaaat aggagataaa	6840
agcaacttac gatataatga attaacaatt attattcagc aagaaatgt accgtggaat	6900
catcctccca aacaagaatt tatttatgga gaatggttac aagagcttta tgaacaagga	6960
tacattcctc agaaggaatt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaaacga	7020
aaaaataaaa gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt	7080
tctgatgtga gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat	7140
gatgaaacca actctatatt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacgggtaaa	7200
atcataccea aagatatgac gggaaatgca gtggctgaat cttctccatt agaacaatagg	7260
gagagaattt tgttagcagt tcgtagttat ctggagaga atattgaatg gactaatgaa	7320
aatgtaaatt taactataaa ctatttaaatt aacagattaa aaaaattata atgtaacctt	7380
tgctttcaaa tgagtagaaa taatgcacat ccatgtttgt atcgtgcaaa taaagtgttt	7440
catccgtagg aaaaaatgac tttagtatct gtccgcttt ttctgatgaa atgtgctccc	7500
cgacaaaatt gaatgaatca tggacatttg ctggctttga tacagcgaaa gcagccgttc	7560
ctatgttata tatcggattt aacagcagga caaaaaacac catgacagcc atcgtcaccc	7620
acttattcac acgcacataa acctttcctg acttttggaa cagatgatag ctcacaaaa	7680
atcccgccat tgccaaataa atcgtatatg gcattactgc accataatct tttagattt	7740

gattgggata tggcgcaagc agcaagacaa gcagtccgat aatcagcgta taaaataagc	7800
ctagtaagat cttatccgtt ctccaataca gcttgaaaaa cactacattc aacgcaatgg	7860
gaagagtgat gatgaaaaac agaaacacga atgcaatcgg ctccatccca tccgggtatt	7920
ccttccaata cgaagaaaaa ctaaaaatca tttgtacgat cggcaaaactg acaacagcaa	7980
ggtcgaacgt ataaaactta ccccttccgc catgatcagc cggcacacgc ataatgtgaa	8040
aagccgtcag cagcacatat ccgtataaca aaaaatgcag cagcggcagc agttcttttc	8100
cgtcctctct taagtaagcg ctgggtgaag tttgtgattg cacctgggtga ataagttcaa	8160
cagacactcc cgccagcagc acaatccgca atataacacc cgccaagaac attgtgcgct	8220
gccggtttat ttigggatga tgcacaaaaa gatataagcc cgccagaaca acaattgacc	8280
attgaatcag cagggtgctt tgtctgctta atataaaata acgttcgaaa tgcaatacat	8340
aatgactgaa taactccaac acgaacaaca aaagtgcgca ttttataaaa gctaatgatt	8400
cagtccacat aattgataga cgaattctgc tacaggtcac gtggctatgt gaaggatcgc	8460
gcgtccagtt aagagcaaaa acattgacaa aaaaatttat ttatgctaaa atttactatt	8520
aatatatattg tatgtataat aagattctcc tggccagggg aatcttattt tttgtggagg	8580
atcatttcat gaggaaaaat gagtccagct taacgtctct aatttcagct ttgcccgtg	8640
catatcacag ccgatatgac acacctctta tttttgatga ttttatcgca aaagatctca	8700
ttaacgaaaa agagttttatc gacatcagta aaaatatgat tcaagaaata tcgtttttca	8760
acaaagagat cgccgaacgt cttcaaaatg atcctgaaaa aatattaaaa tgggttcac	8820
aaatccagct gtctccaacg cccctagcac gtgcttctta ttgtgaaaaa gtcttcacaa	8880
acgaattaat ccigggggca aaacagtatg tcattcttgg agcgggactg gatactttct	8940
gctttcggca tccagaatta gaaaacagct tacaggtttt cgaggttgat catccggcca	9000
cacagcaatt gaaaaaaaaa aagctgaagg atgcaaatct gacaattccg ggtcatcttc	9060
attttgttcc tatggatttc accaaaacgt tttcgtatga tcctctctta gatgaaggat	9120
ttaaaaacac aaaaacattc ttacgccttc tcggagtgtc ttattatgta acacgggaag	9180
aaaatgcaag ctigatcagc aatttatttt ctcattgtccc gcctggaagc tctattgttt	9240
ttgattatgc ggacgaaaca ctttttacag caaaaggac gtcgaatcga gttgaacata	9300
tggtgaagat ggctgccgca agcggggaac cgatgaaatc atgtttcact tatcaagaga	9360
ttgaacatct g	9371
<210> 48	
<211> 4339	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcataatcagg attatcaata	60
ccatatTTTT gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa actcacgag gcagttccat	120
aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc gtccaacatc aatacaacct	180
attaatttcc cctcgtcaaa aataagggtta tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact	240
gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc agacttgttc aacaggccag	300
ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc	360

gcctgagcga ggcgaaatag cgcgacgctg ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgag	420
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat tttcacctga atcaggatat	480
tcttctaata cctggaacgc tgtttttccg gggatcgagc tggtagtaaa ccatgcatca	540
tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagtggca taaattccgt cagccagttt	600
agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac	660
aactctggcg catcgggctt cccatacaag cgatagattg tcgcacctga ttgcccgaca	720
ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca tgttgggaatt taatcgcggc	780

ctcgacgttt cccgttgaat atggctcata ttttctctt ttcaatatta ttgaagcatt	840
tatcagggtt attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaacia	900
atagggttca gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag cccatttata	960
cctgaatatg gtcataaca ccccttggtt gcctggcggc agtagcgagg tgggtccacc	1020
tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggactcc	1080
ccatcgcgaga gtagggaact gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact	1140
gggcctttcg cccgggctaa ttagggggtg tcgcccttta gtcgctgaac atgtgctctg	1200

tttctaccga gaacgtttcc ttcactgaga cggaaaccga ggcacgtcgt agcgcgaact	1260
acgagccgaa tagctgggac tacgatttcc tgctgtcttc cgatactgac gaatctattg	1320
aggtgtacaa agacaaaagc aagaaactgg aggtgaagt gcgccgcgaa attaacaacg	1380
agaaagctga attcctgact ctgctggagc tgatcgataa cgtacagcgc ctgggtctgg	1440
gttaccgctt cgaatctgat atccgtcgcg cactggatcg tttcgtaagc agcggcggtt	1500
tcgatggcgt gacaaaaacg agcctgcacg ctaccgcgct gtccttccgt ctgctgcgtc	1560

agcacggctt cgaagtttct caggaagcat tctccggttt caaagatcaa aacggtaact	1620
tcctggaaaa cctgaaagaa gacactaagg cgatcctgag cctgtatgag gcaagctttc	1680
tgcccttgga gggtagaagc atcctggatg aggcgcgcgt attcgccatc tcccatctga	1740
aagagctgtc tgaagagaaa atcggtaagg aactggcaga gcaggttaat cacgcactgg	1800
aactgccgtc gcatcgtcgt acccagcgtc tggaggcggc ttggtccatc gaagcgtacc	1860
gcaaaaagga ggatgctaac caggttctgc tggaaactggc catcctggac tacaacatga	1920
tccagtcctg ttaccagcgt gatctgcgtg aaacctcccg ttggtggcgc cgtgtgggcc	1980
tggcgaccaa actgcacttc gctaaggacc gcctgattga gtctttttac tgggcagtcg	2040
gcgttgcgtt cgaacctcag tattctgact gccgtaacag cgttgcgaaa atgttcagct	2100
tcgttactat tatcgacgac atctacgacg ttacggtagc tctggacgag ctggaactgt	2160
ttaccgacgc tgtcgaacgt tgggatgtta acgccatcaa cgatctgcct gactacatga	2220
aactgtgctt cctggcactg tataacacga tcaacgaaat tgcatacgac aacctgaaag	2280
acaaaggtga aaacatcctg ccgtacctga ctaaagcgtg ggccgatctg tgtaacgctt	2340
ttctgcaaga agcgaaatgg ctgtataaca aatccactcc gacctttgac gattatttcg	2400
gcaatgcctg gaaatccagc tctggcccgcc tgcaactgat cttcgcttat ttgcggttg	2460
tccaaaacat caaaaaggag gaaattgaaa acctgcaaaa ataccacgat atcattagcc	2520
gtcctttctc tatctttcgc ctgtgcaacg acctggcaag cgcgtccgca gagatcgac	2580
gtggcgaaac cgtaactct ttttctgct acatgcgcac caagggcatt tccgaagagc	2640
tggcaaccga gagcgtaatg aatctgatcg acgaaacctg taagaaaatg aacaaagaaa	2700
aactgggtgg ctccctgttc gctaaaccgt tcgtagagac tgctattaac ctggcacgtc	2760
agagccactg cacctaccac aatggtgacg cacatactag cccggatgaa ctgactcgta	2820
aacgtgtact gtctgttacc accgaaccga ttctgccgtt cgaacgttaa ctgcagcgtc	2880
aatcgaaagg gcgacacaaa atttattcta aatgcataat aaatactgat aacatcttat	2940
agtttgtatt atattttgta ttatcgttga catgtataat ttgtatatca aaaactgatt	3000
ttccctttat tattttcgag atttattttc ttaattctct ttaacaaact agaaatattg	3060
tatatacaaa aaatcataaa taatagatga atagtttaat tataggtgtt catcaatcga	3120
aaaagcaacg tatcttattt aaagtgcgtt gcttttttct catttataag gttaaataat	3180
tctcatatat caagcaaagt gacaggcgcc cttaaataat ctgacaaatg ctctttccct	3240
aaactcccc cataaaaaaa cccgccgaag cgggttttta cgttatttgc ggattaacga	3300

ttactcgta tcagaaccgc ccagggggcc cgagcttaag actggccgtc gttttacaac 3360  
acagaaagag tttagataaa cgcaaaaagg ccatccgtca ggggccttct gcttagtttg 3420  
atgcctggca gttccctact ctgccttcc gcttctcgc tcactgactc gctgcgctcg 3480  
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 3540  
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 3600  
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggtccc gccccctga cgagcatcac 3660  
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg 3720

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgtt taccggatac 3780  
ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat 3840  
ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 3900  
cccgaccgtt gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 3960  
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt 4020  
gtacagagt tctgaagtg gtgggctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttgggt 4080  
atctgcgctc tgcgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 4140

aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 4200  
aaaaaaggat ctcaagaaga tcttttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaa 4260  
gacgcgcgcg taactcagct taagggattt tggatcatgag cttgcgccgt cccgtcaagt 4320  
cagcgtaatg ctctgcttt 4339

<210> 49

<211> 6065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180

tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa 300

caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta 360

aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatgtgctc 420



tgtttctacc gagaacgttt ccttcactga gacggaaacc gaggcacgtc gtagcgcgaa	480
ctacgagccg aatagctggg actacgattt cctgctgtct tccgatactg acgaatctat	540
tgagggtgtac aaagacaaag caaagaaact ggaggctgaa gtgcgccgcg aaattaacaa	600
cgagaaagct gaattcctga ctctgctgga gctgatcgat aacgtacagc gcctgggtct	660
gggttaccgc ttcgaatctg atatccgtcg cgcactggat cgtttcgtaa gcagcggcgg	720
tttcgatggc gtgacaaaa cgagcctgca cgtaccgcg ctgtccttcc gtctgctgcg	780
tcagcacggc ttcgaagttt ctcaagaaac attctccggt ttcaaagatc aaaacggtaa	840
cttcttgga aacctgaaag aagacactaa ggcgatcctg agcctgtatg aggcaagctt	900
tctggccctg gagggtgaga acatcctgga tgaggcgcgc gtattcgcca tctcccatct	960
gaaagagctg tctgaagaga aaatcggtaa ggaactggca gagcaggtta atcacgcact	1020
ggaactgccg ctgcatcgtc gtaccacgcg tctggaggcg gtttgggtcca tcgaagcgta	1080
ccgcaaaaag gaggatgcta accaggttct gctggaactg gccatcctgg actacaacat	1140
gatccagtcc gtttaccagc gtgatctgcg tgaaacctcc cgttgggtggc gccgtgtggg	1200
cctggcgacc aaactgcact tcgctaagga ccgcctgatt gagtcttttt actgggcagt	1260
cggcgttgcg ttcgaacctc agtattctga ctgccgtaac agcgttgcga aaatgttcag	1320
cttcgttact attatcgacg acatctacga cgtttacggt actctggacg agctggaact	1380
gtttaccgac gcigtcgaa gttgggatgt taacgccatc aacgatctgc ctgactacat	1440
gaaactgtgc ttcttggcac tgtataacac gatcaacgaa attgcatacg acaacctgaa	1500
agacaaaggt gaaaacatcc tgccgtacct gactaaagcg tgggcggatc tgtgtaacgc	1560
ttttctgcaa gaagcgaaat ggctgtataa caaatccact ccgacctttg acgattattt	1620
cggcaatgcc tggaatcca gctctggccc gctgcaactg atcttcgctt attttgcggt	1680
tgtccaaaac atcaaaaagg aggaaattga aaacctgcaa aaataccacg atatcattag	1740
ccgtccttct catatctttc gcctgtgcaa cgacctggca agcgcgtccg cagagatcgc	1800
acgtggcgaa accgctaact ctgtttcctg ctacatgcgc accaagggca ttccgaaga	1860
gctggcaacc gagagcgtaa tgaatctgat cgacgaaacc tgtaagaaaa tgaacaaaga	1920
aaaactgggt ggctccctgt tcgctaaacc gtctgtagag actgctatta acctggcacg	1980
tcagagccac tgcacctacc acaatggtga cgcacatact agcccggatg aactgactcg	2040
taaactgtga ctgtctgtta tcaccgaacc gattctgccg ttcgaacgtt aactgcagct	2100
ggtaccatat gggaattcga agctttctag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga	2160

atagcgccgt cgaccatcat catcatcatc attgagtta aacggtctcc agcttggtg	2220
ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg	2280
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtccacacgtg accccatgcc	2340
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggctctccc atgcgagagt	2400
agggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt	2460
ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt	2520
tgaacgttgc gaagcaacgg ccgggagggt ggcgggcagg acgcccgcc taaactgcc	2580
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc	2640
tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	2700
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	2760
ccttatctcc tttttgctgg cattttgcct tctgttttt gctcaccag aaacgttgtt	2820
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct	2880
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac	2940
ttttaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtt gacgccgggc aagagcaact	3000
cggtcggcg atacactatt ctcaaatga ctggttgag tactcaccag tcacagaaaa	3060
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga	3120
taacactcgc gccaaactac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt	3180
tttgacaac atgggggac atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga	3240
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg	3300
caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat	3360
ggaggcggat aaagtgtcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat	3420
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc	3480
agatggtaag ccctcccgta tctagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga	3540
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc	3600
agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcatTTTT aatttaaaag	3660
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc	3720
gttcactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt	3780
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt	3840
gccggatcaa gagctacaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat	3900
accaaatact gtctttctag tgtagccgta gtaggccac cacttcaaga actctgtagc	3960
accgcctaca tactcgcctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcc gtggcgataa	4020

gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg	4080
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag	4140
atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag	4200
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa	4260
cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt	4320
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg	4380
gttcttgccc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat ccctgattc	4440
tgtggataac cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac	4500
cgagcgcagc gagtcatga gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggg attttctcct	4560
tacgcatctg tgcggtatct cacaccgat atggtgcact ctcatgataa tctgctctga	4620
tgccgcatag ttaagccagt atacactccg ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg	4680
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg cctgacggg cttgtctgct cccggcatcc	4740
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca	4800
tcaccgaaac gcgcgagga gcagatcaat tcgcgcgca aggcgaagcg gcatgcattt	4860
acgttgacac catcgaatgg tgcaaacct ttcgcgggtat ggcatgatag cccccggaag	4920
agagtcaatt cagggtgggt aatgtgaaac cagtaacgtt atacgatgtc gcagagtatg	4980
ccggtgtctc ttatcagacc gtttcccgcg tggtagacca ggccagccac gtttctgcga	5040
aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgcgtgg	5100
cacaacaact ggccggcaca cagtcgttgc tgattggcgt tgccacctcc agtctggccc	5160
tgcacgcgcc gtcgcaaatt gtgcggcga ttaaatctcg cgccgatcaa ctgggtgcc	5220
gcgtggtggt gtcgatgta gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaagcg gcggtgcaca	5280
atcttctcgc gcaacgcgtc agtgggctga tcattaacta tccgtggat gaccaggatg	5340
ccattgctgt ggaagctgcc tgactaatg ttccggcgtt atttcttgat gtctctgacc	5400
agacacccat caacagtatt attttctccc atgaagacgg tacgcgactg ggcgtggagc	5460
atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgtgtttage gggccatta agttctgtct	5520
cggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga	5580
tagcgaacg ggaaggcagc tggagtcca tgcgggttt tcaacaaacc atgcaaatgc	5640
tgaatgaggg catcgttccc actgcgatgc tggttgcaa cgatcagatg gcgctggcg	5700
caatgcgcgc cattaccgag tccgggctgc gcgttggtgc ggatatctcg gtagtgggat	5760
acgacgatac cgaagacagc tcatgttata tccgcgcgtc aaccaccatc aaacaggatt	5820
ttcgctgct ggggcaaac agcgtggacc gcttgctgca actctctcag ggccaggcgg	5880

tgaagggcaa tcagctgttg cccgtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgccca	5940
atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	6000
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gcgcaattg	6060
atctg	6065
<210> 50	
<211> 6912	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 50	
ttgtctgtct ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg	60
tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgcgaa	120
ggcgaagcgg catgcattta cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggtatg	180
gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta	240
tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag	300
gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat	360
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcgtt	420
gccacctcca gtctggccct gcacgcgcgc tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcgc	480
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc	540
tgtaaagcgg cggatgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat	600
ccgctggatg accagatgac cattgtctgt gaagctgcct gcactaatgt tccggcggtta	660
tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta tttctccca tgaagacggt	720
acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg	780
ggcccattaa gtctgtctc ggcgctctg cgtctggtg gctggcataa atatctcact	840
cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtccat gtccggtttt	900
caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac	960
gatcagatgg cgtggggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg	1020
gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtca	1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa	1140
ctctctcagg gccaggcggg gaagggaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga	1200
aaaaccacc tggcgcccaa tacgaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta	1260

