



(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 컴파니

미국 오하이오주 44316-1 애크론 이스트 마켓
 스트리트 1144

(72) 발명자

칼라브리아 앤소니 루돌프

미국 94402 캘리포니아주 산 마테오 사우스 멜라
 웨어 스트리트 945

서빈 마가렛 에이

미국 94062 캘리포니아주 레드우드 시티 팔로마
 드라이브 404

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

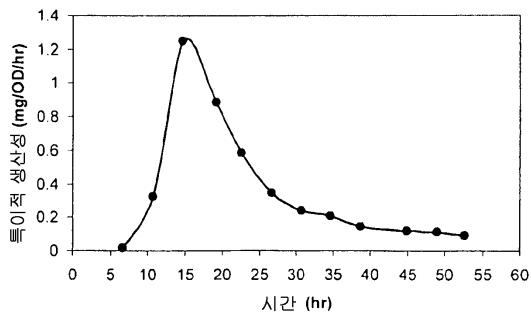
특허법인코리아나

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.

대 표 도 - 도111c

(72) 발명자

초타니 교팔 케이

미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 캐롤 리 드라이
브 10166

맥컬리프 조셉 씨

미국 94085 캘리포니아주 써니베일 프린스턴 드라
이브 663

밀러 마이클 찰스

미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 텍사스 스
트리트 298 넘버9

사보 티모시 앤런

미국 44470 오하이오주 사우팅턴 파크맨 로드 3327
넘버 에린 런

웹스터 웨인 3씨
미국 44313 오하이오주 애크론 웨더베인 레인 1329

샌포드 칼 제이

미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 알리시아 코트
10434

라 두카 리차드

미국 94588 캘리포니아주 플레전튼 징거 코트 7430

화이티드 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_{wcm}/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 세포.

청구항 3

세포가 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하는 조건 하에서 성장하는, 약 400 nmole/g_{wcm}/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포.

청구항 4

세포가 세포 성장과 이소프렌 제조를 분리하는 조건 하에서 성장하는, 약 0.1 mg/L_{보로쓰}/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 이종 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-트리메틸페리딘, 2,3,5-트리메틸페라진, 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-시클로헵텐올페리딘으로 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 OD₆₀₀ 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) CO₂ 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_{wcm}/hr 초과의 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_{wcm}/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

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

배경기술

[0003] 이소프렌(2-메틸-1,3-부타디엔)은 다양한 합성 중합체, 특히 현저하게는 합성 고무에 대한 중요한 원료이다. 이소프렌은 다양한 미생물, 식물 및 동물 종에 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 매력이 없다. 연간 약 800,000 톤의 시스-폴리이소프렌이 이소프렌 중합으로부터 제조되고, 이를 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 초과의 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/시간 (nmole/g_{wcm}/hr)의 이소프렌을 생성하는 배양물 내 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 이종 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 웨პ티드), 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 이종 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 웨პ티드), 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 이종 핵산을 포함하는 배양물 내 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 (i) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하고, (ii) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 이종 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 웨პ티드), 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_{wcm}/hr 초파의 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 이종 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 웨პ티드), 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, OD₆₀₀ 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 초파이다. 특정 구현예에서, (i) 기상 내 이소프렌의 농도는 연소 하한계 미만 또는 연소 상한계 초파이고, (ii) 세포는 약 400 nmole/g_{wcm}/hr 초파의 이소프렌을 제조한다.

[0011]

일부 구현예에서, 본 방법은 세포 배양 배지 내 탄소의 약 0.002% (mol/mol) 초파를 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 이종 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 웨პ티드), 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, OD₆₀₀ 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-부텐, 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-부텐, 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 초과의 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 초과의 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 초과의 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-트리메틸파라진, 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_{wcm}/hr 초과의 이소프렌을 제조하는 배양물 내 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 폐쇄계를 포함하고, 1 시간 동안 배양된 1 OD₆₀₀ 1 mL로 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 vvm의 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 초과의 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 초과의 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 초과의 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-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, 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_{wcm}/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) CO₂를 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_{wcm}/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_{wcm}/h) 으로 제조한다. 본 발명의 임의의 양상의 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 이상의, 이

소프렌 mg/브로쓰 L (mg/L_{브로쓰}, 브로쓰의 부피에는 세포 및 세포 배지의 부피가 포함된다)로 제조한다. 다른 예시적인 이소프렌 제조 속도 및 이소프렌 제조 총량이 본원에 기재된다.

[0027] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 이종 핵산을 추가로 포함한다.

본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 카페의 삽입을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 DXS 폴리펩티드를 코딩하는 이종 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 DXS 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 카페의 삽입을 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 백터가 이소프렌 합성효소 폴리펩티드, IDI 폴리펩티드, 및 DXS 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 구현예에서, 백터는 선별 마커, 예컨대 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0028] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이종 이소프렌 합성효소 핵산은 T7 프로모터, 예컨대 중 또는 고 카페 플라스미드에 함유된 T7 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이종 이소프렌 합성효소 핵산은 Trc 프로모터, 예컨대 중 또는 고 카페 플라스미드에 함유된 Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이종 이소프렌 합성효소 핵산은 Lac 프로모터, 예컨대 저 카페 플라스미드에 함유된 Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이종 이소프렌 합성효소 핵산은 내생 프로모터, 예컨대 내생 알칼리 세린 프로테아제 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이종 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 정지상에서 활성인 반응 조절자에 의해 유도가능한 프로모터의 통제 하에 놓인다.

[0030] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포의 일부 이상은 이종 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 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소, IDI, 또는 DXS 핵산을 포함하는 핵산은 또한 선별 마커, 예컨대 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0031] 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*)로부터의 MVA 경로 폴리펩티드)를 코딩하는 이종 핵산을 추가로 포함한다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*)로부터의 MVA 경로 폴리펩티드)를 코딩하는 내생 핵산의 카페의 삽입을 추가로 포함한다. 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 식물로부터의 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 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 세포, 예컨대 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*), 스트렙토마이세스 코엘리콜로르 (*Streptomyces coelicolor*), 또는 스트렙토마이세스 그리세우스 (*Streptomyces griseus*) 세포)이다.

본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 그람-음성 박테리아 세포 (예를 들어, 에스케리챠 (*Escherichia*) 세포, 예컨대 에스케리챠 콜라이 (*Escherichia coli*) 세포 또는 판토에아 (*Pantoea*) 세포, 예컨대 판토에아 시트레아 (*Pantoea citrea*) 세포)이다. 본 발명의 임의의 양상의 일부 구현예에서, 세포는 진균 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, 야로이야 (*Yarrowia*) 세포, 예컨대 야로이야 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

도 1 은 *E. coli* 내 발현에 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 코돈의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:1). atg 출발 코돈은 이텔릭체로 되어 있고, 정지 코돈은 짚은체로, 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 짚은 대문자이고, 정지 코돈은 짚은, 대문자, 이텔릭체이다. 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. coli* BL21 세포에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다.

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

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

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

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

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

도 10A 는 판테오아 시트레아 (*Panteoa citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 대조군 세포는 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소가 없다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD₆₀₀ 을 나타낸다.

도 10B 는 pCL-lac Kudzu 를 발현하는 판테오아 시트레아 (*Panteoa citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD₆₀₀ 을 나타낸다.

도 10C 는 pTrcKudzu 를 발현하는 판테오아 시트레아 (*Panteoa citrea*) 에서의 이소프렌의 제조를 나타내는 그래프이다. 회색 다이아몬드는 이소프렌 합성을 나타내고, 검은색 사각형은 OD₆₀₀ 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. subtilis* 균주이다. CF443-BG3594comK 는 pBSKudzu (재조합 이소프렌 제조) 를 가진 *B. subtilis* 균주이다. y-축 상의 IS 는 이소프렌을 나타낸다.

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

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

도 14 는 야로이야 (Yarrowia) 내 발현에 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 코돈을 포함하는 pTrex3g의 맵이다.

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

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

도 17 은 합성 혼성 포풀러 (포풀러스 알바 x 포풀러스 트레몰라 (Populus alba x Populus tremula)) 이소프렌 합성효소 유전자의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO: 13). ATG 출발 코돈은 짙은체로, 정지 코돈은 밀줄쳐있다.

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 엘타-이소머라아제, IDI1, EC 5.3.3.2. Assay: J. Biol. Chem. 264:19169-19175, 1989.

DXP 경로: DKS; 1-데옥시자일룰로오스-5-포스페이트 합성효소, dxs, EC 2.2.1.7. Assay: PNAS, 94:12857-62, 1997; DXR; 1-데옥시-D-자일룰로오스 5-포스페이트 리덕토이소머라아제, dxr, EC 2.2.1.7. Assay: Eur. J. Biochem. 269:4446-4457, 2002; MCT; 4-디포스포시티딜-2C-메틸-D-에리트리톨 합성효소, IspD, EC 2.7.7.60. Assay: PNAS, 97: 6451-6456, 2000; CMK; 4-디포스포시티딜-2-C-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. 리포라이티카 (lipolytica) 균주에 의한 이소프렌 제조의 GC-MS 분석 결과를 나타내는 그래프를 보여준다. 화살표는 진정한 이소프렌 표준의 용리 시간을 나타낸다.

도 21 은 pTrcKudzu yIDI DKS Kan 의 맵이다.

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

도 23A 는 BL21/pTrcKudzukan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μ mol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 (μ g/L 상부공간) 또는 특이적 생산성 (μ g/L 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 (μ g/L) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 (μ g/L/OD) 을 나타낸다.

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

0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23C 는 BL21/pTrcKudzu DXS kan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23D 는 BL21/pTrcKudzu yIDI DXS kan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23E 는 BL21/pCL PtrcKudzu 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23F 는 BL21/pCL PtrcKudzu yIDI 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23G 는 BL21/pCL PtrcKudzu DXS 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 시간 0 은 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간이다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 원형은 총 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 23H 는 BL21/pTrcKudzuIDIDXskan 에서 글루코오스로부터 이소프렌의 제조를 보여주는 그래프이다. 화살표는 IPTG (400 μmol) 로의 유도 시간을 나타낸다. x-축은 유도 후 시간이고; y-축은 OD₆₀₀ 이고, y2-축은 이소프렌의 총 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간) 또는 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 상부공간/OD) 이다. 검은색 다이아몬드는 OD₆₀₀ 을 나타내고, 검은색 삼각형은 이소프렌 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 을 나타내고, 흰색 사각형은 이소프렌의 특이적 생산성 ($\mu\text{g}/\text{L}/\text{OD}$) 을 나타낸다.

도 24 는 pTrcKKDyIkIS kan 의 맵이다.

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

도 26 은 pCL PtrcUpperPathway 의 맵이다.

도 27A-27D 는 pCL PtrcUpperPathway 의 뉴클레오티드 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 테카르복실라아제 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. SpecR은 스펙티노마이신 내성 마커를 나타낸다. "amp에 대한 nprE 상류방향 반복"은 증폭을 위해 사용되는 상류방향 영역의 직접적 반복을 나타낸다.

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

도 30은 p9796-poplar의 맵이다.

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

도 32는 pTrcPoplar의 맵이다.

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

도 34는 pTrcKudzu yIDI Kan의 맵이다.

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

도 36은 pTrcKudzuDXS Kan의 맵이다.

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

도 38은 pCL PtrcKudzu의 맵이다.

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

도 40은 pCL PtrcKudzu A3의 맵이다.

도 41은 pCL PtrcKudzu A3의 뉴클레오티드 서열이다 (SEQ ID NO:53).

도 42는 pCL PtrcKudzu yIDI의 맵이다.

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

도 44는 pCL PtrcKudzu DXS의 맵이다.

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

도 46은 바이오매스 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 패널 A는 옥수수 대로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 B는 베개스 (bagasse)로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 C는 침엽수 펠프로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 D는 글루코오스로부터의 이소프렌 제조를 보여주고, 패널 E는 부가적인 공급원료가 없는 세포로부터의 이소프렌 제조를 보여준다. 회색 사각형은 표시된 접종후 시간에서의 배양물의 OD₆₀₀ 측정을 나타내고, 검은색 삼각형은 표시된 접종후 시간에서의 이소프렌 제조를 나타낸다.

도 47A는 글루코오스를 첨가하지 않은 배양물 내 BL21 (λ DE3) pTrcKudzu yIDI DKS (kan)에 의한 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD₆₀₀을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

도 47B는 BL21 (λ DE3) pTrcKudzu yIDI DKS (kan)에 의한 1% 글루코오스 공급원료 전화당으로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD₆₀₀을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

도 47C는 BL21 (λ DE3) pTrcKudzu yIDI DKS (kan)에 의한 1% 전화당 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD₆₀₀을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

도 47D는 BL21 (λ DE3) pTrcKudzu yIDI DKS (kan)에 의한 1% AFEX 옥수수 대 공급원료로부터의 이소프렌 제조를 나타내는 그래프를 보여준다. 사각형은 OD₆₀₀을 나타내고, 삼각형은 제조된 이소프렌을 나타낸다 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

도 48은 이소프렌 제조의 효모 추출물의 효과를 입증하는 그래프를 보여준다. 패널 A는 효모 추출물의 양을 달리하여 공급된 반응기 내의 광학 밀도의 시간 과정을 보여준다. 패널 B는 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 + DKS 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 pJMuupperpathway2 의 맵이다.

도 51 은 pJMuupperpathway2 의 뉴클레오티드 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°C , 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_2 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_2 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_2 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_2 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_2 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% 스텀, 0 psig, 및 40°C 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% 스텀, 0 psig, 및 40°C 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°C 에서의 저온-포획 후 방출-기체 내에 존재하는 미량 휘발물질의 GC/MS 크로마토그램이다.

도 87B 는 -196°C 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 pTrcHis2AUppPathway (또한 pTrcUpperMVA 로 불립) 의 맵이다.

도 92A-92C 는 pTrcHis2AUppPathway (또한 pTrcUpperMVA 로 불립) 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 뉴클레오티드 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-펜틴, 2-펜틴, 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-인 (도 90)이 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 이소프렌 조성물은 임의의 오염 불포화 C5 탄화수소가 실질적으로 없다. 실시예 10에 추가로 기재되는 바와 같이, 이소프렌 이외의 불포화 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-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, 4.8×10^4 nmole/g_{wcm}/hr 의 이소프렌을 생성하는 세포 배양 시스템이 제조되었다 (표 1). 상기 시스템의 효율은 세포가 세포 배양 배지로부터 소모하는 탄소의 약 2.2%를 이소프렌으로 전환됨으로써 입증된다. 실시예 및 표 2에서 제시되는 바와 같이, 브로쓰 1 리터 당 대략 3 g의 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 이종 핵산을 세포 내에 도입함으로써 크게 증가될 수 있다. 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP)를 이소프렌으로 전환시킨다. 실시예에서 제시되는 바와 같이, 이종 푸에라리아 몬타나 (*Pueraria Montana*) (kudzu) 이소프렌 합성효소 폴리펩티드는 다양한 숙주 세포, 예컨대 에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*), 판테오아 시트레아 (*Panteoa citrea*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 야로이야 리폴라이티카 (*Yarrowia lipolytica*), 및 트리코데르마 레에세이 (*Trichoderma reesei*)에서 발현되었다. 모든 상기 세포는 이종 이소프렌 합성효소 폴리펩티드가 없는 상응하는 세포보다 더욱 많은 이소프렌을 제조한다. 표 1 및 2에서 예증되는 바와 같이, 본원에 기재된 방법을 사용하여 다양한 이소프렌이 제조된다. 예를 들어, 이종 이소프렌 합성효소 핵산이 있

는 B. 서브틸리스 세포는 이종 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 큐모로 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 μg/L _{기체}	특이적 속도 μg/L _{브로쓰} /hr/OD (nmol/g _{wcm} /hr)
<i>E. coli</i> BL21/ pTrcKudzu IS	1.40	53.2 (781.2)
<i>E. coli</i> BL21/ pCL DXS yidi Kudzu IS	7.61	289.1 (4.25 x 10 ³)
kudzu IS 및 전체 MVA경로를 가진 <i>E. coli</i> BL21/MCM127	23.0	874.1 (12.8 x 10 ³)
<i>E. coli</i> BL21/ pET N-HisKudzu IS	1.49	56.6 (831.1)
판토에아 시트레아 /pTrcKudzu IS	0.66	25.1 (368.6)
<i>E. coli</i> w/ Poplar IS [Miller (2001)]	-	5.6 (82.2)
US 5849970 호의 바실리스 리캐니포르미스	-	4.2 (61.4)
kudzu 이소프렌 합성효소를 가진 야로이아 리풀라아/ET/카	~0.05 μg/L	~2 (~30)
kudzu 이소프렌 합성효소를 가진 트리코데르마 래에세이	~0.05 μg/L	~2 (~30)
kudzu IS 및 하위 MVA 경로를 가진 <i>E. coli</i> BL21/ pTrcKKD _y I _k IS	85.9	3.2 x 10 ³ (4.8 x 10 ⁴)

[0042]

[0043] * 액체 대 상부공간 부피비가 1:19 인 밀봉된 상부공간 바이알에서 1 시간 동안 배양된, 1 OD₆₀₀ 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 ** (ug/L _{기체})	적정농도 (mg/L _{브로쓰})	피크 특이적 속도 μg/L _{브로쓰} /hr/OD (nmol/g _{wcm} /hr)
Kudzu IS 를 가진 <i>E.콜라0/</i> BL21 /pTrcKudzu	52	41.2	37 (543.3)
<i>E.콜라0/</i> FM5/pTrcKudzu IS	3	3.5	21.4 (308.1)
<i>E.콜라0/</i> BL21/삼중 균주 (DXS, yidi, IS)	285	300	240 (3.52 x 10 ³)
<i>E.콜라0/</i> FM5/삼중 균주 (DXS, yidi, IS)	50.8	29	180.8 (2.65 x 10 ³)
Kudzu IS 및 전체MVA 경로를 가진 <i>E.콜라0/</i> MCM127	3815	3044	992.5 (1.46 x 10 ⁴)
<i>E.콜라0/</i> BL21/pCLPtrc UpperPathway gi1.2 통합 하위 경로	2418	1640	1248 (1.83 x 10 ⁴)

[0045]

<i>E.콜라0/</i> BL21/pCLPtrc UpperPathwayHGS2 - pTrcKKDyIkIS	3500	3300	1088 (1.60 x 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)
바실러스 마르버그 6051 [Wagner and Fall (1999)]	2.04	0.61	24.5 (359.8)
US 5849970 호의 바실러스 마르버그 6051	0.7	0.15	6.8 (100)

[0046]

** 1vvm (방출-기체 1 부피/1 L_{브로쓰}/분) 의 방출-기체 흐름 속도에 표준화됨.

[0047]

부가적으로는, 이종 이소프렌 합성효소 핵산을 함유하는 세포에 의한 이소프렌 제조는 세포에 의해 발현되는 1-데옥시-D-자일루로오스-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 이종 핵산 또는 내생 핵산의 이종 카페일 수 있다. 유사하게는, IDI 핵산은 이종 핵산 또는 내생 핵산의 이종 카페일 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 이종 핵산 (예를 들어, 식물 이소프렌 합성효소 핵산) 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 이종 카페 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-테옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트로 전환시킨다.
- 임의의 특정 이론에 얹매이는 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 얹매이는 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ 로 변하였다 (실시예 7, 파트 VII).
- [0051] 일부 구현예에서, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산의 존재는 이들 이종 또는 추가의 내생 핵산 중 오직 1 개 또는 2 개를 갖는 상응하는 세포와 비교하여, 세포를 더욱 재생가능하게 성장시키고 더욱 장기간 생존가능하게 남아 있게 한다. 예를 들어, 이종 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산을 함유하는 세포는 이종 이소프렌 합성효소 및 DXS 핵산 만을 갖는 세포 또는 이종 이소프렌 합성효소 핵산 만을 갖는 세포보다 잘 성장하였다. 또한, 이종 이소프렌 합성효소, IDI, 및 DXS 핵산은 E. 콜라이 세포에 의해 유지되었던 고 카페 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 얹매이는 것으로 의도되지 않으면서, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소 및 IDI 핵산의 존재가, 세포에 오직 이종 또는 추가의 내생 DXS 핵산 만이 존재했을 경우 축적될 것인 하나 이상의 잠재적으로 독성인 중간체의 양을 감소시킬 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0052] 일부 구현예에서, 이종 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 테카르복실라아제 (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 이종 핵산 또는 내생 핵산의 이중 카페일 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 이종 핵산 (예를 들어, 식물 이소프렌 합성효소 핵산) 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 내생 핵산의 이중 카페 모두를 함유한다.
- [0053] 예를 들어, kudzu 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*) MVK, PMK, MVD, 및 IDI 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 함유하는 E. 콜라이 세포는 이소프렌을 $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol/L}_{\text{보로쓰}}/\text{OD}_{600}/\text{hr}$ 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 이종 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 $\mu\text{g}/\text{L}$) 을 제조하였다 (표 3 및 실시예 8, 파트 VIII 참조).
- [0054] 일부 구현예에서, 세포의 일부 이상은 연속 배양물 (예컨대 회석 없는 연속 배양물) 에서 약 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 이상의 세포 분열에 대해 이종 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 이종 또는 이종 카피를 포함하는 핵산은 또한 선별 마커, 예컨대 카나마이신, 암페실린, 카르베니실린, 젠타마이신, 하이그로마이신, 플레오마이신, 블레오마이신, 네오마이신, 또는 클로르암페니콜 항생제 내성 핵산을 포함한다.

[0055] 실시예 7, 파트 VI에서 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 조성을 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/L의 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/L의 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 초과의 오일 (예컨대 2, 3, 4, 5 개 이상의 오일)이 세포 배지에 포함된다. 임의의 특정 이론에 얹매이는 것으로 의도되지 않으면서, (i) 오일은 이소프렌으로의 전환에 이용가능한 세포 내 탄소의 양을 증가시킬 수 있고, (ii) 오일은 세포 내 아세틸-CoA의 양을 증가시켜, MVA 경로를 통한 탄소 흐름을 증가시킬 수 있고, 및/또는 (iii) 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 11에 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 MG1655에서 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

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

본원에 사용되는 바와 같이, "폴리펩티드" 에는 폴리펩티드, 단백질, 웨프티드, 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 웨프티드, 예컨대 His-태그) 가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 폴리펩티드는 2 개 이상의 MVA 경로 폴리펩티드 (예컨대, AA-CoA 티울라아제 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.

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.

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.

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

본원에 사용되는 바와 같이, "핵산" 은 단일 또는 이중 형태의 2 개 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 및/또는 리보뉴클레오티드를 말한다. 일부 구현예에서, 핵산은 재조합 핵산이다. "재조합 핵산" 은 관심의 핵산이 유래한 유기체의 자연에서 발생되는 게놈 내에, 관심의 핵산 측면에 있는 하나 이상의 핵산 (예를 들어, 유전자) 이 없는 관심의 핵산을 의미한다. 그러므로 용어에는 예를 들어, 백터 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 DNA 가 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 웨프티드, 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.

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

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 뉴클레오티드가 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, 뮤온 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 구제화하기 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 1에 나열되어 있다 (부록 1의 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 2007년 12월 12일에 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, 웨프티드, 및 이소프렌 합성효소 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 표준 방법은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 DMAPP를 이소프렌으로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 활성을 갖는지의 여부를 측정하는데 사용될 수 있다. 예시적 어세이에서, 세포 추출물은 실시예 1에 기재된 바와 같은 진탕 플라스크 방법에서 균주 (예를 들어, 본원에 기재된 E. coli/pTrcKudzu 균주)를 성장시켜 조제된다. 유도 완료 후, 대략 10 mL의 세포를 7000 × g에서 10분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하고, 글리세롤 없이 5 mL의 PEB에 재현탁시켰다. 표준 절차를 사용하여 프렌치 압력 셀 (French Pressure cell)을 사용하여 세포를 용해시켰다. 대안적으로는, -80°C에서 동결/해동 후 세포에 라이소자임 (Ready-Lyse 라이소자임 용액; EpiCentre)을 처리한다.

[0073] 세포 추출물 내의 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 활성을 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 mM의 농도로 재수화시켜, -20°C에 저장하였다. 어세이를 수행하기 위해, 5 μl의 1 M MgCl₂, 1 mM (250 μg/mL) DMAPP, 65 μl의 식물 추출물 완충액 (PEB) (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 5% 글리세롤, 및 2 mM DTT)의 용액을 금속 스크류캡 및 테플론 코팅 실리콘 격막을 가진 20 mL Headspace 바이알 (Agilent Technologies)에 25 μl의 세포 추출물에 첨가하고, 37°C에서 15분 동안 진탕하면서 배양하였다. 200 μl의 250 mM EDTA를 첨가하여 반응을 켄칭하고, 실시예 1, 파트 II에 기재된 바와 같이 GC/MS에 의해 정량하였다.

[0074] 예시적 이소프렌 합성효소 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 웨프티드, 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*), 포풀러 (예컨대, 포풀러스 알바 x 트레몰라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696) Miller et al., *Planta* 213: 483-487, 2001) 사시나무 (예컨대, 포풀러스 트레몰로이데스 (*Populus tremuloides*) Silver et al., *JBC* 270(22): 13010-1316, 1995), 또는 영국산 오크 (English Oak) 퀼르쿠스 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 퀼르쿠스 로부르 (*Quercus robur*)로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산이 아니다 (즉, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산은 퀼르쿠스 로부르 (*Quercus robur*)로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산 이외의 이소프렌 합성효소 폴리펩티드 또는 핵산이다). 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 핵산 또는 폴리펩티드는 포풀러 (예컨대, 포풀러스 알바 x 트레몰라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696)로부터의 자연 발생적 폴리펩티드 또는 핵산이 아니다.

[0076] 예시적 DXS 폴리펩티드 및 핵산

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, 웨프티드, 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, 웨프티드, 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.

[0077] 예시적 IDI 폴리펩티드 및 핵산

이소펜테닐 디포스페이트 이소머라아제 폴리펩티드 (이소펜테닐-디포스페이트 엘타-이소머라아제 또는 IDI)는 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 및 디메틸알릴 디포스페이트 (DMAPP)의 상호전환 (예를 들어, IPP를 DMAPP로 전환시킴 및/또는 DMAPP를 IPP로 전환시킴)을 촉매화한다. 예시적 IDI 폴리펩티드에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 웨프티드, 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 DMAPP를 상호전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 폴리펩티드가 IDI 폴리펩티드 활성을 갖는지를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 예시적 IDI 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 웨프티드, 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.

[0078] 예시적 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산

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 테카르복실라아제 (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, 웨프티드, 및 MVA 경로 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 예시적 MVA 경로 핵산에는 폴리펩티드, 폴리펩티드의 분절, 웨프티드, 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.

특히, 아세틸-CoA 아세틸트랜스페라아제 폴리펩티드 (AA-CoA 티올라아제 또는 AACT)는 아세틸-CoA의 2 개의 분자를 아세토아세틸-CoA로 전환시킨다. 표준 방법 (예컨대 본원에 기재된 방법)은 시험관 내에서, 세포 추출물 내에서, 또는 생체 내에서 아세틸-CoA의 2 개의 분자를 아세토아세틸-CoA로 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 계놈)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 계놈 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 폴리미라아제 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. coli 와 같은 유기체에서 구축될 수 있고, 그 다음 이소프렌 제조에 대해 스크리닝된다. 특히, 코스미드 라이브러리는 계놈 DNA 의 큰 절편 (35-45 kb) 이 벡터 내로 패키지되는 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 패키지 및 후속 환형화에 필요한 cos DNA 서열의 하나 이상의 카페를 갖는다. cos 서열 외에, 상기 벡터는 또한 ColE1 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, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989]에 잘 기재되어 있다.

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

[0094] 이소프렌 합성효소, DDXS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산을 수득하기 위한 부가적인 방법에는 어세이(예컨대 본원에 기재된 상부공간 어세이)에 의해 또는 보존된 아미노산 길이(예를 들어, 3개 이상의 보존된 아미노산)를 코딩하는 뉴클레오티드에 대해 지정된 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 메타게놈 라이브러리를 스크리닝하는 것이 포함된다. 보존된 아미노산은 공지된 이소프렌 합성효소, DDXS, 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 DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산의 구조와의 유사성에 근거한 부가적인 DDXS, 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, DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드 및 핵산을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 이소프렌 합성효소, DDXS, 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 디플트 설정을 사용하여 예측될 수 있다. 대안적으로는, 이소프렌 합성효소, DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 폴리펩티드의 실제 이차 및/또는 삼차 구조는 표준 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 부가적인 이소프렌 합성효소, DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 또한 공지된 이소프렌 합성효소, DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산으로부터 생성된 탐침에 대한 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

예시적 프로모터 및 벡터

[0097] 본원에 기재된 임의의 이소프렌 합성효소, DDXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 하나 이상의 벡터에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 이소프렌 합성효소, DDXS, 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 활성인 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 pyr4로서 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. 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 상용성이 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 각각 전체가 참조로서 인용된 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd 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 (페치아 (*Pichia*) 에서의 발현에 유용함); 및 lac, trp, □P_L, □P_R, T7, tac, 및 trc (*E. coli*에서의 발현에 유용함)를 포함하나 이에 제한되지 않음).

[0102] 일부 구현예에서, 글루코오스 이소미라아제 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 이소미라아제 프로모터 돌연변이체는 글루코오스 이소미라아제 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코딩된 폴리펩티드의 발현 수준을 변화시키기 위해 사용될 수 있다 (미국 특허 번호 7,132,527). 다양한 구현예에서, 글루코오스 이소미라아제 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, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 T7 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, T7 프로모터에 작동가능하게 연결된 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 중 또는 고 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, Trc 프로모터에 작동가능하게 연결된 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 중 또는 고 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, Lac 프로모터에 작동가능하게 연결된 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 저 카피 플라스미드에 함유된다. 일부 구현예에서, 이종 또는 추가의 내생 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산은 내생 프로모터, 예컨대 내생 에스케리차 (*Escherichia*), 판테오아 (*Panteoa*), 바실러스 (*Bacillus*), 야로이와 (*Yarrowia*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 또는 트리코데르마 (*Trichoderma*) 프로모터 또는 내생 알칼리 세린 프로테아제, 이소프렌 합성효소, DXS, IDI, 또는 MVA 경로 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 내생 프로모터에 작동가능하게 연결된 이종 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 계놈 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. 레에세이*가 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* 글루코아밀라제 (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 오리자에 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, *T. 레에세이* xln1, 및 *T. 레에세이* 셀로바이오헤드롤라아제 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 라이케이션하기 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 라이케이션될 수 있다. 연결은 일반적으로 편리한 제한 부위에서의 라이케이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 링커는 통상의 실시에 따라 사용된다 (특히, 올리고뉴클레오티드 링커에 관해, 전체가 참조로서 본원에 각각 인용된 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd 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 바람직할 것이다. 이 결과는 상기 폴리펩티드를 다중카페 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, 2nd 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 [Kriegler, Gene Transfer and Expression; A Laboratory Manual, 1990 및 Ausubel et al., Eds. Current Protocols in Molecular Biology, 1994].

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 도입함으로부터 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. 세레비지아에, 스퀴조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*) 종, 예컨대 S. 폼베, 및 트리코데르마 (*Trichoderma*) 종, 예컨대 T. 레에세이이다. 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 군사체를 특징으로 한다. 사상 진균은 효모와 형태적으로, 물리적으로 그리고 유전적으로 구별된다. 사상 진균에 의한 영양적 성장은 군사 신장에 의해 이루어지고, 탄소 이화작용은 의무적 호기성이다. 사상 진균 모 세포는 트리코데르마 (*Trichoderma*), (예를 들어, 트리코데르마 레에세이 (*Trichoderma reesei*), 하이포크 레아 제코리나 (*Hypocrea jecorina*)의 무성 형태, 이전에는 T. 롱기브라키아툼 (*T. longibrachiatum*), 트리코데르마 비리데 (*Trichoderma viride*), 트리코데르마 코닝기아 (*Trichoderma koningii*), 트리코데르마 하르지아눔 (*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. lanuginose*), 또는 H. 그리세아 (*H. grisea*)); 크리소스 포리움 (*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. 니돌란스 (*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. miehei* (M. miehei)), *Rhizopus* 종 및 *Emericella* 종 (또한, Innis et al., Sci. 228: 21-26, 1985 참조)의 세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. "트리코데르마" 또는 "트리코데르마 종 (*Trichoderma* sp. 또는 *Trichoderma* spp.)"이라는 용어는 트리코데르마로서 이전에 또는 현재 분류되는 임의의 진균 속을 말한다.

[0115] 일부 구현예에서, 진균은 *A. 니돌란스*, *A. 아와모리*, *A. 오리자에*, *A. 아쿨레아투스* (*A. aculeatus*), *A. 니게르*, *A. 자포니쿠스*, *T. 레에세이*, *T. 비리데*, *F. 옥시스포룸*, 또는 *F. 솔라니*이다. 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 트리코데르마의 균주, 예컨대 *T. 레에세이*의 균주이다. *T. 레에세이*의 균주는 알려져 있고, 비제한적인 예에는 특히, *T. 레에세이*의 균주에 관해, 전체가 본원에 각각 참조로서 인용된 ATCC No. 13631, ATCC No. 26921, ATCC No. 56764, ATCC No. 56765, ATCC No. 56767, 및 NRRL 15709가 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주 균주는 RL-P37의 유도체이다. RL-P37은 특히, *T. 레에세이*의 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 에스케리챠 균주, 예컨대 *E. 콜라이*이다.

[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. 아밀로리퀴파시엔스* (*B. amyloliquefaciens*), *B. 클라우시* (*B. clausii*), *B. 할로두란스* (*B. halodurans*), *B. 메가테리움* (*B. megaterium*), *B. 코아굴란스* (*B. coagulans*), *B. 써큘란스* (*B. circulans*), *B. 라우투스* (*B. lautus*), 및 *B. 투린지엔시스* (*B. thuringiensis*) 가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바실러스 속에 대한 분류학 재편성이 지속적으로 이루어짐을 인지한다. 그러므로, 속에는 이제는 "제오바실러스 스텐아로테르모필러스" (*Geobacillus stearothermophilus*)라고 칭하는 *B. 스텐아로테르모필러스* (*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 벼지바실러스 (*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 파보이데아에 (*Faboideae*) 아족으로부터의 식물이다. 일부 구현예에서, 공급원 유기체는 청, 포풀러 (예컨대, 포풀러스 알바 x 트레몰라 (*Populus alba x tremula*) CAC35696), 사시나무 (예컨대, 포풀러스 트레몰로이데스 (*Populus tremuloides*)), 또는 케르кус 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: 크로오코칼스 (*Chroococcales*), 플레로캡살스 (*Pleurocapsales*), 오실라토리알레스 (*Oscillatoriales*), 노스토칼레스 (*Nostocales*), 또는 스티고네마탈레스 (*Stigonematales*).

[0123] 예시적 숙주 세포

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

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 과지 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, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989; 및 Campbell et al., Curr. Genet. 16:53-56, 1989] 참조). 트리코데르마 내 이종 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 우돌 투둘하다가 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 트리코데르마 종의 조제는 진균 균사로부터의 원생동물의 조제를 포함한다 (특히, 형질전환 방법에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 문헌 [Campbell et al., Curr. Genet. 16:53-56, 1989] 참조). 일부 구현예에서, 균사는 발아된 영양 포자로부터 수득된다. 균사는 원생동물을 야기하는 세포벽을 소화하는 효소로 처리된다. 그 다음 원생동물은 혼탁 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 M이다. 혼탁 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 CaCl₂ 내지 50 mM CaCl₂ 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 (모르폴린프로판술 폰산) 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, 10⁵ 내지 10⁷/mL (예컨대 2 × 10⁶/mL) 의 밀도로 투과성 처리에 적용된 트리코데르마 종 원생동물 또는 세포를 함유하는 혼탁액이 형질전환에 사용된다. 적합한 용액 (예를 들어, 1.2 M 소르비톨 및 50 mM CaCl₂) 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 혼탁액에 첨가할 수 있다. 일부 구현예에서, 약 0.25 부피를 원생동물 혼탁액에 첨가한다. 디메틸 솔록시드, 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°C 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 CaCl₂ 용액의 첨가 전 실온 또는 냉장에서 배양된다. 그 다음 원생동물 혼탁액을 성장 배지의 용용 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 유기 체에 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), 전화당 (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 웹티드), 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 구현 예에서, 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 포함된다.

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 웨პ티드) 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 브로쓰 1 리터 당 약 5 그램 이상 (g/L, 브로쓰의 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 C₁₂-C₂₂ 지방산, 예컨대 C₁₂ 포화 지방산, C₁₄ 포화 지방산, C₁₆ 포화 지방산, C₁₈ 포화 지방산, C₂₀ 포화 지방산, 또는 C₂₂ 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 브로쓰 1 리터 당 약 1 그램 이상 (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, 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 대 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, 사탕무우 당밀, 보리 누룩, 및 상기 중 임의의 것으로부터의 성분이 포함된다. 예시적 재생가능 탄소원에는 또한 바이오매스에 존재하는 글루코오스, 헥소오스, 펜토오스 및 자일로오스, 예컨대 옥수수, 지팽이풀 (switchgrass), 사탕수수, 발효 공정의 세포 폐기물, 및 대두, 옥수수, 또는 밀의 제분으로부터의 단백질 부산물이 포함된다. 일부 구현예에서, 바이오매스 탄소원은 리그노셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 또는 세룰로오스 물질, 예컨대, 잔디, 밀, 밀짚, 베개스, 사탕수수 베개스, 침엽수 펠프, 옥수수, 옥수수 속 또는 겉껍질, 옥수수 핵, 옥수수 핵으로부터의 섬유, 옥수수 대, 지팽이풀, 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 세룰로오스 물질에는 목재, 종이 및 펠프 폐기물, 초본 식물, 및 과일 과육이 포함된다. 일부 구현예에서, 탄소원에는 임의의 식물 부분, 예컨대 줄기, 곡물, 뿌리 또는 뎅이줄기가 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 팽창 (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, 세룰로오스 탈결정화 (decrystallization)의 조합된 화학적 및 물리적 효과, 및 증가된 표면적은 세룰로오스 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. AFEX는 기본적으로 건조 내지 건조 공정이다. 처리된 재생가능 탄소원은 장기간 동안 안정하고, 효소적 가수분해 또는 발효 공정에 매우 높은 고체 적재량으로 공급될 수 있다. 세룰로오스 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. 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.

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 또 다른 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 리불로오스 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. 리불로오스 모노포스페이트 경로에는 프룩토오스 및 결국에는 3 탄소 생성물 글리세르알데하이드-3-포스페이트가 되는 6 탄당을 형성하는, 포르메이트의 리불로오스-5-포스페이트와의 축합이 포함된다. 마찬가지로, 세린 경로는 메틸렌테트라히드로플레이트를 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.], 7th 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, DKS, IDI, 및/또는 MVA 경로 핵산이 유도 성 프로모터의 조절 하에 있는 일부 구현예에서, 유도제 (예를 들어, 당, 금속 염 또는 항생제) 가 바람직하게는, 이소프렌 합성효소, DKS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 효과적인 농도로 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 배지는 하나 이상의 DKS, 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% CO₂, 및 pH 약 5 내지 약 9)에서 세포를 성장 및 유지시킨다. 일부 구현예에서, 적합한 세포 배지에서 세포를 35°C에서 성장시킨다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 원하는 양의 이소프렌 제조가 달성될 때까지 배양물을 진탕 배양물 또는 발효기 내의 적합한 배지에서 대략 28°C에서 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 공자된 발효 방식, 예컨대 배치, 공급-배치, 또는 연속 과정을 사용하여 세포를 성장시킨다. 일부 구현예에서, 배치 발효 방법이 사용된다. 고전적인 배치 발효는 배지 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 충분으로 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 측정 가능한 인자, 예컨대 pH, 용존 산소, 및 CO₂와 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, 배지 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 CO₂ 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. 혼탁 배양의 경우, 세포는 혼탁 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, DKS, IDI, 또는 MVA 경로 핵산(들)의 발현을 유도하기 위해 첨가되지 않는다. 일부 구현예에서, 화합물 (예컨대, IPTG) 은 프로모터에 작동가능하게 연결된 이소프렌 합성효소, DKS, 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 OD₆₀₀ 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 nm에서의 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 nm에서의 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_{wcm}/hr)로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 예컨대 약 2 내지 약 100 nmole/g_{wcm}/hr, 약 100 내지 약 500 nmole/g_{wcm}/hr, 약 150 내지 약 500 nmole/g_{wcm}/hr, 약 500 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 1,000 내지 약 2,000 nmole/g_{wcm}/hr, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 100 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 200 내지 약 2,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 200 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 300 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 또는 약 400 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr 이다.

[0169]

일부 구현예에서, 세포의 550 nm에서의 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_{брюц}, 브로쓰의 부피에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 포함된다)의 이소프렌의 누적 적정농도 (총 양)를 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 mg/L_{брюц}, 예컨대 약 2 내지 약 100 mg/L_{брюц}, 약 100 내지 약 500 mg/L_{брюц}, 약 500 내지 약 1,000 mg/L_{брюц}, 약 1,000 내지 약 2,000 mg/L_{брюц}

쓰, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰} 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰}, 약 100 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰}, 약 200 내지 약 2,000 mg/L_{브로쓰}, 약 200 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰}, 약 300 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰}, 또는 약 400 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰} 이다.

[0170] 일부 구현예에서, 세포의 550 nm에서의 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 OD₆₀₀ 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 nm에서의 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 혼합은 성장상에서보다 정지상에서 더욱 활성인 프로모터 또는 인자의 조절 하에 있다. 예를 들어, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 혼합은 정지상 시그마 인자, 예컨대 RpoS의 조절 하에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MVA 경로, IDI, DXP, 또는 이소프렌 합성효소 혼합은 정지상에서 활성인 반응 조절자에 의해 유도 가능한 프로모터와 같은, 정지상에서 유도 가능한 프로모터의 조절 하에 있다.

안전한 조작 범위 내에서의 이소프렌의 제조

[0173] 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.

[0174] 그러므로, 공정 안전성을 확실히 하기 위해, 이소프렌의 연소 한계 (예컨대 O₂, N₂, CO₂, 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. LFL은 연소를 유지하기 위해 존재해야만 하는 최소량의 이소프렌인 반면, UFL은 존재할 수 있는 최대 량의 이소프렌이다. 상기 제한 초과에서, 혼합물은 풍부한 연료이고, 산소 분획은 가연성 혼합물을 갖기엔 너무 낮다. LOC는 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.

[0175] 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.

[0177] (1) 컴퓨터 시뮬레이션 및 수학적 분석

[0178] 시험 스위트 1:

[0179] 이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

[0180] O₂: 6 wt% - 21 wt%

[0181] N₂: 79 wt% - 94 wt%

[0182] 시험 스위트 2:

[0183] 이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

[0184] O₂: 6 wt% - 21 wt%

[0185] N₂: 79 wt% - 94 wt%

[0186] H₂O로 포화됨

[0187] 시험 스위트 3:

[0188] 이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

[0189] O₂: 6 wt% - 21 wt%

[0190] N₂: 79 wt% - 94 wt%

[0191] CO₂: 5 wt% - 30 wt%

[0192] (2) 연소 한계의 최종 측정을 위한 실험적 시험

[0193] 시험 스위트 1:

[0194] 이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

[0195] O₂: 6 wt% - 21 wt%

[0196] N₂: 79 wt% - 94 wt%

[0197] 시험 스위트 2:

[0198] 이소프렌: 0 wt% - 14 wt%

[0199] O₂: 6 wt% - 21 wt%

[0200] N₂: 79 wt% - 94 wt%

[0201] H₂O로 포화됨

[0202] 시뮬레이션 소프트웨어를 사용하여 여러 상이한 시험 조건에 대해 시스템의 가연성 특성의 추정치를 제공하였다. CO₂는 시스템의 연소 한계에 대해 유의한 영향을 보이지 않았다. 시험 스위트 1 및 2는 실험적 시험에 의해 확인되었다. 모델링 결과는 실험적 시험 결과와 연관이 있었다. 물을 첨가하면 약간의 변화만이 발견되었다.

[0203] LOC는 40°C, 1 대기압에서 이소프렌, O₂, N₂, 및 CO₂ 혼합물에 대해 9.5 부피%인 것으로 측정되었다. 30% 이하의 CO₂의 첨가는 이소프렌, O₂, 및 N₂ 혼합물의 가연성 특성에 유의하게 영향을 미치지 않았다. 가연성 특성에서의 오직 약간의 변화가 건조 및 물 포화 이소프렌, O₂, 및 N₂ 시스템 사이에서 보였다. 제한 온도는 약 -54°C이다. 약 -54°C 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 UFC 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 UFC 은 약 2.0 부피% 내지 약 12.0 부피% 이고, 온도가 약 25°C 내지 약 55°C (예컨대, 약 40°C) 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 UFC 초과 (예컨대 약 12 부피% 초과) 이다. 예를 들어, 이소프렌의 양은 이소프렌을 UFC 초과의 농도로 제조하는 시스템 (예컨대 본원에 기재된 세포 배양 시스템 중 임의의 것) 을 사용하여 UFC 초과의 농도로 유지될 수 있다. 바람직한 경우, 비교적 낮은 수준의 산소가 사용되어 UFC 이 또한 비교적 낮도록 할 수 있다. 이 경우, UFC 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 UFC) 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 희미될 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 UFC 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 90% 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 90% 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) CO₂, 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) CO₂ 를 포함한다.
- [0209] 일부 구현예에서, 이소프렌 조성물은 또한 에탄올을 함유한다. 예를 들어, 에탄올은 이소프렌의 추출 종류에 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 UFC 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 LOC의 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 LFL의 약 25, 20, 15, 10, 또는 5% 이하이다.

[0211] 이소프렌의 예시적 제조

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 량이 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.

"피크 특이적 생산성" 이란, 특정 시간 동안의 세포 배양 (예를 들어, 특정 발효 실행 동안 세포의 배양) 동안 세포 당 제조되는 이소프렌의 최대 량을 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 nm에서의 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.

"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.

"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 μm; 0.25 μm 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.

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 물의 이소프렌/세포의 습윤 중량에 대한 세포 g/시간 (nmole/g_{wcm}/hr)으로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 예컨대 약 2 내지 약 100 nmole/g_{wcm}/hr, 약 100 내지 약 500 nmole/g_{wcm}/hr, 약 150 내지 약 500 nmole/g_{wcm}/hr, 약 500 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 1,000 내지 약 2,000 nmole/g_{wcm}/hr, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 100 내지 약 5,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 200 내지 약 2,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 200 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 약 300 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr, 또는 약 400 내지 약 1,000 nmole/g_{wcm}/hr 이다.

단위 nmole/g_{wcm}/hr의 이소프렌의 양은 특히, 이소프렌 제조의 측정에 관해, 본원에 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 번호 5,849,970에 기재된 바와 같이 측정할 수 있다. 예를 들어, 2 mL의 상부공간 (예를 들어, 200 rpm에서 대략 3 시간 동안 진탕하며 32°C의 밀폐 바이알에서 배양된 2 mL의 배양물과 같은 배양물로부터의 상부공간)은 표준 기체 크로마토그래피 시스템, 예컨대 n-옥탄/porasil C 컬럼 (Alltech Associates, Inc., Deerfield, 111.)이 구비되고, RGD2 산화제2수은 환원 기체 검출기 (Trace Analytical, Menlo Park,

CA) 가 연결된 등온선적으로 (85°C) 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 그램에 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 그램으로 전환시킴으로써 계산된다.

일부 구현예에서, 세포의 그램은, A_{600} 값이 1 인 1 리터의 브로쓰 (세포 배지 및 세포 포함) 가 1 그램의 습윤 세포 중량을 갖는 것으로 가정함으로써 추정한다. 같은 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_{wcm}/h) 로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 ng/g_{wcm}/h, 예컨대 약 2 내지 약 100 ng/g_{wcm}/h, 약 100 내지 약 500 ng/g_{wcm}/h, 약 500 내지 약 1,000 ng/g_{wcm}/h, 약 1,000 내지 약 2,000 ng/g_{wcm}/h, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 ng/g_{wcm}/h 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 ng/g_{wcm}/h, 약 100 내지 약 5,000 ng/g_{wcm}/h, 약 200 내지 약 2,000 ng/g_{wcm}/h, 약 200 내지 약 1,000 ng/g_{wcm}/h, 약 300 내지 약 1,000 ng/g_{wcm}/h, 또는 약 400 내지 약 1,000 ng/g_{wcm}/h 이다. 이소프렌의 양 (ng/g_{wcm}/h) 은 상기 논의된 nmole/g_{wcm}/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_{브로쓰}, 브로쓰의 부피에는 세포 및 세포 배지의 부피가 포함된다) 로 제조한다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 2 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰}, 예컨대 약 2 내지 약 100 mg/L_{브로쓰}, 약 100 내지 약 500 mg/L_{브로쓰}, 약 500 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰}, 약 1,000 내지 약 2,000 mg/L_{브로쓰}, 또는 약 2,000 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰} 이다. 일부 구현예에서, 이소프렌의 양은 약 20 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰}, 약 100 내지 약 5,000 mg/L_{브로쓰}, 약 200 내지 약 2,000 mg/L_{브로쓰}, 약 200 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰}, 약 300 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰}, 또는 약 400 내지 약 1,000 mg/L_{브로쓰} 이다.

[0220] 이소프렌의 특이적 생산성 (이소프렌 mg/진탕 플라스크 또는 유사한 배양물로부터의 상부공간 L) 은, 대략 1.0 의 OD₆₀₀ 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. OD₆₀₀ 값이 1.0 이 아닌 경우, 측정은 OD₆₀₀ 값으로 나눔으로써 1.0 의 OD₆₀₀ 값에 표준화될 수 있다. 이소프렌 mg/상부공간 L 의 값은 38 의 인자를 곱하여 mg/L_{브로쓰}/hr/OD₆₀₀ 배양 브로쓰로 전환될 수 있다. mg/L_{브로쓰}/hr/OD₆₀₀ 단위의 값은 시간의 수 및 OD₆₀₀ 값을 곱하여 이소프렌 mg/브로쓰 L 단위의 누적 적정 농도를 수득할 수 있다.

[0221] 발효기 내의 즉각적인 이소프렌 제조 속도 (mg/L_{브로쓰}/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_{기체} 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_{기체} 이다) 측정할 수 있다. 그러므로, 1 mg/L_{기체} 의 방출-기체 수준은 1 vvm 의 공기 흐름에서 60 mg/L_{브로쓰}/hr 의 즉각적인 제조 속도에 상응한다. 바람직하게는, mg/L_{브로쓰}/hr 단위의 값은 OD₆₀₀ 값으로 나누어 mg/L_{브로쓰}/hr/OD 단위의 특이적 속도를 수득할 수 있다. 이소프렌 mg/L_{기체} 의 평균 값은 상기 평균 방출-기체 이소프렌 농도에 발효 동안 발효 브로쓰 1 리터당 살포되는 방출-기체의 총 양을 곱함으로써 총 생성물 생산성 (발효 브로쓰 1 리터 당 이소프렌 그램, mg/L_{브로쓰}) 으로 전환될 수 있다. 그러므로, 1 vvm 에서 10 시간에 걸친 0.5 mg/L_{브로쓰}/hr 의 평균 방출-기체 이소프렌 농도는 300 mg 이소프렌

$L_{\text{브로쓰}}$ 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 몰을 탄소원 내 탄소 몰 (예컨대, 배치 및 공급 글루코오스 및 효모 추출물 내 탄소 몰)로 나누어 측정할 수 있다. 상기 수에 100%를 곱하여 % 값을 산출한다 (방정식 1에 표시된 바와 같음).