atgcagctgg caccagaggt ttcccgaactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa	1320
tgtgagttag cgcaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa	1380
tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac	1440
tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgaca	1500
tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca tccggctcgt	1560
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa ttccacacag gaaacagcgc cgctgagaaa	1620
aagcgaagcg gcaactgctct ttaacaattt atcagacaat ctgtgtgggc actcgaccgg	1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa	1740
taaggaggaa taaacctgt gtgcgacctc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa	1800
ttcccgtcgt tccgcaaact atcagccaaa cctgtggaat ttcgaattcc tgcaatccct	1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt	1920
tcgctgcatg atcaaccgtg tagacacca gccgctgtcc ctgctggagc tgatcgacga	1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaaatt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa	2040
catcgtactg ctggacgaaa acaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgctctgtc	2100
tttccgtctg ctgcgtcagc acggtttcga ggtttctcag gatgtttttg agcgtttcaa	2160
ggataaagaa ggtggtttca gcggtgaact gaaaggtgac gtccaaggcc tgctgagcct	2220
glatgaagcg tcttacctgg gtttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt	2280
ttccatcacc cactgaaga acaactgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca	2340
agtgaaccac gccctggaac tgccatatca ccagcgtctg caccgtctgg aggcacgttg	2400
gttctctgat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgctgg agctggcgaa	2460
gctggatttt aacatggtac agacctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccgtg	2520
gtggaccgag atgggcctgg ctagcaaaact ggattttgta cgcgaccgcc tgatggaagt	2580
ttatttctgg gcaactgggtg tggcgccaga cccgcagttt ggtgaatgtc gcaaagctgt	2640
tactaaaatg tttggtctgg tgacgatcat cgatgacgtg tatgacgttt atggcactct	2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgctgg gacgttaacg ctattaacac	2760
cctgccggac tatatgaac tgtgtttcct ggcaactgtac aacaccgtta acgacacgtc	2820
ctattctatt ctgaaagaga aaggtcataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg	2880
tgaactgtgc aaagcctttc tgcaagaggc gaaatggtcc aacaacaaaa ttatcccggc	2940
tttctccaag tacctggaaa acgccagcgt ttctctctcc ggtgtagcgc tgctggcgcc	3000

gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttcctt	3060
gaccgacttc catggtctgg tgcgttctag ctgcgttata ttccgcctgt gcaacgatct	3120
ggccacctct gcggcgggagc tggaacgtgg cgagactacc aattctatca ttagctacat	3180
gcacgaaaac gatggtacca gcgaggaaca ggcccgcgaa gaactgcgta aactgatcga	3240
cgccgaatgg aaaaagatga atcgtgaacg cgttagcgac tccacctgc tgcctaaagc	3300
gttcatggaa atcgcagtta acatggcacg tgtttccac tgcacctacc agtatggcga	3360
tggctctgggt cgcccagact acgcgactga aaaccgcata aaactgctgc tgattgacct	3420
tttcccgatt aaccagctga tgtatgtcta actgcatcgc ccttaggagg taaaaaaaa	3480
tgactgccga caacaatagt atgccccatg gtgcagtata tagttacgcc aaattagtgc	3540
aaaaccaaac acctgaagac attttgaag agtttcctga aattattcca ttacaacaaa	3600
gacctaatat ccgacttagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaaca tgttttctg	3660
gtcatgatga ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattg tattgttttg gattgggacg	3720
ataatgctat tggcgccgtt accaagaaag ttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg	3780
gtttactaca tcgtgcatc tccgtcttta tttcaatga acaagtgtaa ttacttttac	3840
aacaaagagc cactgaaaaa ataactttcc ctgatctttg gactaacaca tgctgctctc	3900
atccactatg tattgatgac gaattagggt tgaagggtaa gctagacgat aagattaagg	3960
gcgctattac tgcggcgggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa	4020
ctaagacaag gggtaagttt cactttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg	4080
aacctggggg tgaacatgaa attgattaca tcctatttta taagatcaac gctaaagaaa	4140
acttgactgt caacccaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaag	4200
atttgaaaac tatgtttgct gaccaagtt acaagtttac gccttggtt aagattattt	4260
gcgagaatta cttattcaac tgggtgggagc aattagatga ctttctgaa gtggaaaatg	4320
acaggcaaat tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca gctggtacca tatgggaatt	4380
cgaagctttc tagaacaaaa actcatctca gaaggagatc tgaatagcgc cgtcgacct	4440
catcatcctc atcattgagt ttaaaccgtc tccagcttgg ctgttttggc ggatgagaga	4500
agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggcttgata aaacagaatt	4560
tgcttgccgg cagttagcgc gtgggtccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac	4620
gccgtagcgc cgatggtagt gtgggtctc cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat	4680
caataaaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg	4740

gtgaacgctc tctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa	4800
cggcccgag ggtagggggc aggacgccc ccataaactg ccaggcatca aattaagcag	4860
aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg ttctacaaa ctctttttgt ttatttttct	4920
aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc ggaattgcc gctggggcgc cctctggtaa	4980
ggttgggaag cctgcaaag taaactggat ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg	5040
caggggatca agctctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga	5100
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc	5160
acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttcgg ctgtcagcgc aggggcgccc	5220
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc	5280
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac	5340
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcc gggcaggatc tcctgtcatc	5400
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	5460
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg	5520
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	5580
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcgt	5640
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg	5700
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac	5760
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	5820
tatcgccgt cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg	5880
acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa	5940
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaa	6000
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc	6060
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatc tgtccttcta gttagccgt	6120
agttaggcca ccaactcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec	6180
tgttaccagt ggtgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	6240
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	6300
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg	6360
ccacgttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag	6420
gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	6480
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	6540
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc	6600

acatgttctt tctgcgtta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	6660
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag	6720
cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca	6780
tatgggtcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gtttaagccag tatacactcc	6840
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc	6900
gccctgacgg gc	6912
<210> 51	
<211> 7902	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 51	
ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccgga gctgcatgtg	60
tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagcgag cagatcaatt cgcgcgcgaa	120
ggcgaagcgg catgcattta cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggtatg	180
gcatgatagc gcccgaaga gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta	240
tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctt tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag	300
gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat	360
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcgtt	420
gccacctcca gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaatg tcgcggcgat taaatctcgc	480
gccgatcaac tgggtgccag cgtgggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc	540
tgtaaagcgg cgggtgcaca ttttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat	600
ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcaactaatgt tccggcggtta	660
tttcttgatg ttcttgacca gacacccatc aacagtatta ttttctccca tgaagacggt	720
acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg	780
ggcccattaa gtctgtctc ggcgctctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact	840
cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt	900
caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac	960
gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg	1020
gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtca	1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa	1140



ctctctcagg gccaggcggg gaagggaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga	1200
aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta	1260
atgcagctgg cagcacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa	1320
tgtgagttag cgcaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa	1380
tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac	1440
tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt tgcgcgcaca	1500
tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca tccggctcgt	1560
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa ttccacacag gaaacagcgc cgctgagaaa	1620
aagcgaagcg gcactgctct ttaacaattt atcagacaat ctgtgtgggc actcgaccgg	1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa	1740
taaggaggaa taaacctgt gtgcgacctc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa	1800
ttcccgtcgt tccgcaact atcagccaaa cctgtggaat ttcgaattcc tgcaatccct	1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt	1920
tcgtgcatg atcaaccgtg tagacacca gccgctgtcc ctgctggagc tgatcgacga	1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaaatt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa	2040
catcgtactg ctggacgaaa acaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgctctgtc	2100
tttccgtctg ctgcgtcagc acggtttcga ggtttctcag gatgtttttg agcgtttcaa	2160
ggataaagaa ggtggtttca gcggtgaact gaaaggtgac gtccaaggcc tgctgagcct	2220
glatgaagcg tcttacctgg gtttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt	2280
ttccatcacc cacctgaaga acaacctgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca	2340
agtgagccac gccctggaac tgccatatca ccagcgtctg caccgtctgg aggcacgttg	2400
gttctctgat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgctgg agctggcgaa	2460
gctggatttt aacatggtag agacctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccgtg	2520
gtggaccgag atgggcctgg ctagcaaaact ggattttgta cgcgaccgcc tgatggaagt	2580
ttatttctgg gcactgggta tggcgccaga cccgcagttt ggtgaatgtc gcaaagctgt	2640
tactaaaatg ttigtctgg tgacgatcat cgatgacgtg tatgacgttt atggcactct	2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgttgg gacgttaacg ctattaacac	2760
cctgccggac tatatgaac tgtgtttcct ggcactgtac aacaccgtta acgacacgtc	2820
ctattctatt ctgaaagaga aaggtcataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg	2880
tgaactgtgc aaagccttcc tgcaagaggc gaaatgttcc aacaacaaaa ttatcccggc	2940
tttctccaag tacttggaac acgccagctt ttctctctcc ggtgtlagcgc tgctggcgcc	3000

gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttcctt	3060
gaccgacttc catggtctgg tgcgttctag ctgcgttata ttccgcctgt gcaacgatct	3120
ggccacctct gggcgaggc tggaaactgg cgagactacc aattctatca ttagctacat	3180
gcacgaaaac gatggtacca gcgaggaaca gggccgcgaa gaactgcgta aactgatcga	3240
cgccgaatgg aaaaagatga atcgtgaacg cgttagcgac tccacctgc tgcctaaagc	3300
gttcatggaa atcgcagtta acatggcacg tgtttccac tgcacctacc agtatggcga	3360
tggctctgggt cgcccagact acgcgactga aaaccgcata aaactgctgc tgattgacct	3420
tttcccattt aaccagctga tgtatgtcta actgcattcg cccttaggag gtaaaaaaac	3480
atgagttttg atattgcaa ataccgcacc ctggcactgg tcgactccac ccaggagtta	3540
cgactgttgc cgaaagagag ttaccgaaa ctctgcgacg aactgcgccg ctatttactc	3600
gacagcgtga gccgttccag cgggcacttc gctccgggc tgggcacggt cgaactgacc	3660
gtggcgctgc actatgtcta caacaccccg ttgaccaat tgatttggga tgtggggcat	3720
caggcttata cgataaaat ttgaccgga cgccgcgaca aaatcggcac catccgtcag	3780
aaaggcggtc tgcaccgtt cccgtggcgc ggcgaaagcg aatatgacgt attaacgctc	3840
gggcattcat caacctccat cagtcccgga attggtattg cggttgctgc cgaaaaagaa	3900
ggcaaaaatc gccgcaccgt ctgtgtcatt ggcgatggcg cgattaccgc aggcattggcg	3960
tttgaagcga tgaatcacgc gggcgataat cgtctgata tgctgggtgat tctcaacgac	4020
aatgaaatgt cgatttccga aaatgtcggc gcgtcaaca accatctggc acagctgctt	4080
tccggtaaag ttactcttc actgcgcgaa ggcgggaaaa aagttttctc tggcgtgccg	4140
ccaattaaag agctgctcaa acgcaccgaa gaacatatta aaggcatggt agtgcctggc	4200
acgttgtttt aagagctggg ctttaactac atcgccccgg tggacggtca cgatgtgctg	4260
gggcttatca ccacgctaaa gaacatgcgc gacctgaaag gcccgagtt cctgcatatc	4320
atgacaaaaa aaggtcgtgg ttatgaaccg gcagaaaaag acccgatcac tttccacgcc	4380
gtgcctaaat ttgatccctc cagcggttgt ttgccgaaaa gtagcggcgg ttgccgagc	4440
tattcaaaaa tctttggcga ctggttgtgc gaaacggcag cgaaagacaa caagctgatg	4500
gcgattactc cgccgatcgc tgaaggttcc ggcatggtcg agttttcacg taaattcccg	4560
gatecgtact tcgactggc aattgccgag caacacgcgg tgacctttgc tgcgggtctg	4620
gcgattgggtt ggiacaaacc cattgtcgcg atttactcca ctttctgca acgcgcctat	4680
gatcaggtgc tgcatgacgt ggcgattcaa aagcttccgg tcctgttcgc catcgaccgc	4740

gcgggcattg ttggtgctga cgggtcaaacc catcagggtg cttttgatct ctcttacctg	4800
cgctgcatac cggaatggt cattatgacc ccgagcgatg aaaacgaatg tcgccagatg	4860
ctctataccg gctatcacta taacgatggc ccgtcagcgg tgcgtaccc gcgtggcaac	4920
gcggtcggcg tggaactgac gccgctggaa aaactaccaa ttggcaaagg cattgtgaag	4980
cgctgtggcg agaaactggc gatccttaac ttggtacgc tgatgccaga agcggcgaaa	5040
gtcgccgaat cgctgaacgc cacgtggtc gatatgcgtt ttgtgaaacc gcttgatgaa	5100
gcgttaattc tggaatggc cgccagccat gaagcgctgg tcaccgtaga agaaaacgcc	5160
attatgggcg gcgcaggcag cggcgtgaac gaagtgtga tggcccatcg taaaccagta	5220
cccgtgctga acattggcct gccggacttc ttattccgc aaggaaactca ggaagaaatg	5280
cgcgccgaac tcggcctcga tgccgctggt atggaagcca aaatcaaggc ctggctggca	5340
taactgcagc tggtaaccata tgggaattcg aagctttcta gaacaaaaac tcatctcaga	5400
agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt aaacggtctc	5460
cagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa	5520
cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtccacct	5580
gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc ctagcgccg atggtagtgt ggggtctccc	5640
catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg	5700
ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcgtt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc	5760
gggagcggtt ttgaacgtt cgaagcaacg gcccgagggg tggcgggcag gacgcccgcc	5820
ataaactgcc aggcatacaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttcggtt	5880
tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gcttaaccgg	5940
aattgccagc tggggcgccc tctggttaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg	6000
ctttctcgcc gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat	6060
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg	6120
tggagaggct attcggtctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg	6180
tgttccggct gtcagcgagc gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg	6240
ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc	6300
cttgccagc tgtgctcagc gttgtcactg aagcggaag ggactggctg ctattgggcg	6360
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgccgagaaa gtatccatca	6420
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc	6480

aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctccgatgga agccggctctt gtcgatcagg 6540  
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 6600  
cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 6660  
tcatgggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 6720  
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatatgac tgaagagctt ggcggcgaat 6780  
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgtccc cgattcgag cgcacgcct 6840  
tctatgcct tcttgacgag ttctctgac gcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 6900  
  
cgttcactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 6960  
ttctgcgct aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 7020  
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 7080  
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 7140  
caccgcctac atacctcgtc ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 7200  
agtcgtgtc taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 7260  
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 7320  
  
gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 7380  
ggatatccgt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa 7440  
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatctt 7500  
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 7560  
ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tctgctgta tcccctgatt 7620  
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 7680  
ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tatcttctcc 7740  
  
ttacgcatct gtccggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 7800  
atgccgata gtttaagccag tataactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc 7860  
gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gc 7902  
  
<210> 52  
<211> 6783  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic Construct  
<400> 52  
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 60

tggcgaatgg cgctgatgc ggtatcttct ccttacgcat ctgtgcggtt tttcacaccg	120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca	180
cccggcaaca cccgtgacg agcttagtaa agccctcgct agattttaat gcggatgttg	240
cgattacttc gccaaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcctttcatg atatactcc	300
caatttgtgt agggcttatt atgcacgctt aaaaataata aaagcagact tgacctgata	360
gtttggctgt gagcaattat gtgcttagtg catctaacgc ttgagttaag ccgcgccgcg	420
aagcggcgtc ggcttgaacg aattgttaga cattatttgc cgactacctt ggtgatctcg	480
cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa gcgatcttct	540
tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg ggccggcagg	600
cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttcggcgcga ttttgccggt tactgcgctg	660
taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca ttctgctcat cgccagccca gtcggggcggc	720
gagttccata gcgttaaggt ttcatcttagc gcctcaaata gatcctgttc aggaaccgga	780
tcaaagagtt cctccgccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct tgcttttgc	840
agcaagatag ccagatcaat gtgcgatctg gctggctcga agatacctgc aagaatgtca	900
ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca cggaatgatg	960
tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgtcttc tccaggggaa	1020
gccgaagttt ccaaaaggtc gttgatcaaa gctcgccgcg ttgtttcatc aagccttacg	1080
gtcaccgtaa ccagcaaate aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc cactgcggag	1140
ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggg tcgagatggc gctcgatgac gccaaactacc	1200
tctgatagtt gactcgatc ttccggcatc accgcttccc tcatgatgtt taactttgtt	1260
ttagggcgac tgccttctg ctgaacatcg ttgctgtcc ataacatcaa acatcgaccc	1320
acggcgtaac gcgttctgtg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc aaaaaaacag	1380
tcataacaag ccatgaaaac cgccactgcg ccgttaccac cgctgcgttc ggtcaaggtt	1440
ctggaccagt tgcgtgagcg catagctac ttgcattaca gcttacgaac cgaacaggct	1500
tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt ttccacggtg tgcgtcaccc ggcaaccttg	1560
ggcagcagcg aagtcgaggc atttctgtcc tggttgccga acgagcgcaa ggtttcggtc	1620
tccacgcatc gtcaggcatt ggccggcctt ctgttcttct acggcaaggt gctgtgcacg	1680
gatctgccct ggcttcagga gatcggaaga cctcgccgct cgcggcgctt gccgggtggtg	1740
ctgaccccggt atgaagtggg tcgcatctc ggttttctgg aaggcgagca tcgtttgttc	1800

gcccagcttc tgatggaac gggcatgcgg atcagtgagg gtttgcaact gcgggtcaag	1860
gatctggatt tcatcacgg cagcatcatc gtgcgggagg gcaagggctc caagatcgg	1920
gccttgatgt taccgagag cttggcacc agcctgcgcg agcaggggaa ttaattcca	1980
cgggttttgc tgcccgaac cgggctgttc tgggtgtgct agtttgttat cagaatcgca	2040
gatccggctt cagccggttt gccgctgaa agcgtatatt cttccagaat tgccatgatt	2100
ttttcccccac gggaggcgtc actggctccc gtgttgctgg cagctttgat tcgataagca	2160
gcctgcctg tttcaggctg tctatgtgtg actgttgagc tgtaacaagt tgtctcagg	2220
gttcaatttc atgttctagt tgccttgttt tactggtttc acctgttcta ttaggtgtta	2280
catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcatggtg aacagctttg aatgcaccaa	2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct tttttacacc gtttcatct gtgcatatgg	2400
acagttttcc cttgatatg taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg	2460
atgcttcact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttccgta ttagccagt	2520
atgttctcta gtgtggttcg ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca	2580
tacttacttt gcatgtcact caaaaatttt gcctcaaaac tggtagctg aatttttgca	2640
gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt ccgttatgta ggtaggaatc tgatgtaatg	2700
gttgttggtta tttgtcacc attcattttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga	2760
tccatttgc tctctagttc aacttggaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgtta	2820
tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc	2880
cattggttaa gccttttaaa ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat	2940
tcatcaaggc taatctctat atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttctttta	3000
aacctcat aaatctcat agagtatttg tttcaaaag acttaacatg ttccagatta	3060
tattttatga attttttaaa ctggaaga taaggcaata tctcttact aaaaactaat	3120
tctaattttt cgcttgagaa cttggcatag ttgtccact ggaaaatctc aaagccttta	3180
accaaaggat tcttgatttc cacagtctc gtcatcagct ctctggttgc ttagctaat	3240
acaccataag cattttcctt actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac	3300
gataccgtcc gtcttttctt ttaggggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag	3360
cataaatta gcttggttcc atgtccgtt aagtcatagc gactaatgc tagttcattt	3420
gctttgaaaa caactaattc agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta	3480
taccaattga gatgggctag tcaatgataa ttactagtcc ttttctttg agttgtgggt	3540
atctgtaaat tctgctagac ctttctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta	3600
aattccgcta gaccttctg tgtttttttt gtttatattc aagtgggtat aatttataga	3660

ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta	3720
ctttagttag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa	3780
aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcacctcgc caagctcggg caaatcgctg	3840
aatattcctt ttgtctccga ccatcaggca cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca	3900
gttcgctgcg ctacaggctc tggcagtga tgggggtaaa tggcactaca ggcgcctttt	3960
atggattcat gcaaggaaac taccataat acaagaaaag cccgtcacgg gctttctcagg	4020
gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc tatctgactt tttgctgttc agcagttcct	4080
gccctctgat ttccagctt gaccacttcg gattatcccg tgacaggtca ttcagactgg	4140
ctaatacacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgtctta ctgtcgggaa	4200
ttcgcggttg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc	4260
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgccgc	4320
tgagaaaaag cgaagcgga ctgctcttta acaatttata agacaatctg tgtgggcact	4380
cgaccggaat tatcgattaa ctttattatt aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc	4440
gattaaataa ggaggaataa accatgtgtg cgacctcttc tcaatttact cagattaccg	4500
agcataattc ccgtcgttcc gcaactatc agccaaacct gtggaatttc gaattcctgc	4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcgacc aaactggagg	4620
aagaagtctg ctgcatgac aaccgtgtag acaccagcc gctgtccctg ctggagctga	4680
tcgacgatgt gcagcgccctg ggtctgacct acaaatgtga aaaagacatc attaaagccc	4740
tggaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaacaa atctgacctg cacgcaaccg	4800
ctctgtcttt ccgtctgctg cgtcagcacg gtttcgaggt ttctcaggat gtttttgagc	4860
gtttcaagga taaagaaggt ggtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggcctgc	4920
tgagcctgta tgaagcgtct tacctgggtt tcgagggtga gaacctgctg gaggaggcgc	4980
gtaccttttc catcaccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcattaat accaaggttg	5040
cagaacaagt gagccacgcc ctggaactgc catatcacca gcgtctgcac cgtctggagg	5100
cacgttggtt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagc	5160
tggcgaagct ggattttaac atggtacaga cctgcacca gaaagagctg caagatctgt	5220
cccgtggtg gaccgagatg ggctggcta gaaaactgga tttgtacgc gaccgcctga	5280
tggaagttaa ttcttggtca ctgggtatgg cgccagacc gcagtttggg gaatgtcgca	5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggtga cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg	5400
gcactctgga cgaactgcaa ctgttcaccg atgctgtaga gcgtgggac gttaacgcta	5460
ttaacacct gccggactat atgaaactgt gtttcctggc actgtacaac accgttaacg	5520

acacgtccta ttctattctg aaagagaaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa 5580

gctggcgtga actgtgcaaa gcctttctgc aagaggcgaa atgggtccaa aacaaaatta 5640

tcccgccttt ctccaagtac ctggaaaacg ccagcgtttc ctctccggt gtagcgctgc 5700

tggcgccgtc ttacttttcc gtatgccagc agcaggaaga catctccgac cacgcgctgc 5760

gttcctgac cgacttccat ggtctgggtgc gttctagctg cgttatcttc cgctgtgca 5820

acgatctggc cacctctcgc gcggagctgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta 5880

gctacatgca cgaaaacgat ggtaccagcg aggaacaggc ccgcaagaa ctgcgtaaac 5940

tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc accctgctgc 6000

ctaaagcgtt catggaaatc gcagttaaca tggcacgtgt ttccactgc acctaccagt 6060

atggcgatgg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcatcaaa ctgctgctga 6120

ttgacctttt cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcagctggta ccatatggga 6180

attcgaagct ttctagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac 6240

catcatcatc atcatcattg agtttaaacg gtctccagct tggctgtttt ggcggatgag 6300

agaagatfff cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg ataaaacaga 6360

atttgctgg cggcagtagc gcggtgggtcc cacctgacct catgccgaac tcagaagtga 6420

aacgccgtag cgccgatggt agtgtgggtt ctcccatgc gagagtaggg aactgccagg 6480

catcaataa aacgaaagcg tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg 6540

tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcaag 6600

caacggcccg gaggggtggcg ggcaggacgc ccgcataaa ctgccaggca tcaaattaag 6660

cagaaggcca tctgacgga tggccttttt gcgtttctac aaactctttt tgtttatfff 6720

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 6780

aat 6783

<210> 53

<211> 6783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt 60

tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia 120

aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggccttctgc ttaatttgat 180



gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc gccaccctcc gggccgttgc ttcgcaacgt	240
tcaaattccgc tcccggcgga ttgtcctac tcaggagagc gttcacgcac aaacaacaga	300
taaaacgaaa ggcccagtct ttgactgag cctttcgttt tatttgatgc ctggcagttc	360
cctactctcg catggggaga cccacactia ccatcggcgc tacggcgttt cacttctgag	420
ttcggcatgg ggtcaggtagg gaccaccgcg ctactgccgc caggcaaatt ctgttttacc	480
agaccgcttc tgcgttctga tttaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcatecgcca	540
aaacagccaa gctggagacc gtttaactc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc	600
tattcagatc ctcttctgag atgagttttt gttctagaaa gcttcgaatt cccatatggt	660
accagctgca gttagacata catcagctgg ttaatcgga aagggtcaat cagcagcagt	720
ttgatgcggt tttcagtcgc gtagtctggg cgaccagac catcgccata ctggtaggtg	780
cagtgggaaa cacgtgccat gtttaactgcg atttccatga acgttttagg cagcagggtg	840
gagtcgctaa cgcgttcacg attcatcttt ttccattcgg cgtcgatcag ttacgcagt	900
tcttcgctgg cctgttctc gctggtacca tcttttctg gcatgtagct aatgatagaa	960
ttggtagtct cgccagttc cagctccgcc gcagaggtgg ccagatcgtt gcacaggcgg	1020
aagataacgc agctagaacg caccagacca tggaagtcgg tcagggaacg cagcgctgg	1080
tcggagatgt cttcctgctg ctggcatacg gaaaagtaag acggcgccag cagcgctaca	1140
ccggaggagg aaacgctggc gttttccagg tacttggaga aagccgggat aattttgttg	1200
ttggaccatt tcgctcttg cagaaaggct ttgcacagtt cacgccagct tttcgtcaga	1260
taggacaggt tgttatgacc tttctctttc agaatagaat aggacgtgc gttaacggtg	1320
ttgtacagt ccaggaacaa cagtttcata tagtccgga ggggtttaat agcgttaacg	1380
tcccagcgt ctacagcatc ggtgaacagt tgcagttcgt ccagagtgc ataaacgtca	1440
tacacgtcat cgatgatcgt caccagacca aacattttag taacagcttt gcgacattca	1500
ccaaactgcg ggtctggcgc cataccagc gccagaaat aaacttccat caggcggtcg	1560
cgtaaaaaat ccagtttctg agccaggccc atctcggtcc accagcgga cagatcttgc	1620
agctctttct ggtagcagggt ctgtaccatg ttaaaatcca gcttcgccag ctccagcagc	1680
agctggtgat gcggttcttt cggttcgtat ttatccagga accaacgtgc ctccagacgg	1740
tgcagacgt ggtgatatgg cagttccagg gcgtggctca cttgttctgc aaccttggtg	1800
ttaatgcctt ctttcaggtt gttcttcagg tgggtgatgg aaaaggtagc cgcctctcc	1860
agcaggttct caccctcgaa acccaggtaa gacgttcat acaggctcag caggccttgg	1920

acgtcacctt tcagttcacc gctgaaacca ccttctttat ccttgaaacg ctcaaaaaca	1980
tcctgagaaa cctcgaaacc gtgctgacgc agcagacgga aagacagagc ggttgctgctc	2040
aggtcagatt tgttcttttt gttttcgtcc agcagtacga tgttttcag ggctttaatg	2100
atgtcttttt caaatgtga ggtcagaccc aggcgctgca catcgtgat cagctccagc	2160
agggacagcg gctgggtgtc tacacggttg atcatgcagc gaacttcttc ctccagtttg	2220
gtcgttttct cctccagctt ttccactttc aggtcgttct ccagggttg caggaattcg	2280
aaattccaca ggtttgctg atagtgtcg gaacgacggg aattatgctc ggtaatctga	2340
gtaaattgag aagaggtcgc acacatggtt tattctctct tatttaatcg atacattaat	2400
atatacctct ttaattttta ataataaagt taatcgataa ttccggtcga gtgcccacac	2460
agattgtctg ataaattgtt aaagagcagt gccgcttcgc tttttctcag cggcgtgtt	2520
tcctgtgtga aattgttate cgctcacaat tccacacatt atacgagcgg gatgattaat	2580
tgtcaacagc tcatttcaga atctggcgta atagcgaaga ggcccgccacc gatcgccctt	2640
cccaacagtt ggcgagcctg aatggcgaat ggcgctgat gcggtatttt ctcttacgc	2700
atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgcgg	2760
catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgctga cgagcttagt aaagccctcg	2820
ctagatttta atgcggaagt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc	2880
cagcctttca tgatatact cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaataa	2940
taaaagcaga cttgacctga tagtttggt gtgagcaatt atgtgcttag tgcattctaac	3000
gcttgagtta agccgcgcgg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattattt	3060
gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc	3120
gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac	3180
gggctgatac tgggcgggca ggcgtccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc	3240
gattttgccg gttactgcgc tgtaccaa at gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc	3300
atcgccagcc cagtcggggc gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa	3360
tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcttcgcc gctggacctt ccaaggcaac	3420
gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc	3480
gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc	3540
tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcggag	3600
aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg	3660

cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt	3720
caggccgccca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg	3780
gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc	3840
cctcatgatg tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgctgct	3900
ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggaag cccgagggcat	3960
agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc	4020
accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatagct acttgcatga	4080
cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gtttcacagg	4140
tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc	4200
gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt	4260
ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggaa gacctcggcc	4320
gtcgcggcgc ttgccggctg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggttttct	4380
ggaagcgag catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga	4440
gggtttgcaa ctgcgggtca aggatctgga ttctgatcac ggcacgatca tcgtgcggga	4500
gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttaccgag agcttggcac ccagcctgcg	4560
cgagcagggg aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctggtgttg	4620
ctagtttgtt atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggctg aaagcgtat	4680
ttcttcaga attgccatga tttttccccc acgggagggc tcactggctc ccgtgttgtc	4740
ggcagctttg attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgtctatgtg tgactgttga	4800
gtgtaacaa gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt ttactgggt	4860
tcacctgttc tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg	4920
tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat cttttttaca	4980
ccgttttcat ctgtgcatat ggacagtttt ccttttgata tgtaacgggtg aacagtgtgt	5040
ctacttttgt ttgttagtgt tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca	5100
gaccttccg tatttagcca gtatgttctc tagtgtggtt cggtgttttt gcgtgagcca	5160
tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa	5220
actggtgagc tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gtttttctta gtccgttatg	5280
taggtaggaa tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctggtt	5340
gttctcaagt tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga aaatcaacgt	5400
atcagtcggg cgccctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc	5460
tttacttatt gggttcaaaa cccattgggt aagcctttta aactcatggt agttattttc	5520

aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaattctt atatttgcct tgtgagtttt	5580
cttttgtgtt agttctttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt tgttttcaaa	5640
agacttaaca tgttccagat tatattttat gaattttttt aactggaaaa gataaggcaa	5700
tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttgccttgag aacttggcat agtttgtcca	5760
ctggaaaatc tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag	5820
ctctctgggt gctttagcta atacaccata agcattttcc ctactgatgt tcatcatctg	5880
agcgtattgg ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttglagggt tttcaatcgt	5940
ggggttgagt agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg ttaagtcata	6000
gcgactaatc gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg	6060
gtctaggtga ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt	6120
ccttttcctt tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag accttgcgtg gaaaacttgt	6180
aaattctgct agaccctctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat	6240
tcaagtgggt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc	6300
cagccctgtg tataactcac tacttttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca	6360
aacgctgttt gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa gtagcacctt	6420
cgcaagctcg ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc	6480
gctgtctttt tcgtgacatt cagttcgtcg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggta	6540
aatggcacta caggcgctt ttatggattc atgcaaggaa actaccata atacaagaaa	6600
agcccgtcac gggtttctca gggcgtttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac	6660
tttttctgt tcagcagttc ctgccctctg attttccagt ctgaccactt cggattatcc	6720
cgtgacaggt cattcagact ggctaatagca ccagtaagg cagcggtatc atcaacaggc	6780
tta	6783
<210> 54	
<211> 7687	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 54	
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa	60
tggcgaatgg cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg	120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca	180

cccgccaaaca cccgctgacg agcttagtaa agccctcgct agattttaat gcggatgttg	240
cgattacttc gccaaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcccttcatg atatatctcc	300
caatttgtgt agggcttatt atgcacgctt aaaaaataata aaagcagact tgacctgata	360
gtttggctgt gagcaattat gtgcttagtg catctaacgc ttgagttaag ccgcgccgcg	420
aagcggcgtc ggcttgaacg aattgttaga cattatttgc cgactacctt ggtgatctcg	480
cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa gcgatcttct	540
tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg ggccggcagg	600
cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttccggcgca ttttgccggt tactgcgctg	660
taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca ttctgctcat cgccagccca gtcgggcggc	720
gagttccata gcgttaaggt ttcathtagc gcctcaaata gatcctgttc aggaaccgga	780
tcaaagagtt cctccgccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct tgcctttgtc	840
agcaagatag ccagatcaat gtcgatctg gctggctcga agatacctgc aagaatgtca	900
ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca cggaatgatg	960
tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgtcttc tccaggggaa	1020
gccgaagttt ccaaaaggct gttagatcaa gctcgccgcg ttgtttcatc aagccttacg	1080
gtcaccgtaa ccagcaaate aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc cactgcggag	1140
ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggg tcgagatggc gctcgatgac gccaaactacc	1200
tctgatagtt gagtcgatac ttccggcgtc accgcttccc tcatgatgtt taactttgtt	1260
ttagggcgac tgcctgctg cgtaacatcg ttgctgtccc ataacatcaa acatcgacct	1320
acggcgtaac gcgcttgctg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc aaaaaacag	1380
tcataacaag ccatgaaaaa cgccactgcg ccgttaccac cgctcgttc ggtcaaggtt	1440
ctggaccagt tgcgtgagcg catacgttac ttgcattaca gcttacgaac cgaacaggt	1500
tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt ttccacggtg tgcgtcaccc ggcaaccttg	1560
ggcagcagcg aagtcgagc atttctgtcc tggtggcga acgagcgcaa ggtttcggtc	1620
tccacgcatc gtcaggcatt ggccgccttg ctgttcttct acggcaaggt gctgtgcacg	1680
gatctgccct ggcttcagga gatcggaaga cctcgccgt cgccggcgctt gccggtggtg	1740
ctgaccccg atgaagtgg tgcatectc ggttttctgg aaggcgagca tcgtttgttc	1800
gcccagcttc tgiatggaac gggcatgcgg atcagtgagg gtttgcaact gcgggtcaag	1860
gatctggatt tcgatcacgg cacgatcatc gtgcgggagg gcaagggtc caaggatcgg	1920
gccttgatgt taccgagag cttggcacc agcctgcgcg agcaggggaa ttaattccca	1980
cgggttttgc tgcccgcaa cgggctgttc tgggtgtgct agtttgttat cagaatcgca	2040

gatccggctt cagccggttt gccggctgaa agcgcatttt cttccagaat tgccatgatt	2100
ttttcccccac gggaggcgctc actggctccc gtgttgctcg cagctttgat tcgataagca	2160
gcacgcctg tttcagctg tctatgtgtg actgttgagc tgtaacaagt tgtctcaggt	2220
gttcaatttc atgttctagt tgctttgttt tactggtttc accgtttcta ttaggtgtta	2280
catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct gtcatgggtg aacagctttg aatgcaccaa	2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct tttttacacc gttttcatct gtgcatatgg	2400
acagttttcc ctttgatatg taacggtgaa cagtgtgtct acttttgttt gttagtcttg	2460
atgcttcaact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt	2520
atgttctcta gtgtgggtcg ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca	2580
tacttacttt gcatgtcaact caaaaatttt gcctcaaac tggtagctg aatttttgca	2640
gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt ccgttatgta ggtaggaatc tgatgtaatg	2700
gttgttggtta tttgtcacc attcattttt atctgggtgt tctcaagttc ggttacgaga	2760
tccatttgtc tatctagttc aacttggaat atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgtta	2820
tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc	2880
cattgggttaa gcctttttaa ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat	2940
tcatcaaggc taatctctat atttgccctg tgagttttct tttgtgttag ttcttttaat	3000
aaccactcat aaatcctcat agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta	3060
tattttatga atttttttaa ctggaaaaga taaggcaata tctcttcaact aaaaactaat	3120
tctaattttt cgttgagaa cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta	3180
accaaaggat tctgatttc cacagtctc gtcatcagct ctctgggttc tttagctaat	3240
acaccataag cattttccct actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac	3300
gataccgtcc gttctttcct tgtaggggtt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag	3360
cataaaatta gcttgggttc atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt	3420
gctttgaaaa caactaattc agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta	3480
taccaattga gatgggctag tcaatgataa ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt	3540
atctgtaaat tctgctagac ctttctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta	3600
aattccgcta gacctttgtg tgtttttttt gtttatattc aagtgggtat aatttataga	3660
ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta	3720
ctttagttag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa	3780