방정식 1

$$\% \text{ 탄소 수율} = (\text{제조되는 이소프렌 내 탄소 몰}) / (\text{탄소원 내 탄소 몰}) * 100$$

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

방정식 2

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

[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 V에는 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)

방정식 3

$$1 \text{ g 이소프렌}/L_{\text{브로쓰}}/\text{hr} = 14.7 \text{ mmol 이소프렌}/L_{\text{브로쓰}}/\text{hr} \text{ (총 체적 속도)}$$

방정식 4

$$1 \text{ nmol 이소프렌}/g_{\text{wcm}}/\text{hr} = 1 \text{ nmol 이소프렌}/L_{\text{브로쓰}}/\text{hr}/OD_{600} \text{ (이 전환율은 } 1 \text{ 의 } OD_{600} \text{ 값을 갖는 브로쓰 } 1 \text{ 리터가 } 1 \text{ 그램의 습윤 세포 중량을 갖는다는 것으로 추정한다)}$$

방정식 5

$$1 \text{ nmol 이소프렌}/g_{\text{wcm}}/\text{hr} = 68.1 \text{ ng 이소프렌}/g_{\text{wcm}}/\text{hr} \text{ (제공된 이소프렌의 분자량)}$$

방정식 6

$$1 \text{ nmol 이소프렌}/L_{\text{기체}} O_2/\text{hr} = 90 \text{ nmol 이소프렌}/L_{\text{브로쓰}}/\text{hr} \text{ (배양 브로쓰 L 당 } 90 \text{ L}/\text{hr} \text{ 의 } O_2 \text{ 흐름 속도로)}$$

방정식 7

$$1 \text{ ug 이소프렌}/L_{\text{기체}} \text{ 방출-기체 내 이소프렌} = 60 \text{ ug 이소프렌}/L_{\text{브로쓰}}/\text{hr}, L_{\text{브로쓰}} \text{ 당 } 60 \text{ L}_{\text{기체}} \text{ 의 흐름 속도로 (1 vvm)}$$

[0242] 적정농도에 대한 단위 (총 및 특이적)

방정식 8

1 nmol 이소프렌/세포 단백질 mg = 150 nmol 이소프렌/L_{브로쓰}/OD₆₀₀ (이 전환율은 1의 OD₆₀₀ 값을 갖는 브로쓰 1 리터가 대략 150 mg의 총 세포 단백질을 갖는다는 것으로 추정한다) (특이적 생산성)

방정식 9

1 g 이소프렌/L_{브로쓰} = 14.7 mmol 이소프렌/L_{브로쓰} (총 적정농도)

[0247] 바람직한 경우, 방정식 10은 세포의 습윤 중량을 포함하는 임의의 단위를 세포의 건조 중량을 포함하는 상응하는 단위로 전환하기 위해 사용될 수 있다.

방정식 10

세포의 건조 중량 = (세포의 습윤 중량)/3.3

[0249] 바람직한 경우, 방정식 11은 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/L에서 ppm로의 전환 (예를 들어, 기체 g 당 분석물 ug)은 방출-기체 L 당 질량 (즉, 기체의 밀도)을 측정하여 수행될 수 있다. 예를 들어, STP에서의 공기 1 리터는 대략 1.2 g/L의 밀도를 갖는다. 그러므로, 1 ppm (ug/g)의 농도는 STP에서의 0.83 ug/L (방정식 11)과 동일하다. ppm (ug/g)에서 ug/L로의 전환은 압력, 온도, 및 방출-기체의 전체적인 조성 모두의 함수이다.

방정식 11

[0250] 1 ppm (ug/g)은 표준 온도 및 압력 (STP; 101.3 kPa (1 bar) 및 273.15K)에서의 0.83 ug/L와 동일하다.

[0251] ug/L에서 ppmv으로의 전환 (예를 들어, 기체 L당 분석물 uL)은 이상 기체 법칙 (방정식 12)을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 1000 ug/L_{기체}의 방출-기체 농도는 14.7 umol/L_{기체}에 상응한다. 이상 기체 상수는 0.082057 L.atm K⁻¹mol⁻¹이고, 방정식 12를 사용하여, STP에서 HG의 14.7 umol에 의해 점유된 부피는 0.329 mL이다. 그러므로, 1000 ug/L HG의 농도는 STP에서 329 ppmv 또는 0.0329% (v/v)이다.

방정식 12

[0252] PV = nRT, 식 중, "P"는 압력이고, "V"는 부피이고, "n"은 기체의 몰이고, "R"은 이상 기체 상수이고, "T"는 온도 (Kelvin)이다.

[0253] 이소프렌 조성물 내 불순물의 양은 전형적으로 본원에서 부피 당 중량 (w/v) 기반, 단위 예컨대 ug/L로 측정된다. 바람직한 경우, 단위 ug/L의 측정치는 방정식 13을 사용하는 mg/m³으로 전환될 수 있다.

방정식 13

[0254] 1 ug/L = 1 mg/m³

[0255] 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이종 핵산을 포함하는 세포는 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이종 핵산 없이 본질적으로 동일한 조건하에서 성장하는 상응하는 세포로부터 제조되는 이소프렌의 양보다 약 2배, 3배, 5배, 10배, 25배, 50배, 100배, 150배, 200배, 400배 이상의 이소프렌의 양을 제조한다.

[0256] 본 발명에 포함되는 일부 구현예에서, 이소프렌 합성효소 폴리펩티드를 코딩하는 이종 핵산 및 DKS, IDI, 및/또는 MVA 경로 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 이종 핵산을 포함하는 세포는 이종 핵산 없이 본질적으로 동일한 조건하에서 성장하는 세포로부터 제조되는 이소프렌의 양보다 약 2배, 3배, 5배, 10배, 25배, 50배, 100배, 150배, 200배, 400배 이상의 이소프렌의 양을 제조한다.

[0257] 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-부텐, 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-부텐, 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-부텐, 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-부텐, 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 알파아세틸렌, 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, 부탄-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-헵тен-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-시클로헵텐올파리딘, 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 ppm의 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 초과의 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 분획의 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 이종 핵산을 포함하는 세포는, 하나 이상의 이종 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 이종 핵산을 포함하는 세포는, 하나 이상의 이종 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 중류는 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 초과의 희석 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 액상으로의 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 액상으로의 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 중류 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 방식으로도 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, 특히 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 연관하여 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

I. E. 콜라이 내 kudzu 이소프렌 합성효소의 발현용 벡터의 구축

kudzu (푸에라리아 몬타나 (*Pueraria montana*)) 이소프렌 합성효소 유전자 (*IspS*)에 대한 단백질 서열을 GenBank (AAQ84170)로부터 수득하였다. E. 콜라이 코돈 용법에 대해 최적화된 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 DNA2.0 (SEQ ID NO: 1)에서 구입하였다. *Bsp*LU11I/*Pst*I로의 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 공급된 플라스미드로부터 이소프렌 합성효소 유전자를 제거하고, 젤-정제하고, *Nco*I/*Pst*I으로 소화된 *pTrcHis2B* (Invitrogen) 내에 라이게이션하였다. *Pst*I 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).

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'-CGTGAGATCATATGTGCGACCTCTCAATTAC (SEQ ID NO:3) 및 *pET-His-Kudzu-R*: 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:4)를 사용하여 PCR에 의해 *pTrcKudzu*로부터 증폭시켰다. 상기 프라이머에 유전자의 5'-말단에 *Nde*I 부위 및 3' 말단에 *Bam*H1 부위를 각각 첨가하였다. 상기 기재된 플라스미드 *pTrcKudzu*를 주형 DNA로서 사용하였고, 헤르쿨라아제 (Herculase) 폴리머라아제 (Stratagene)를 제조자의 지침에 따라 사용하였고, 프라이머를 10 pMol의 농도로 첨가하였다. PCR을 총 부피 25 μ l에서 수행하였다. PCR 생성물을 *Nde*I/*Bam*H1으로 소화하고, 동일한 효소로 소화된 *pET16b* 내로 클로닝하였다. 라이게이션 믹스를 *E. coli* 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 *Hind*III 부위 및 *E. coli* 일치 RBS를 5' 말단에 첨가하였다. *Pst*I 클로닝 부위는 *pTrcKudzu* 내 정지 코돈의 바로 3'에 이미 존재하여, 최종 PCR 생성물에 *Pst*I 부위가 포함되도록 역방향 프라이머를 구축하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같다: *Hind*III-rbs-Kudzu F: 5'-CATATGAAAGCTTGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAAC (SEQ ID NO:6) 및 *Bam*H1-Kudzu R:

5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID NO:4). PCR 생성물을 10 pmol의 농도의 프라이머 및 1 ng의 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 *Hind*III 및 *Pst*I으로 소화시키고, *Hind*III 및 *Pst*I로 소화되었던 *pCL1920* 내로 라이게이션하였다. 라이게이션 믹스를 *E. coli* Top 10 내로 형질전환시켰다. 여러 개의 형질전환체를 서열분석에 의해 확인하였다. 수득된 플라스미드를 *pCL-lac-Kudzu* (도 6 및 7)로 지정하였다.

II. 이소프렌 제조의 측정

[0287] 진탕 플라스크 배양을 위해, 1 ml의 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 rpm에서 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 × 0.25 mm; 0.25 μ m 필름 두께)를 분석물 분리를 위해 사용하였다. 샘플러를 500 μ l의 상부공간 기체를 주입하는 것으로 설정하였다.

GC/MS 방법은 운반 기체로서 헬륨을 1 ml/분의 속도로 이용하였다. 주입 포트를 50:1 의 분열비로 250°C 에서 유지하였다. 오븐 온도를 분석 2 분 기간 동안 37°C 로 유지하였다. Agilent 5793N 질량 선택적 검출기를 m/z 67 상의 단일 이온 모니터링 (SIM) 방식으로 실행시켰다. 검출기를 1.4에서 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. coli 세포를 함유하는 진탕 플라스크 내 이소프렌의 제조

[0291] [0291] 상기 기재된 벡터를 E. coli 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 퍼뜨리고, 37°C 에서 밤새 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 20 ml 루리아 베르타니 (Luria Bertani) 브로쓰 (LB) 및 카르베니실린 (100 µg/ml) 을 함유하는 250 ml 배풀 (baffled) 진탕 플라스크 내에 인큐베이션하였다. 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 20°C 에서 밤새 성장시켰다. 밤샘 배양물의 OD₆₀₀ 을 측정하고, 배양물을 30 ml MagicMedia (Invitrogen) + 카르베니실린 (100 µg/ml) 을 함유하는 250 ml 배풀 진탕 플라스크에 OD₆₀₀ ~ 0.05 으로 희석하였다. 배양물을 200 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 인큐ベ이션하였다. OD₆₀₀ 가 약 0.5 ~ 0.8 일 때, 400 µM IPTG 를 첨가하고, 세포를 200 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 추가 6 시간 동안 인큐베이션하였다. IPTG 로의 인큐베이션 0, 2, 4 및 6 시간 후에, 배양물 1 ml 분취액을 수집하고, OD₆₀₀ 을 측정하고, 제조된 이소프렌의 양을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과를 도 8 에 제시한다.

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

[0293] [0293] 재조합 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 함유하는 E. coli로부터의 이소프렌의 대규모 제조를 공급-배치식 배양물로부터 측정하였다. 발효 배지 1 리터 당 발효 배지 (TM2) 에 대한 구성은 다음과 같았다: K₂HPO₄ 13.6 g, KH₂PO₄ 13.6 g, MgSO₄ * 7H₂O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, (NH₄)₂SO₄ 3.2 g, 효모 추출물 5 g, 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH₂O 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 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 µ 필터로 필터 멸균하였다.

[0294] [0294] 바람직한 발효, pH 6.7 및 온도 34°C 에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 14 L 생물반응 기에서 상기 실험을 수행하였다. 동결 바이알로부터 취해진 E. coli 균주 BL21/pTrcKudzu 의 접종물을 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지에서 제조하였다. 접종물을 OD₅₅₀ = 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. coli 내 이소프렌의 제조

[0296] [0296] poplar (포폴러스 알바 x 포폴러스 트레му라 (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. coli에 대해 최적화된 코돈인 유전자를 DNA2.0 로부터 구입하였다 (p9796-poplar, 도 30 및 31). BspLU11I/PstI 로의 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 공급된 플라스미드로부터 이소프렌 합성효소 유전자를 제거하고, 젤-정제하고, NcoI/PstI 으로 소화된 pTrcHis2B 내로 라이제이션하였다. 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 (*Panteoa citrea*) 내 이소프렌의 제조

조

- [0298] 실시예 1 에 기재된 pTrcKudzu 및 pCL-lac Kudzu 플라스미드를 P. 시트레아 내로 전기천공시켰다 (미국 특허 번호 7,241,587). 형질전환체를 카르베니실린 ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 스페티노마이신 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 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'- GACATCAATTGCTCCATTCTCTGCTATC (SEQ ID NO:58)
- [0306] CF 07-43 (-) Kudzu ispS 에 대해 aprE 프로모터를 융합함
- [0307] 5'- ATTGAGAAGAGGTGCACACACTCTTACCCCTCTCCTTTA (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'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGCGACCTCTCAAT (SEQ ID NO:60)
- [0312] CF 07-45 (-) 터미네이터에 대해 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 3' 말단을 융합함
- [0313] 5'- CCAAGGCCGGTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAAC (SEQ ID NO:61)
- [0314] c) 전사 터미네이터의 증폭
- [0315] 바실러스 아밀리퀴파시엔스의 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'- GATTAACCAGCTGATGTATGTCTAAAAAAACCGGCCTGG (SEQ ID NO:62)
- [0318] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀴파시엔스 터미네이터의 말단 (BamH1)
- [0319] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0320] kudzu 분절을 하기 프라이머로의 PCR 을 사용하여 터미네이터 분절에 융합시켰다:
- [0321] CF 07-42 (+) kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 대해 aprE 프로모터를 융합함 (GTG 출발 코돈)
- [0322] 5'- TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGCGACCTCTCAAT (SEQ ID NO:61)
- [0323] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀴파시엔스 터미네이터의 말단 (BamH1)
- [0324] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0325] kudzu-터미네이터 분절을 하기 프라이머로의 PCR 을 사용하여 프로모터 분절에 융합시켰다:

- [0326] CF 797 (+) aprE 프로모터 MfeI 를 출발함
- [0327] 5'- GACATCAATTGCTCCATTTCCTCTGCTATC (SEQ ID NO:64)
- [0328] CF 07-46 (-) B. 아밀리케파시엔스 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 라이케이션하였다.
- [0331] 라이케이션 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 프라이머로의 서열분석을 위해 보냈다:
- [0332] CF 149 (+) aprE 프로모터의 EcoRI 출발
- [0333] 5'- GACATGAATTCCCTCCATTTCCTCTGC (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'- CCAAGGCCGGTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAAC (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'- GGCATAATGGTCCAACAACAAAATTATC (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 딴 다음, OD₆₀₀ 이 1.5 에 도달할 때까지 LB+5 클로르암페니콜에서 성장시켰다. 이것을 글리세롤의 존재하에, -80°C 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°C 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 K₂HPO₄, 75 g 글루코오스, 3.6 g 우레아, 100 ml 10 × MOPS, 1 L 까지 H₂O 충분량, pH 7.2 이었고; 10× MOPS 구성은 83.72 g MOPS, 7.17 g 트리신, 12 g KOH 펠렛, 10 ml 0.276M K₂SO₄ 용액, 10 ml 0.528M MgCl₂ 용액, 29.22 g NaCl, 100 ml 100× 미량영양소, 1 L 까지 H₂O 충분량이었고; 100× 미량영양소 구성은 1.47 g CaCl₂*2H₂O, 0.4 g FeSO₄*7H₂O, 0.1 g MnSO₄*H₂O, 0.1 g ZnSO₄*H₂O, 0.05 g CuCl₂*2H₂O, 0.1 g CoCl₂*6H₂O, 0.1 g Na₂MoO₄*2H₂O, 1 L 까지 H₂O 충분량이었다. 진탕 플라스크를 37°C 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 실시 예 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 펩티나아제를 포함하는 효소의 혼합물을 사용하여 90 분 동안 불린다 (참조, WO95/04134). 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. 배지 중의 글루코오스가 검출되지 않을 때 공급을 시작하였다. 공급 속도를 여러 시간에 걸쳐 높이고, 동일한 탄소 기재의 오일을 첨가하여 조절하였다. 28% w/v 수산화암모늄을 사용하여 pH 를 6.8 - 7.4 로 조절하였다. 거품이 발생하는 경우, 소포체를 배지에 첨가하였다. 발효 온도를 37°C 에서 조절하고, 발효 배양물을 750 rpm 으로 진탕하였다. pH, D0%, 기류, 및 압력과 같은 다양한 기타 파라미터를 전체 공정 동안 모니터링하였다. D0% 를 20 초파로 유지한다. 샘플을 36 시간의 시간 과정에 걸쳐 채취하고, 세포 성장 (OD₅₅₀) 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

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

[0349] 실시예 5: 트리코데르마 내 이소프렌의 제조

[0350] I. 트리코데르마 레에세이 내 kudzu 이소프렌 합성효소의 발현용 백터의 구축

야로이야 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 μl 중에, 1 μl 플라스미드 주형 (20 ng/μl), 1 μl 프라이머 EL-945 (10 uM) 5'-GCTTATGGATCCTCTAGACTATTACACGTACATCAATTGG (SEQ ID NO:9), 1 μl 프라이머 EL-965 (10 uM) 5'-CACCATGTGTGCAACCTCCCTCCAGTTAC (SEQ ID NO:10), 1 μl dNTP (10 mM), 5 μl 10× PfuUltra II 용합 HS DNA 폴리미라아제 완충액, 1 μl PfuUltra II 용합 HS DNA 폴리미라아제, 40 μl 물. 정방향 프라이머에는 *Y. 리폴라이티카* 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 상응하지 않으나, pENTR/D-TOPO 백터 내의 클로닝에 필요한 5'-말단에 부가적인 4 개의 뉴클레오티드가 함유되어 있다. 역방향 프라이머에는 *Y. 리폴라이티카* 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자에 상응하지 않으나, 다른 백터 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-겔 상에서 분석하여, *Y. 리폴라이티카* 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 성공적인 증폭을 확인하였다.

그 다음 PCR 생성물을 하기 제조자의 프로토콜에 따라 TOPO pENTR/D-TOPO Cloning Kit 를 사용하여 클로닝하였다: 총 반응 용액 6 μl 중에, 1 μl PCR 반응물, 1 μl 염 용액, 1 μl TOPO pENTR/D-TOPO 백터 및 3 μl 물. 반응을 실온에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 1 μl 의 TOPO 반응물을 TOP10 화학적으로 수용능이 된 *E. coli* 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 LA + 50 μg/ml 카나마이신 플레이트 상에서 선별하였다. 여러 개의 콜로니를 집어내고, 각각을 LB + 50 μg/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.

Y. 리폴라이티카 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 코딩하는 단일 pENTR/D-TOPO 플라스미드를, 주문 제작된 pTrex3g 백터 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 μl *Y. 리폴라이티카* 코돈-최적화 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자 pENTR/D-TOP0 공여체 백터, 1 μl pTrex3g 목적지 백터, 6 μl TE 완충액, pH 8.0 (총 반응 부피 8 μl). 반응을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션시킨 다음 1 μl 트로테이나아제 K 용액을 첨가하고, 인큐베이션을 37°C 에서 10 분 동안 계속하였다. 그 다음, 1 μl 의 반응물을 TOP10 화학적으로 수용능이 된 *E. coli* 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 LA + 50 μg/ml 카르베니실린 플레이트 상에서 선별하였다. 여러 개의 콜로니를 집어내고,

각각을 LB + 50 µg/ml 카르베니실린을 함유하는 5 ml 투브 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 투브로부터 플라스미드를 단리하였다. 여러 개의 플라스미드를 서열분석하여 DNA 서열이 올바른지를 입증하였다.

[0354] 4 개의 (quad) 결절 트리코데르마 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 단리 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. 이 소프렌의 양은 14 시간 인큐베이션에 의해 증가될 수 있었다. 2 개의 양성 샘플은 14 시간 인큐베이션 동안 약 0.5 µg/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: 야로이야 내 이소프렌의 제조

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

[0359] 야로이야 리폴라이티카 내 kudzu 이소프렌 합성효소 유전자의 발현용 벡터의 구축을 위한 시작점은 벡터 pSPZ1(MAP29Spb) 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' - GGTGAATTCACTACTGGGGATTCCAAATCTATATACTGCAGGTGAC

[0363] (SEQ ID NO:69)

[0364] ICL1 5

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

[0366] XPR 3

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

[0368] XPR 5

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

[0370] XPRT3

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

[0372] XPRT 5

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

[0374] Y18S3

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

[0376] Y18S 5

- [0377] 5'- GGTGGGCCATTAAATCAGTTATCGTTATTTGATAG (SEQ ID NO:76)
- [0378] YURA3
- [0379] 5'- GGTGACCAGCAAGTCCATGGGTGGTTGATCATGG (SEQ ID NO:77)
- [0380] YURA 50
- [0381] 5'- GGTGCGGCCGCTTGGAGTACGACTCCAATATG (SEQ ID NO:78)
- [0382] YURA 51
- [0383] 5'- GCGGCCGCAGACTAAATTATTCAGTCTCC (SEQ ID NO:79)
- [0384] PCR 증폭을 위해, PfuUltraII 폴리미라아제 (Stratagene), 공급처에서 제공된 완충액 및 dNTPs, 2.5 μM 프라이며 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] 야로이야 내의 발현을 위해 코돈-최적화된, kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 코딩하는 합성 DNA 분자를 DNA 2.0로부터 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 (포풀러스 알바 x 포풀러스 트레몰라 (*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, 우리단 영양요구성을 위해 표준 리튬 아세테이트/폴리에틸렌 글리콜 절차에 의해 균주 Y. 리폴라이티카 CLIB 122 를 형질전환시키는데 사용하였다. 간략하게는, 밤새 YEPD (1% 효모 추출물, 2% 웨톤, 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 혼탁시켰다. 세포 혼탁액의 200 μl 분취액을 선형화된 플라스미드 DNA 용액 (10-20 μg) 과 혼합하고, 10 분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 샘플 완충액 내 1 ml 의 50% PEG 4000 과 혼합하였다. 혼탁액을 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% 웨톤, 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 μg/L 내지 1 μg/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

pTrcKudzu 의 bla 유전자 (실시예 1에 기재됨) 를 카나마이신 내성을 부여하는 유전자로 대체하였다. bla 유전자를 제거하기 위해, pTrcKudzu 를 BspHI 로 소화시키고, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 로 처리하고, 65°C에서 가열 치사시킨 다음, Klenow 분절 및 dNTP로 말단을 채웠다. 5 kbp 큰 분절을 아가로 오스 젤로부터 정제하고, 프라이머 MCM22 5'- GATCAAGCTAACCGGAATTGCCAGCTG (SEQ ID NO: 14) 및 MCM23 5'- GATCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC (SEQ ID NO: 15) 를 사용하여 pCR-Blunt-II-TOPO로부터 PCR 증폭된 kan^r 유전자에 라이케이션시키고, 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

pTrcKudzuKan 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 젤 정제하였다. 이것을 합성 RBS 를 가진 S. 세레비지아에로부터 idi 를 코딩하는 PCR 생성물에 라이케이션하였다. PCR에 대한 프라이머는 NsiI-YIDI 1 F 5'- CATCAATGCATGCCCTTAGGAGGTAAAAAAAATGAC (SEQ ID NO: 16) 및 PstI-YIDI 1 R 5'- CCTTCTGCAGGACCGTTATAGC (SEQ ID NO: 17) 이었고; 주형은 S. 세레비지아에 게놈 DNA 였다. PCR 생성물을 NsiI 및 PstI 로 소화시키고, 라이케이션 전에 젤 정제하였다. 라이케이션 혼합물을 화학적으로 수용능이 된 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 50 µg/ml 카나마이신을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 여러 개의 형질전환체를 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pTrcKudzu-yIDI(kan) 으로 불렀다 (도 34 및 35).

[0396] iii) pTrcKudzu Dxs Kan 의 구축

플라스미드 pTrcKudzuKan 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 젤 정제하였다. 이것을 합성 RBS 를 가진 E. 콜라이로부터 dxs 를 코딩하는 PCR 생성물에 라이케이션하였다. PCR에 대한 프라이머는 MCM 13 5'- GATCATGCATTGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTGATATTGCCAAAT 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, 라이케이션 전에 젤 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

pTrcKudzu-yIDI(kan) 을 PstI 으로 소화시키고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시키고, 젤 정제하였다. 이것을 NsiI 및 PstI 로 소화시킨 합성 RBS (프라이머 MCM13 5'- GATCATGCATTGCCCTTAGGAGGTAAAAAACATGAGTTTGATATTGCCAAAT 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 라이케이션하고, 젤 정제하였다. 최종 플라스미드를 pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) 으로 불렀다 (도 21 및 22).

[0400] v) pCL PtrcKudzu 의 구축

상기 실시예 1로부터의 프로모터, 구조적 유전자 및 터미네이터를 함유하는 DNA의 분절을 SspI 를 사용하여 pTrcKudzu로부터 소화시키고, 젤 정제하였다. 이것을 PvuII로 소화시킨 pCL1920에 라이케이션하고, SAP로 처리하고, 가열 치사시켰다. 수득되는 라이케이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA에서 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

NsiI-PstI 소화되고, 젤 정제된, 상기 IDI PCR 엠플리콘 형태 (ii) 를 PstI로 소화된 pCL PtrcKudzu 내로 라이케이션하고, SAP로 처리하고, 가열 치사시켰다. 라이케이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 스펙티노마이신 50 µg/ml 을 함유하는 LA에서 선별하였다. 여러 개의 클론을 단리하고, 서열분석하고, 수득된 플라스미드를 pCL PtrcKudzu yIDI로 불렀다 (도 42 및 43).

[0404] vii) pCL PtrcKudzu Dxs 의 구축

NsiI-PstI 소화되고, 젤 정제된, 상기 Dxs PCR 엠플리콘 형태 (iii) 를 PstI로 소화된 pCL PtrcKudzu (A3) 내

로 라이제이션하고, SAP 로 처리하고, 가열 치사시켰다. 라이제이션 혼합물을 TOP10 세포 내로 형질전환시 키고, 스펙티노마이신 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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(λ DE3) 의 배양물을 LB 카나마이신 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 성장시켰다. pCL PtrcKudzu (E), pCL PtrcKudzu, pCL PtrcKudzu-yIDI (F) 및 pCL PtrcKudzu-DXS (G) 의 배양물을 LB 스펙티노마이신 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 성장시켰다. 배양물을 시간 0 (OD_{600} 대략 0.5) 에서 400 μM 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°C 에서 카나마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 을 함유하는 LB 에서 밤새 성장시키고, 1% 글루코오스를 함유하는 TM3 (13.6 g K_2PO_4 , 13.6 g KH_2PO_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 조정됨 및 H_2O 충분량, 및 필터 살균됨) 의 진탕 플라스크에 접종하는데 사용하였다. OD_{600} 이 0.8 에 도달할 때까지, 플라스크를 30°C 에서 인큐베이션시킨 다음, 400 μM 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; 벼개스, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 접종에 사용하였다. 배양물을 25°C 에서 밤새 진탕하면서 인큐베이션하였다. 다음날, 밤샘 배양물을 25 mL 의 TM3 + 0.2% YE + 1% 공급원료에 OD_{600} 이 0.05 가 되도록 희석하였다. 공급원료는 옥수수 대, 벼개스, 또는 침엽수 펄프였다. 글루코오스를 양성 대조군으로서 사용하였고, 음성 대조군으로서 글루코오스가 사용되지 않았다. 배양물을 180 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 인큐베이션하였다. OD_{600} 가 ~0.8 에 도달할 때까지 배양물을 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 (λ DE3)/pTrcKudzu yIDI DXS (kan) 의 새롭게 형질전환된 세포 플레이트로부터의 단일 콜로니를 5 mL 의 LB + 카나마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 접종에 사용하였다. 배양물을 25°C 에서 밤새 진탕하면서 인큐베이션하였다. 다음날, 밤샘 배양물을 25 mL 의 TM3 + 0.2% YE + 1% 공급원료에 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°C 에서 성장시키고, 첫번째 샘플을 배양물의 OD_{600} 가 ~0.8-1.0 에 도달할 때 측정하였다 (0 시간). 배양물을 0, 1 및 3 시간에 실시예 1 과 같이 이소프렌 제조에 대해, 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°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 니게르 (*Aspergillus niger*)로부터의 Danisco 자일라나아제 제품), 및 72.65 ml 의 DI 물이 있는 500 ml 플라스크에 첨가하였다. 플라스크를 오비탈 쉐이커에 넣고, 50°C에서 96 시간 동안 인큐베이션하였다. 쉐이커로부터 1 개의 샘플을 취하고, HPLC 를 사용하여 분석하였다. 가수분해물에는 38.5 g/1 의 글루코오스, 21.8 g/1 의 자일로오스, 및 10.3 g/1 의 글루코오스 및/또는 자일로오스의 올리고머가 함유되어 있다.

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

발효를, 상기 기재된 pTrcKudzu yIDI DKS 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 DKS yIDI 의 500 L 발효 내 이소프렌의 제조

kudzu 이소프렌 합성효소, S. 세레비지아에 IDI, 및 E. 콜라이 DKS 혁산 (E. 콜라이 BL21 (λDE3) pTrc Kudzu dks yidi) 을 갖는 E. 콜라이 세포의 500 리터 발효를 이소프렌을 제조하기 위해 사용하였다. 이소프렌의 수준은 15 시간의 기간에 걸쳐 50 내지 300 µg/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

배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

K₂HPO₄ 7.5 g, MgSO₄ * 7H₂O 2 g, 구연산 1 수화물 2 g, 철 암모늄 시트레이트 0.3 g, 효모 추출물 0.5 g, 1000 × 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution) 1 ml. 모든 성분을 함께 첨가하고, diH₂O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 암모니아 기체 (NH₃) 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.

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

구연산 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 µ 필터로 필터 멸균하였다.

발효를, pTrcKudzu yIDI DKS 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 500 L 생물반응기에서 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30°C에서 글루코오스 및 효모 추출물로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 수행하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주 접종물을 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지에 조제하였다. 접종물을 550 nm에서 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°C에서 OD 1.0 까지 성장시키고, 2.0 L 를 500 L 생물반응기로 옮겼다.

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 49A에 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 49C에 제시된다.

[0426] 실시예 8: kudzu 이소프렌 합성효소 및 재조합 메발론산 경로 유전자를 발현하는 E. 콜라이 내 이소프렌의 제조

[0427] I. 하위 MVA 경로 클로닝

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 Blunt II 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.

S. 세레비지아에 S288C로부터의 염색체 DNA를 ATCC (ATCC 204508D)로부터 입수하였다. 제조자의 지침대로 PfuTurbo를 사용하고 프라이머 MVKF (5'-AGGAGGTAAAAAAACATGTCAATTACCGTTCTAACCTCTGC, SEQ ID NO:21) 및 MVK-PstI-R (5'-ATGGCTGCAGGCCATCGAAATTAGCTTATGAAGTCCATGGTAAATTCTGTG, SEQ ID NO:22)을 사용하여 S. 세레비지아에의 염색체로부터 MVK 유전자를 증폭시켰다. 올바른 크기의 PCR 생성물 (1370 bp)을 1.2% E-겔 (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 라이케이션하였다. 수득된 플라스미드를 pTrcMVK1이라고 불렀다.

메발론산 생합성 경로 내의 제 2 유전자 PMK를 프라이머: PstI-PMK1 R (5'-GAATTCGCCCTCTGCAGCTACC, SEQ ID NO:23) 및 BsiHKA I-PMK1 F (5'-CGACTGGTGACCCCTAAGGAGGAAAAACATGTCAG, 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 BsiHKA로 소화시키고, PstI로 소화된 pTrcMVK1 내로 라이케이션시켰다. 수득된 플라스미드를 pTrcKK라고 불렀다. MVD 및 idi 유전자를 동일한 방식으로 클로닝하였다. 프라이머 쌍 PstI-MVD 1 R (5'-GTGCTGGAATTGCCCTCTGCAGC, SEQ ID NO:25) 및 NsiI-MVD 1 F (5'-GTAGATGCAGATTGCCCTTAAGGAGG, SEQ ID NO:26)을 사용하여 PCR을 수행하여 MVD 유전자를 증폭시키고, PstI-YIDI 1 R (5'-CCTTCTGCAGGACCGCTGTATAGC, SEQ ID NO:27) 및 NsiI-YIDI 1 F (5'-CATCAATGCATGCCCTTAGGAGGTAAAAAAATGAC, 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'- GTGTGATGGATATCTGCAGAATTG, SEQ ID NO:29) 및 NsiI-CIDI 1 F (5'- CATCAATGCATGCCCTTAGGAGGTAAAAAAATG, 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 pKKDlc라고 불렀다. 플라스미드를 후속 분석을 위해 E. 콜라이 숙주 BL21내로 형질전환하였다. 일부 경우에서 kudzu로부터의 이소프렌 합성효소를 pKKDIy내로 클로닝하여, 플라스미드 pKKDIyIS를 산출하였다.

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-겔 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-겔로부터 벡터를 함유하는 3338 bp 분절을 정제하였다. 3338 bp 벡터 분절 및 5930 bp 하위 MVA 경로 분절을 Roche Quick Ligation 키트를 사용하여 라이케이션하였다. 라이케이션 믹스를 E. 콜라이 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 카나마이신 (50 µg/ml)을 함유하는 LA상에서 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 유전자, 프라이머 MCM50 5'-GATCATGCATTGCCCTAGGAGGTAAAAACATGTGTGACCTCTCAATTACT (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 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 을 함유하는 LA 상에서 선별하여 밤새 37°C 에서 인큐베이션하였다. 분절의 올바른 삽입을 서열분석에 의해 입증하였고, 상기 균주를 MCM93 으로 지정하였다.

[0434] 균주 MCM93 으로부터의 플라스미드를 제한 엔도뉴클레아제 *Nsi*I 및 *Pst*I 로 소화시켜, RBS 및 kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 1724 bp 삽입체를 방출시켰다. 1724 bp 분절을 1.2% 아가로오스 E-겔 상에서 분리하고, 제조자의 지침에 따라 Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 정제하였다. 플라스미드 pTrcKanKKDiy 를 제한 엔도뉴클레아제 *Pst*I 로 소화시키고, SAP 로 30 분 동안 37°C 에서 처리하고, Qiagen PCR 클린업 (cleanup) 키트를 사용하여 정제하였다. DNA 분절을 코딩하는 플라스미드 및 kudzu 이소프렌 합성효소를 Roche Quick Ligation 키트를 사용하여 라이케이션하였다. 라이케이션 믹스를 E. 콜라이 TOP10 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 카나마이신을 함유하는 LA 상에서 선별하여 37°C 에서 밤새 성장시켰다. 올바른 형질전환체를 제한 소화에 의해 입증하고, 플라스미드를 pTrcKKDyIkISkan 이라고 지정하였다 (도 24 및 25). 상기 플라스미드를 BL21(λDE3) 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/pTrcKKDyIkISkan 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 OD₆₀₀ 이 0.3 내지 0.5 에 도달할 때 500 μM IPTG 로 유도하였다. 배양물을 250 rpm 으로 진탕하면서 30°C 에서 성장시켰다. 이소프렌 제조를 실시에 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_{브로쓰} 는 브로쓰의 부피이고, 여기에는 세포의 부피 및 세포 배지의 부피가 모두 포함된다) 였다. 메발론산을 보충하지 않은 대조군 배양물은 측정가능한 이소프렌을 제조하지 않았다.

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 *Sac*I 의 출발

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

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

[0442] 5' -TTTATCAATCCAATTGTCATGTTTTTACCTCCTTATTGTTTCTTAAATC (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 용합함

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

[0446] CF 07-102 (-) mvaS 유전자 *Bgl*III 의 말단

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

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

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

- [0450] 5' -GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO:34)
- [0451] CF 07-102 (-) mvaS 유전자의 말단
- [0452] 5'-GACATGACATAGATCTTAGTTCGATAAGAACGAAACGGT (SEQ ID NO:37)
- [0453] 용합 PCR 분자를 Qiagen 키트를 사용하여 정제하고, 제한 효소 SacI 및 BgIII로 소화시켰다. 상기 소화된 DNA 분자를 Qiagen 키트를 사용하여 젤 정제하고, SacI 및 BgIII로 소화된 시판 벡터 pTrcHis2A 내로 라이케이션하고, 젤 정제하였다.
- [0454] 라이케이션 믹스를 E. 콜라이 Top 10 세포 내에 형질전환하고, 콜로니를 LA+50 µg/ml 카르베니실린 플레이트 상에서 선별하였다. 총 6 개의 콜로니를 선택하고, LB+50 µg/ml 카르베니실린에서 밤새 성장시키고, Qiagen 키트를 사용하여 플라스미드를 단리하였다. 플라스미드를 SacI 및 BgIII로 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' - ATGTTATTGTTCTTAAATCATTAAATAGC (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' - TTAGTTCGATAAGAACGAAACGGT (SEQ ID NO:41)
- [0463] CF 07-86 (+) mvaE 내 서열
- [0464] 5' - GAAATAGCCCCATTAGAAAGTATC (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' - GAAACCTACATCCAATCTTGCCC (SEQ ID NO:45)
- [0471] pTrcHis2AUppPathway#1 이라고 불리는 플라스미드를 서열분석에 의해 정정하고, 시판 E. 콜라이 균주 BL21 내로 형질전환시켰다. LA+ 50 µg/ml 카르베니실린 상에서 선별하였다. 2 개의 형질전환체를 선택하고, 이들의 OD₆₀₀ 이 1.5 에 도달할 때까지 LB+ 50 µg/ml 카르베니실린에서 성장시켰다. 글리세롤의 존재하에 -80 °C 의 바이알에서 모든 균주를 동결시켰다. 균주를 BL21 내 pTrcHis2AUppPathway#1에 대해서는 CF 449, 단리물 #1 및 BL21 내 pTrcHis2AUppPathway#1에 대해서는 CF 450, 단리물 #2로 지정하였다. 분석 시 모든 클론은 동일하게 행동하는 것으로 발견되었다.
- [0472] V. pCL1920 내로의 UpperMVA Pathway의 클로닝
- [0473] 플라스미드 pTrcHis2AUppPathway 를 제한 엔도뉴클레아제 SspI 으로 소화시켜, pTrc-mvaE-mvaS-(His 태그)-터미네이터를 함유하는 분자를 방출시켰다. 상기 분자를his-태그는 번역되지 않았다. 상기 뭉툭한 말단 4.5 kbp 분자를 Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 1.2% E-젤로부터 정제하였다. pCL1920 으로부터의 탈인산화된, 뭉툭한 말단 4.2 kbp 분자를, 벡터를 제한 엔도뉴클레아제 PvuII로 소화시키고, SAP로 처리하고, Qiagen Gel Purification 키트를 사용하여 1.2% E-젤로부터 젤 정제함으로써 제조하였다. Roche Quick Ligation Kit 를 사용하여 2 개의 분자를 라이케이션하고, TOP10 화학적으로 수용능이 된 세포 내에 형질전환시켰다. 형질전환체를 스펙티노마이신 (50 µg/ml) 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. PCR에 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(λDE3) 수용능 세포 (Invitrogen) 내에 형질전환시키고, 형질전환체를 카나마이신 (50 µg/ml) 및 스펙티노마이신 (50 µg/ml) 을 함유하는 LA 상에서 선별하였다. 모든 플라스미드가 숙주 내에 유지되었는지를 확인하기 위해 형질전환체를 플라스미드 프렙에 의해 체크하였다. 균주를 MCM 127로 지정하였다.

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

[0477] BL21/pTrcHis2A-mvaE/mvaS 또는 FM5/p TrcHis2A-mvaE/mvaS 의 단일 콜로니를 LB + 카르베니실린 (100 µg/ml) 내에 접종하고, 200 rpm 으로 진탕하면서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 상기 배양물을 250 ml 배플 플라스크 내의 50 ml 배지 내에 OD₆₀₀ 이 0.1 이 되도록 희석하였다. 배지는 TM3 + 1 또는 2% 글루코오스 + 카르베니실린 (100 µg/ml) 또는 TM3 + 1% 글루코오스 + 가수분해된 대두 오일 + 카르베니실린 (100 µg/ml) 또는 TM3 + 바이오매스 (조제된 버개스, 옥수수 대 또는 지팡이풀) 이었다. 배양물을 OD₆₀₀ 0.4 에 도달할 때까지 대략 2-3 시간 동안 200 rpm 으로 진탕하면서 30°C에서 성장시켰다. 이 시점에, mvaE mvaS 구축물로부터의 발현을 IPTG (400 µM) 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, OD₆₀₀ 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 BL21로부터의 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 7에 기재된 이소프렌 합성효소 유전자의 다양한 조합으로의 형질전환에 의해 제작하였다. 사용된 숙주 세포는 화학적으로 수용능이 된 BL21(λDE3) 이었고, 형질전환을 표준 방법에 의해 수행하였다. 형질전환체를 카나마이신 (50 µg/ml) 또는 카나마이신 + 스펙티노마이신 (모두 농도는 50 µg/ml 임) 을 함유하는 L 아гар 상에서 선별하였다. 플레이트를 37°C에서 성장시켰다. 수득된 균주를 하기와 같이 지정하였다:

[0481] 카나마이신 + 스펙티노마이신 (각각 50 µg/ml) 상에서 성장함

[0482] MCM127 - BL21(λDE3) 내 pCL Upper MVA + pTrcKKDyIkIS (kan)

[0483] MCM131 - BL21(λDE3) 내 pCL1920 + pTrcKKDyIkIS (kan)

[0484] MCM125 - BL21(λDE3) 내 pCL Upper MVA + pTrcHis2B (kan)

[0485] 카나마이신 (50 µg/ml) 상에서 성장함

[0486] MCM64 - BL21(λDE3) 내 pTrcKudzu yIDI DXS (kan)

[0487] MCM50 - BL21(λDE3) 내 pTrcKudzu (kan)

[0488] MCM123 - BL21(λDE3) 내 pTrcKudzu yIDI DXS DXR (kan)

[0489] 상기 균주를 동결 저장액으로부터 LA + 적합한 항생제에 스트리킹하고, 37°C에서 밤새 성장시켰다. 각 플레이트로부터 단일 콜로니를 진탕 플라스크 (25 ml LB + 적합한 항생제)에 접종하는데 사용하였다. 플라스크를 200 rpm 으로 진탕하면서 밤새 22°C에서 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 OD₆₀₀ 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°C 에서 인큐베이션하였다. 1 세트의 배양물을 1.50 시간 (샘플링 시점 1 후 즉시) 후에 유도하였다. 각 샘플링 시점에, OD₆₀₀ 을 측정하고, 이소프렌의 양을 실시에 1 에 기재된 바와 같이 측정하였다.

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

[0490] 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.

[0491] IX. 메발론산의 분석

[0492] 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 ¹H 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 H₂O 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.

[0493] X. 상위 MVA 경로 + kudzu 이소프렌 합성효소를 함유하는 E. 콜라이 BL21로부터의 이소프렌의 제조

[0494] 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.

[0495] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0496] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K₂HPo₄ 7.5 g, MgSO₄ * 7H₂O 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, diH₂O 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.

[0497] 1000× 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

[0498] 1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, 및 NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH 로 pH 를 3.0 으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0499] 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°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°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 소이톤-효모 추출물-글루코오스 배지 내로 접종하였다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0까지 성장한 후, 500 mL을 5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

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

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

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

[0503] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0504] 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 pH를 7.0로 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_2O 40 g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 g, NaCl 10 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 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/NaOH로 pH를 3.0으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

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

[0508] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. 59시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글루코오스의 총 양은 2.2 kg이었다. IPTG를 첨가하여 유도를 달성하였다. 550 nm에서의 광학 밀도 (OD_{550})가 10의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 uM로 하였다. OD_{550} 이 190에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 uM으로 상승시켰다.

시간에 따른 생물반응기 내 OD_{550} 프로파일을 도 93에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 3.0 g/L로 증가되었다 (도 94). 59시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 22.8 g이었고, 제조 시간 과정은 도 95에 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. coli로부터

의 이소프렌 발효

- [0510] 메발론산 경로 폴리펩티드, 푸에라리아 로바타 (*Pueraria lobata*) 이소프렌 합성효소, 및 Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 *E. coli*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) pCLP_{trc}UpperPathwayHGS2 의 구축
- [0512] 푸에라리아 로바타 (*Pueraria lobata*)로부터 이소프렌 합성효소를 코딩하는 유전자를 브라이머 NsiI-RBS-HGS F (CTTGATGCATCCTGCATTGCCCTAGGAGG, SEQ ID NO:88) 및 pTrcR (CCAGGCAAATTCTGTTTATCG, SEQ ID NO:89), 및 pTrcKKDyIkIS를 주형으로서 사용하여 PCR 증폭시켰다. 그렇게 수득된 PCR 생성물을 NsiI 및 PstI로 제한 소화시키고, 젤 정제하였다. 플라스미드 pCL P_{trc}UpperPathway를 PstI로 제한 소화시키고, 제조자의 지침에 따라 rAPid 알칼리 포스파타아제 (Roche)를 사용하여 탈인산화시켰다.
- [0513] 상기 DNA 분절을 함께 라이케이션하고, 라이케이션 반응물을 *E. coli* Top 10 화학적으로 수용능이 된 세포 (Invitrogen) 내로 형질전환시키고, 스페티노마이신 (50 ug/ml)을 함유하는 L 아가 상에 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플라스미드 DNA를 Qiaquick Spin Mini-prep 키트를 사용하여 6 개의 클론으로부터 제조하였다. 플라스미드 DNA를 제한 효소 EcoRV 및 MluI으로 소화시켜 삽입물이 오른쪽 방향을 갖는 클론을 확인하였다 (즉, pTrc 프로모터와 동일한 방향의 유전자).
- [0514] 수득된 올바른 플라스미드를 pCLP_{trc}UpperPathwayHGS2로 지정하였다. 상기 플라스미드를 본원에 기재된 상부공간 어세이를 사용하여 어세이하고, *E. coli* Top 10 내 이소프렌을 제조하였음을 발견하여, 유전자의 기능성을 입증하였다. 플라스미드를 pTrcKKDyIkIS를 함유하는 BL21(LDE3) 내로 형질전환시켜, 균주 BL21/pCLP_{trc}UpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS를 산출하였다. 상기 균주는 BL21/pCL P_{trc}UpperMVA 및 pTrc KKDDyIkIS 균주와 비교하여 이소프렌 합성효소의 추가 카페를 갖는다 (실시예 8, 파트 XI). 상기 균주는 또한 실시예 8, 파트 XI에서 사용된 BL21/pCL P_{trc}UpperMVA 및 pTrc KKDDyIkIS 균주와 비교해 HMGS의 발현 및 활성이 증가하였다.
- [0515] ii) 15 L 규모의 공급-배치식 배양물에서 성장하고 pCLP_{trc}UpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS를 발현하는 *E. coli*로부터의 이소프렌 발효
- [0516] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):
- [0517] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K₂HPO₄ 7.5 g, MgSO₄ * 7H₂O 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, diH₂O에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 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 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, 및 NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O에 한번에 용해하고, HCl/NaOH로 pH를 3.0으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.
- [0520] pCLP_{trc}UpperPathwayHGS2 및 pTrc KKDDyIkIS 플라스미드를 함유하는 BL21 (DE3) *E. coli* 세포로 15 L 생물반응기에서 발효를 수행하였다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30°C에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 *E. coli* 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0까지 성장한 후, 500 mL을 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_{550}) 가 9 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 uM 로 하였다. OD_{550} 이 170 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 uM 으로 상승시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD_{550} 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 (데이터는 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 테카르복실라아제, 및 IPP 이소미라아제를 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.

표 9. 프라이머

MCM78	통합 구축물을 위한 attTn7 업 역방향	gcatgctcgagcggccgc TTTTAATCAAACATCCTGC CAACTC (SEQ ID NO:91)
MCM79	통합 구축물을 위한 attTn7 다운 역방향	gatcgaaggcgatcg TGTCACAGTCTGGCGAAACC G (SEQ ID NO:92)
MCM88	통합 구축물을 위한 attTn7 업 정방향	ctgaattctgcagatatacTGTTTTCCACTCTTCGTTCA CTTT (SEQ ID NO:93)
MCM89	통합 구축물을 위한 attTn7 다운 정방향	tctagaggcccAAGAAAAATGCCCGCTTACG (SEQ ID NO:94)
MCM104	GI1.2 프로모터 – MVK	Gatcgccgcgcgccttgacatgccacatctgagcaaataat tcaaccactaattgtgacgcgataacacaaggaggaaacagctat gtcattaccgttttaacttc (SEQ ID NO:95)
MCM105	aspA 터미네이터 – yIDI	Gatcgccgcccaagaaaaaaaggcacgtcatgtacgtgccttttt atttgttagacgcgcgttgtatagcattcta (SEQ ID NO:96)
MCM120	attTn7 의 정방향 : attTn7 상동성, GB 마커 상동성	aaagtgcgaagatgacgggtgtcacatggagtggcaggatgt ttgattaaaagcAATTAAACCCCTCACTAAAGGGCGG (SEQ ID NO:97)
MCM127	1.2 GI 의 역방향 보완물 : GB 마커 상동성(예외적으로 긴), 프로모터 , RBS, ATG	AGAGTGTTCACCAAAAATAATAACCTTTCCCG GTGCAagaagttaagaacgcgtaatgacatagctgtttccctgt gttatccgtcacaattgtgttaatttgcctaggatgtggcatc gtcaaggcTAATACGACTCACTATAAGGGCTCG (SEQ ID NO:98)

[0526]

i) 표적 벡터 구축

[0527] 통합을 위해 attTn7 부위를 선택하였다. 상동성 상류방향 (attTn7 업) (프라이머 MCM78 및 MCM79) 및 하류방향 (attTn7 다운) (프라이머 MCM88 및 MCM89) 영역을 MG1655 세포로부터 PCR 에 의해 증폭시켰다. 1uL 10uM 프라이머, 3uL ddH₂O, 45uL Invitrogen Platinum PCR Supermix High Fidelity, 및 MG1655 의 스크랩한 콜로니를 함유하는 50 uL 반응물을 94°C 에서 2:00 동안 변성시키고, 25 회 (94°C 에서 2:00, 50°C 에서 0:30, 및 68°C 에서 1:00) 사이클에 적용하고, 72°C 에서 7:00 동안 확장시키고, 4°C 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.

[0528]

ii) 하위 경로 및 프로모터의 클로닝

[0529] 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°C에서의 변성, 0:20 동안 95°C, 0:20 동안 55°C, 2:00 동안 72°C의 5회 사이클, 0:20 동안 95°C, 0:20 동안 58°C, 2:00 동안 72°C, 10:00 동안 72°C의 25회 사이클 후, 4°C로의 냉각의 PCR 프로그램을 1uL ~10 ng/uL 주형, 1 uL 각 프라이머, 1.25 uL 10 mM dNTPs, 5 uL 10x 완충액, 1 uL 효소, 및 39.75 uL ddH₂O를 함유하는 4개의 50 uL PCR 반응에 사용하였다. 반응물을 수집하고, Qiagen PCR 클린업 컬럼으로 정제하고, 플라스미드 MCM296을 함유하는 블 세정된 Pir1 세포를 전기천공하기 위해 사용하였다. 2.5V 및 200 ohms에서 2 mM 큐벳 내에서 전기천공을 수행하였다. 30°C에서 3 hr 동안 LB에서 전기천공 반응을 회복시켰다. 형질전환체 MCM330을 CMP5, Kan50이 있는 LA상에서 선별하였다(도 107 및 108A-108C).

[0531] iii) E. 콜라이 염색체 내로의 통합

MCM330으로부터 미니프렙된 DNA(Qiaquick Spin 키트)를 SnaBI으로 소화시키고, GeneBridges 플라스미드 pRedET Carb을 함유하는 BL21(DE3)(Novagen) 또는 MG1655를 전기천공하는데 사용하였다. 세포를 30°C에서 ~OD1까지 성장시킨 다음, 0.4% L-아라비노오스로 37°C에서 1.5시간 동안 유도하였다. 상기 세포를 4°C ddH₂O로 3회 세정한 후, 2 uL의 DNA를 전기천공시켰다. 클로르암페니콜(5 ug/ml)을 함유하는 L아가상에서 통합체를 선별하고, 이어서 L아가 + 카나마이신(50 ug/ml)상에서 성장하지 않는다는 것을 확인하였다. BL21통합체 MCM331 및 MG1655통합체 MCM333을 동결시켰다.