aacagacctt aaaaccctaa aggccttaagt agcacccctcg caagctcggg caaatcgctg	3840
aatattcctt ttgtctccga ccatcaggca cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca	3900
gttcgctgcg ctcacggctc tggcagtgaa tgggggtaaa tggcactaca ggcgcctttt	3960
atggattcat gcaaggaaac taccataat acaagaaaag cccgtcacgg gcttttcagg	4020
gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc tatctgactt tttgtgttc agcagttcct	4080
gccctctgat ttccagctc gaccacttcg gattatcccg tgacaggtca ttcagactgg	4140
ctaatacacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgtctta ctgtcgggaa	4200
ttcgcgttgg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc	4260
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgccgc	4320
tgagaaaaag cgaagcgga ctgctcttta acaatttata agacaatctg tgtgggcact	4380
cgaccggaat tatcgattaa ctttattatt aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc	4440
gattaataa ggaggaataa accatgtgtg cgacctcttc tcaatttact cagattaccg	4500
agcataattc ccgtcgttcc gcaaacatc agccaaacct gtggaatttc gaattcctgc	4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcgacc aaactggagg	4620
aagaagtctg ctgcatgac aaccgtgtag acaccagcc gctgtccctg ctggagctga	4680
tcgacgatgt gcagcgctg ggtctgacct acaaatttga aaaagacatc attaaagccc	4740
tggaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaaca atctgacctg cacgcaaccg	4800
ctctgtcttt ccgtctgctg cgtcagcacg gtttcgaggt ttctcaggat gtttttgagc	4860
gtttcaagga taaagaaggt ggtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggcctgc	4920
tgagcctgta tgaagcgtct tacctgggtt tcgagggtga gaacctgctg gaggaggcgc	4980
gtaccttttc catcaccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcattaat accaaggttg	5040
cagaacaagt gagccacgcc ctggaactgc catatcacca gcgtctgcac cgtctggagg	5100
cacgttgggt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagc	5160
tggcgaagct ggattttaac atggtacaga ccctgcacca gaaagagctg caagatctgt	5220
cccgttggtg gaccgagatg ggccctggct gcaaaactgga tttgtacgc gaccgcctga	5280
tggaagttaa tttctgggca ctgggtatgg cgccagacc gcagtttggt gaatgtcgca	5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggtga cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg	5400
gcactctgga cgaactgcaa ctgttcaccg atgctgtaga gcgctgggac gttaacgcta	5460
ttaacacct gccggactat atgaaactgt gtttctggc actgtacaac accgttaacg	5520

acacgtccta ttctattctg aaagagaaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa	5580
gctggcgtga actgtgcaaa gcctttctgc aagaggcgaa atggtccaac aacaaaatta	5640
tcccggcttt ctccaagtac ctggaaaacg ccagcgtttc ctctccggt gtagcgctgc	5700
tggcgccgtc ttacttttcc gtatgccagc agcaggaaga catctccgac cacgcgctgc	5760
gttcctgac cgacttccat ggtctggtgc gtcttagctg cgttatcttc cgctgtgca	5820
acgatctggc cacctctgcg gcggagctgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta	5880
gctacatgca cgaaaacgat ggtaccagcg aggaacaggc ccgcaagaa ctgcgtaaac	5940
tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc accctgctgc	6000
ctaaagcgtt catggaaatc gcagttaaca tggcacgtgt ttccactgc acctaccagt	6060
atggcgtagg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcatcaaa ctgctgctga	6120
ttgaccttt cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcatcgccct taggaggtaa	6180
aaaaaaaaatga ctgccgacaa caatagtatg ccccatggtg cagtatctag ttacgcaaaa	6240
ttagtgcaaa accaaacacc tgaagacatt ttggaagagt ttctgaaat tattccatta	6300
caacaaagac ctaatacccg atctagttag acgtcaaatg acgaaagcgg agaaacatgt	6360
ttttctggtc atgatgagga gcaaattaag ttaatgaatg aaaattgtat tgttttggat	6420
tgggacgata atgctattgg tgccggtacc aagaaagttt gtcatttaat ggaaaatatt	6480
gaaaagggtt tactacatcg tgcatctctc gtctttatct tcaatgaaca aggtgaatta	6540
cttttacaac aaagagccac tgaaaaaata actttccctg atctttggac taacacatgc	6600
tgctctcadc cactatgtat tgatgacgaa ttaggtttga agggtaagct agacgataag	6660
attaaggcgc ctattactgc ggcggtgaga aaactagatc atgaattagg tattccagaa	6720
gatgaaacta agacaagggg taagtttcac tttttaaaca gaatccatta catggcacca	6780
agcaatgaac catgggggtga acatgaaatt gattacatcc tattttataa gatcaacgt	6840
aaagaaaact tgactgtcaa cccaacgtc aatgaagtta gagacttcaa atgggtttca	6900
ccaaatgatt tgaaaactat gtttctgac ccaagttaca agtttacgcc ttggtttaag	6960
attatttgcg agaattactt attcaactgg tgggagcaat tagatgacct ttctgaagtg	7020
gaaaatgaca ggcaaattca tagaatgcta taacgacgcg tcctgcagct ggtaccatat	7080
gggaattcga agctttctag aacgaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt	7140
cgaccatcat catcatcadc attgagttta aacggctctc agcttggtg ttttggcggg	7200
tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa	7260
cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa	7320
gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggtctcccc atgcgagagt agggaaactgc	7380



caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt ttatctgttg	7440
tttgtcgggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc	7500
gaagcaacgg cccggagggt ggccggcagg acgcccgcc taaactgcc ggcatacaat	7560
taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc tttttgttta	7620
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataatgctt	7680
caataat	7687
<210> 55	
<211> 8675	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 55	
cccgtcttac tgcgggaat tcgcttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt	60
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca	120
aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggccttctgc ttaatttgat	180
gcctggcagt ttatggcggg cgtctctgcc gccaccctcc gggccgttgc ttgcgaacgt	240
tcaaattccg tcccggcgga ttgtctctac tcaggagagc gttcacgcac aaacaacaga	300
taaaacgaaa ggcccagctt ttgactgag cctttcggtt tatttgatgc ctggcagttc	360
cctactctcg catggggaga cccacacta ccatcggcgc tacggcgttt cacttctgag	420
ttcggcatgg ggtcagggtg gaccaccgcg ctactgccgc caggcaaatt ctgttttacc	480
agaccgttc tgcgttctga ttaaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcacccgcca	540
aaacagccaa gctggagacc gtttaaacctc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc	600
tattcagatc ctcttctgag atgagttttt gtcttagaaa gcttcgaatt cccatatggt	660
accagctgca gttatgccag ccaggccttg attttggtt ccataccagc ggcacgagg	720
ccgagttcgg cgcgcatttc ttctgagtt ccttgcggaa taaagaagtc cggcaggcca	780
atgttcagca cgggtactgg ttacgatgg gccatcagca cttcgttcac gccgtgcct	840
gcgccgcca taatggcgtt ttcttctacg gtgaccagcg cttcatggct ggcggccatt	900
tccagaatta acgcttcac aagcggtttc acaaacgca tatcgaccag cgtggcgctt	960
agcgattcgg cgactttcgc cgcttctggc atcagcgtac caaagttaag gatcgccagt	1020
ttctcgccac gacgcttcac aatgcctttg ccaattggta gttttccag cggcgtcagt	1080
tccacgccga ccgcgttgcc acgcgggtag cgcaccgtg acgggccatc gttatagtga	1140

tagccggtat agagcatctg gcgacattcg ttttcatcgc tcgggggtcat aatgaccatt	1200
tccggtatgc agcgagagta agagagatca aaagcacct gatgggtttg accgtcagca	1260
ccaacaatgc ccgcgcggtc gatggcgaac aggaccggaa gcttttgaat cgccacgtca	1320
tgcagcacct gatcataggc gcgttgcagg aaagtggagt aaatcgcgac aatgggtttg	1380
taccaccaa tcgccagacc cgcagcaaag gtcaccgcgt gttgctcggc aattgccacg	1440
tcgaagtagc gatccgggaa ttacgtgaa aactcgacca tgccggaacc ttcacgcatc	1500
gccggagtaa tcgccatcag cttgttgtct ttcgtgccg tttcgacaa ccagtcgcca	1560
aagatttttg aatagctcgg caaacgcgcg ctacttttcg gcaaacaacc gctggaggga	1620
tcaaatttag gcacggcgtg gaaagtgatc gggtcttttt ctgccggttc ataaccacga	1680
ccttttttgg tcatgatatg caggaaactgc gggcctttca ggtcgcgcat gttctttagc	1740
gtggtgataa gcccagcac atcgtgaccg tccaccgggc cgatgtagtt aaagcccagc	1800
tcttcaaaca acgtgccagg cactacatg cctttaatat gttcttcggt gcgtttgagc	1860
agctctttaa ttggcggcac gccagagaaa acttttttcc cgccttcgcg cagtgaagag	1920
taaagcttac cggaaagcag ctgtgccaga tggttgttga gcgcgcgcac attttcggaa	1980
atcgacatct cattgtcgtt gagaatcacc agcatatcag gacggatcgc gcccgctga	2040
ttcatcgctt caaacgcat gcttcgggta atcgcgccat cgccaatgac acagacggtg	2100
cggcgatctt tgctttcttt ttccgcagca accgcaatac caattccggc actgatggag	2160
gttgatgaat gcccagcgt taatactca tattcgcttt cgccgcgcca cgggaacggg	2220
tgcagaccgc ctttctgacg gatggtgccg attttgcgc ggcttcggt caaaatttta	2280
tgcggataag ctgatgccc cacatcccaa atcaattggt caaacggggt gttgtagaca	2340
tagtgacgcg ccacggtcag ttccaccgtg ccagcccgg aggcaagtg cccgctggaa	2400
cggtcacgc tgcgagtaa atagcggcgc agttcgtcgc agagtttcgg taaactctct	2460
ttcggcaaca gtcgtaactc ctgggtggag tcgaccagtg ccagggtcgg gtatttggca	2520
atatcaaac tcatgttttt ttacctcta agggcgaatg cagttagaca tacatcagct	2580
ggttaatcgg gaaagggtca atcagcagca gtttgatgcg gttttcagtc gcgtagtctg	2640
ggcgaccag accatcgcca tactggtagg tgcagtggga aacacgtgcc atgttaactg	2700
cgatttccat gaacgttta ggcagcaggg tggagtgcgt aacgcgttca cgattcatct	2760
ttttccattc ggcgtcgatc agtttacgca gttcttcgcg ggcctgttcc tcgctggtac	2820
catcgtttgc gtgatgtag ctaatgatag aattggtagt ctcgccacgt tccagctccg	2880
ccgcagaggt ggccagatcg ttgcacaggc ggaagataac gcagctagaa cgcaccagac	2940
catggaagtc ggtcagggaa cgcagcgcgt ggtcggagat gtcttcctgc tgctggcata	3000

cggaaaagta agacggcgcc agcagcgcta caccggagga ggaaacgctg gcgttttcca	3060
ggtacttgga gaaagccggg ataattttgt tgttggaacca ttctgcctct tgcagaaagg	3120
ctttgcacag ttcacgccag cttttcgtca gataggacag gttgttatga cttttctctt	3180
tcagaataga ataggacgtg tcgttaacgg tgttgtacag tgccaggaaa cacagtcca	3240
tatagtccgg cagggtgta atagcgtaa cgtccagcg ctctacagca tcggtgaaca	3300
gttgcagtgc gtccagagtg ccataaacgt catacacgtc atcgatgac gtcaccagac	3360
caaacatttt agtaacagct ttgcgacatt caccaaacgt cgggtctggc gccataccca	3420
gtgccagaa ataaacttc atcaggcggc cgcgtacaaa atccagtttg ctagccaggc	3480
ccatctcggc ccaccagcgg gacagatctt gcagctcttt ctggtgcagg gtctgtacca	3540
tgtaaaatc cagcttcgcc agctccagca gcagctggtg atgcggttct ttcggttcgt	3600
atttatccag gaaccaacgt gcctccagac ggtgcagacg ctggtgatat ggcagttcca	3660
gggcgtggct cacttgttct gcaaccttgg tattaatgcc ttctttcagg ttgttcttca	3720
ggtgggtgat gaaaaagta cgcgcctcct ccagcaggtt ctacacctcg aaaccaggt	3780
aagacgttc atacaggtc agcaggcctt ggacgtcacc ttacagttca ccgtgaaac	3840
cacctcttt atccttgaac cgctcaaaaa catcctgaga aacctcgaaa ccgtgctgac	3900
gcagcagacg gaaagacaga gcggttgcgt gcaggtcaga ttgttcttt ttgtttcgt	3960
ccagcagtac gatgtttcc agggctttta tgatgtcttt ttcaaattg taggtcagac	4020
ccaggcgtg cacatcgtc atcagctcca gcaggacag cggctgggtg tctacacggt	4080
tgatcatgca gcgaactct tctccagtt tggctcgttt ctctccagc ttttccactt	4140
tcaggctgtt ctccagggat tgcaggaatt cgaattcca caggtttggc tgatagttg	4200
cggaacgacg ggaattatgc tcggtaatct gagtaattg agaagaggtc gcacacatgg	4260
tttatctct cttatttaac cgatacatta atatatacct ctttaatttt taataataaa	4320
gttaatcgat aattccggtc gagtgcctac acagattgtc tgataaattg ttaaagagca	4380
gtgccgttc gctttttctc agcggcgtg ttctctgtgt gaaattgtta tccgtcaca	4440
attccacaca ttatacgagc cggatgattt attgtcaaca gctcatttca gaatctggcg	4500
taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga	4560
atggcgctg atgcggtatt ttctcttac gcactgtgc ggtatttcac accgcatatg	4620
gtgactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacaccgcc	4680
aacaccgcgt gacgagctta gtaaagccct cgctagattt taatgcggat gttgcgatta	4740

cttcgccaac tattgcgata acaagaaaaa gccagccttt catgatatat ctcccaattt	4800
gtgtagggct tattatgcac gcttaaaaat aataaaaagca gacttgacct gatagtgttg	4860
ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcatcta acgcttgagt taagccgcgc cgcgaagcgg	4920
cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ccttggatgat ctgcctttc	4980
acgtagtgga caaattcttc caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc ttcttcttgt	5040
ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat actgggccgg caggcgctcc	5100
attgccagct cggcagcgac atccttcggc gcgattttgc cggttactgc gctgtaccaa	5160
atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag ccagtcggg cggcgagttc	5220
catagcgta aggtttcatt tagcgctca aatagatcct gttcaggaac cggatcaaag	5280
agttcctccg ccgttgacc taccaaggca acgctatgtt ctcttgcttt tgcagcaag	5340
atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac ctgcaagaat gtcattgcgc	5400
tgccattctc caaattgcag ttgcgctta gctggataac gccacggaat gatgtcgtcg	5460
tgcacaacaa tggtagcttc tacagcgagg agaattctgc tctctccagg ggaagccgaa	5520
gtttcaaaaa ggtcgttgat caaagctcgc cgcgttgctt catcaagcct tacggtcacc	5580
glaaccagca aatcaatata actgtgtggc ttcaggccgc catccactgc ggagccgtac	5640
aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga tgacgccaac tacctctgat	5700
agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct tcctcatga tgtttaactt tgttttaggg	5760
cgactgccct gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca tcaaacatcg acccagggc	5820
taacgcgctt gctgcttga tgcccaggc atagactgta ccccaaaaaa acagtcataa	5880
caagccatga aaaccgccac tgcgccgtta ccaccgtgc gttcgggtcaa ggttctggac	5940
cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcac tacagcttac gaaccgaaca ggcttatgtc	6000
caatgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggaac cttgggcagc	6060
agcgaagtcg aggcatcttct gtcctggctg gcgaacgagc gcaagggttc ggtctccacg	6120
catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg	6180
ccctggcttc aggagatcgg aagacctcgg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc	6240
ccggaatgaag tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcgcccag	6300
cttctgtatg gaacgggcat gcggatcagt gagggtttgc aactcgggt caagatctg	6360
gatttcgac acggcacgat catcgtgcgg gagggcaagg gctccaagga tcgggccttg	6420
atgttaccg agagcttggc acccagcctg cgcgagcagg ggaattaatt cccacgggtt	6480

ttgctgcccc caaacgggct gttctgggtg tgctagtttg ttatcagaat cgcagatccg	6540
gcttcagccg gtttgccgcg tgaaagcgct atttcttcca gaattgccat gattttttcc	6600
ccacgggagg cgtcactggc tcccgtgttg tcggcagctt tgattcgata agcagcatcg	6660
ccgttttcag gcigtctatg tgtgactgtt gagctgtaac aagttgtctc aggtgttcaa	6720
tttcatgttc tagttgcttt gttttactgg ttccacctgt tctattaggt gttacatgct	6780
gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc tttgaatgca ccaaaaactc	6840
gtaaaagctc tgatgtatct atctttttta caccgttttc atctgtgcat atggacagtt	6900
ttccctttga tatgtaacgg tgaacagttg ttctactttt gtttgtagt cttagatgctt	6960
cactgataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatttagc cagtatgttc	7020
tctagtgtgg ttcgttgttt ttgcgtgagc catgagaacg aaccattgag atcactactta	7080
ctttgcatgt cactcaaaaa ttttgccctca aaactgggtga gctgaatttt tgcagttaaa	7140
gcatcgtgta gtgtttttct tagtccgtta tgtaggtagg aatctgatgt aatggttgtt	7200
ggatatttgt caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa gttcgggttac gagatccatt	7260
tgtctatcta gttcaacttg gaaaatcaac gtatcagtcg ggccggcctcg cttatcaacc	7320
accaatttca tattgctgta agtgttttaa tctttactta ttggtttcaa aaccattgg	7380
ttaagccttt taaactcatg gtagttattt tcaagcatta acatgaactt aaattcatca	7440
aggctaactc ctatatttgc cttgtgagtt ttcttttgtg ttagttcttt taataaccac	7500
tcataaatcc tcatagagta tttgttttca aaagacttaa catgttccag atttatattt	7560
atgaattttt ttaactggaa aagataaggc aatatctctt cactaaaaac taattcta	7620
ttttcgcttg agaacttggc atagtittgc cactggaaaa tctcaaagcc tttacacaaa	7680
ggattcctga ttccacagt tctcgtcatc agctctctgg ttgcttttagc taatacacca	7740
taagcatttt cctactgat gttcatcatc tgagcgtatt gggtataagt gaacgatacc	7800
gtccgttctt tcctttagg gttttcaatc gtgggggtga gtagtgccac acagcataaa	7860
attagcttgg tttcatgctc cgttaagtca tagcgactaa tcgctagttc atttgctttg	7920
aaaacaacta attcagacat acatctcaat tggcttaggt gattttaatc actataccaa	7980
ttgagatggg ctagtcaatg ataattacta gtccctttcc tttgagttgt gggtatctgt	8040
aaattctgct agaccttgc tggaaaactt gtaaatctg ctagaccctc tgtaaatcc	8100
gctagacctt tgtgtgtttt tttgtttat attcaagtgg ttataattta tagaataaag	8160
aaagaataaa aaaagataaa aagaatagat ccagccctg tgtataactc actactttag	8220
tcagtccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgtgt ttgtctctct acaaaacaga	8280
ccttaaaacc ctaaaggctt aagtagcacc ctgcgaagct cgggcaaact gctgaatatt	8340

ccctttgtct cgcaccatca ggcacctgag tcgctgtctt tttcgtgaca ttcagttcgc	8400
tgcgctcagc gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgcc ttttatggat	8460
tcatgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct cagggcgttt	8520
tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct gttcagcagt tcctgccctc	8580
tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag gtcattcaga ctggctaata	8640
caccagtaa ggcagcggtat tcatcaacag gctta	8675
<210> 56	
<211> 8032	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 56	
tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata	60
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa	120
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggt cgcggccct	180
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	240
agataaccagg cgtttcccc tggaagctcc ctgctgcgct ctctgttcc gacctgccc	300
cttaccggat acctgtccgc ttttctcct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca	360
cgtgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa	420
cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg	480
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg	540
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaaga	600
acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc	660
tcttgatccg gcaaaacaac caccgtggt agcgggtggt ttttgtttg caagcagcag	720
attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac	780
gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc	840
ttcacctaga tctttttaa ttaaaatga agttttaa caatctaaag tatatatgag	900
taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt	960
ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag	1020
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggtcca	1080
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact	1140

ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca	1200
gttaatatgt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg	1260
tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	1320
atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg	1380
gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca	1440
tcgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt	1500
atgcggcgac cgagttgtct ttgcccgcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	1560
agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc	1620
ttaccgctgt tgagatccag ttcatgttaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca	1680
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa	1740
aagggaataa ggcgacacg gaaatgtga atactcatac tcttctttt tcaatattat	1800
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatthagaaa	1860
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa	1920
accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc	1980
gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agtccccgga gacggtcaca	2040
gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt	2100
ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac	2160
catagatctg gagctgtaat ataaaaacct tcttcaacta acggggcagg ttagtgacat	2220
tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa gccagtcatt	2280
aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat aaccatcaca	2340
aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt tattaatgaa	2400
ttttctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat ttaagttaaa	2460
cccagtaaat gaagtcctag gaataataga aagagaaaaa gcattttcag gtataggtgt	2520
tttgggaaac aatttccccg aaccattata ttctctaca tcagaaaggt ataaatcata	2580
aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt tagatacacc	2640
atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atccaataa cctaactctc cgtcgctatt	2700
gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt taccacctt gtcactaaga aaataaatgc	2760
agggtaaaaat ttatatcctt cttgttttat gtttcggtat aaaacactaa tatcaatttc	2820
tgtggttata ctaaaagtcg tttgttggtt caaataatga ttaaatactt cttttctctt	2880
ccaattgtct aaatcaattt tattaagtt catttgatat gcctcctaaa tttttatcta	2940
aagtgaattt aggaggctta cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc ttttttaaaa	3000

gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaaatat cccactttat ccaattttcg	3060
tttgttgaac taatgggtgc tttagttaa gaataaaaga cctatgcggt gtgaaatacc	3120
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tgcctattca ggctgcgcaa	3180
ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg	3240
atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa	3300
aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcactccatt ttcttctgct atcaaaataa	3360
cagactcgtg attttccaaa cgagctttca aaaaagcctc tgccccttgc aaatcggatg	3420
cctgtctata aaattccgga tattgggtta acagcggcgc aatggcggcc gcattctgatg	3480
tctttgcttg gcgaatgttc atcttatttc ttcttccctc tcaataattt ttcatctta	3540
tcccttttct gtaaagttaa tttttcagaa tacttttata atcatgcttt gaaaaaatat	3600
cacgataata tccattgttc tcacggaagc acagcgaggt catttgaacg aattttttcg	3660
acaggaattt gccgggactc aggagcattt aacctaaaa agcatgacat ttcagcataa	3720
tgaacattta ctcatgtcta ttttcgttct ttctgtatg aaaatagtta ttctgagtct	3780
ctacggaaat agcgagagat gatataccta aatagagata aaatcatctc aaaaaaatgg	3840
gtctactaaa atattattcc atctattaca ataaattcac agaatagtct ttttaagtaag	3900
tctactctga atttttttaa aaggagaggg taaagagtga aaacagtagt tattattgat	3960
gcattacgaa caccaattgg aaaatataaa ggcagcttaa gtcaagtaag tgccgtagac	4020
ttaggaacac atgttacaac acaactttta aaaagacatt ccactatttc tgaagaaatt	4080
gatcaagtaa tctttgaaa tggttttaca gctggaaatg gccaaaatcc cgcacgacaa	4140
atagcaataa acagcgggtt gtctcatgaa attcccgcaa tgacgggtta tgaggctctgc	4200
ggatcaggaa tgaaggcgtt tattttggcg aaacaattga ttcaattagg agaagcggaa	4260
gttttaattg ctggcgggat tgagaatatg tccaagcac ctaaattaca acgttttaat	4320
tacgaaacag aaagctacga tgcgcctttt tctagtatga tgtatgatgg attaacggat	4380
gccttttagtg gtcaggcaat gggcttaact gctgaaaatg tggccgaaaa gtatcatgta	4440
actagagaag agcaagatca attttctgta cattcacaat taaaagcagc tcaagcacia	4500
gcagaaggga tattcgtcga cgaaatagcc ccattagaag tatcaggaac gcttgtggag	4560
aaagatgaag ggattcgccc taattcgagc gttgagaagc taggaacgct taaaacagtt	4620
tttaagaag acggtactgt aacagcaggg aatgcatcaa ccattaatga tggggcttct	4680
gctttgatta ttgcttcaca agaatatgcc gaagcacacg gtcttctta tttagctatt	4740



attcgagaca gtgtggaagt cggtattgat ccagcctata tgggaatttc gccgattaaa	4800
gccattcaaa aactgttagc gcgcaatcaa cttactacgg aagaaattga tctgtatgaa	4860
atcaacgaag catttgcagc aacttcaatc gtgggtccaaa gagaactggc tttaccagag	4920
gaaaaggta acatttatgg tggcgggtatt tcattaggtc atgcgattgg tgccacaggt	4980
gctcgtttat taacgagttt aagttatcaa ttaaatcaaa aagaaaagaa atatggagt	5040
gcttctttat gtatcggcgg tggcttagga ctcgctatgc tactagagag acctcagcaa	5100
aaaaaaaaca gccgatttta tcaaatgagt cctgaggaac gcctggcttc tcttcttaat	5160
gaaggccaga tttctgctga tacaaaaaaa gaatttgaaa atacggcttt atcttcgcag	5220
attgccaatc atatgattga aaatcaaatc agtgaaacag aagtgccgat gggcgttggc	5280
ttacatttaa cagtgacga aactgattat ttggtaccaa tggcgacaga agagccctca	5340
gttattgcgg ctttgagtaa tggtgcaaaa atagcacaag gatttaaac agtgaatcaa	5400
caacgcttaa tgcgtggaca aatcgTTTT tacgatgttg cagatcccga gtcattgatt	5460
gataaactac aagtaagaga agcggagatt tttcaacaag cagagttaag ttatccatct	5520
atcgTTAAAC ggggcggcgg cttaagagat ttgcaatatc gtacttttga tgaatcattt	5580
glatctgtcg actttttagt agatgttaag gatgcaatgg gggcaaatat cgTTAACGCT	5640
atgttgaag gtgtggccga gttgttccgt gaatggtttg cggagcaaaa gatTTTATTC	5700
agtattttaa gtaattatgc cacggagtcg gttgttacga tgaaaacggc tattccagtt	5760
tcacgtttaa gtaaggggag caatggccgg gaaattgctg aaaaaattgt tttagcttca	5820
cgctatgctt cattagatcc ttatcgggca gtcacgcata acaaaggaat catgaatggc	5880
attgaagctg tagtttttagc tacaggaaat gatacacgcg ctgttagcgc ttcctgtcat	5940
gcttttgcgg tgaaggaagg tcgctaccaa ggcttgacta gttggacgct ggatggcgaa	6000
caactaattg gtgaaatttc agttccgctt gctttagcca cggttggcgg tgccacaaaa	6060
gtcttaccta aatctcaagc agctgctgat ttgttagcag tgacggatgc aaaagaacta	6120
agtcgagtag tagcggctgt tggtttggca caaaatttag cggcgttacg ggccttagtc	6180
tctgaaggaa ttcaaaaagg acacatggct ctacaagcac gttcttttagc gatgacggtc	6240
ggagctactg gtaaagaagt tgaggcagtc gctcaacaat taaaacgtca aaaaacgatg	6300
aaccaagacc gagccatggc tattttaaat gatttaagaa aacaataaaa ggagagggtg	6360
acaattggga ttgataaaat tagttttttt gtgccccctt attatattga tatgacggca	6420
ctggctgaag ccagaaatgt agaccctgga aaatttcata ttggtatttg gcaagaccaa	6480

atggcgggtga acccaatcag ccaagatatt gtgacatttg cagccaatgc cgcagaagcg 6540  
atcttgacca aagaagataa agaggccatt gatatgggtga ttgtcgggac tgagtccagt 6600  
atcgatgagt caaaagcggc cgcagttgtc ttacatcggt taatggggat tcaacctttc 6660  
gtcgcgtctt tcgaaatcaa ggaagcttgt tacggagcaa cagcaggctt acagttagct 6720  
aagaatcacg tagccttaca tccagataaa aaagtcttgg tcgtagcggc agatatgtca 6780  
aaatatggct taaattctgg cggtagcctt acacaaggag ctggggcggg tgcaatgtta 6840  
gttgctagtg aaccgcgcat ttggctttta aaagaggata atgtgatgct gacgcaagat 6900

atctatgact ttggcgctcc aacaggccac ccgtatccta tggtcgatgg tcctttgtca 6960  
aacgaaacct acatccaatc ttttgcccaa gtctgggatg aacataaaaa acgaaccggt 7020  
cttgattttg cagattatga tgcttttagcg ttccatattc cttacacaaa aatgggcaaa 7080  
aaagccttat tagcaaaaaa ctccgaccaa actgaagcag aacaggaacg aatttttagcc 7140  
cgttatgaag aaagtatcgt ctatagtcgt cgcgtaggaa acttgtatac gggttcactt 7200  
tatctgggac tcatttcctt ttagaaaaat gcaacgactt taaccgcagg caatcaaatt 7260  
ggtttattca gttatgggtc tgggtctgtc gctgaatttt tcactgggtga attagtagct 7320

ggttatcaaa atcatttaca aaaagaaact catttagcac tgctggataa tcggacagaa 7380  
ctttctatcg ctgaatatga agccatgttt gcagaaactt tagacacaga cattgatcaa 7440  
acgttagaag atgaattaaa atatagtatt tctgtatta ataataccgt tcgtttctat 7500  
cgaaactaaa aaaaaccggc cttggccccc cgggtttttt attatttttc ttcctccgca 7560  
tgttcaatcc gctccataat cgacggatgg ctccctctga aaattttaac gagaaacggc 7620  
gggttgacct ggctcagtc cgtaacggcc aagtcctgaa acgtctcaat cgccgcttcc 7680  
cggtttccgg tcagctcaat gccgtaacgg tcggcggcgt tttctgata cggggagacg 7740

gcattcgtaa tcgggatccc cgggtaccga gctcgaattc gtaatcatgt catagctgtt 7800  
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 7860  
gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact 7920  
gcccgtttc cagtcgggaa acctgtctg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 7980  
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttcgccttcc tcgtcactg ac 8032

<210> 57

<211> 6592

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

gaattgctcc attttcttct gctatcaaaa taacagactc gtgattttcc aaacgagctt	60
tcaaaaaagc ctctgccct tgcaaatcgg atgctgtct ataaaattcc cgatattggt	120
taaacagcgg cgcaatggcg gccgcatctg atgtctttgc ttggcgaatg ttcatttat	180
ttcttctcc ctctcaataa ttttttcatt ctatcccttt tctgtaaagt ttattttca	240
gaatactttt atcatcatgc ttgaaaaaa taccacgata atatccattg ttctcacgga	300
agcacacgca ggtcatttga acgaattttt tcgacaggaa ttgccggga ctgaggagca	360
tttaacctaa aaaagcatga catttcagca taatgaacat ttactcatgt ctattttcgt	420
tcttttctgt atgaaaatag ttatttcgag tctctacgga aatagcgaga gatgatatac	480
ctaaatagag ataaaatcat ctcaaaaaa tgggtctact aaaatattat tccatctatt	540
acaataaatt cacagaatg tcttttaagt aagtctactc tgaattttt taaaaggaga	600
gggtaaagag tgtgtgcgac ctcttctcaa ttactcaga ttaccgagca taattcccgt	660
cgttcgcaa actatcagcc aaacctgtgg aatttcgaat tcctgcaatc cctggagaac	720
gacctgaaag tggaaaagct ggaggagaaa gcgaccaaac tggaggaaga agttcgtgc	780
atgatcaacc gtglagacac ccagccgtg tcctgtctgg agctgatcga cgatgtgcag	840
cgctgggtc tgacctaca atttgaaaaa gacatcatta aagccctgga aaacatcgta	900
ctgctggacg aaaacaaaaa gaacaaatct gacctgcacg caaccgtct gtctttccgt	960
ctgctgcgtc agcacggttt cgaggtttct caggatgttt ttgagcgttt caaggataaa	1020
gaagggtggt ttacggttga actgaaaggt gacgtccaag gcctgctgag cctgtatgaa	1080
gcgtcttacc tgggttttca ggggtgagaac ctgctggagg aggcgcgtac cttttccatc	1140
accacctga agaacaacct gaaagaaggc attaatacca aggttgacga acaagtgcgc	1200
cacgccctgg aactgccata tcaccagcgt ctgcaccgtc tggaggcacg ttggttcctg	1260
gataaatagc aaccgaaaga accgcatcac cagctgctgc tggagctggc gaagctggat	1320
tttaaatagg tacagacct gcaccagaaa gagctgcaag atctgtcccg ctggtggacc	1380
gagatgggcc tggctagcaa actggatttt gtacgcgacc gcctgatgga agtttatttc	1440
tgggcactgg gtatggcgcc agaccgcag ttgggtgaat gtcgcaaagc tgttactaaa	1500
atgtttggtc tggtagcat catcatgac gtgtatgacg ttatggcac tctggacgaa	1560
ctgcaactgt tcaccgatgc tgtagagcgc tgggacgtta acgctattaa caccctgccg	1620
gactatatga aactgtgttt cctggcactg tacaacaccg ttaacgacac gtctattct	1680

attctgaaag agaaaggcca taacaacctg tcctatctga cgaaaagctg gcgtgaactg	1740
tgcaaagcct ttctgcaaga ggcgaaatgg tccaacaaca aaattatccc ggctttctcc	1800
aagtacctgg aaaacgccag cgtttctctc tccggtgtag cgctgctggc gccgtcttac	1860
ttttccgtat gccagcagca ggaagacatc tccgaccacg cgctgcgttc cctgaccgac	1920
ttccatggtc tggcgcgttc tagctgcgtt atcttccgcc tgtgcaacga tctggccacc	1980
tctgcggcgg agctggaacg tggcgagact accaattcta tcattagcta catgcacgaa	2040
aacgatggta ccagcgagga acaggcccg c gaagaactgc gtaactgat cgacgccgaa	2100
tggaaaaaga tgaatcgtga acgcgttagc gactccaccc tgctgcctaa agcgttcatg	2160
gaaatcgtag ttaacatggc acgtgtttcc cactgcacct accagtatgg cgatggctctg	2220
ggcgcgccag actacgcgac tgaaaaccgc atcaaaactgc tgctgattga ccttttcccg	2280
attaaccagc tgatgtatgt ctaaaaaaaaa cggccttgg ccccgccggt tttttattat	2340
ttttcttctt ccgcatgttc aatccgctcc ataatcgacg gatggctccc tctgaaaatt	2400
ttaacgagaa acggcgggtt gaccggctc agtcccgtaa cggccaagtc ctgaaacgtc	2460
tcaatcgccg cttcccggtt tccggtcagc tcaatgccgt aacggtcggc ggcgttttcc	2520
tgataccggg agacggcatt cgtaatcgga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag	2580
ctttgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccgag	2640
acggtcacag ctgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgtca	2700
gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagc cactgacgga tagcggagt	2760
tatactggct taactatgag gcacagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt	2820
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgat caggcgctct tccgcttctt	2880
cgctcactga ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa	2940
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	3000
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcccggtt gctggcgttt ttccataggc	3060
tccgcccccc tgacgagcat caaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccgca	3120
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	3180
cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttgggaagc gtggcgcttt	3240
ctcaatgctc acgtgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc aagctgggct	3300
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	3360
agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	3420
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgtacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct	3480
acactagaag gacagtattt ggtatctgag ctctgtgaa gccagttacc ttcggaaaaa	3540