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

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 CGACCTTTC TCAATTACT(SEQ ID NO:99) 및 MCM53 5'-CGGTCGACGG ATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG(SEQ ID NO: 100)을 사용하여 pTrcKudzu 주형DNA로부터 증폭시켰다. Taq DNA Polymerase(Invitrogen)를 사용하여 PCR반응을 수행하였고, 수득된 PCR반응물을 pCR2.1-TOP10 TA 클로닝 벡터(Invitrogen)내로 클로닝하고, E. 콜라이 Top 10화학적으로 수용능이 된 세포(Invitrogen)내로 형질전환시켰다. 카르베니실린(50 µg/ml)을 함유하는 L아가상에 형질전환체를 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 카르베니실린 50 µg/ml을 함유하는 5 ml Luria Broth 배양물을 단일 형질전환체로 접종하고, 밤새 37°C에서 성장시켰다. 5개의 콜로니를 1 ml의 액체 배양물(Luria Broth)로부터 단리된 플라스미드 DNA의 서열분석에 의해 올바른 삽입물에 대해 스크리닝하고, QIAprep Spin Mini-prep Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였다. MCM93으로 지정된 수득된 플라스미드는 pCR2.1 백본내에 kudzu 이소프렌 합성효소 코딩 서열을 함유한다.

[0535] kudzu 코딩 서열을 PciI 및 BamH1(Roche)로 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 제거하고, QIAquick Gel Extraction 키트(Qiagen)를 사용하여 젤 정제하였다. pET24d 벡터DNA를 NcoI 및 BamH1(Roche)로 소화시키고, 새우 알칼리 포스파타아제(Roche)로 처리하고, QIAprep Spin Mini-prep Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였다. kudzu 이소프렌 합성효소 분절을 Rapid DNA Ligation Kit(Roche)를 사용하여 NcoI/BamH1 소화된 pET24d로 5:1 분절 대 벡터비로 총 부피 20 µl에서 라이게이션시켰다. 라이게이션 혼합물 일부(5 µl)를 E. 콜라이 Top 10화학적으로 수용능이 된 세포내로 형질전환시키고, 카나마이신(50 µg/ml)을 함유하는 L아가상에 플레이팅시켰다. 올바른 형질전환체를 서열분석에 의해 확인하고, 화학적으로 수용능이 된 BL21(λDE3)pLysS세포(Novagen)내로 형질전환시켰다. 카나마이신(50 µg/ml)을 함유하는 L아가상에 37°C에서 밤새 성장시킨 후 단일 콜로니를 선별하였다. pET24D-Kudzu로서 지정된 수득된 플라스미드의 맵을 도 109에 제시한다. pET24D-Kudzu의 서열(SEQ ID NO: 101)을 도 110A 및 110B에 제시한다. 이 소프렌 합성효소 활성을 상부공간 어세이를 사용하여 확인하였다.

[0536] v) 제조 균주

균주 MCM331 및 MCM333을 플라스미드 pCLPptrupperpathway 및 pTrcKudzu 또는 pETKudzu으로 공동형질전환시켜, 표 10에 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]

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, $MgSO_4 * 7H_2O$ 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 침가하고, diH_2O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 * HCl 0.1 g, 및 항생제를 침가하였다.

[0543]

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

[0544]

1000× 개질 미량 금속 용액을 하기 성분을 사용하여 제조하였다: 구연산 * H_2O 40 g, $MnSO_4 * H_2O$ 30 g, NaCl 10 g, $FeSO_4 * 7H_2O$ 1 g, $CoCl_2 * 6H_2O$ 1 g, $ZnSO_4 * 7H_2O$ 1 g, $CuSO_4 * 5H_2O$ 100 mg, H_3BO_3 100 mg, 및 $NaMoO_4 * 2H_2O$ 100 mg. 각 성분을 diH_2O 에 한번에 용해하고, HCl/NaOH로 pH를 3.0으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 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°C에서 글루코오스로부터 이소프렌 형성을 모니터링 하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0 까지 성장한 후, 500 mL을 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. IPTG를 침가하여 유도를 달성하였다. 이산화탄소 증발 속도가 100 mmol/L/hr에 도달하였을 때 IPTG 농도를 100 μ M로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 프로파일을 도 111A에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다.

[0547]

이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 1.6 g/L로 증가되었다 (도 111B). 발효 과정 동안 이소프렌의 특이적 생산성은 도 111C에 제시되고, 1.2 mg/OD/hr에서 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 BL21로부터의 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/L의 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, $MgSO_4 * 7H_2O$ 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 침가하고, diH_2O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 * HCl 0.1 g, 및 항생제를 침가하였다.

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, diH₂O에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 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 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, 및 NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O에 한번에 용해하고, HCl/NaOH로 pH를 3.0으로 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°C에서 글리세롤로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 소이툰-효모 추출물-글루코오스 배지 내로 접종하고, 35°C에서 성장시켰다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0까지 성장한 후, 600 mL을 7.5 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0555] 세포가 550 nm에서의 광학 밀도 (OD₅₅₀)가 153에 도달할 때까지 글리세롤을 기하급수적 속도로 공급하였다.

36시간 발효 동안 생물반응기에 전달되는 글리세롤의 총 양은 1.7 kg이었다. 접종 물 내의 글루코오스 외에는, 생물반응기에 글루코오스를 추가하지 않았다. IPTG를 첨가하여 유도를 달성하였다. OD₅₅₀이 50의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 20 uM로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 프로파일을 도 57에 제시한다. 생물반응기로부터의 배출 기체 내 이소프렌 수준을 본원에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이소프렌 적정농도는 발효 과정 동안 최종 값 2.2 g/L로 증가되었다 (도 58). 54시간 발효 동안 제조되는 이소프렌의 총 양은 20.9 mg이었고, 제조 시간 과정은 도 59에 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/L의 이소프렌을 제조하였음을 증명한다.

[0558] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

[0559] 발효 배지 1 리터 당 하기 성분을 사용하여 배지를 제조하였다: K₂HPO₄ 7.5 g, MgSO₄ * 7H₂O 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, diH₂O에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 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 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, 및 NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O에 한번에 용해하고, HCl/NaOH로 pH를 3.0으로 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°C에서 전화당으로부터 이소프렌 형성을 모니터링하기 위해 실시하였다. 동결 바이알로부터 채취한 E. 콜라이 균주의 접종물을 LB 브로쓰 아가 플레이트 (항생제 있음) 상에 스트리킹하고 37°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립تون-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 OD 1.0까지 성장한 후, 500 mL을 5 L 생물반

응기애 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_{550}) 가 9 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 uM 로 하였다. OD_{550} 이 200 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 uM 로 증가시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD_{550} 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 제시 된다. 발효 동안 이소프렌 제조에 투입된 이용된 탄소의 몰 수율은 1.7% 였다. 글루코오스로부터의 이소프렌의 중량% 수율은 0.8% 였다.

실시예 9. 바실러스 서브틸리스 내로의 통합을 위한 상위 및 하위 MVA 경로의 구축

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 헤르큘라아제 폴리미라아제를 사용하여 실시한다.

1. PaprE

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

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

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

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

[0573] 주형: 바실러스 서브틸리스 염색체 DNA

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'- TTTATCAATCCAATTGTCATGTTTTACCTCCTTATTGTTTCTTAAATC

[0579] (SEQ ID NO:35)

[0580] 주형: 엔테로코쿠스 파에칼리스 염색체 DNA (ATCC로부터)

3. *mvaS*

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

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

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

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

[0586] 주형: 엔테로코쿠스 파에칼리스 염색체 DNA

- [0587] 4. B. 아밀리퀴파시엔스 알칼리 세린 프로테아제 터미네이터
- [0588] CF 07-123 (+) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0589] 5'- ACCGTTCGTTCTTATCGAAACTAAAAACCGGCCTGGCCCCG (SEQ ID NO:86)
- [0590] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀴파시엔스 터미네이터 BamH1 의 말단
- [0591] 5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID NO:63)
- [0592] 주형: 바실러스 아밀리퀴파시엔스 염색체 DNA
- [0593] PCR 융합 반응
- [0594] 5. mvaS 와 mvaE 를 융합시킴
- [0595] CF 07-93 (+) aprE 프로모터에 mvaE 를 융합시킴 (GTG 출발 코돈)
- [0596] 5'- TTAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID NO: 84)
- [0597] CF 07-124 (-) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0598] 5'- CGGGCCAAGGCCGGTTTTAGTTCGATAAGAACGAACGGT (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'- GACATCTGCAGCTCCATTTCCTCTGC (SEQ ID NO: 82)
- [0603] CF 07-124 (-) 터미네이터에 mvaS 의 말단을 융합시킴
- [0604] 5'- CGGGCCAAGGCCGGTTTTAGTTCGATAAGAACGAACGGT (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'- GACATCTGCAGCTCCATTTCCTCTGC (SEQ ID NO: 82)
- [0609] CF 07-46 (-) B. 아밀리퀴파시엔스 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 라이케이션시켰다 (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.).
라이케이션을 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, pJMUupperpathway2 (도 50 및 51) 로 지정한다. 정제된 플라스미드 DNA 를 바실러스 서브틸리스 aprEnprEPxy1-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 플레이팅하여, 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'- GACATCTGCAGCTCCATTCTTCTG (SEQ ID NO: 82)
- [0619] CF 07-58 (+) mvaE 유전자의 출발
- [0620] 5'- ATGAAAACAGTAGTTATTGATGC (SEQ ID NO:38)
- [0621] CF 07-59 (-) mvaE 유전자의 말단
- [0622] 5'- ATGTTATTGTTCTAAATCATTAAAATAGC (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'- TTAGTTTCGATAAGAACGACCGT (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'- GAAACCTACATCCAATCTTGCCC (SEQ ID NO:45)
- [0635] 형질전환체를 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 클로르암페니콜을 함유하는 LA 상에서 선별한다. 하나의 콜로니를 서열분석에 의해 올바른 통합을 갖는지를 확인하고, 수 일에 걸쳐 클로르암페니콜의 농도를 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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 comK로 지정한다 (클로르암페니콜 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 함유하는 LA 상에서 성장시키기 위해 증폭됨).
- [0636] II. 바실러스 서브틸리스 내 하위 MVA 경로의 구축
- [0637] 유전자 mvk1, pmk, mpd 및 idi로 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 DNA2.0에 의해 합성하고, aprE 유전자좌에 통합된 상위 MVA 경로를 함유하는 B. 서브틸리스의 염색체 내에 통합한다. kudzu 이소프렌 합성효소 유전자를 실시예 4에 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 이소마라아제, 및 Kudzu로부터의 이소프렌 합성효소를 코딩하는 2개의 플라스미드 (pCLupperMev; pTrcKKDyIkIS)를 함유하는 재조합 E. coli 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/MS에 의해 분석한다.
- [0641] 상부공간 분석을 Agilent HP-5MS GC/MS 컬럼 ($30 \text{ m} \times 250 \mu\text{m}$; $0.25 \mu\text{m}$ 필름 두께)에 장착된 Agilent 6890 GC/MS 시스템으로 수행하였다. 20 mL 상부공간 바이알로부터 500 μL 분취액을 샘플링하기 위해 combiPAL 자동주입기를 사용하였다. GC/MS 방법은 헬륨을 운반 기체로서 $1 \text{ mL}/\text{분}$ 의 흐름으로 이용하였다. 주입 포

트를 250°C에서 50:1의 분할 비로 유지하였다. 오븐 온도를 37°C에서 초기 2분 기간에서 유지한 후, 10분의 총 방법 시간 동안 25°C/분의 속도로 237°C로 증가시켰다. Agilent 5793N 질량 선택 검출기는 m/z 29에서 m/z 300으로 스캐닝하였다. 상기 시스템의 검출 한계는 대략 0.1 ug/L_{기체} 또는 대략 0.1 ppm이다.

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

[0642] 방출-기체는 99.925% (v/v) 영구 기체 (N_2 , CO_2 및 O_2), 대략 0.075% 이소프렌 (2-메틸-1,3-부타디엔) (~750 ppmv, 2100 $\mu g/L$) 및 소량 (<50 ppmv)의 에탄올, 아세톤, 및 2개의 C5 프레닐 알코올로 이루어졌다. 수증기의 양은 측정하지는 않았으나, 0°C에서의 평형 증기압과 동일한 것으로 추정되었다. 휘발성 유기 분획의 조성을 GC/MS 크로마토그램 내 피크 하면적의 적분 (도 86A 및 86B)에 의해 측정하고, 표 6에 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 이종 메발로네이트 경로, 효모로부터의 이소프레닐 피로포스페이트 이소미라아제, 및 Kudzu로부터의 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. coli BL21 (DE3) 균주를 사용하는 발효의 27.9시간 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. coli 균주의 발효 동안 이소프렌과 동시 제조되는 미량 휘발성 유기 화합물 (VOC)의 측정

[0645] 14 L 규모 발효를 이소프레노이드 전구체 생합성에 대한 전체 메발로네이트 경로, 효모로부터의 이소프레닐 피로포스페이트 이소미라아제, 및 Kudzu로부터의 이소프렌 합성효소를 코딩하는 2개의 플라스미드 (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS)를 함유하는 재조합 E. coli BL21 (DE3) 균주로 수행하였다.

[0646] 발효 방출-기체를 농축을 위해 냉각 상부공간 바이알을 통해 통과시키고, 미량의 휘발성 유기 성분을 확인하였다. 상기 발효로부터의 방출-기체를 석영솜 (2g)으로 패킹한 20 mL 상부공간 바이알을 통해 10분 동안 1L/분의 속도로 샘플링하고, 드라이 아이스로 -78°C로 냉각시켰다. 바이알을 새로운 비닐 캡으로 다시 캡을 씌우고, 실시에 10, 파트 I에 기재된 조건을 사용하여 트랩된 VOC에 대해 상부공간 GC/MS에 의해 분석하였다. 도 87A-87D에 관찰된 화합물의 비는 발효 방출-기체, -78°C에서의 상대적 증기압, 및 질량분석기의 검출기 반응의 전체적 수준의 조합이다. 예를 들어, 산화된 휘발물질 (예를 들어, 아세톤 및 에탄올)에 대한 이소프렌의 낮은 수준은 -78°C에서 상부공간 바이알에 축적되지 않는 정도의 상기 물질의 높은 휘발성의 작용이다.

[0647] 많은 상기 화합물의 존재는 생물학적 공급원으로부터 유도된 이소프렌 조성물에 독특한 것이다. 결과는 도 87A-87D에 묘사되어 있고, 표 7A 및 7B에 요약된다.

[0648] 표 7A: -78°C에서 저온-트랩핑 후 E. coli BL21 (DE3) (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS)에 의해 제조된 방출-기체 내 존재하는 미량 휘발물질.

화합물	RT (분)	GC 면적 ¹	면적% ²	비율 % ³
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-부타닐	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-헵타논	5.348	67224	0.081	0.67
2,5-디메틸파라진	5.591	58029	0.070	0.58
3-메틸-2-부트-1-에닐 아세테이트	5.676	1686507	2.031	16.84
6-메틸-5-헵тен-2-온	6.307	101797	0.123	1.02
2,4,5-트리메틸파리딘	6.39	68477	0.082	0.68
2,3,5-트리메틸파라진	6.485	30420	0.037	0.30
(E)-3,7-디메틸-1,3,6-옥타트리エン	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-시클로헵테놀파리딘	8.98	1119947	1.349	11.18

[0650]

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

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

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

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

화합물	RT (분)	GC 면적 ¹	면적 % ²	비율 % ³
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-부태날	4.152	585690	0.097	0.12
부틸 아세테이트	4.502	29665	0.005	0.01
3- 메틸부틸 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-시클로헵타놀피리딘	8.983	135104	0.022	0.03

[0655]

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

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

[0658] ³비율 % 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 CO₂ 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 타이트 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).

[0662] 표 8A: 석유-유도 이소프렌의 GC/MS 분석

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

[0663] [0664] 표 8B: 발효-유도 이소프렌 (% 총 C5 탄화수소) 의 GC/MS 분석

화합물	RT (분)	교정된 GC 영역	총 C5 탄화수소의 %
이소프렌	2.966	8.1×10^7	100%

[0665] [0666] 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°C에서 15분 동안 유지된 Agilent DB-Petro 컬럼 ($100\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$, 0.50 um 필름 두께) 상에서 수행하였다. GC/MS 방법은 헬륨을 운반 기체로서 1 mL/분의 흐름으로 이용하였다. 주입 포트를 200°C에서 50:1의 분할 비로 유지하였다. Agilent 5793N 질량 선택 검출기는 m/z 19에서 m/z 250 까지의 전체 스캔 방식으로 실행하였다. 상기 조건하에서, 각각의 표준의 100 ug/L 농도는 실험 오차 내에서 동일한 검출기 반응을 산출하였다.

[0667] IV. 고상에 흡착된 이소프렌을 포함하는 조성물.

[0668] 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.

[0669] [0670] 발효 방출-기체를 0°C로 유지된 구리 응축 코일을 통과시킨 후, 수증기를 제거하기 위해 과립화된 실리카 건조제 필터에 적용하였다. 탈습된 방출-기체를 이소프렌의 초기흡착포화선이 GC/MS에 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.

[0671] V. 응축 이소프렌의 수집 및 분석.

[0672] [0673] 발효 방출-기체를 탈습시키고, 적합한 흡착제 (예를 들어, 아스카라이트)를 통해 여과에 의해 CO_2 를 제거하였다. 그 다음 수득된 방출-기체 스트림을 스트림 내 VOC를 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 NMR에 의해 분석하였다.

[0674] VI. 발효에 의한 프레닐 알코올의 제조

[0675] Kudzu 이소프렌 합성효소를 발현하는 E. coli BL21 (DE3) 균주로부터의 방출-기체의 분석은 이소프렌 및 3-메틸-3-부텐-1-올 (이소프레놀) 모두의 존재하에서 밝혀졌다. 발효에 걸친 발효 방출-기체 내 2개 화합물의 수준은 상부공간 GC/MS에 의해 측정되는 바와 같이 도 89에 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/L방출기체의 수준을 제조하였다.

[0676] VII. 공급-배치식 배양물에서 발효되고 메발론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. coli 내 이소프렌의 성장 및 제조의 분리

[0677] 실시예 11은 이소프렌 제조 및 메발론산으로부터의 세포 성장 분리를 나타낸다.

I. 발효 조건

[0677] 배지 구성 (발효 배지 1 리터 당):

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 침가하고, diH_2O 에 용해하였다. 상기 용액을 오토클레이브하였다. 수산화암모늄 (30%)으로 pH를 7.0로 조정하고, 부피를 충분량으로 하였다. 멸균 및 pH 조정 후에 글루코오스 10 g, 티아민 * HCl 0.1 g, 및 항생제를 침가하였다.

[0679] $1000\times$ 개질 미량 금속 용액 (Modified Trace Metal Solution):

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, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 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/NaOH로 pH를 3.0으로 조정한 다음, 부피를 충분히 하고, 0.22 μ 필터로 필터 멸균하였다.

[0681] pTrcHis2AUppPathway (또는 pTrcUpperMVA로 불림, 도 91 및 92A-92C) (50 μ g/mL 카르베니실린) 또는 pCL PtrcUpperMVA (또한 pCL PtrcUpperPathway로 불림 (도 26)) (50 μ g/mL 스펙토노마이신) 플라스미드를 함유하는 E. 콜라이 세포로 발효를 수행하였다. 이소프렌이 제조되는 실험을 위해, E. 콜라이 세포에는 또한 pTrc KKDyIkIS (50 μ g/mL 카나마이신) 플라스미드가 함유된다. 상기 실험을 바람직한 발효 pH 7.0 및 온도 30°C에서 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°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 트립톤-효모 추출물 배지 내로 접종하였다. 550 nm에서 측정하였을 때 접종물이 광학 밀도 1.0까지 성장한 후, 이것을 생물반응기에 접종하는데 사용하였다.

[0682] 세포가 정지상에 도달할 때까지 글루코오스를 기하급수적 속도로 공급하였다. 이 후 글루코오스 공급량을 감소시켜 대사 요구를 충족시켰다. IPTG를 첨가하여 유도를 달성하였다. 과염소산 (Sigma-Aldrich # 244252) 처리된 샘플 (0.3 M, 4°C에서 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 발생되는 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 I에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 BL21 (DE3) 세포를 45 mL의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 170 rpm으로 진탕하면서 30°C에서 5 시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 용액을 트립톤-효모 추출물 배지의 5 L 생물반응기로 옮기고, 배양물의 OD₅₅₀이 1.0에 도달할 때까지 세포를 27.5 rpm으로 30°C에서 성장시켰다. 5 L의 접종물을 45 kg의 배지를 함유하는 150 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀이 10의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.1 mM로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 프로파일을 도 60A에 제시한다. 메발론산 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 61.3 g/L (도 60B)으로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 60C에 제시되어 있고, 도 60A와의 비교는 성장과 메발론산 제조의 분리를 증명한다. 52.5 시간 발효 동안 제조된 메발론산의 총 양은 이용된 글루코오스 14.1 kg으로부터 4.0 kg이었다. 발효 동안 메발론산 제조에 투입된 탄소의 몰 수율은 34.2%였다.

[0685] III. 15 L 규모에서 pTrcUpperMVA 플라스미드를 발현하는 E. 콜라이 BL21 (DE3) 세포로부터의 메발론산 제조

[0686] 실시예 11, 파트 I에서 상기 설명된 바와 같이 플레이트 상에서 성장한 BL21 (DE3) 세포를 500 mL의 트립톤-효모 추출물 배지를 함유하는 플라스크 내에 접종하고, 160 rpm으로 30°C에서 OD₅₅₀이 1.0이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀이 10의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.0 mM로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 프로파일을 도 61A에 제시한다. 메발론산 적정농도를 발효 과정에 따라 최종 값 53.9 g/L (도 61B)으로 증가시켰다. 발효 동안의 특이적 생산성 프로파일은 도 61C에 제시되어 있고, 도 61A와의 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 몰 수율은 28.8% 였다.

[0687] IV. 15 L 규모에서 pTrcUpperMVA 플라스미드를 발현하는 E. coli BL21 (DE3) 세포로부터의 메발론산 제조

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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다.

상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 30 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 1.0 mM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 15.2% 였다.

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

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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 25 μM 로 하였다.

OD₅₅₀ 이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 로 증가시켰다. 발효 38 시간에 IPTG 농도를 100 μM 로 상승시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 1.53% 였다.

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

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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 26 μM 로 하였다. OD₅₅₀ 이 175 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 로 증가시켰다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 1.34% 였다.

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

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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 45 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 24 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 0.92% 였다.

[0695] VIII. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKDyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. coli 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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 10 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 30 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 0.73% 였다.

[0697] IX. 15 L 규모에서 pCL PtrcUpperMVA 및 pTrc KKDyIkIS 플라스미드를 발현하는 E. coli 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°C 에서 OD₅₅₀ 이 1.0 이 될 때까지 성장시켰다. 상기 물질을 4.5 kg 의 배지를 함유하는 15 L 생물반응기 내에 시딩하였다. OD₅₅₀ 이 15 의 값에 도달하였을 때 IPTG 농도를 27 μM 로 하였다. 시간에 따른 생물반응기 내 OD₅₅₀ 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 몰 수율은 0.32% 였다.

[0699] 실시예 12: 공급-배치식 배양물에서 발효되고 메탈론산 경로로부터의 유전자를 발현하는 E. coli의 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: K₂HPO₄ 7.5 g, MgSO₄ * 7H₂O 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, diH₂O 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 * H₂O 40 g, MnSO₄ * H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄ * 7H₂O 1 g, CoCl₂ * 6H₂O 1 g, ZnSO₄ * 7H₂O 1 g, CuSO₄ * 5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, 및 NaMoO₄ * 2H₂O 100 mg. 각 성분을 diH₂O 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. coli 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. coli 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 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 μM 로 하였다. OD_{550} 이 190 에 도달하였을 때 IPTG 농도를 50 μM 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 몰 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 스텀 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

[0711]

[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

[0713]

[0714] II. 계산된 단열 불꽃 온도 (CAFT) 모델의 설명

[0715] 연소 발생에 대해 선택된 제한 불꽃 온도에 따른 계산된 단열 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 단열 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 결정해야 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°C 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, 단열 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.

III. 계산된 단열 불꽃 온도 (CAFT) 모델로부터의 결과

[0724] 도 68 내지 74에 작성된 것은 시리즈 A 내지 G 각각에 대한 CAFT 모델 결과이다. 도면은 계산된 단열 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 74에 제시된 형태로 해석되기는 어려울 수 있다. 부가적으로는, 현행 형태는 일반적으로 부피%로 제시된 실험 데이터와 비교하기 위해 수행되기에 좋지 않다.

[0725] 실시예로서 시리즈 A를 사용하여 도 68에서의 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 물 량을 달성할 수 있다.

[0726] 상기 물 량으로부터 % 부피 농도를 계산할 수 있다. 그 다음 부피%로의 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 76B는 도 69에 제시된 데이터로부터 발생된 시리즈 B에 대한 가연성 엔벨로프에 대해 계산된 부피 농도가 제시되어 있다. 도 70-74에 제시된 데이터에 대해 유사한 접근법이 사용될 수 있다.

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 단열체를 둘러쌌다. 유형 K 열전대를 기체 공간의 온도 뿐 아니라 용기 자체의 온도를 측정하기 위해 사용하였다. 도 77은 시험 용기를 나타낸다.

[0729] 시험을 실시하기 전, 용기를 비우고, 질소로 펴지하여, 이전 시험으로부터의 임의의 기체가 제거되었음을 확실히 하였다. 그 다음 용기에 진공을 적용했다. 이후 수행된 압력은 전형적으로 대략 0.06 bar(a) 였다. 질소 펴지로 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 닉铬 코일 및 AC 볼트 공급원으로 구성되었다. 오실로스코프를 사용하여, 34.4 VAC 가 3.2 초 동안 점화기에 전달된 것으로 측정되었다. 3.8 amps의 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.

V. 가연성 시험 결과

[0733] 첫번째 실험 시리즈 (시리즈 1) 를 스텀 없이 40°C 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 엔벨로프로의 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 적합하게 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 초과의 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 스텀 농도로 40°C 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% 스텀의 첨가는 가연성 엔벨로프의 핵심 제한을 유의하게 변경하지 않았다. 스텀/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.

V. 3 대기압에서 공기 내 이소프렌의 가연성 제한 계산

[0740] 실시예 13, 파트 I 내지 IV 에 기재된 방법은 또한 3 대기압 및 40°C 의 절대 시스템 압력에서 이소프렌의 연소 한계를 계산하기 위해 사용하였다. 상기 결과를 대기압 및 40°C 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.

VII. 가연성 연구 요약

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

대해 개발하였다. 개발된 CAFT 모델은 상기 작업에서 수행된 시험에 의해 발생되는 실험 데이터와 잘 들어 맞는다. 시리즈 1 및 2로부터의 실험 결과는 시리즈 A 및 B로부터의 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 일반적 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-데옥시-D-자일룰로오스-5-포스페이트 합성효소 혼산 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: FIT1018c(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: bll2651(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(dxss)
CBO: CBO1881(dxss)
CBA: CLB_1818(dxss)
CBH: CLC_1825(dxss)
CBF: CLI_1945(dxss)
CKL: CKL_1231(dxss)
CHY: CHY_1985(dxss)
DSY: DSY2348
DRM: Dred_1078
PTH: PTH_1196(dxss)
SWO: Swol_0582
CSC: Csac_1853
TTE: TTE1298(dxss)
MTA: Moth_1511
MPE: MYPE730
MGA: MGA_1268(dxss)
MTU: Rv2682c(dxss1) Rv3379c(dxss2)
MTC: MT2756(dxss)
MBO: Mb2701c(dxss1) Mb3413c(dxss2)
MLE: ML1038(dxss)
MPA: MAP2803c(dxss)
MAV: MAV_3577(dxss)
MSM: MSMEG_2776(dxss)
MMC: Mmcs_2208
CGL: NCgl1827(cgl1902)
CGB: cg2083(dxss)
CEF: CE1796
CDI: DIP1397(dxss)
CJK: jk1078(dxss)
NFA: nfa37410(dxss)
RHA: RHA1_ro06843

[0759]

SCO: SCO6013(SC1C3.01) SCO6768(SC6A5.17)

SMA: SAV1646(dxS1) SAV2244(dxS2)

TWH: TWT484

TWS: TW280(Dxs)

LXX: Lxx10450(dxS)

CMI: CMM_1660(dxSA)

AAU: AAur_1790(dxS)

PAC: PPA1062

TFU: Tfu_1917

FRA: Francci3_1326

FAL: FRAAL2088(dxS)

ACE: Acel_1393

SEN: SACE_1815(dxS) SACE_4351

BLO: BL1132(dxS)

BAD: BAD_0513(dxS)

FNU: FN1208 FN1464

RBA: RB2143(dxS)

CTR: CT331(dxS)

CTA: CTA_0359(dxS)

CMU: TC0608

CPN: CPn1060(tktB_2)

CPA: CP0790

CPJ: CPj1060(tktB_2)

CPT: CpB1102

CCA: CCA00304(dxS)

CAB: CAB301(dxS)

CFE: CF0699(dxS)

PCU: pc0619(dxS)

TPA: TP0824

TDE: TDE1910(dxS)

LIL: LA3285(dxS)

LIC: LIC10863(dxS)

LBJ: LBJ_0917(dxS)

LBL: LBL_0932(dxS)

SYN: sll1945(dxs)
 SYW: SYNW1292(Dxs)
 SYC: syc1087_c(dxs)
 SYF: Synpec7942_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
VYY: 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: Mmwyl1_0073 Mmwyl1_3021 Mmwyl1_3053 Mmwyl1_3097 Mmwyl1_4182
 AHA: AHA_2143(atoB)
 CVI: CV_2088(atoB) CV_2790(phbA)
 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(phbA) 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

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: Phuc_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)

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(phbA) 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: bll0226(atoB) bll3949 bll7400 bll7819 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: Rspf17029_0022 Rspf17029_2401 Rspf17029_3179 Rspf17029_3921
 RSQ: Rspf17025_0012 Rspf17025_2466 Rspf17025_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

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: llmg_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: OEOE_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: Acel_0626 Acel_0672
SEN: SACE_1192(mmgA) SACE_2736(fadA6) SACE_4011(catF)
SACE_6236(fadA4)
STP: Strop_3610
SAQ: Sare_1316 Sare_3991
RXY: Rxyl_1582 Rxyl_1842 Rxyl_2389 Rxyl_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

CHU: CHU_1910(atoB)
GFO: GFO_1507(atoB)
FJO: Fjoh_4612
FPS: FP0770 FP1586 FP1725
RRS: RoseRS_3911 RosRS_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 혼산 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(hmges1) 447204(MGC80816)
DRE: 394060(hmges1)
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: COXBUT912_1931
TCX: Tcr_1719
DNO: DNO_0799
BMA: BMAA1212
BPS: BPSS1002
BPM: BURPS1710b_A2613
BPL: BURPS1106A_A1384
BPD: BURPS668_A1470
BTE: BTH_II1670
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: LSEI_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: rrmAC1740(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: Patl_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: rrnAC3412(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: OEOE_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: rrnAC0077(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 포스포메탈로네이트 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: llmg_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 디포스포메발로네이트 테카르복실라아제 혼산 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 엘타-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: Hhal_1623
DNO: DNO_0798
EBA: ebA5678 p2A143
DVU: DVU1679(idi)
DDE: Dde_1991
LIP: LI1134
BBA: Bd1626
AFW: Anae109_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: Rxyl_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(crt_1) VNG6445G(crt_2) VNG7060 VNG7149
 HMA: rrnAC3484(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

[0808]

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

[0809]

[0810] 예시적 이소프렌 합성효소 핵산 및 폴리펩티드

[0811] Genbank 접근 번호

AY341431

AY316691

AY279379

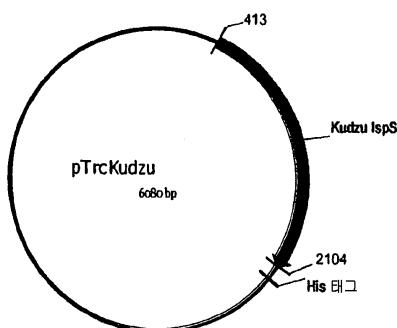
AJ457070

AY182241

도서

도면1

도면2



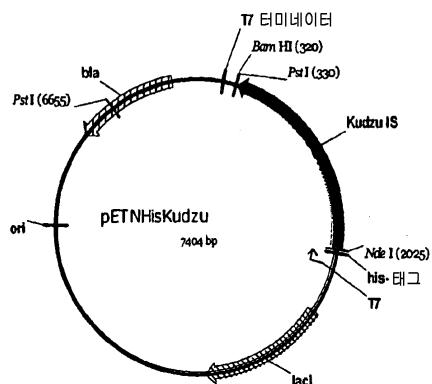
도면3a

도면3b

도면3c

Gcactaatgttccggcggttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattttt
ctcccatgaagacggtagccgactggggctggagcatctggcgcattgggtcaccagcaaat
gcccgttgttagcccccaattaaaggctgtctccggcgcgtctgcgtctggctggcataaat
atccactcgtcaatcaaattcagccgatagcggaaacgggaaggcgcactggagtgccatgtccgg
tttcacaaaaccatgcbaatgtctgaatggggcatgtccactgcgtctgggtgccaac
gatcagatggcgtggccgaatgcgcgcattaccgcgtccgggtcgccgttgggtcgatata
tctcggtatggatatacgacatgcggaaacgcgtcatgttatatccggcgtcaaccacccat
caaacaggatttcgcctgtggggcaaaaccagcgtggaccgcgtgcgaactcttcagggc
caggcggtaaggggcaatcagctgtccgttcaactgtgaaaagaaaaaccacccctggcgc
ccaatacgccaaaccgcctccccggcgttgcgcattcaatgcagctggcagcacaggtt
ttccgcactggaaacggggcgtgagcgcacgcattaaatgtgagttagcgcgaattgtatctg
(SEQ ID NO:2)

도면4

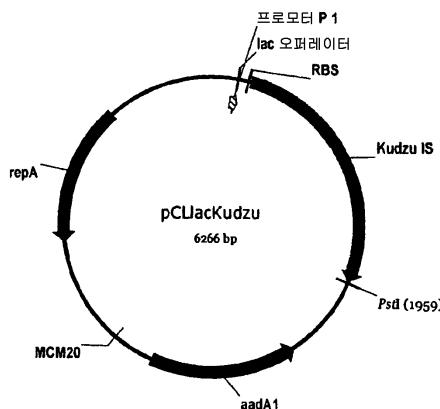


도면5a

도면5b

도면5c

도면6



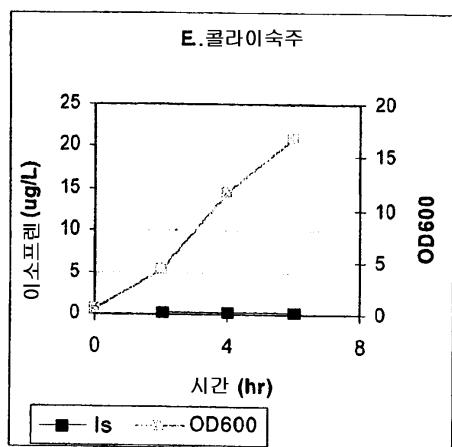
도면7a

도면7b

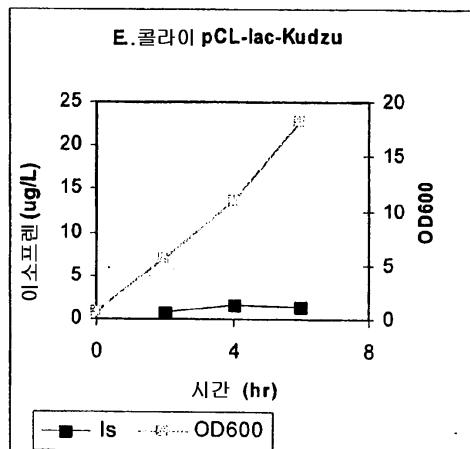
도면7c

Aattctgttagacccttgtggaaaactgtaaattctgttagaccctctgtaaattccgctag
acctttgtgttttttgcgtttatattcaagtgggtataatttataagaataaaagaataaa
aaaagaaaaaaagaataagatcccagccctgtgtataactactacttttagtcgttccgcagt
attacaataaaaggatgtcgcggccgttgcgtctcataaaaaacagacccataaaacctaaagg
cttaaagtgcacccctcgcaagctggggaaatcgtaattatctttgtctccgcacccatcg
gcacccgtgcgtgttttgcgtacattcagttcgtgcgtgcgtcaaggcttcggcgtatgt
ggggtaaatggcactacaggcgcctttatggattcatgcaggaaactaccataataacaag
aaaagccgtcacggcgttctcagggcgtttatggccggctgtctatgttgtctatctgact
ttttgcgttcagcgttccgtccctgtatgtttccagtcgcaccatccggattatcccgta
caggtcattcagactggcataatgcacccaggtaaggcagcggtatcatcaacaggctta
(SEQ ID NO:7)

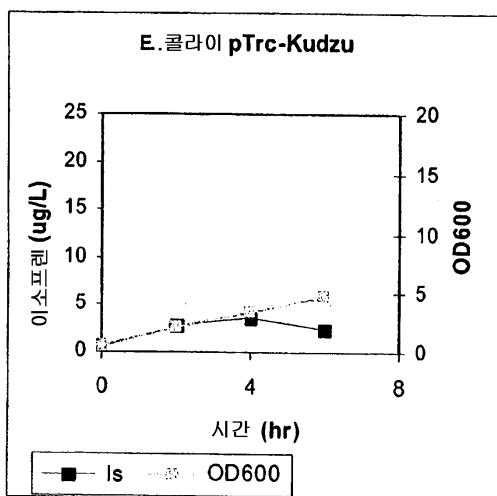
도면8a



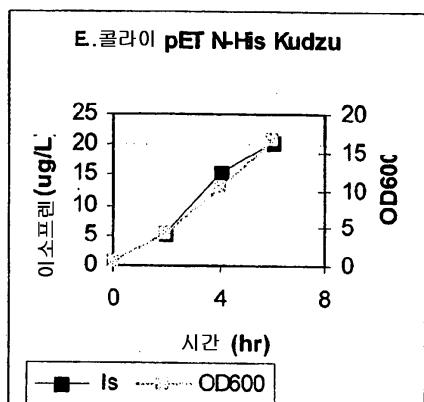
도면8b



도면8c

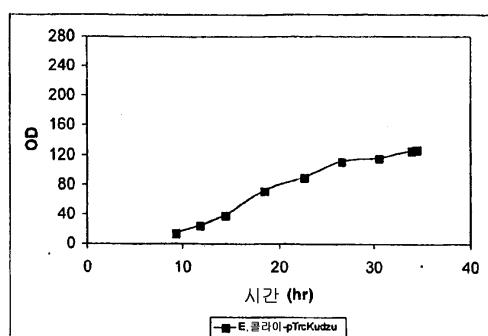


도면8d

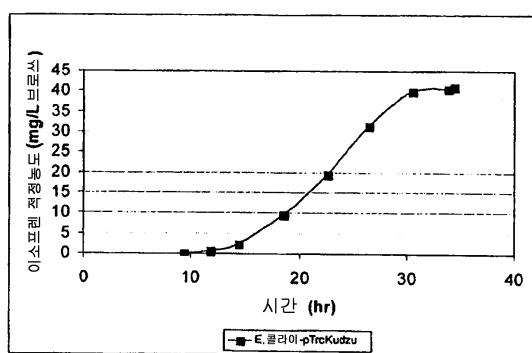


도면9

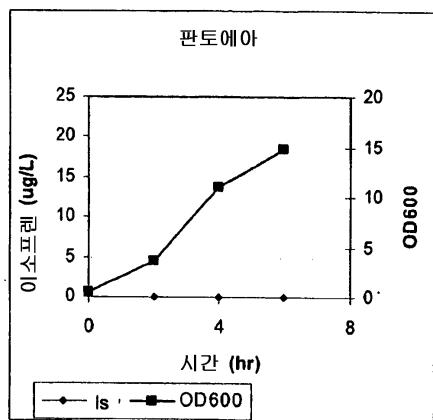
A.



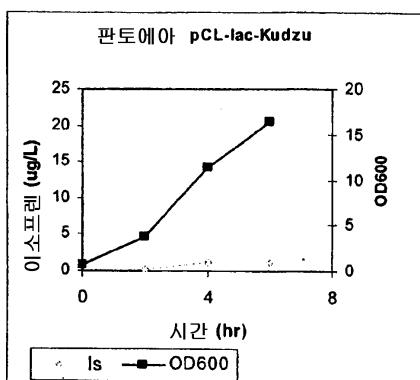
B.



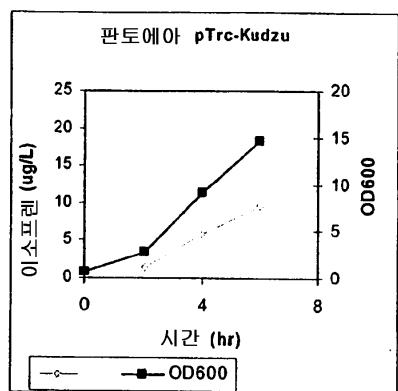
도면10a



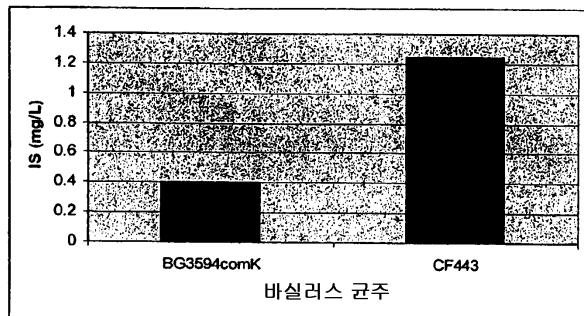
도면10b



도면10c



도면11



도면12a

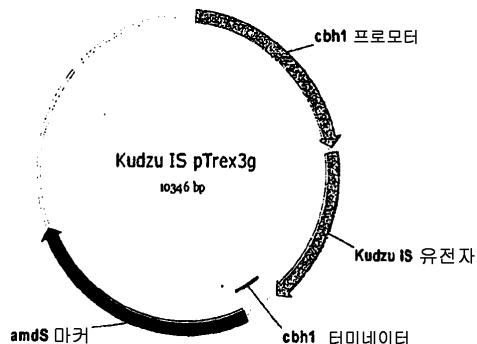
도면12b

도면 12c

(SEQ ID NO:57)

도면13

ATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTACTCAGATTACCGAGCATATTCTGACGATCTGCTAACT
 ACCAGCCGAACCTTTGGAACTTGAGTTCTCAGTCTCGAAAATGACCTGAAGGTGGAAAAA
 GCTCGAGGAGAAGGCACCAACTCGAGGAGGGTGCAGTGTATGATCACAGAGTTGACACC
 CAACCCCTGTCTTGCTGGAGCTGATCGACGATGTCAGCGTTGGGTTTGACTTATAATTG
 AGAAGGACATTATCAAGGCACTGGAGAACATTGTGCTCTCGACGAGAACAGAAGAACAGTC
 TGATCTCACGCTACCGCTCTCTTCCGACTTCTCGACAAACACGGCTTCGAGGGTGTCCGAG
 GAGCTCTCGAGAGATTAAAGGACAAGGGAGGGATTAGCGCGAGCTGAAGGGAGACGTTC
 AGGGTCTCTCTCCTGTACGAGGCGTCTACCTGGGATTGAGGGAGAACCTCTGGAGGA
 AGCTCGTACATTTCATCACCTTAAGAATAACCTTAAGGAGGGAAATTAAACACCAAGGTG
 GCCGAGCAGGTTCTCACGCCCTGGAGCTCCCTACCCACCAACGGCTCCAATAGACTGGAGGCTC
 GTTGGTTCTGGAAATAATGAGCCAAGGAGCCTCATCATCAGTTGCTGTTGGAGTTGGCAA
 GCTGGACTCTCAATATGGTTCAGACGCTGACACAAAGGAGTTGAGGACCTGCTCGATGGTGG
 ACCGAGATGGGATTGGCCTCGAAGCTGATTGTCCTGACCGACTTATGGAGGTCTATT
 GGCCTTGGAATGGCCCTGACCCCCAGTCCGGAGAGTGCCTGGAGGCGGTGACGAAGATGTT
 CGGTCTTGACTATCATCGACGAGCTACAGATGTCTACGGCACACTCGACGAGTTGCAGCTG
 TTCACTGAGCCGCTGGAGCGATGGGATGTGAAGGCCATTAAACTCTCCCTGACTATATGAAGC
 TGTGCTTCTGGCTCTGTACAAACACTGTCAACGATACCTGTAACCTCTCAAGGAGAACGG
 ACACAAACATCTCTTACTTGACCAAAATCTGGCGAGAACATGTGCAAGGCTTCTGAGGAG
 GCTAAATGGTCCAATAACAAGATCATTCCTGCTTTCTAAATAACCTGGAAAATGCTCGGTG
 CGAGCTCTGGCTGCCCTTGGCCCTTCTACTTCTCCGTGCGAGCAGCAGGAGGATAT
 TTCCGATCATGCTCTTAGATGCTGACCGATTTCACGCCCTCGTGCATCTCCTGCGTGATT
 TTGCGTTGTGTAATGACCTTGCACCTCTGCTGAGCTGGAACAGGGCAGACTACAAATT
 CCATTATTCATGACGACGAAACGATGAAACATCTGAAGAACAGGCTAGAGAGGAACCTGCG
 AAAGTTGATCGACGCCGAGTGGAAAGATGAAAGAGAGGCGGTGTCGACTTACCCCTGCTT
 CCCAAGGCTTCATGGAGATGCCGTGAACATGGCTCGAGTTCCATTGTAACCTACAGTAGC
 GTGACGGCTGGCTCGTCCGACTCGTACAGAGAACCGAATCAAGCTGCTGCTCATCGACCC
 CTTCCATCAACCAATTGATGTACGTGAA
 (SEQ ID NO:8)

도면14

도면15a

1 TCGACCGGTG AGAGAACAG CTCGGGACA AGGGAGGAA GAACAAAGAC AAAGAAAAAC
 61 AAAGAAAGCA ATTGAARACA ARAACAAAATC ATTTCATTC CTTCCTCTAT CATTCCCTTT
 121 CTTTCTTTCTT CTCTCATTC ACCCACTCCA TCGTATCGGT ATTCTCTTAA TTTTTCTCT
 181 CTCTCTATAT CAATTCCTTT CTCTCTAGGT GTGTCCTCTC TCTCTCTTC ATTCTCTAC
 241 AACGCATATCTC TCCCGGAAACCC TCCCGGTTCC TCCCTTACGGG CGGATACCGA
 301 TCGCTTTCTT CTGGCTATCA CTGGCTACGG GCGCCCTCTC TGACCGTAA CCTCTCTACGG
 361 ATTTACCCATA TCATAAAGGT TTTCGGAGG CTTATCGTG ACCCCCTGTC GCGCTCTAT
 421 TGCTGGGGTGG ATTATCTCTC TGTCATAAG GTGATCCATG CTTCCTGAGG ATTCCCGAAA
 481 TGTCCTACT TTGGGGGGG ATCATTCCAT CCACCTCTT CTCTCTGCT TTCTCTATC
 541 GGCGCTGGTCA ATTTGGTCTT CGGCCCGGTT TTGCTTTEC CGATGTTACT
 601 TGGGGAGAG TGGGATAATCA CTGGGCAAATC AACTGGTTT GACGGCTCCC ATGGTATAAA
 661 TAGTGGGTG CGGACAGGTG CCTTGGCTT TCTTAAAGCA AGAGAATCC ATTGTCCTGA
 721 CTATCACGAA TTACATACA TTATGAAGAT CACCCGCTGC ATTCGGCTT TATTCTCACT
 781 TGCTGGCTGC TCACCTATTC CAGTTGGCA TCTTGGTGTG TTTCAGGTT GCAAGTCATA
 841 TGCTGATTTC TTTCGGTGTG ACCAAAGGTG GAACACTTT GCTAATCTTG ATAGACCCAA
 901 CCTTAAGAAG AGAAATGATA CACCTGCAAG TGATGATCAA TTGAAAAGAAG TGTAATT
 961 GTCACCGTCAC GTGTGTTAGGG CCCTTACAAA ATAGACTCAA ACCATGGGTG ATGTCCTCC
 1021 TAATACATGG CGAACATGGC CCCTTAAATTG AGGATATATT ACACAAAGAC GTGAAACATT
 1081 GATATCACTT ATGGGGGGT TTACCGTCA AAAATCCAG CACAAAGGAA TCCCTTCTCA
 1141 CGGCTCTACT CTCATCTCTA ACTCCATATA TGTCGGCTG GACGTCGATC ACCGTTACTT
 1201 AAAACTCTGTG GAAGCATTC TTGCTGGTGTG GCGACCAAAT TGTCGGCTGA CAATTCTATCA
 1261 CCAACAAATAT CTTCAGGAAAG CTGATCTCTC TTTCATCTCC TTAAAGCTG GAACCTGCTC
 1321 TATGATATAA ACTCAAGTTT ACAAGCTGTG TGAGAGGGAG GCACAAACTC CTATAGATAA
 1381 TTGAAATCTA CATTACATCC CCTTTTGTAGC TTAAATGAAT ACAACATIA ATTTCATGAC
 1441 TTCTGCTCTG TGGCCAAAAC ACTCTGCTGA TAAATCTGT GACCTAGTT TATCCATGCC
 1501 TTCTTAAATTG CCTATAAAAG ATPATGTTA CAAGGTGCA TTGGATGGAG TTATGGTCT
 1561 ATCCCTCTACT TTGGGGGAGA TTTCCTCTCT TGAAATATGCT CAAGGGATGC CTCAAGCTGC
 1621 TTGGGGTAAC ATCCACTCAAC AGCAAGACTG GCGCTCTTCA CTAAAGTTCG ATAATGTTCA
 1681 ATTGATTTAG ATGGGGGAGA CACCTTATAG TGCTGGACAT AACGGTACTC TTATTTGCA
 1741 AGCTATATCA ATAGCCCTTA ATCCCAAGGC CACTGAATCA AAACCTCCAG ATATTTCACC
 1801 TGATAACAAA ATATTGTTCA TTGCAAGTCA TGACACAAAT ATTGCTTATA TAGCCGCAT
 1861 GTTAAATATG CGTGGACAT TACCAAGTCA ACCAGATAAT ACTCTCCAG GTGGTGCCT
 1921 AGTATTGAA CGTCTGCTG ATTTAAAGTTG AAAAACATAT TTTCCTGTAT CTATGGTTA
 1981 TCAAACACTTC GAACAAACTTC GATCACAGAC TCCCCCTCTT CTAAATCAGC GTGCCGGATC
 2041 TGTCACCTT AAAATCCAC TTGCAATGCA TCAACACAGC GAGGGTACT GTCTCTTTC
 2101 CACTTTTACA AGAGTTGTTT CCAAAATCTGT TGAACTTGGA TGCCAACTTC AATAATGAGG
 2161 ATCCAAGTAA GGGAAATGAGA ATGTCATCTCA TTTCATTTTG CTATGNAATA CATGCCATA
 2221 GTTCTTTCTT TTGTTGTTT TGTCGGTAC GGGCGTGTCA AATCTCAGT
 2281 TGTCGGCTG TTGCAAGCTT GTTTCAAAT CTGTCATCT CATGAATCT TTACCAATT
 2341 ACCACACGGT TATACCATTC TCTCATGAA TCTTCATCAA ACCATCTCGG GTTGTAGGTG
 2401 GAAAGAAAGT TTGTTCTTT TATTTCTTAA TTCCCATCTT CAAGGCTTTT TTTCCTTCTC
 2461 TCTCTCTCTGAG TTGTCAGCTG CTGTTAGA ATTTCAGCTG GTTGTAGCT
 2521 CTAAATTGTTT GTTGGCGAA AACGGAGGCG TTACTCTCT TCATCAGCTG GACGATTGCTA
 2581 CCTTTGAAAAA CCAACTACTT TTGCACTGTT TGATAGAAA TCAATGATAT TAGAATCCCA
 2641 TCCCTTTAATT TCTTTCAAAG TACTTGAGCT ATAGTTAAGT GTAAGGGCCC TACTGGCAA
 2701 GCATTTGCCA AGGAATGTTT CATTAATCAA GAACGAAAGT TAGGGATGCG AAGACGATCA
 2761 GATACCGTCG TACTCTTAACT CATAAACTAT GCCGACTAGG GATCGGGCAA TGTTTCTT
 2821 ATCGACTTGC TCGCACCTT ACCGAAATC AAAGCTTTG GTTCCCGGGG GGAGTATGGT
 2881 CGCAAGCTG AAACCTAAAG GAATTTGAGG AGGGGCAACCA CAATGGAGTG GAGCTGCGG
 2941 CTAAATTGAA CTCAACACGG GGAACACTCA CAGGTTCCAGA CATACTAAGG ATTGACAGAT
 3001 TGAGAGCTCT TCTTGTATTC TATGGGTGGT GGTGCAATGCC CGTTCTTAGT TGGTGGAGTG
 3061 ATTTCGCTGC TTAAATGCGA TAACCAAGCA GACCTTAACC TGCTAAATAG CTGGATCAGC
 3121 CATTTCGGCT GATCATTAGC TTCTTGGAG GACTATTGCC ATAAGGCCAA TGAAGTTTG
 3181 AGGCAATAC AGGTCTGTA TGCCCTTAA TGTTCTGGC CGCACGGGG CCTACATGAC
 3241 GGAGGCAACG AGTTGAAAAA ATCTTTTGAA TTTCCTATCC TTGGCCGGAA GGCTGTTGTA
 3301 ATCTGTTTAA ACTCCGGCTGT GCTGGGGATA GAGCAATGCA ATTATTGCGC CGCCTCCCA
 3361 ATTCGATGTT GCAAGATTTA CAAGTTTTA AAATGTTTT CATTATTAATCTTATAGC
 3421 CTAAATAAAAA AGCCATAGTT TAATCTATAG ATAACCTTTT TTCCAGTGC CTAACCGGACG