gagttggttag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgttt	3600
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta	3660
cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat	3720
caaaaaggat cgaagtcggt tcagaaaaag aaggatatgg atctggagct gtaatatata	3780
aaccttttc aactaacggg gcaggttagt gacattagaa aaccgactgt aaaaagtaca	3840
gtcggcatta tctcatatta taaaagccag tcattaggcc tatctgacaa ttcctgaata	3900
gagttcataa acaatcctgc atgataacca tcacaaacag aatgatgtac ctgtaaagat	3960
agcggtaaat atattgaatt acctttatta atgaattttc ctgctgtaat aatgggtaga	4020
aggtaattac tattattatt gatatttaag ttaaaccag taaatgaagt ccatggaata	4080
atagaaagag aaaaagcatt ttcaggtata ggtgttttgg gaaacaattt aaaagaacca	4140
ttatatctt ctacatcaga aaggtataaa tcataaaact ctttgaagtc attctttaca	4200
ggagtccaaa taccagagaa tgtttttagat acaccatcaa aaattgtata aagtggctct	4260
aacttatccc aataacctaa ctctccgtcg ctattgtaac cagttctaaa agctgtattt	4320
gagtttatca ccttgtcgc taagaaaata aatgcagggt aaaatttata tcttcttgt	4380
tttatgtttc ggtataaaac actaatatca atttctgtgg ttatactaaa agtcgtttgt	4440
tggttcaaat aatgattaaa tatctctttt ctcttccaat tgtctaaatc aattttatta	4500
aagttcattt gatatgcctc ctaaattttt atctaaagtg aatttaggag gcttacttgt	4560
ctgctttctt cattagaatc aatcctttt taaagtcaat attactgtaa cataaatata	4620
tattttaaaa atatccact ttatccaatt ttcgtttgtt gaactaatgg gtgctttagt	4680
tgaagaataa agaccacatt aaaaaatgtg gtcttttgtg tttttttaa ggatttgagc	4740
gtacgcgaaa aatccttttc tttctttctt atcttgataa taagggtaac tattgccggt	4800
tgtecatcca tggtgaaact ctgcttcttc tgttgacatg acacacatca tctcaatac	4860
cgaatagggc ccatcagctc gacgaccaag agagccataa acaccaatag ccttaacatc	4920
atcccatat ttatccaata ttcgttctt aatttcatga acaatcttca ttctttcttc	4980
tctagtcatt attattggtc cattcactat tctcattecc ttttcagata attttagatt	5040
tgcttttcta aataagaata tttggagagc accgttctta ttcagctatt aataactcgt	5100
cttctaaagc atccttcaat ccttttaata acaattatag catctaatct tcaacaaact	5160
ggccccgttg ttgaactact ctttaataaa ataatttttc cgttcccaat tccacattgc	5220
aataatagaa aatccatctt catcggtttt ttcgtcatca tctgtatgaa tcaaactgcc	5280
ttcttctgtg tcatcaaggt ttaatttttt atgtatttct tttacaaac caccatagga	5340
gattaacctt ttacggtgta aaccttctc caaatcagac aaacgtttca aattcttttc	5400

ttcacatcg gtcataaaat ccgtatcctt tacaggatat ttgacagttt cgtcaattgc 5460

cgattgtata tccgatttat atttatTTTT cggtcgaatc atttgaactt ttacatttgg 5520

atcatagtct aatttcattg cctttttcca aaattgaatc cattgttttt gattcacgta 5580

gttttctgtt attctaaaat aagttgggtc cacacatacc attacatgca tgtgctgatt 5640

ataagaatta tctttattat ttattgtcac atccgttgca cgcataaaac caacaagatt 5700

tttattaatt tttttatatt gcatcattcg gcgaaatcct tgagccatat ctgtcaaact 5760

cttatttaat tcttcgcat cataaacatt tttactgtt aatgtgagaa acaaccaacg 5820

aactgttggc ttttgtttaa taacttcagc aacaaccttt tgtgactgaa tgccatgttt 5880

cattgtcttc ctccagttgc acattggaca aagcctggat ttgcaaaacc acactcgata 5940

ccactttctt tcgctgttt cagcattttg ttataactct aatatttcag cacaatcttt 6000

tactctttca gcctttttaa attcaagaat atgcagaagt tcaaagtaat caacattagc 6060

gattttcttt tctctccatg gtctcacttt tccacttttt gtcttgtcca ctaaaacctt 6120

tgatttttca tctgaataaa tgctactatt aggacacata atattaaaag aaaccccat 6180

ctatttagtt atttgtttag tcacttataa ctttaacaga tgggggtttt ctgtgcaacc 6240

aattttaagg gttttcaata ctttaaaaca catacatacc aacacttcaa cgcacctttc 6300

agcaactaaa ataaaaatga cgttatttct atatgtatca agataagaaa gaacaagttc 6360

aaaaccatca aaaaaagaca ccttttcagg tgcttttttt attttataaa ctcatccct 6420

gatctcgact tcgttctttt ttacctctc ggttatgagt tagttcaaat tcgttctttt 6480

taggttctaa atcgtgtttt tcttggatt gtgctgtttt atcctttacc ttgtctacaa 6540

accccttaaa aacgttttta aaggctttta agccgtctgt acgttctta ag 6592

<210> 58

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 58

gacatcaatt gctccatttt cttctgctat c 31

<210> 59

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer  
 <400> 59  
 attgagaaga ggtcgcacac actctttacc ctctcctttt a 41  
 <210> 60  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 60  
 taaaaggaga gggtaaagag tgtgtgacac ctcttctcaa t 41  
 <210> 61  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 61  
 ccaaggccgg ttttttttag acatacatca gctgggtaat c 41  
 <210> 62  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 62  
 gattaaccag ctgatgtatg tctaaaaaa accggccttg g 41  
 <210> 63  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 63  
 gacatgacgg atccgattac gaatgccgtc tc 32  
 <210> 64  
 <211> 31  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 64

gacatcaatt gctccatttt cttctgctat c

31

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 65

gacatgaatt cctccatttt cttctgc

27

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 66

aggagagggt aaagagtgag

20

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 67

cttttccatc acccacctga ag

22

<210> 68

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 68

ggcgaaatgg tccaacaaca aaattatc

28

<210> 69



<211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 69  
 ggtgaattca gtctactggg gattcccaaa tctatatata ctgcaggtga c 51  
 <210> 70  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 70  
 gcaggtggga aactatgcac tcc 23  
 <210> 71  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 71  
 cctgaattct gttggattgg aggattggat agtggg 36  
 <210> 72  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 72  
 ggtgtcgacg tacggtcgag cttattgacc 30  
 <210> 73  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 73

ggtgggcccg cattttgcc a ctacaagcc ag

32

<210> 74

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 74

ggtgaattct agaggatccc aacgtgttg cctacaacgg

40

<210> 75

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 75

ggtgcggccg ctgtctggac ctggtagtt tccccg

36

<210> 76

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 76

ggtgggccca ttaaatacgt tatcgtttat ttgatag

37

<210> 77

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 77

ggtgaccagc aagtcacatg gtggtttgat catgg

35

<210> 78

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	PCR Primer	
<400>	78	
ggtgcggccg cctttggagt acgactccaa ctatg		35
<210>	79	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	79	
gcggccgcag actaaattta tttcagtctc c		31
<210>	80	
<211>	7	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	80	
aggaggt		7
<210>	81	
<211>	7	
<212>	DNA	
<213>	Escherichial coli	
<400>	81	
aaggagg		7
<210>	82	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	82	
gacatctgca gctccatttt cttctgc		27
<210>	83	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	PCR Primer	
<400>	83	
caataataac tactgttttc actctttacc ctctcctttt aa		42
<210>	84	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	84	
ttaaaaggag agggtaaaga gtgaaaacag tagttattat tg		42
<210>	85	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	85	
cggggccaag gccggttttt tttagtttcg ataagaacga acggt		45
<210>	86	
<211>	7999	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	86	
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggcg caccaatgct tctggcgta ggcagccatc		60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc		120
gcactcccg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaattatc		180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga		240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa		300
caatttatca gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac ttattattta		360
aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc		420
gagctcagga ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca		480
attggaaaat ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt		540
acaacacaac ttttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt		600

ggaaatgttt tacaagctgg aaatggccaa aatcccgac gacaaatagc aataaacagc	660
ggtttgtctc atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag	720
gccgttattt tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc	780
gggattgaga atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc	840
tacgatgcgc ctttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag	900
gcaatgggct taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa	960
gatcaatttt ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc	1020
gctgacgaaa tagcccatc agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggtt	1080
cgccctaatt cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagtttttaa agaagacggt	1140
actgtaacag cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgcttt gattattgct	1200
tcacaagaat atgccgaagc acacggtctt cttattttag ctattattcg agacagtgtg	1260
gaagtcggta ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg	1320
ttagcgcgca atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt	1380
gcagcaactt caatcgttgt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt	1440
tatggtggcg gtatttcatt aggtcatgcg attggtgcca caggctgctg tttattaacg	1500
agtttaagtt atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatag gattggcttc tttatgtatc	1560
ggcgggtggct taggactcgc tatgtactia gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga	1620
ttttatcaaa tgagtccga ggaacgcctg gcttctcttc ttaatgaagg ccagatttct	1680
gctgatacaa aaaaagaatt tgaaaatacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg	1740
attgaaaatc aaatcagtga aacagaagtg ccgatggcg ttggcttaca tttaacagtg	1800
gacgaaactg attatttggc accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg	1860
agtaatggtg caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt	1920
ggacaaatcg ttttttacga tgttcagat cccgagtcac tgattgataa actacaagta	1980
agagaagcgg aagtttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc	2040
ggcggcttaa gagatttgca atatcgtact tttgatgaat catttgatc tgtcgacttt	2100
ttagtagatg ttaaggatgc aatgggggca aatatcgta acgctatgtt ggaaggtgtg	2160
gccgagtgtg tccgtgaatg gtttcgggag caaaagattt tattcagtat tttaaagtaat	2220
tatgccacgg agtcggttgt tacgatgaaa acggctattc cagtttcacg tttaaagtaag	2280
gggagcaatg gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta	2340

gacccattac gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt	2400
ttagctacag gaaatgatac acgcgctgtt agcgtttctt gtcattgttt tgcggatgaag	2460
gaaggctgct accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggatgaa	2520
atttcagttc cgcttgcttt agccacgggtt ggcggatgcca caaaagtctt acctaatct	2580
caagcagctg ctgatttgtt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtgc agtagtagcg	2640
gctgttggtt tggcacaaaa tttacggcg tttacggcct tagtctctga aggaattcaa	2700
aaaggacaca tggctctaca agcagcttct ttagcgatga cggctggagc tactggtaaa	2760
gaagttgagg cagtcgctca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc	2820
atggctatct taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaacat gacaattggg	2880
attgataaaa ttagtttttt tgtgccccct tattatattg atatgacggc actggctgaa	2940
gccagaaatg tagacctgg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcgggtg	3000
aaccacatca gccaagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc	3060
aaagaagata aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtcag tatcgatgag	3120
tcaaaagcgg ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgtct	3180
ttcgaaatca aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagtttagc taagaatcac	3240
gtagccttac atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatattgc aaaatatggc	3300
ttaaattctg gcggtagacc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgctagt	3360
gaaccgcga ttttggtctt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgaaga tatctatgac	3420
ttttggcgtc caacaggcca cccgtatcct atggctgatg gtctttgtc aaacgaaacc	3480
tacatccaat cttttgcccc agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt	3540
gcagattatg atgcttttagc gttccatatt ctttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta	3600
ttagcaaaaa tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaatttttagc ccgttatgaa	3660
gaaagtatcg tctatagtcg tcgcgtagga aacttgtata cgggttact ttatctggga	3720
ctcatttccc ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggttttattc	3780
agttatggtt ctggtgctgt cgctgaattt ttcactggtg aattagtagc tggttatcaa	3840
aatcatttac aaaaagaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc	3900
gctgaatatg aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa	3960
gatgaattaa aatatagtat ttctgctatt aataataccg ttcgttctta tcgaaactaa	4020
gagatctgca gctggtacca tatgggaatt cgaagcttgg gcccgacaa aaactcatct	4080

cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg	4140
tctccagctt ggctgttttg gcgcatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc	4200
agaacgcaga agcggctctga taaaacagaa ttgcctggc ggcagtagcg cgggtgtccc	4260
acctgacccc atgccgaact cagaagtga acgccgtagc gccgatggta gtgtggggtc	4320
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag	4380
actgggcctt tcgttttatac tgttgtttgt cggatgaacgc tctcctgagt aggacaaatc	4440
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg aggggtggcgg gcaggacgcc	4500
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg	4560
cgttttctaca aactcttttt gtttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat	4620
gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca	4680
acatttcctg gtgcacctta ttcccttttt tgccgcatTT tgcccttctg tttttgctca	4740
cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta	4800
catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt	4860
tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc	4920
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc	4980
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctgc	5040
cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa ctacttctg acaacgatcg gaggaccgaa	5100
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga	5160
accggagctg aatgaagcca taccaaagca cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat	5220
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca	5280
attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc	5340
ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat	5400
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag	5460
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa	5520
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca	5580
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc	5640
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc	5700
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgtacc	5760
agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt	5820
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagttag ccgtagttag gccaccactt	5880
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	5940

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	6000
ggcgacgcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac	6060
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg	6120
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga	6180
gcttccaggg gaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact	6240
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa acgccagcaa	6300
cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc	6360
gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gactgagctg ataccgctcg	6420
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgctgat	6480
gcggtatctt ctctttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag	6540
tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac	6600
tgggtcatgg ctgcgccccg acaccgcga acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt	6660
ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag	6720
aggtttttac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg	6780
aagcgcatg catttacgtt gacaccatcg aatgggtcaa aacctttcgc ggtatggcat	6840
gatagcgccc ggaagagagt caattcaggg tggatgaatgt gaaaccagta acgtttatcg	6900
atgtcgcaga gtatgccgtt gtctcttata agaccgtttc ccgctgggtg aaccaggcca	6960
gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca	7020
ttccaaccg cgtggcaca caactggcgg gcaaacagtc gttgtgatt ggcgttgcca	7080
cctccagtct ggccctgcac gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg	7140
atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta	7200
aagcgccggt gcacaatctt ctgcgcgaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc	7260
tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatctc	7320
ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatctt ctcccatgaa gacggtacgc	7380
gactgggctt ggagcatctg gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggccc	7440
cattaagtgc tgtctcggcg cgtctgcgtc tggttggtcg gcataaatat ctcaactcga	7500
atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac	7560
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg tccactgcg atgctggttg ccaacgatca	7620
gatggcgctg ggcgcaatgc gcgccattac cgagtccggg ctgcgcgttg gtgcggatat	7680
ctcggtagtg ggatacgacg ataccgaaga cagctcatgt tataatccgc cgtcaaccac	7740
catcaaacag gattttcgcc tgctggggca aaccagcgtg gaccgcttgc tgcaactctc	7800



tcagggccag gcggtgaagg gcaatcagct gttgcccgtc tctactggtga aaagaaaaac	7860
caccctggcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca	7920
gctggcacga caggtttccc gactggaaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga	7980
gtagcgcgca attgatctg	7999
<210> 87	
<211> 10433	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 87	
cccgctttac tgtcgggaat tgcgttggc cgattcatta atgcagattc tgaatgagc	60
tgttgacaat taatcatccg gctcgataaa tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc	120
acacaggaaa cagcgccgct gaaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa caatttatca	180
gacaatctgt gtgggcactc gaccggaatt atcgattaac tttattatta aaaattaaag	240
aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaa ccatggatcc gagctcagga	300
ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca attggaaaat	360
ataaaggcag cttaagtcaa gtaagtgccg tagacttagg aacacatgtt acaacacaac	420
ttttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgatca agtaatcttt ggaaatgttt	480
tacaagctgg aaatggccaa aatcccgcac gacaaatagc aataaacagc ggttttgtctc	540
atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctgcggatc aggaatgaag gccgttattt	600
tggcgaaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagtttt aattgctggc gggattgaga	660
atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc tacgatgcgc	720
ctttttctag tatgatgat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag gcaatgggct	780
taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa gatcaatttt	840
ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc gctgacgaaa	900
tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggatt cgccctaatt	960
cgagcgttga gaagctagga acgcttaaaa cagtttttaa agaagacggt actgtaacag	1020
cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgcttt gattattgct tcacaagaat	1080
atgccgaagc acacggtctt cttattttag ctattattcg agacagtgtg gaagtcggta	1140
ttgatccagc ctatatggga atttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg ttagcgcgca	1200
atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt gcagcaactt	1260

caatcgtggt ccaaagagaa ctggcctttac cagaggaaaa ggtcaacatt tatggtggcg	1320
gtatttcatt aggtcatgcg attggtgccca caggtgctcg tttattaacg agtttaagtt	1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaaatatg gagtggcttc tttatgtatc ggcgggtggt	1440
taggactcgc tatgtacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaaa	1500
tgagtctga ggaacgcctg gcttctcttc ttaatgaagg ccagatttct gctgatacaa	1560
aaaaagaatt tgaaaatagc gctttatctt cgcagattgc caatcatatg attgaaaatc	1620
aaatcagtga aacagaagtg ccgatggcg ttggcttaca tttaacagtg gacgaaactg	1680
attatttggg accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgcggctttg agtaatggtg	1740
caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg	1800
ttttttacga tgttgcagat cccgagtcac tgattgataa actacaagta agagaagcgg	1860
aagtttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc ggcggcttaa	1920
gagatttgca atatcgtact tttgatgaat catttgtatc tgtcgacttt ttagtagatg	1980
ttaaggatgc aatgggggca aatatcgta acgctatgtt ggaagggtgt gccgagttgt	2040
tccgtgaatg gtttgcggag caaaagattt tattcagtat ttttaagtaat tatgccacgg	2100
agtcggttgt tacatgataa acggctattc cagtttcacg ttttaagtaag gggagcaatg	2160
gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcatta gatccttacc	2220
gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtagtt ttagctacag	2280
gaaatgatac acgcgtgtt agcgtctctt gtcagctttt tgcggtgaag gaaggtcgt	2340
accaaggctt gactagtgg acgctggatg gcgaacaact aattgggtgaa atttcagttc	2400
cgcttgcttt agccacggtt ggcggtgccca caaaagctt acctaaatct caagcagctg	2460
ctgatttgtt agcagtgacg gatgcaaaag aactaagtcg agtagtagcg gctgttggtt	2520
tggcacaaaa tttagcggcg ttacgggctt tagtctctga aggaattcaa aaaggacaca	2580
tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa gaagttgagg	2640
cagtcgtca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgatgaacca agaccgagcc atggctattt	2700
taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg attgataaaa	2760
ttagtttttt tgtgccccct tatttatattg atatgacggc actggctgaa gccagaaatg	2820
tagaccttg aaaatttcat attggtattg ggcaagacca aatggcggtg aaccaatca	2880
gccagatat tgtgacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgacc aaagaagata	2940
aagaggccat tgatatggtg attgtcggga ctgagtcag tatcgatgag tcaaaagcgg	3000

ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggga ttcaaccttt cgctcgctct ttcgaaatca	3060
aggaagcttg ttacggagca acagcaggct tacagttagc taagaatcac gtagccttac	3120
atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatatgtc aaaatatggc ttaaattctg	3180
gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgctagt gaaccgcgca	3240
ttttggcttt aaaagaggat aatgtgatgc tgacgcaaga tatctatgac ttttggcgtc	3300
caacaggcca cccgtatcct atggtcgatg gtcctttgtc aaacgaaacc tacatccaat	3360
cttttgccca agtctgggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt gcagattatg	3420
atgcttttagc gttccatatt ccttacacaa aaatgggcaa aaaagcctta ttagcaaaaa	3480
tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaattttagc ccgttatgaa gaaagiatcg	3540
tctatagtcg tcgcgtagga aacttgata cgggttcact ttatctggga ctcatctccc	3600
ttttagaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaat tggtttatc agttatggtt	3660
ctggtgctgt cgctgaattt ttcactgggt aattagtagc tggttatcaa aatcatttac	3720
aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcgacaga actttctatc gctgaatatg	3780
aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgatca aacgttagaa gatgaattaa	3840
aatatagtat ttctgctatt aataataaccg ttcgttctta tcgaaactaa agatctgcat	3900
cctgcattcg cccttaggag gtaaaaaaac atgtgtcgga cctcttctca atttactcag	3960
attaccgagc ataattcccc tcgttccgca aactatcagc caaacctgtg gaatttcgaa	4020
ttcctgcaat ccttgaggaa cgacctgaaa gtggaaaagc tggaggagaa agcgacaaaa	4080
ctggaggaag aagttcgctg catgatcaac cgtgtagaca cccagccgct gtccctgctg	4140
gagctgatcg acgatgtgca gcgcctgggt ctgacctaca aatttgaaaa agacatcatt	4200
aaagccctgg aaaacatcgt actgctggac gaaaacaaaa agaacaaatc tgacctgcac	4260
gcaaccgctc tgtctttccg tctgctgcgt cagcacgggt tcgaggttcc tcaggatgtt	4320
tttgagcgtt tcaaggataa agaaggtggt ttcagcgggt aactgaaagg tgacgtccaa	4380
ggcctgctga gccgtatga agcgtcttac ctgggtttcg aggttgagaa cctgctggag	4440
gaggcgcgta ctttttccat caccacctg aagaacaacc tgaaagaagg cattaatacc	4500
aaggttgagc aacaagttag ccacgccctg gaactgccat atcaccagcg tctgcaccgt	4560
ctggaggcac gttggttctt ggataaatac gaaccgaaag aaccgcatca ccagctgctg	4620
ctggagctgg cgaagctgga ttttaacatg gtacagaccc tgcaccagaa agagctgcaa	4680
gatctgtccc gctggtggac cgagatgggc ctggctagca aactggattt tgtacgcgac	4740

cgctgatgg aagtttattt ctgggcactg ggtatggcgc cagaccgca gtttggtgaa	4800
tgtcgcaaag ctgttactaa aatgtttggt ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac	4860
gtttatggca ctctggacga actgcaactg ttcaccgatg ctgtagagcg ctgggacgtt	4920
aacgctatta acacctgccc ggactatatt aaactgtgtt tcctggcact gtacaacacc	4980
gttaacgaca cgtcctattc tattctgaaa gagaaaggtc ataacaacct gtctatctg	5040
acgaaaagct ggctggaact gtgcaaagcc tttctgcaag aggcgaaatg gtccaacaac	5100
aaaattatcc cggctttctc caagiaccig gaaaacgcca gcgtttctc ctccggtgta	5160
gcgctgctgg cggcgtctta cttttccgta tgccagcagc aggaagacat ctccgaccac	5220
gcgctgcgtt ccttgaccga cttccatggt ctggtgcgtt ctagctgctt tatcttccgc	5280
ctgtgcaacg atctggccac ctctgcggcg gagctggaac gtggcgagac taccaattct	5340
atcattagct acatgcacga aaacgatggt accagcgagg aacaggcccg cgaagaactg	5400
cgtaaaactga tcgacgcga atggaaaaag atgaatcgtg aacgcgttag cgactccacc	5460
ctgctgccta aagcgttcat ggaaatcgca gttaacatgg cacgtgttcc cactgcacc	5520
taccagtatg gcgatggtct gggtcgccca gactacgga ctgaaaaccg catcaaactg	5580
ctgctgattg accctttccc gattaaccag ctgatgtatg tctaactgca gctggtacca	5640
tatgggaatt cgaagcttgg gcccgaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc	5700
gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaaccg tctccagctt ggctgttttg	5760
gcgcatgaga gaagatttcc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga agcggctctga	5820
taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cgggtgtccc acctgacccc atgccgaact	5880
cagaagtga acgcccgtag gccgatggta gtgtggggtc tccccatcg agagtaggga	5940
actgccaggc atcaataaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt tcgttttacc	6000
tggtgtttgt cggatgaacg tctctgagt aggacaaatc cgccgggagc ggatttgaac	6060
gttgcaagc aacggcccgg aggggtggcg gcaggacgcc cgccataaac tgccaggcat	6120
caaatgaac agaaggccat cctgacgat ggcctttttg cgtttctaca aactctttt	6180
gtttattttt ctaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa	6240
tgcttcaata atctggcgta atagcgaaga ggccgcacc gatcgccctt cccaacagtt	6300
gcgcagcctg aatggcgaat ggccctgat gcggtatttt ctcttacgc atctgtcgcg	6360
tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag	6420
ccagccccga caccgcca caccgctga cgagcttagt aaagccctcg ctagatttta	6480
atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc cagcctttca	6540
tgatatatct ccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaaata taaaagcaga	6600

cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcatctaac gcttgagtta	6660
agccgcgccc cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattatit gccgactacc	6720
ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc gcgcgaggcc	6780
aagcgatctt ctctttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac gggctgatac	6840
tgggccggca ggcgtccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc gattttgccg	6900
gttactgcgc tgtaccaaatt gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc atcgccagcc	6960
cagtcgggcg gcgagtcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa tagatcctgt	7020
tcaggaaccg gatcaaagag ttctctcgcc gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct	7080
cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg ttgctggctc gaagatacct	7140
gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc	7200
cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcgag aatctcgctc	7260
tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg cgttgtttca	7320
tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca	7380
tccactgccc agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg gcgctcgatg	7440
acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc cctcatgatg	7500
tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgcctgt ccataacatc	7560
aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcctggatg cccgaggcat agactgtacc	7620
ccaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc accgctcgt	7680
tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatagct acttgcatca cagcttacga	7740
accgaacagg ctatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gtttcacagg tgtgcgtcac	7800
ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatctctgt cctggctggc gaacgagcgc	7860
aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcgccct tgcgttctt ctacggcaag	7920
gtgtgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcgga gacctcgcc gtcgcgcgcc	7980
ttgccgttg tgcagcccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggttttct ggaaggcgag	8040
catcgtttgt tcgccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga gggtttgcaa	8100
ctcggggtca aggatctgga ttctgatcac ggcacgatca tcgtcgggga gggcaagggc	8160
tccaaggatc gggccttgat gttaccgag agcttgccac ccagcctgag cgagcagggg	8220
aattaattcc cacgggtttt gctgcccga aacgggctgt tctggtgttg ctagtittgt	8280
atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccgctg aaagcgctat ttcttcaga	8340
attgccatga ttttttcccc acgggaggcg tcaactggctc ccgtgttgc ggcagctttg	8400
attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgtctatgtg tgactgttga gctgtaacaa	8460

gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt tttactgggt tcacctgttc	8520
tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg tgaacagctt	8580
tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat cttttttaca cgtttttcat	8640
ctgtgcataat ggacagtttt ccccttgata tgtaacgggt aacagtgtgt ctacttttgt	8700
ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat aagaacctca gatccttccg	8760
tatttagcca gtatgttctc tagtgtgggt cgttgttttt gcgtgagcca tgagaacgaa	8820
ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaa actggtgagc	8880
tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gtttttctta gtccgttatg taggtaggaa	8940
tctgatgtaa tgggtgttgg tattttgtca ccattcattt ttaactgggt gtcttcaagt	9000
tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttga aatcaacgt atcagtcggg	9060
cggcctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag tgtttaaatc tttacttatt	9120
ggtttcaaaa cccattgggt aagcctttta aactcatgggt agttattttc aagcattaac	9180
atgaacttaa attcatcaag gctaactctt atatttgcct tgtgagtttt cttttgtgtt	9240
agttctttta ataaccactc ataaatcttc atagagtatt tgttttcaa agacttaaca	9300
tgttccagat tatattttat gaattttttt aactggaaaa gataaggcaa tatctcttca	9360
ctaaaaacta attctaattt ttgccttgag aacttggcat agtttgtcca ctggaaaatc	9420
tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag ctctctgggt	9480
gcttttagcta atacaccata agcattttcc ctactgatgt tcatcatctg agcgtattgg	9540
ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt tttcaatcgt ggggttgagt	9600
agtgccacac agcataaaat tagcttgggt tcatgctccg ttaagtcata gcgactaatc	9660
gctagttcatt ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattg gtctaggatga	9720
ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat aattactagt ctttttcctt	9780
tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag acctttgctg gaaaacttgt aaattctgct	9840
agaccctctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt ttgtttatat tcaagtgggt	9900
ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc cagccctgtg	9960
tataactcac tacttttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca aacgctgttt	10020
gtctctctac aaaacagacc ttaaaacctt aaaggcttaa gtagaccct cgcaagctcg	10080
ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc gctgtctttt	10140
tcgtgacatt cagttcgtg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggta aatggcacta	10200

caggcgctt ttatggattc atgcaaggaa actaccata atacaagaaa agcccgtcac	10260
gggcttctca gggcgcttta tggcgggtct gctatgtggt gctatctgac tttttgctgt	10320
tcagcagttc ctgccctctg attttccagt ctgaccactt cggattatcc cgtgacaggt	10380
cattcagact ggctaatacca cccagtaagg cagcgggtatc atcaacaggc tta	10433
<210> 88	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 88	
cttgatgcat cctgcattcg cccttaggag g	31
<210> 89	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 89	
ccaggcaaat tctgttttat cag	23
<210> 90	
<211> 10356	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 90	
caagaaaaat gccccgctta cgcagggcat ccatttatta ctcaaccgta accgattttg	60
ccaggttacg cggtcggta acgtcgggtc ctttgatcag cgcgacatgg taagccagca	120
gctgcagcgg aacgggtgtag aagatcgggtg caatcacctc ttccacatgc ggcatctcga	180
tgatgtgcat gttatcgcta cttacaaaac ccgcatcctg atcggcgaag acatacaact	240
gaccgccacg cgcgcaact tcttcaatgt tggatttcag tttttccagc aattcgttgt	300
tcggtgcaac aacaataacc ggcatatcgg catcaattag cgccagcgga ccgtgtttca	360
gttcgccagc agcgtaggct tcagcgtgaa tgtaagagat ctctttcaac ttcaatgcgc	420
cttccagcgc gattgggtac tgatcgccac ggcccaggaa cagcgcgtga tgtttgtcag	480
agaaatcttc tgccagcgt tcaatgcgtt tgcctgaga cagcatctgc tcaatacggc	540

tcggcagcgc ctgcagacca tgcacgatgt catgttcaat ggaggcatcc agacctttca	600
ggcgagacag cttcgccacc agcatcaaca gcacagttaa ctgagtgggtg aatgccttag	660
tggatgccac gccgatttct gtaccgcgt tggtcattag cgccagatcg gattcgcgca	720
ccagagaaga acccggaacg ttacagattg ccagtgaacc aaggtaacct agctctttcg	780
acagacgcag gccagccagg gtatccgcgg ttctgccaga ctgtgacacg atcgcccttc	840
ccaacagttg cgcagcctat acgtacggca gtttaagggt tacacctata aaagagagag	900
ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccgg ggcgacggat	960
ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccggtg aactttacct	1020
ggtggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc	1080
ggtctccgtt atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa	1140
cgccattaac ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc atgagattat caaaaaggat	1200
cttcacctag atccttttca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccggt	1260
gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt	1320
agcttgaggt gggctttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga	1380
accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taagggtggg aagccctgca aagtaactg	1440
gatggctttc tcgccccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagctctg atcaagagac	1500
aggatgagga tcgttttcga tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc	1560
ttgggtggag aggtatttcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc	1620
cgccgtgttc cggtgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc	1680
cggtgccctg aatgaactgc aagacgaggc agcgcggtta tcgtggctgg ccacgacggg	1740
cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgi cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt	1800
gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgcg agaaagtatc	1860
catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggtacct gccattcga	1920
ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgcga	1980
tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct	2040
caaggcgagc atccccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc	2100
gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcacc gactgtggcc ggctgggtgt	2160
ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg	2220
cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat	2280



cgcttcttat cgcttcttg acgagttctt ctgaattatt aacgcttaca atttctgat	2340
gcggtatfff ctctttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacagg tggcactfff	2400
cggggaaatg tgcgcggaac ccctatfffgt tttttttct aaatacatc aaatatgtat	2460
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg ctcaataat agcacgtgag gagggccacc	2520
atggccaagt tgaccagtgc cgttcgggtg ctaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc	2580
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cctagtaacg gccgccagtg tgctggaatt	2640
caggcagttc aacctgttga tagtacgtac taagctctca tgtttcacgt actaagctct	2700
catgtttaac gtactaagct ctcatgttta acgaactaaa ccctcatggc taacgtacta	2760
agctctcatg gctaacgtac taagctctca tgtttcacgt actaagctct catgtttgaa	2820
caataaaatt aatataaatc agcaacttaa atagcctcta aggttttaag tttataaga	2880
aaaaaaagaa tatataagc ttttaagct ttttaagttt aacggttgtg gacaacaagc	2940
cagggatgta acgcactgag aagcccttag agcctctcaa agcaattttc agtgacacag	3000
gaacacttaa cgctgacag cctgaattct gcagatatct gttttccac tcttcgttca	3060
ctttcgccag gtagctgggtg aagacgaagg aagtcgccga gccatctgcg cggcgtacta	3120
cagcaatgtt ttgtgaaggc agtttcagac ccggattcag tttggcgatg gcttcatcat	3180
cccacttctt gatfffgcc aggtagatgt cgccgagggt tttaccatcc agcaccagtt	3240
cgccagactt cagccctgga atgttaaccg ccagcaccac gccgccaatc acggtcggga	3300
actggaacag accttctga gccagttfff cgtcagacag cggcgcgtca gaggcaccaa	3360
aatcaacggt attagcgata atctgtttta cgccaccgga agaaccgata ccctggtagt	3420
taactttatt accggtttct ttctggtaag tgcagccca tttggcatac accggcgcag	3480
ggaaggttgc acctgcacct gtcaggcttg ctctgcaaa cacagagaaa gcactcatcg	3540
ataaggtcgc ggcgacaaca gttgcgacgg tggtagcat aactttcata atgtctcctg	3600
ggaggattca taaagattg tttgttggct acgagaagca aaataggaca aacaggtgac	3660
agttatatgt aaggaatatg acagttttat gacagagaga taaagtcttc agtctgattt	3720
aaataagcgt tgatattcag tcaattacaa acattaataa cgaagagatg acagaaaaat	3780
tttattctg tgacagagaa aaagtagccg aagatgacgg tttgtcacat ggagtggca	3840
ggatgtttga ttaaaagcaa ttaacctca ctaaaggcg gccgcaagt tcctattctc	3900
tagaaagtat aggaacttca ttctaccggg taggggaggc gcttttccca aggcagttctg	3960
gagcatgcgc tttagcagcc ccgctgggca ctggcgcta cacaagtggc ctctggcctc	4020
gcacacattc cacatccacc ggtaggcgcc aaccggctcc gttctttggt ggcccttcg	4080
cgccaccttc cactctccc ctagtcagga agttccccc cgccccgcag ctgcgctcgt	4140

gcaggacgtg acaaatggaa gtagcacgtc tcactagtct cgtgcagatg gacagcacccg	4200
ctgagcaatg gaagcgggta ggcctttggg gcagcggcca atagcagctt tgctccttcg	4260
ctttctgggc tcagaggctg ggaaggggtg ggtccggggg cgggctcagg ggcgggctca	4320
ggggcggggc gggcgcccgga aggtcctccg gaggcccggc attctgcacg cttcaaaagc	4380
gcacgtctgc cgcgtgttc tectcttct catctccggg cctttcgacc tgcagcagca	4440
cgtgttgaca attaatacgc ggcatagtat atcgcatag tataatacga caaggtgagg	4500
aactaaacca tggagaaaaa aatcactgga tataaccaccg ttgatatac ccaatggcat	4560
cgtaaagaac attttaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa ccagaccgtt	4620
cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcaca gttttatccg	4680
gcctttattc acattcttgc ccgcctgatg aatgctcacc cggaattccg tatggcaatg	4740
aaagacgggtg agctggtgat atgggatatg gttcacccct gttacaccgt tttccatgag	4800
caaaactgaaa cgttttcacc gctctggagt gaataccacc acgatttccg gcagtttcta	4860
cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctatct ccctaaaggg	4920
tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac cagttttgat	4980
ttaaactgtg ccaatatgga caacttcttc gccccggtt tcaccatggg caaatattat	5040
acgcaaggcg acaagggtgt gatgccgtg gcgattcagg ttcacatgc cgtttgtgat	5100
ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga gtggcagggc	5160
ggggcgtaag cgggactctg gggttcgaat aaagaccgac caagcgacgt ctgagagctc	5220
cctggcgaat tcggtaccaa taaaagagct ttattttcat gatctgtgtg ttggtttttg	5280
tgtgcggcgc ggaagtctct attctctaga aagtatagga acttcctcga gccctatagt	5340
gagtcgtatt agcccttgac gatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actaattgtg	5400
agcggataac acaaggagga aacagctatg tcattaccgt tcttaacttc tgcaccggga	5460
aaggttatta tttttgggta acactctgct gtgtacaaca agcctgccgt cgctgctagt	5520
gtgtctgcgt tgagaacctt cctgctaata agcagatcat ctgcaccaga tactattgaa	5580
ttggacttcc cggacattag cttaaatcat aagtgggtcca tcaatgattt caatgccatc	5640
accgaggatc aagtaaaact ccaaaaattg gccaaaggctc aacaagccac cgatggcttg	5700
tctcaggaac tcgttagtct tttggatccg ttgttagctc aactatccga atccttccac	5760
taccatgcag cgttttgttt cctgtataatg tttgtttgcc tatgccccca tgccaagaat	5820
attaagtttt ctttaaagtc tactttacc atcggtgctg ggttgggctc aagcgcctct	5880
atttctgtat cactggcctt agctatggcc tacttggggg ggttaatagg atctaagac	5940
ttggaaaagc tgcagaaaa cgataagcat atagtgaatc aatgggcctt cataggtgaa	6000