도면15b

3481 TTACATCCC ATACAAAATC GGCTAGTTAA AGCTAAGGAA AAGTTAATAT CATGTTAATT
 3541 AAATACGGTA TTTPACAAATAA GACATGGAC TCATTATAT CGTTGAATAT GAATAACCAA
 3601 TTTCAGCGAA TTTTAAACAA ACATCGTCA CCTCGTTAA GGATATCTG TGTATGGGT
 3661 GTTGACTGC TTATCGAAT AATACCGTA CCTGTAATTG CTTGCTGGA TAGCGGTG
 3721 GTCTAATATC TAGCAAATAAT CTTTGGGTC AAAAGGCTTG CAATTTCAGC ACACCGAATC
 3781 ATTGGTCATT TTTTAATAA GAAGTTTCC ATAATTCCT GTAAATTCTG GTTGATCTAA
 3841 TTGAAAAGAG TAGTTTGC A TCACCGATGAG GAGGCGTTT GTAGAAAGAA ATACCGAACGA
 3901 AACGAAAATC AGCGTTGCCA TCGCTTGGG CAAAGCTCCC TTACCTGAAG AGTCGATTT
 3961 TATTGATGAA CCTATAACTT CCAAGCATG AAACCAAAAG GGAGAACAG TAATCAGT
 4021 AGACGATGAA ATGGGATCT TGATCACAT GTATCATGCA CTGGCTAAC AC ATGGAGGCTG
 4081 GAGCTTACGA CTTTACTCGA GAGGTGATTG AATCATCGAT GATCATCAC CTGAGAAGA
 4141 TACTGCTATT GCACCTGGTA TTGCTACTGAA GCAGGCTATG GTGAACTTTC CGGGCGTTAA
 4201 AAGATTTGGA CATGCTTATT GTCTACTGGA CGAACGCTTCT TCTAGAAGG TAGTTGACTT
 4261 GTCCGGACCG CCCTATGCTG TTATCGATT GGGATTAAG CGTGAAGAAGG TTGGGAATT
 4321 ATGATCCCTC ACTTACTATA TTCTTTCG GTAGCAGCTG GAATTACTT
 4381 GCATGTTACC TGCTTATAG TGATGAAATG CCTACATCGT GTGAAAGCC CTTTAAATC
 4441 TCTGGCTGCC CGGCTACTAG TCTTACTGGA AGTTCTGAG TCCCAAGCAC
 4501 GAAGGAGGTG TTGTAAGAT GAATGGATTG ATGTCAGGAA AAGAACGACA ATTTCGATC
 4561 CAAATTTGCTA AAATTGTTAGA GTTGGCTTGA AACANTAGAA CCTTACTTGC TTATATAATTA
 4621 CGTTAATTAAG AGCGTGTATC TCGTGAAGGA RTATAGTACG TAGCCGTTATA AATIGAATG
 4681 AAATGTTACG TTATAGATAA GAAGACACTT GTCTGTTAAT GTGAAATTAAT ATGATGACAA
 4741 CACTTTAATTAAG ATGATAAACCT CGCGCGTTAT GTTAAATTAAT TTAAAGCTGAT CCCCCCACACA
 4801 AACGCTTACG CCTATATGCCA TAACACAAAT TTAAATTAAT TTAAAGCTGAT CCCCCCACACA
 4861 CCATAGCTTACG CCTATATGCCA TAACACAAAGC ACAGCATACT AAATTTCCTC GGACTTCCGG
 4921 CATCGCCGTA CCACTTACAA ACACCCAAAGC ACAGCATACT AAATTTCCTC TTCTTCTCC
 4981 TCTAGGGTGT CGTTAATTAC CGCTACTAAA GTTITGGAAA AGAAAAAAAGA GACCGCTCG
 5041 TTCTTCTTCTT TTGCTGCGAAA AAGGCAATAA AAATTTTAT CACGTTTCCTT TTCTTCTGAAA
 5101 TTTTTTTTTT TACTTTTTCTT CTCTTCTGAT GACCTTCTT GATATTTAAAG TTTATAAACG
 5161 GTCTTCAATT TCTCAAGTTT CGTTTCTTCTT TATTACACT TTTTTTACTT
 5221 CTGGTTCATT AGAAAGAACG CATAGCAATC TAATCTAAGG GCGGTGTTGA CAATTAATCA
 5281 TTGACCTAGT ATATCGGCAT AGTATAATACG GACAGGTGA GGAACAAAC CATGGCCAAG
 5341 TTGACCTGGT CGCTTCCGGT CCTCTCAGG CGCGAGCTCG CGGGAGGGT CGAGTTCTG
 5401 ACCGACCGGC CGGGGTCTC CGGGACTTC GTGGGAGACG ACTTCGGGG TGTCGTCGG
 5461 GAGCAGCGTA CCTGTGTCAT CAGGCCGGTC CAGGACCGAG TGTTGCGGGA CAACACCCCTG
 5521 CCTGGGGTGT GGTTGGCGGT CCTGGACGAC CTGTAACCCCG AGTGGTGGGA EGTGTTGTC
 5581 AGCAAGCTTC CGGACCCCTA CGGGCCGGCC ATGACCGAGA TGCGGAGGCA GCGCTGGGG
 5641 CGGGAGTTCG CCTCTGGCGA CGGGCCGGCG AACTCTGTCG ACTTGTGTCG CGAGGAGCAG
 5701 GACTGACAGC TCGGACGGG CGCCACGGGT CCCAGGCTC GGAGATCGT CCCCCCTTC
 5761 TTTGTCGAT ATCATGTAAT TAGTTATGTC AGCGTACAT TCAGCCCTC CCCCCACATC
 5821 CGCTCTAAC GAAAAGGAG GAGTTGACAA ACCTGAAAGTC TAGTCCCTA TTTTTTTTT
 5881 TATAGTATTAG TTAGTATTAG GAACGTTATT TATATTCATAA ATTTTTCTT TTTTTCTGTA
 5941 CAGACCGCAT CTTCCTCAGTA ATGTTGCCCCAT CTCTGAGCA GAAAAGCGTT CCCCCCTAGG
 6001 GTCTCTCTCT TTGCTCTCTT TCTAGGTGCG GTGTATGCT CTGAAAGCTC TCTAGGGGG
 6061 CTCACACCAT AGCGAGATPA CCTTCCCCAC CGGCTCGCTT CTGAAAGGCA CAAGGACTGC
 6121 TCCCAAAGAT CCTAGGGGG ATTGGCGGA TTTCGGCTA AAGGAACCG AACACTAGA
 6181 AAGCGACGCC CGAGAACCGG TCTGACCCCG GGATGAATGT CAGCTACTG GCTATCTGGA
 6241 CAAGGGAAAC CCAAGCCCA AAGAGAACG AGGTAGCTTG CAGTGGCTT ACATGGCGAT
 6301 AGCTGACTG CGGGTTTTA TGAGCAGCAA CGGAACCGGA ATTGCCAGCT GGGGGCCCT
 6361 CTGGTAAGGT TGGGAGGCC TCGAAAGTAA ACTGGATGGC TTTCTTCCG CCAAGGATCT
 6421 GTATGGCAGG GGGATCAGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTT CGCATGATIG
 6481 ACAAAGATGG ATTGACCGCA GGTCTCCGG CGGCTGGGT GGAGAGGCTA TTGGCTATG
 6541 ACTGGCCATC ACAGACAAATC GGCTGCTCTG ATGCCCTCG GTTCCGGCTG TCAGCCAGG
 6601 GGCGCCCGT TCTTTTGTC AGAGCCGAC TGTCGACCCCG ECTGAATGAA CTGAGGAGG
 6661 AGGCACGCCG CCTATGTTG CTGGCCACGA CGGGCTTCTC TTGGCGAGCT GTGCTGAGG
 6721 TTGTCACTGAA CGGGGAAGG GACTGCTGCA TATGGGGCA ACTCCGGGG CAGGATCTCC
 6781 TGTCATCTCG CCTCTCTCT CCTGGAGAAAG TATCCATCAT CGCTGATGCA ATGCCGGCC
 6841 TCCATACGCT TGATCGGCT ACCTGCCAT TGACCAACCA AGCGAAACAT CGCATGAGC
 6901 GAGCACGAC TCGGATGAA CGGGCTCTG TGATCACCA TGATCTGGAC GAGAGCATC
 6961 AGGGCTCGG CGCCACGGGA CTGTTCCCA CGCTCAAGGC CGCCATGCC GACGGGGAGG
 (SEQ ID NO:11)

도면15c

7021 ATCTCGCTGT GATCCATGGC GATGCCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT
 7081 TTCTGGAATT CAACGACTGT GGCGCGCTGG TTGTCGGCGA CGCGPATCAG GACATAGCGT
 7141 TTGAGATTTGCT GTATGTTGCT GAAGAGCTTG CGGGCGGAATG GGCTGACCCGC TTCTCTGTC
 7201 TTTCACGGTAT GCGCGCTCCC GATTTCGCGACG GCATCGCCCTT CTATGCCCTT CTGAGGACT
 7261 TCTCTCTGAAT TGAAGAAAGT CCTACGTTTA CTACATATA CTTTRGATG ATTAAAATC
 7321 CCTTTTAAAGG TCTAGGTGAA GATCCCTTTT GATAATCTCA TGACCAAAT
 7381 CCTCTAACGT GAGTTTCTGTC CCTACGAGC GTCAACGCCCC GTAGAAAGGA TCAAAAGGATC
 7441 TTCTTGGAGAT TCTTTTTCTG TGCCCGTAAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT
 7501 ACCAGCGGTG TTGTTGTTGC CGGATCAAGA GTTACCAACT GTTCTTCCGA AGGTAACTGG
 7561 CCTCAGCAGA CGCCAGATAC AAATACTGT CCTCTAGTG TAGCGTGTAG TAGGCCACCA
 7621 CTTCAGAACAC TCTGTAGCAC CGCCCTACATA CCTCCGCTCTG CTAATCTGT TACCAAGTGGC
 7681 TGCTGGCAGT CGGCTACAGT CGTCTCTAC CGGGCTGGAC TCAAGACGGT AGTACCCGG
 7741 TAAGGGCCAG CGGTCCGGGT GAACCGGGGG TTCTGTCACCA CGGCCAGCT TGAGGGGAC
 7801 GACCTACACC GAACCTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAACGCCA CGCTTCCGA
 7861 AGGGAGAAAG CGGGACAGGT ATCCGGTAAG CGCAGGGTC GGAACAGGAG AGGCCACCGAG
 7921 GGAGCTTCCA CGGGGAACG CCTGGTATCT TTATGTCCT GTCGGGTTTG GCAACCTCTG
 7981 ACTMGAACCT CGATTTTTGT GTGCTCGTC AGGGGGCCCG AGCCATGCA AAAACGCCAG
 8041 CAACGGGGCC TTTTACGGT TCTCTGGCTT TTGCTGGCTT TTGCTCAAC TGTTCTTCC
 8101 TGCGTTATCC CCTGATTCCTG TGATACCGG TATTCACCCG TTGAGTGAG CTGATACCGC
 8161 TCGCCGAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA G

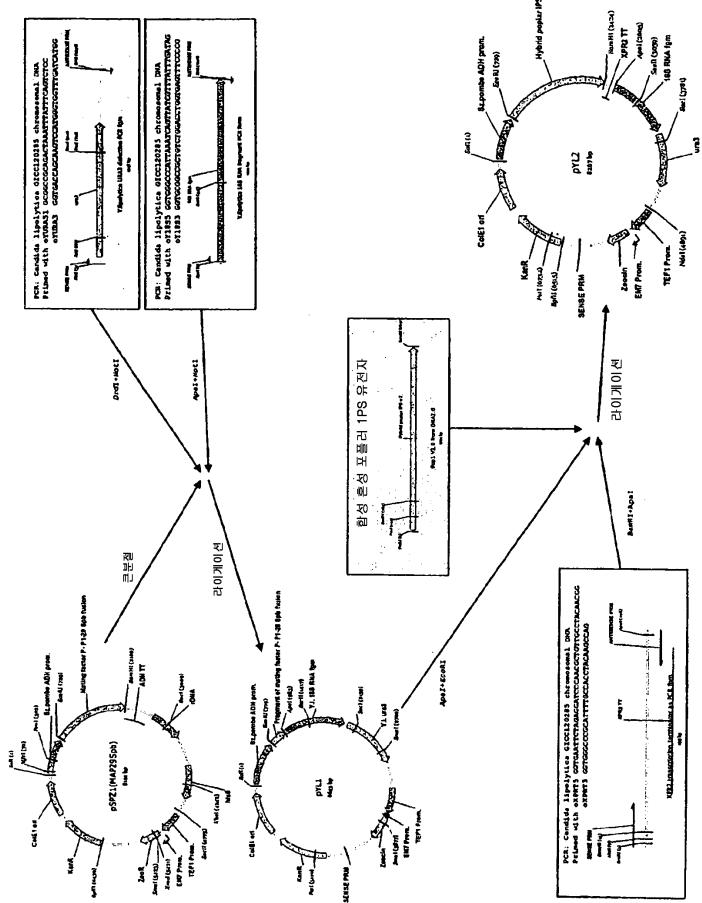
도면16

1 GAATTCAAAA CAAATGTGT GCAACCTCCT CCCAGTTAC TCAGATTACC GAGCATAATT
 61 CTCGACGATC TGCTAATC CACCGCAACC TTGGTAACT TGAGTTCTC CAGTCTCTG
 121 AAAATGACCT GAAGGTTGAA AGACTCGAG AGAAGGCCAC CAAACTCGAG GAGGAGGTGC
 181 GATGTATGAT CAACAGAGTT GACACCCAAC CCCCTGCTTT GCTGGAGCTG ATCGAGATG
 241 TGCAGCGGTT GGTTTGAAT TATAAATTCG AGAAGGACAT TATCAAGGA CTGGAGAACA
 301 TTGTGCTCT CGACGAGAAC AAAGAGAACAA AGTCIGATCT TCACGGTACCC GCTCTCTCT
 361 TCCGACTCTC TGACACAC GGCTTGAGG TGTCGGAGA CGTCTTGGAG AGATTAAGG
 421 ACAAGGAGGG AGGATTTAGC GGCGAGCTGA AGGGAGACGT TCACGGTCTT CTCTCTTGT
 481 ACAGGGGTC TAACCTGGGA TTGGAGGGAG AGAACCTCT GGAGGAGCT CGTACATTIT
 541 CCATCACTCA CCTTAAAGAAT AACCTTAAGG AGGGAAATTAC CACCAAGGTG GCGGAGCAGG
 601 TTCTGACCC CGTGGAGCTC CCCTACCAAC AACGGCTCCA TAGACTGGAG GCTCGTTGGT
 661 TCCCTGGACAA ATATGAGCCA AAAGGGCCTC ATCATAGT GTCTTGGAG TTGGGCAAGC
 721 TGGAACCTCA TAATGGTTCAG AGCCTTCACCA AAAAGGAGT GCAGGACCTG TCTCGATGGT
 781 CGAGGAGATG GGATGGGGCC TCGAAGCTGTT ATTGTTGCGG TGACCGACTT ATGGAGGTCT
 841 ATTTTTGGGC CCTTGGAAATG GGCGCTGACCC CCCAGTTGCG AGAGTGGCGG AAGGGCGGTA
 901 CGAAGATGTT CGGTCTTGTG ACTATCATGG ACGACGCTCA CGATGTCAC GGACACACTG
 961 ACGAGTGTCA GCTGTTCACT GACGCCGCTGG AGGGATGGGA TGTAAGACGGG ATTAATACCTC
 (SEQ ID NO:12)

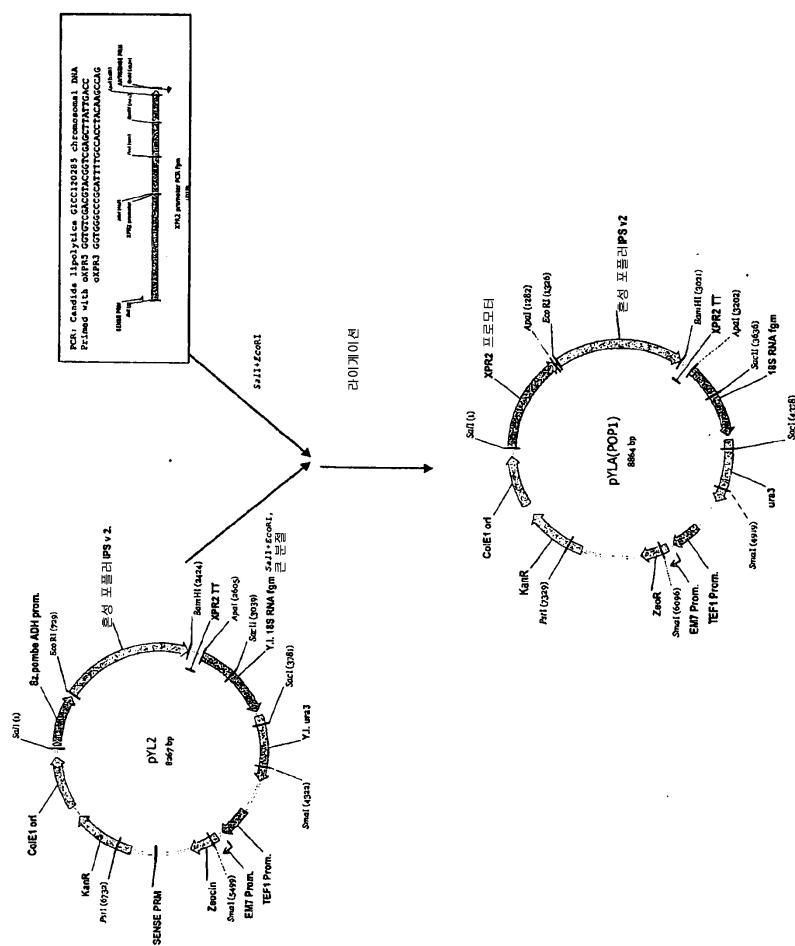
도면17

1 GRATTCAACA AAAATGTGCT CTGTTTCCAC TGAGAACGTG TCCTTACTG AGACTGAGAC
 61 TGAAGCACGT AGAACGCCA ACTACGAACC CAACCTCCGG GATTATGACT TTCTGCTGTC
 121 TTCTGACACC GACCGACTCGA TGAGGTTTA TAAGGATAAG GCGAAGAAC TTGAGGGCGA
 181 GGTAGACAGA GAGATTAACA AGCGAGAACGC CGAGTTCTG ACCCTCTG ACCTGATCGA
 241 CAACGTTCAA CGACCTGGTC TTGGTTACCG TTGGAATCC GATATCCGAC GTGATTGGA
 301 TCGATTGTC CGCTCGGAG STTCTGATGG TGAGTCAAG CGTCTGCTG AGGCCACAGC
 361 TCTTCTTCAG ACTCTGTG GGCAGCATGG ATTGAGGTT TCCCGAAAG CCTTCTG
 421 TTCTGAGATG CAGGAGCTCGT CCTCTGCTCT TGAGGGCGAG ATTATCTGG ATGGAGTCG
 481 GGTGTTGCT ATTTGACCC TGAGGAGTT GTGGAGGAA AAGATCGGAA AGGAACCTGG
 541 CGAGCAGGAC AACCATGAC CTTGAACTCC CCTGACATCGA CGTACCCAGG GACTGGAGG
 601 CGTGTGGAGC ATCGAGGGCT ACAGAAAAAA GGAGGAGTCT ATCAGGTTG TCTCTGAACT
 661 CGCTATCTC GACTATAACA TGATTCAGAG CGTGTACCCAG CGTACTGAG GAGGACACAG
 721 CGGTGCTGG CGACGGGTGG GACTGCCCCAC GAAGCTCCAC TTGCTAAAG ATCGATTGAT
 781 TGAGTCTTC TACTGGGAG TGAGGTTGGC CTTTGACCT CAGTACTCCC ACTCGGGAAA
 841 CTCCTGACCA AAGATGTTT CTTTGTCAC TATCATCGAC GACACTTACCG ATCTTACGG
 901 CACTCTCGAT GAACCTCGA CTTTCACGGG CGCTGTGAG CGATGGGATG TGAATGGCAT
 1021 TAATGATCTC CGAGATTATA TGAGGTTGTT TTCTTGCCC CTCTACACAA CAATTAAATGA
 1081 AATTGCTAC GACACCTCA AGGRCAGGG AGAGAACATT CTGCCCTACCT TTACTAAAGC
 1141 CTGGCCGAC CTGTGAAACG CCTTTTGCA GGAGGCCAG TGGCTTATA ACAAAATCTAC
 1201 TCCATATT GATGACTACT CGGCAACGC TTGGAGACTCT TCCAGGGCC CTCTCCAGT
 1261 GATCTCGCT TACTTTCAG TGCTCGAGA CATCAAGAAA GAGGAGATG AGAACCTCCA
 1321 GAAGTATCAC GACATCATCT CCCGACCTTC GCAACATCTT CGACTGTGCA ATGACCTTGC
 1381 CTCCGCATCC GCTGAGATTG CCCGAGGGAGA AACAGCCRAAT TCTGTTGCTG GTTACATGCG
 1441 TACAAAGGC ATCTCCGAGG AGCTGGCTAC CGAGTCTGAG ATGACCTGA TCGATGAAAC
 1501 CTGTAAGAAG ATGAAACAAAG AGAAAATGGG CGGTCTCTG TTGGCCTAAC CATTGTTGAA
 1561 AACCGGATC AATCTGGCTC GTCAAGCTCA TTGACTTAC CATAACGGTG ACGGGCACAC
 1621 TTGGCCGGAC GAATTGACCC GTAAAGCTGT GCTTCGGSTG ATTACCGAGC CGATCCTGCC
 1681 GTTCAAGAAGA TAATAGGATC C
 (SEQ ID NO:13)