aagtgtattc acggtacccc ttcaggaata gataacgctg tggccactta tggtaatgcc	6060
ctgctatttg aaaaagactc acataatgga acaataaaca caaacaattt taagttctta	6120
gatgatttcc cagccattcc aatgattccta acctatacta gaattccaag gtctacaaaa	6180
gatcttggtg ctgcggttcg tgtgttggc accgagaaat ttcctgaagt tatgaagcca	6240
attctagatg ccatgggtga atgtgcccta caaggcttag agatcatgac taagttaagt	6300
aatgtaaag gcaccgatga cgaggctgta gaaactaata atgaactgta tgaacaacta	6360
ttggaattga taagaataaa tcatggactg ctgtgtctca tcggtgttc tcatcctgga	6420
ttagaactta ttaaaaatct gagcgatgat ttgagaattg gctccacaaa acttaccggt	6480
gctgggtggcg gcggttgctc tttgactttg ttacgaagag acattactca agagcaaatt	6540
gacagcttca aaaagaaatt gcaagatgat tttagttacg agacatttga aacagacttg	6600
ggtgggactg gctgctgttt gtttaagcgca aaaaatttga ataaagatct taaaatcaaa	6660
tccctagtat tccaattatt tgaaaaataa actaccacaa agcaacaaat tgacgatcta	6720
ttattgccag gaaacacgaa ttaccatgg acttcataag ctaatttgcg ataggcctgc	6780
acccttaagg aggaaaaaaa catgtcagag ttgagagcct tcagtgcgcc agggaaagcg	6840
ttactagctg gtggatatatt agtttttagat acaaaatgat aagcatttgt agtcggatta	6900
tcggcaagaa tgcatgctgt agcccatcct tacggttcat tgcaagggtc tgataagttt	6960
gaagtgcgtg tgaaaagtaa acaatttaaa gatggggagt ggctgtacca tataagtcct	7020
aaaagtggct tcatttcctg ttcatagagc ggatctaaga accctttcat tgaaaaagtt	7080
atcgctaacg tatttagcta ctttaaacct aacatggacg actactgcaa tagaaacttg	7140
ttcgttattg atattttctc tgatgatgcc taccattctc aggaggatag cgttaccgaa	7200
catcgtggca acagaagatt gagttttcat tcgcacagaa ttgaagaagt tcccaaaaca	7260
gggctgggct cctcggcagg tttagtcaca gttttaacta cagctttggc ctcctttttt	7320
glatcggacc tgaaaaataa ttagacaaa tatagagaag ttattcataa ttagcacaa	7380
gttgctcatt gtcaagctca gggtaaaatt ggaagcgggt ttgatgtacg ggcggcagca	7440
tatggatcta tcagatatag aagattccca cccgattaa tctctaattt gccagatatt	7500
ggaagtgcta cttacggcag taaactggcg catttggttg atgaagaaga ctggaatatt	7560
acgattaaaa gtaaccattt acctcggga ttaactttat ggatgggcga tattaagaat	7620
ggttcagaaa cagtaaaact ggtccagaag gtaaaaaatt ggtatgattc gcatagccca	7680
gaaagcttga aaatatafac agaactcat catgcaaatt ctagatttat ggatggacta	7740

tctaaactag atcgcttaca cgagactcat gacgattaca gcgatcagat atttgagtct	7800
cttgagagga atgactgtac ctgtcaaaag tatcctgaaa tcacagaagt tagagatgca	7860
gttgccacaa ttagacgttc ctttagaaaa ataactaaag aatctggtgc cgatatcgaa	7920
cctcccgtag aaactagctt attggatgat tgccagacct taaaaggagt tcttacttgc	7980
ttaataacctg gtgctggtag ttatgacgcc attgcagtga ttactaagca agatgttgat	8040
cttagggctc aaaccgctaa tgacaaaaga ttttctaagg ttcaatggct ggatgtaact	8100
caggctgact ggggtgttag gaaagaaaaa gatccgaaa cttatcttga taaataactt	8160
aaggtagctg catgcagaat tcgcccttaa ggaggaaaaa aaaatgaccg tttacacagc	8220
atccgttacc gcacccgtca acatcgcaac ccttaagtat tgggggaaaa gggacacgaa	8280
gttgaatctg ccaccaatt cgtccatc agtgacttta tcgcaagatg acctcagaac	8340
gttgacctct gcggctactg cacctgagtt tgaacgcgac actttgtggt taaatggaga	8400
accacacagc atcgacaatg aaagaactca aaattgtctg cgcgacctac gccaattaag	8460
aaaggaaatg gaatcgaagg acgcctcatt gccacatta tctcaatgga aactccacat	8520
tgtctccgaa aataacttic ctacagcagc tggtttagct tctccgctg ctggctttgc	8580
tgcatgggtc tcigcaattg ctaagttata ccaattacca cagtcaactt cagaaatc	8640
tagaatagca agaaaggggt ctggttcagc ttgtagatcg ttgtttggcg gatacgtggc	8700
ctgggaaatg ggaaaagctg aagatgggtca tgattccatg gcagtacaaa tcgcagacag	8760
ctctgactgg cctcagatga aagcttgtgt cctagtgtc agcgatatta aaaaggatgt	8820
gagttccact cagggtatgc aattgaccgt ggcaacctcc gaactattta aagaaagaat	8880
tgaacatgtc gtaccaaaga gatttgaagt catgcgtaaa gccattgttg aaaaagattt	8940
cgccaccttt gcaaaggaaa caatgatgga ttccaactct ttccatgcca catgtttgga	9000
ctctttccct ccaatattct acatgaatga cacttccaag cgtatcatca gttggtgcca	9060
caccattaat cagttttacg gagaacaat cgttgcatc acgtttgatg cagggtccaa	9120
tgctgtgttg tactacttag ctgaaaatga gtcgaaactc tttgcattta tctataaatt	9180
gtttggctct gttcctggat gggacaagaa atttactact gagcagcttg aggctttcaa	9240
ccatcaattt gaatcatcta actttactgc acgtgaattg gatcttgagt tgcaaaagga	9300
tggtgccaga gtgattttta ctcaagtcgg ttcaggccca caagaaacaa acgaatcttt	9360
gattgacgca aagactggtc taccaaagga ataagatcaa ttcgtgcat cgcccttagg	9420
aggtaaaaaa aaatgactgc cgacaacaat agtatgcccc atgggtgcagt atctagttac	9480
gccaaattag tgcaaaacca aacacctgaa gacattttgg aagagtttcc tgaaattatt	9540
ccattacaac aaagacctaa taccgatct agtgagacgt caaatgacga aagcggagaa	9600

acatgttttt ctggatcatga tgaggagcaa attaagttaa tgaatgaaaa ttgtattgtt 9660  
 ttggattggg acgataatgc tattgggtgcc ggtaccaaga aagtttgtca tttaatggaa 9720  
 aatattgaaa aggggtttact acatcgtgca ttctccgtct ttattttcaa tgaacaaggt 9780  
 gaattacttt tacaacaaag agccactgaa aaaataactt tccctgatct ttggactaac 9840

acatgctgct ctcatccact atgtattgat gacgaattag gtttgaaggg taagctagac 9900  
 gataagatta agggcgctat tactgcggcg gtgagaaaac tagatcatga attaggtatt 9960  
 ccagaagatg aaactaagac aagggttaag ttccactttt taaacagaat ccattacatg 10020  
 gcaccaagca atgaaccatg gggatgaacat gaaattgatt acatcctatt ttataagatc 10080  
 aacgctaaag aaaacttgac tgtcaacca aacgtcaatg aagttagaga cttcaaatgg 10140  
 gtttcaccaa atgatttgaa aactatgttt gctgacccaa gttacaagtt tacgccttgg 10200  
 ttttaagatta ttgcgagaa ttacttattc aactggtggg agcaattaga tgacctttct 10260

gaagtggaaa atgacaggca aattcataga atgctataac aacgcgtcta caaataaaaa 10320  
 aggcacgtca gatgacgtgc cttttttctt gggggc 10356

<210> 91

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 91

gcatgctcga gcggccgctt ttaatcaaac atcctgccaa ctc 43

<210> 92

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 92

gatcgaaggc cgatcgtgtc acagtctggc gaaaccg 37

<210> 93

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400>	93	
ctgaattctg cagatatctg tttttccact cttcgttcac ttt		43
<210>	94	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	94	
tctagagggc ccaagaaaaa tgccccgctt acg		33
<210>	95	
<211>	111	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	95	
gatcgggcc gcgcccttga cgatgccaca tctgagcaa ataattcaac cactaattgt		60
gagcggataa cacaaggagg aaacagctat gtcattaccg ttcttaactt c		111
<210>	96	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	96	
gatcgggccc caagaaaaaa ggcacgtcat ctgacgtgcc ttttttattt gtagacgcgt		60
tgttatagca ttcta		75
<210>	97	
<211>	81	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	97	
aaagtagccg aagatgacgg tttgtcacat ggagtggca ggatgtttga ttaaaagcaa		60
ttaaccctca ctaaaggcg g		81

<210> 98  
 <211> 160  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 98  
 agagtgttca ccaaaaataa taacctttcc cggatgcagaa gtaagaacg gtaatgacat 60  
 agctgtttcc tccttgtgtt atccgctcac aattagtggg tgaattattt gctcaggatg 120  
 tggcatcgtc aagggttaac acgactcact atagggtcgc 160  
 <210> 99  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > PCR Primer  
 <400> 99  
 gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgtgtg cgacctcttc tcaatttact 60  
 60  
 <210> 100  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR Primer  
 <400> 100  
 cggatgcacgg atccctgcag ttagacatac atcagctg 38  
 <210> 101  
 <211> 6974  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 101  
 gtgcggccgc aagcttgtcg acggagctcg aattcggatc cctgcagtta gacatacatc 60  
 agctgggttaa tcgggaaagg gtcaatcagc agcagtttga tgcgggtttc agtcgcgtag 120  
 tctgggcgac ccagaccatc gccatactgg taggtgcagt gggaaacacg tgccatgtta 180

actgcgattt ccatgaacgc tttaggcagc aggggtggagt cgctaacgcg ttcacgattc	240
atctttttcc attcggcgct gatcagttta cgcagttctt cgcgggcctg ttcctcgctg	300
gtaccatcgt tttcgtgcat gtagctaata atagaattgg tagtctcgcc acgttccagc	360
tccgccgcag aggtggccag atcgttgcac aggcggaaga taacgcagct agaacgcacc	420
agaccatgga agtcggtcag ggaacgcagc gcgtggctcg agatgtcttc ctgctgctgg	480
catacggaaa agtaagacgg cgccagcagc gctacaccgg aggaggaaac gctggcgttt	540
tccaggtact tggagaaagc cgggataatt ttgttgttgg accatttcgc ctcttgcaga	600
aaggctttgc acagttcacg ccagcttttc gtcagatagg acaggttgtt atgacctttc	660
tccttcagaa tagaatagga cgtgtcgtta acggtgttgt acagtgccag gaaacacagt	720
ttcatatagt ccggcagggt gttaatagcg ttaacgtccc agcgtcttac agcatcggtg	780
aacagttgca gttcgtccag agtgccataa acgtcataca cgtcatcgat gatcgtcacc	840
agaccaaaaca ttttagtaac agctttgcga cattcaccaa actgcgggtc tggcgccata	900
cccagtgcgc agaaataaac ttccatcagg cggtcgcgta caaaatccag ttgtctagcc	960
aggcccatct cggtcaccaa gcgggacaga tcttgcagct ctttctgggt cagggtctgt	1020
accatgttaa aatccagctt cgccagctcc agcagcagct ggtgatgcgg ttccttcggt	1080
tcgtatttat ccaggaacca acgtgcctcc agacgggtgca gacgttggtg atatggcagt	1140
tccagggcgt ggctcacttg ttctgcaacc ttggatttaa tgccttcttt caggttgttc	1200
ttcaggtggg tgatggaaaa ggtacgcgcc tctccagca ggttctcacc ctcgaaaccc	1260
aggtaagacg cttcatacag gtcacgagg ccttggacgt cacctttcag ttcaccgctg	1320
aaaccacctt cttatcctt gaaacgctca aaaacatcct gagaaacctc gaaaccgtgc	1380
tgacgcagca gacggaaga cagagcgggt gcgtgcaggt cagatttgtt cttttgttt	1440
tcgtccagca gtacgatgtt ttccagggtt ttaatgatgt ctttttcaa tttgtaggtc	1500
agaccaggc gctgcacatc gtcgatcagc tccagcagg acagcggctg ggtgtctaca	1560
cggttgatca tgcagcgaac ttcttctcc agtttggtcg ctttctctc cagcttttcc	1620
actttcaggt cgttctccag ggattgcagg aattcgaaat tccacaggtt tggctgatag	1680
tttgcggaac gacgggaatt atgctcggta atctgagtaa attgagaaga ggtcgcacac	1740
atggtatata tcttcttaa agttaacaa aattatttct agagggaat tgttatccgc	1800
tcacaattcc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcgga tcgagatctc gatcctctac	1860
gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgctgg cgcctatata	1920
gccgacatca ccgatggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag cgcttgtttc	1980
ggcgtgggta tgggtggcagg ccccggtggc gggggactgt tgggcgcat ctccttgcac	2040



gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggccccaacc tactactggg ctgcttccta	2100
atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga gatcccggac accatcgaat ggcgcaaaac	2160
ctttcgcggg atggcatgat agcgcccggg agagagtcaa ttcagggtgg tgaatgtgaa	2220
accagtaacg ttatacgaat tcgcagagta tgccggtgtc tcttatcaga ccgtttcccg	2280
cgtggtgaac caggccagcc acgtttctgc gaaaacgcgg gaaaaagtgg aagcggcgat	2340
ggcggagctg aattacattc ccaaccgcgt ggcaacaaca ctggcgggca aacagtcgtt	2400
gctgattggc gttgccacct ccagtcctggc cctgcacgcg ccgtcgcaaa ttgtcgcggc	2460
gattaaatct cgcgccgac aactgggtgc cagcgtggtg gtgtcgatgg tagaacgaag	2520
cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcgggtgca caatcttctc gcgcaacgcg tcagtgggct	2580
gatcattaac tatccgtcgg atgaccagga tgccattgct gtggaagctg cctgcactaa	2640
tgttcggcgg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc atcaacagta ttattttctc	2700
ccatgaagac ggtacgcgac tggcgtgga gcatctggtc gcattgggtc accagcaaat	2760
cgcgtgtta gggggcccat taagtctgt ctcggcgcgt ctgctctgg ctggctggca	2820
taaatacttc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa cgggaaggcg actggagtgc	2880
catgtccggt ttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag ggcatcgtc cactgcgat	2940
gctggttgcc aacgatcaga tggcgtggg cgcaatgcgc gccattaccg agtccgggct	3000
gcgcgttggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat accgaagaca gctcatgtta	3060
tatcccggc ttaaccacca tcaaacagga ttttcgctg ctggggcaaa ccagcgtgga	3120
ccgcttgctg caactctctc agggccagcc ggtgaagggc aatcagctgt tgcccgtctc	3180
actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacga accgcctctc cccgcgcgtt	3240
ggccgattca ttaatgcagc tggcagcaca gttttccga ctggaagcg ggcagtgage	3300
gcaacgaat taatgtaagt tagctcactc attagccacc gggatctcga ccgatgccct	3360
tgagagcctt caaccagtc agctccttc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg	3420
catttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgtctggg	3480
tcattttcgg cgaggaccgc tttcgtgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg	3540
tattcggaat cttgcacgcc ctgcctcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt	3600
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcgccccc acgggtgcgc atgatcgtgc	3660
tcctgtcgtt gaggaccgg ctaggtggc ggggttgcc tactggttag cagaatgaat	3720
caccgatacg cgagcgaac tgaagcgact gctgtgcaa aacgtctgcg acctgagcaa	3780

caacatgaat ggcttccggt ttccgtgttt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc	3840
cctgcacat tatgttccgg atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggaacac	3900
ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt gacctgagt gatttttctc tggccccgc	3960
gcattccatac cgccagttgt ttacctcac aacgttccag taaccgggca tgttcatcat	4020
cagtaacccg tatcgtgagc atcctctctc gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca	4080
gaaatcccc ttacacggag gcattcagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg	4140
cccgttttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg	4200
atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct	4260
gcctcgcgcg ttccggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg	4320
tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg	4380
gtgttgccgg gtgtccgggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata	4440
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt	4500
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg	4560
ctcactgact cgctgcgctc ggctgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag	4620
gcggtataac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	4680
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	4740
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca	4800
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg	4860
acctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct	4920
catagctcac gcgttaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt	4980
gtgcacgaac ccccgctca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag	5040
tccaaccggt taagacaga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	5100
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	5160
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	5220
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc	5280
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	5340
gggtctgacg ctcatggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggatcat gaacaataaa	5400
actgtctgct tacataaaca gtaatacaag gggtgttatg agccatattc aacgggaaac	5460
gtcttgctct aggcccgcat taaattccaa catggatgct gatttataat ggtataaatg	5520
ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga	5580
tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga	5640

gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat 5700  
ccgtactcct gatgatgcat gggtactcac cactgcgac cccgggaaaa cagcattcca 5760  
ggtagtagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttctt 5820  
gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgac gcgtatttcg 5880

tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 5940  
cgagcgaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt 6000  
ctcaccggat tcagtcgca ctcatggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga 6060  
ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgagacc gataccagga 6120  
tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 6180  
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 6240  
tgagtttttc taagaattaa ttcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 6300

aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaaatt gtaaacgtta 6360  
atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT aaccaatagg 6420  
ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg 6480  
ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa 6540  
aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agtttttttg 6600  
ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaactgga accctaaagg gagccccga tttagagctt 6660  
gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaaggga gaaagcgaaa ggagcgggcg 6720

ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcggtaac caccacacc gccgcgtta 6780  
atgcgccgct acagggcgcg tccattcgc caatccgat atagtctctc ctttcagcaa 6840  
aaaaccctc aagaccgtt tagaggcccc aagggttat gctagttatt gctcagcgtt 6900  
ggcagcagcc aactcagctt ctttcgggc tttgttagca gccgatctc agtggtggtg 6960  
gtggtggtgc tcga 6974

<210> 102  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR Primer  
<400> 102  
accgttcgtt cttatcgaaa ctaaaaaaaa cggccttgg ccccg 45