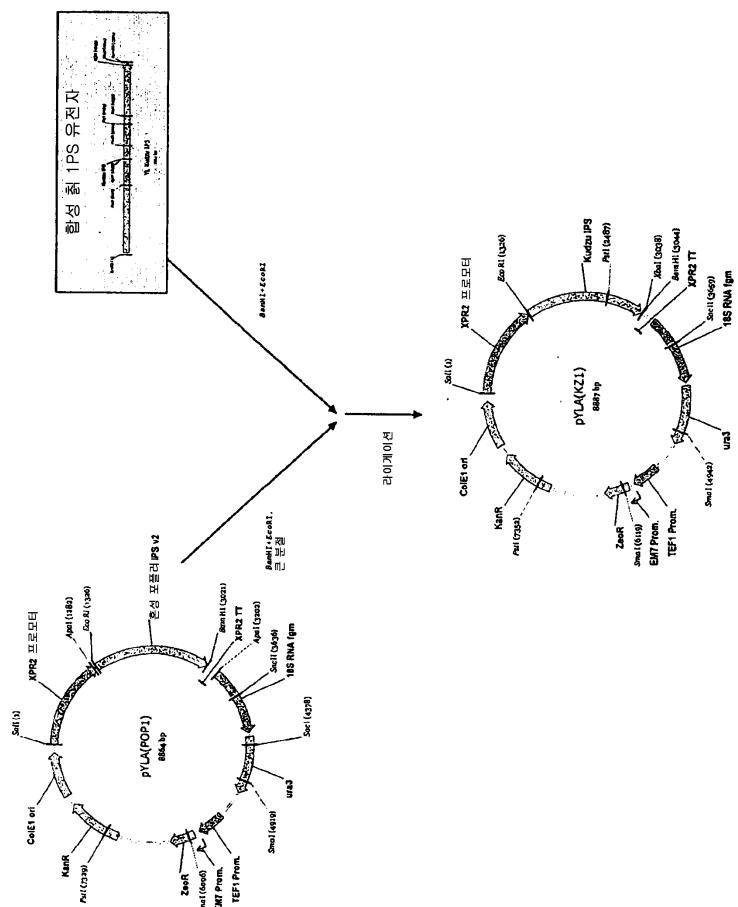
도면 18a



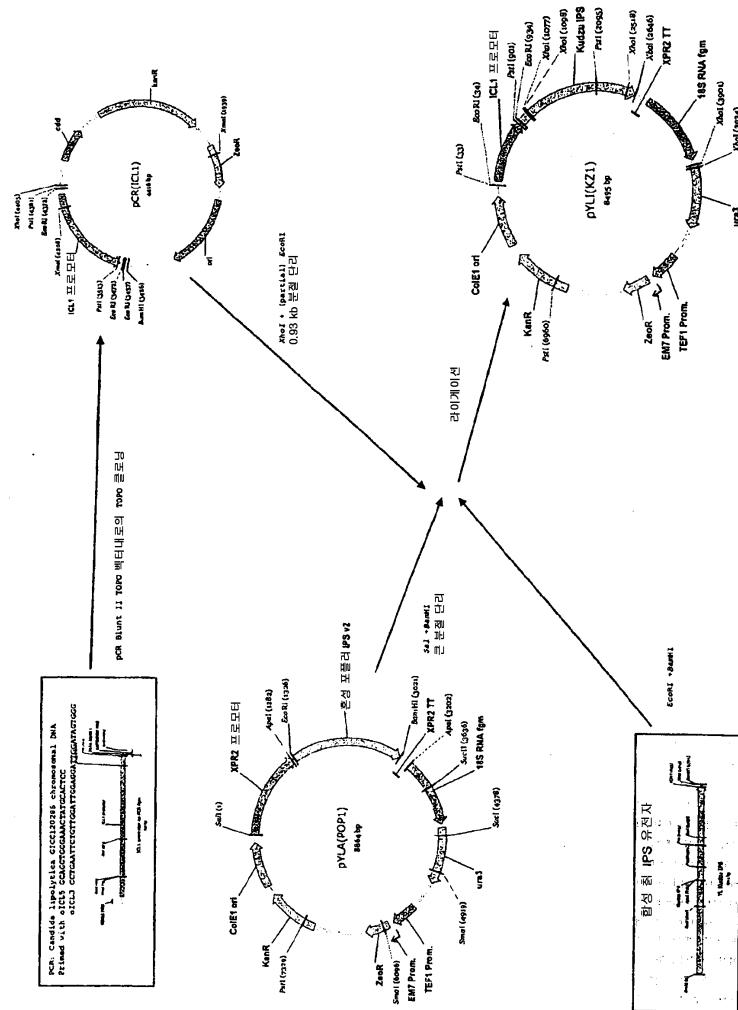
도면18b



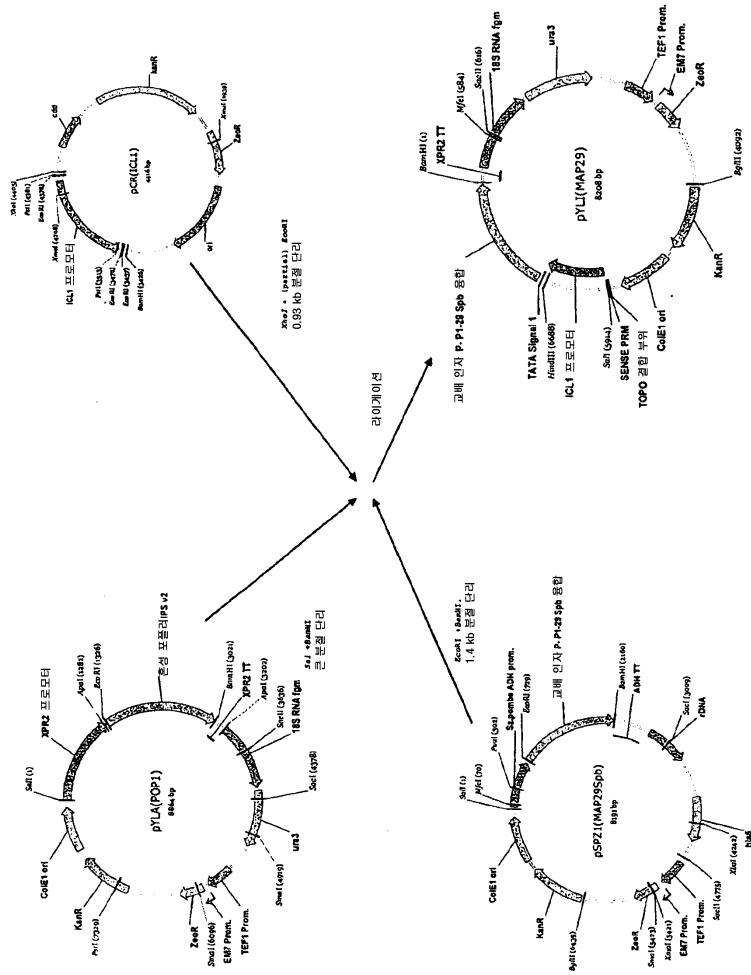
도면 18c



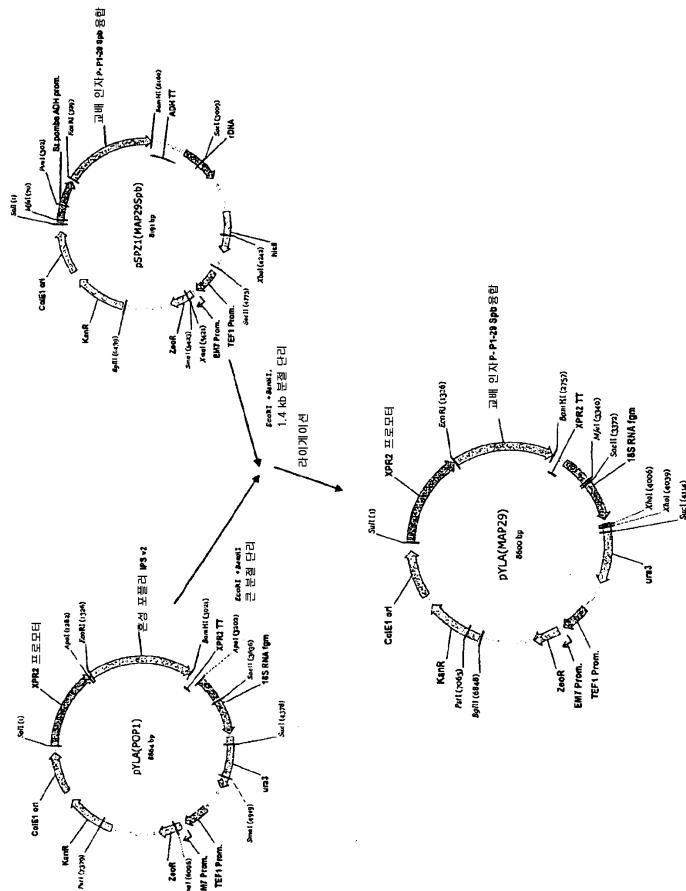
도면 18d



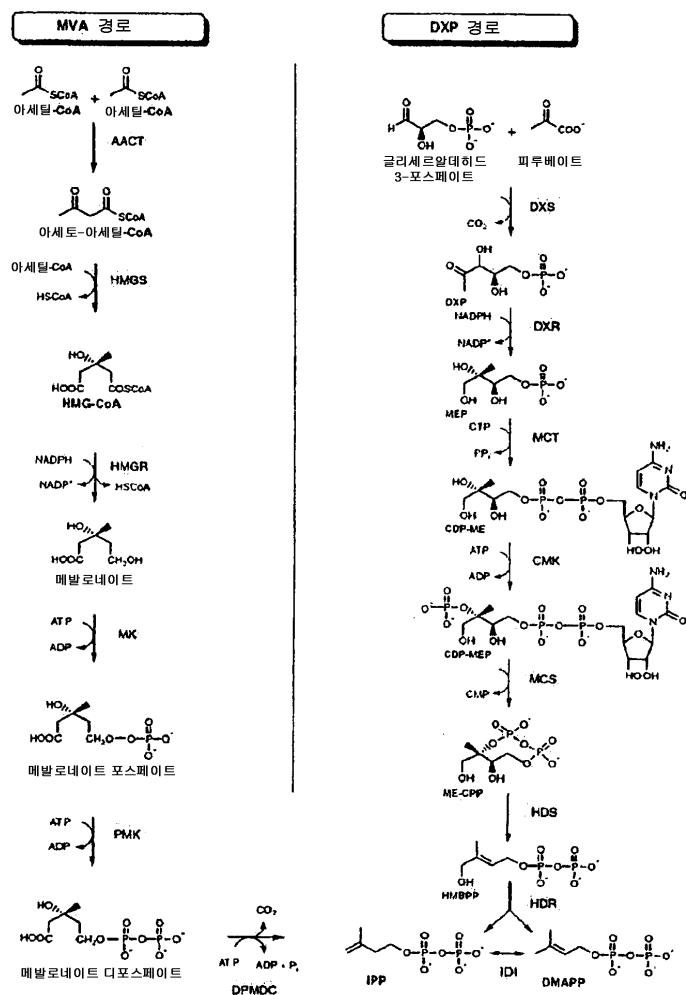
도면18e



도면 18f

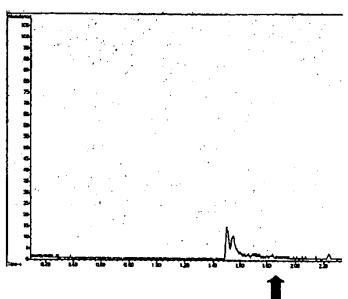


도면19

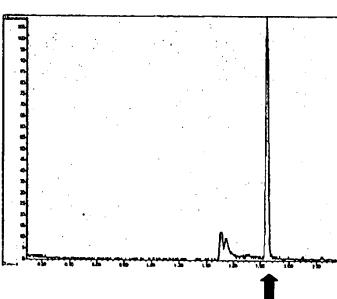


도면20

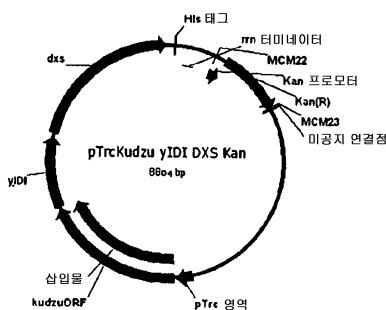
Y. 리플리티카 CLIB122:: pYLA(MAP29)



Y. 리플리티카 CLIB122:: pYLA(KZ1)



도면21



도면22a

도면22b

gagtcaattcagggtggtaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgagagtatgcgg
 gtctttatcagaccgttcccgctgttgaaaccaggccagccacgttttcgaaaacgcgg
 aaaaagtggaaagccgcgatggggactgaaattacattccaaaccgcgtggcacaacaactgg
 gggcaaacagtctgtgattggcgttgcaccctccagtcggccctgcacgcgcgtcgcaa
 attgtcgccgatcaaactgggtgcagcgtgggtgtcgatgttag
 aacgaaggccgtcgaaggctgtaaagccgggtgcacaatcttcgcgcacacgcgtcaatgg
 gctgtatcatcaactatccgtggatgaccaggatgcattgtgtggaaagotgcgtcaactaat
 gttccggcgttatttctgtatgtctgtaccagacaccatcaacagttatatttctccatg
 aagacggatcgactggcgtggcatctggcgttgcattgggtaccaggcaatcgctgtt
 agcgggcccattaaatctccgcgttgcgtgggtgcataatctcaact
 cgcataatcaatttcgcgttgcgttgcgtgggtgcataatctcaact
 aaaccatcgaaatgtgtaaatggggcatcggtccactgcgtatgtgttgcgcacatcgat
 ggcgtggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gtgggatcgcacatccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 attttcgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gaagggtcaatcgatgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 caaaccgcctctccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tggaaaggccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gttatcatcgactgcacqgtgcacatcgatgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 atggctgtcgaggctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 taatgtttttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 taatcatcggt
 ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 taaaataaggagaataaaccatgtgtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttcccgcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aacgaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tgatcaaccgtgttagacaccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gggctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gaaacaaaaaaaacatcgacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 acggtttcgagggttctcaggatgttttgagctgttcaaggataaagggtgttgcgttgcgt
 tgaactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaggcattataaccagggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tctgcaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ctgt
 aagatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cctgt
 aaagctgttactaaaatgtttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 ctctggacactgtcaactgttaccgtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tctatctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcaaaaggcttctgtcaagaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cttggaaaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt

도면22c

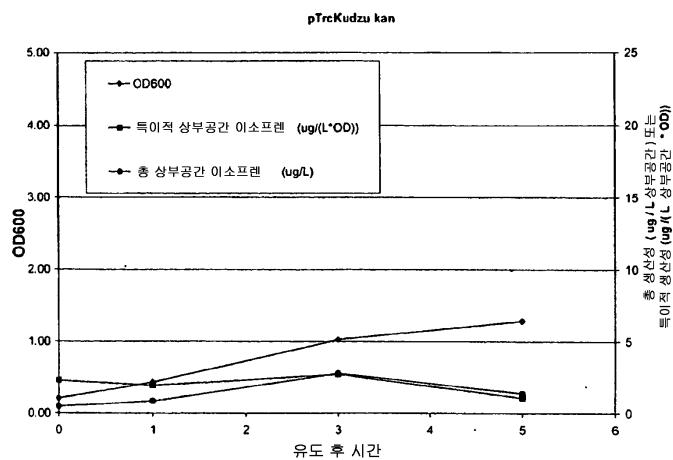
tgccaggcaggagaagacatctccgaccacgcgtgcgttccctgaccgacttccatggcttg
 tgcttagctcgttatctccgcgtgcacgcgtgcgcacccctgcggcggagctgg
 acgtggcagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatgttaccagcgaggaa
 caggcccgcgaagaactcgcttaactgatcgacgcgaatggaaaaagatgatcgtaacgcg
 ttacgcactccacctgtgcctaaagcgctcatggaaatcgcaagttaacatggcacgtt
 ccactgcacccatcaggatggcgttgcggccaggactcgcaactgaaaaccgcac
 aaactgtctgtatgtacccttccgattaaccaggatgtatgtctaactgcacgc
 aggaggtaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgcggcatggcagtagttagtac
 ccaaattagtgcacaaacccaaacccatgcacgatgttggaaagagttccctgaaattattccatt
 acaacaacgacccataatccgcgtactgagacgcctaattgacgcggagaaacatgttt
 tctggcatgtatggaggacaaattatgttattgttggattgggac
 ataatgttattgttgcggatccaagaaatgttgcattatgttggaaaatttgaaaagggtt
 actacatcgtcattctccgtctttatgttcaatgaacaaggtaattacttacaacaaaga
 gcaactgaaaaataacttccctgatcttggactaacatgcgtctcatccactatgt
 ttatgcacgatgttgcgggaaatgcacgatgttgcggacttactgcgg
 ggtggaaaaacttagatcatgatgttgcgggaaatgcacgatgttggggaaatgtt
 cacttttaacagaatccattacatgcaccaagcaatgcacatggggtaacatgaaaattt
 attacatcttatttataagatcaacgctaaagaaaacttgcactgtcaacccaaacgtcaat
 agttagagacttcaatgttgcgggaaatgcacatgttgcggacttgcgg
 aaggatgccttgcgttgcgggaaatgcacgatgttgcggacttgcgg
 atgacccattctgcgggaaatgcacgatgttgcggacttgcgg
 ttcccccattggggatccatgcggggatgcggggatgcgggg
 tcgactccaccaggatgttgcggggatgcggggatgcgggg
 gcggcgttatttgcggggatgcggggatgcgggg
 gtgcggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 tggggcatcaggatgcggggatgcggggatgcgggg
 tcggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 gggcattcatcaacccatgcggggatgcggggatgcgggg
 aaaaatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 gatgatcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 atttccggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 ctgcggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 acgcggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 aactacatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 gcggacatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 agaaaaagccccatcttcacccgcgtgcggggatgcgggg
 aaaaatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 ggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 cggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 ttcaatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 gctggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 gcccattatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 cccggggatgcggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 cgctgcataccggggatgcggggatgcggggatgcgggg
 ataccggggatgcggggatgcggggatgcgggg

도면22d

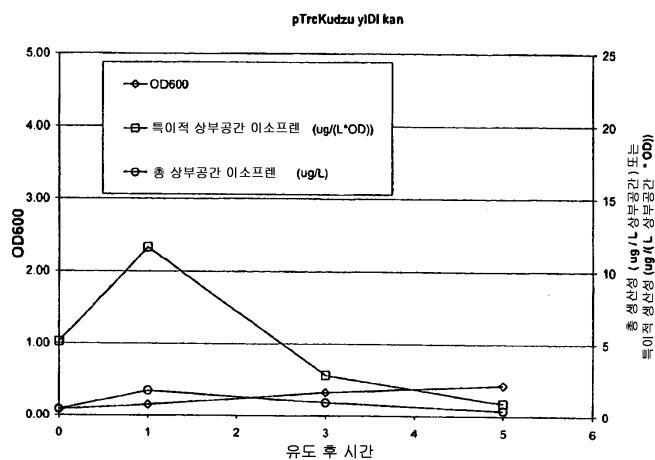
cgtggaaactgacgcggctggaaaaactaccaattggcaaggcattgtgaagcgtcggtggcag
 aaactggcgatcttaacttgcgtacgcgtgcgtgcggaaaatgcgcggaaatgcgcggaaatgcgcgg
 acggccacgcgtgtcgatgcgttttgtgaaaccgcgttgcgtgcgttgcgtgcgt
 cgcgcggccatgcggcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgt
 gtggaaacgtgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgt
 tctttatccgcaaggaaactcaggaaagaaatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
 ggaagccaaaataaggcgtggcataactgc

(SEQ ID NO:20)

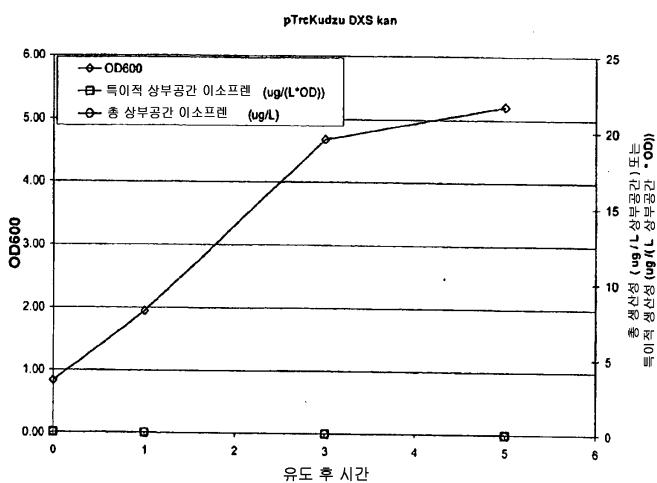
도면23a



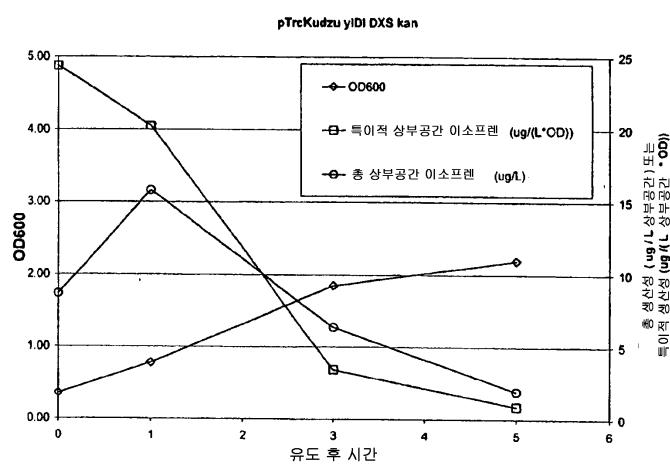
도면23b



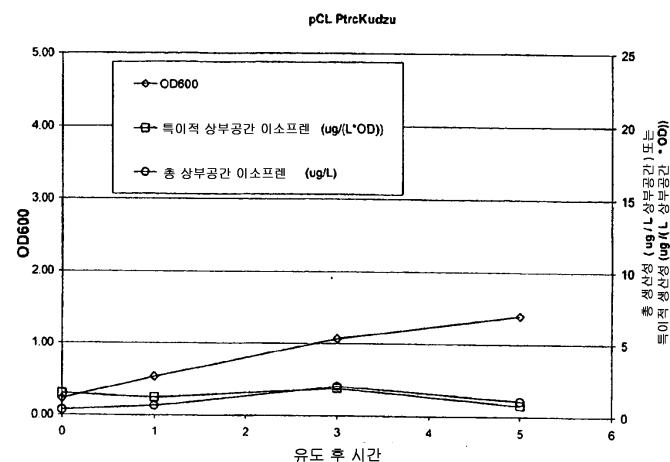
도면23c



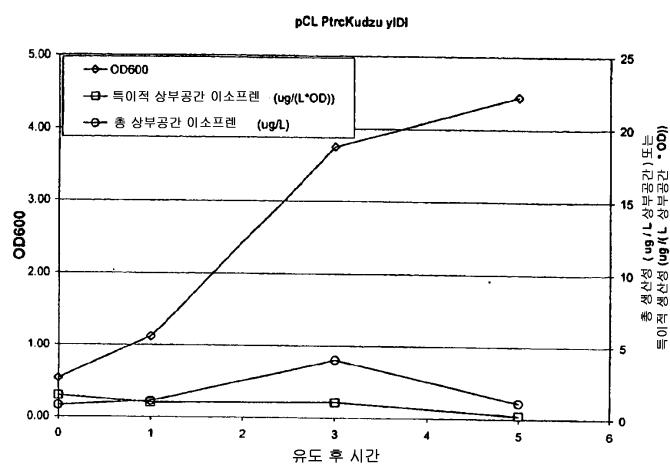
도면23d



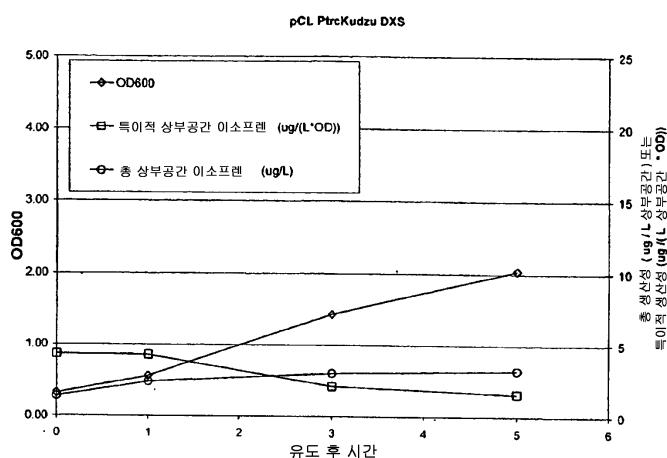
도면23e



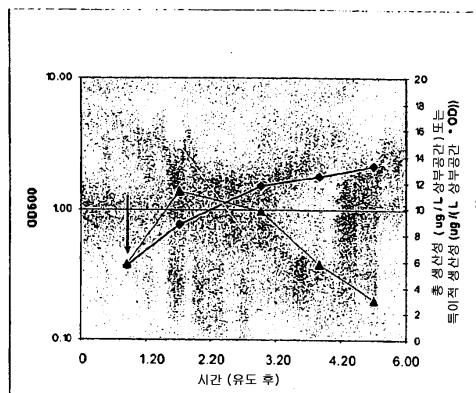
도면23f



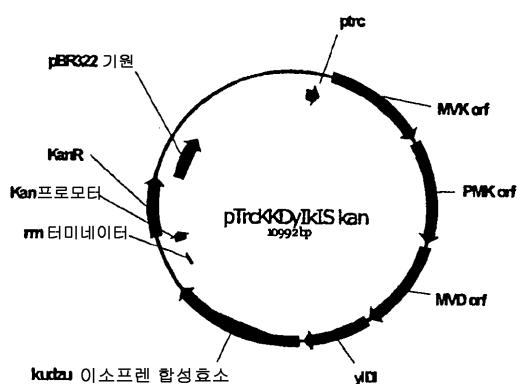
도면23g



도면23h



도면24



도면25a

도면25b

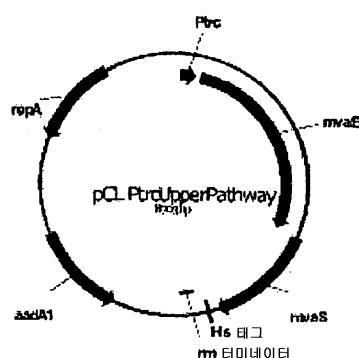
tatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaactagatcgcttac
 acgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtcttgcgaggaaatgactgtacctg
 tcaaaaatctccgtaaatcacagaagtttagatgcagttccacaatttagacgttcctttaga
 aaaataactaaagaatctgtccgatatacgaaacctccgtacaaactagcttattggatgatt
 gccagaccccttaaaggagttcttacttgcttaataacttgcgtgtgtttatgacgcattgc
 atgtgattactaagaagtttagtgcgatcggctcaaccgctaatgacaaaagatttctaaag
 gttaatgcgtgtactcaggctgactgggttagggcttagaaagaaaaagatccggaaactt
 atcttgataaataacttaaggtagtgcgtcagaattcccttaaggagaaaaaaatgaa
 ccgttacacacatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaacccttaagtattggggaaaag
 ggacacgaaggtaatcgccaccatcgccatcatcgacttgcgcaagatgaccc
 agaacatcgatccgtgcgtactgcacctgcgttagttgaacgcgacacttgcgtttaggag
 aaccacacagcatcgacaaactgaaagaaactcaaaattgtctgcgcgacccatcgccatgaaa
 gggaaatgaaatcgaaaggacgccttattcccccattatctcaatggaaactccacattgtcc
 gaaaataacttccatcagcagctggtttagcttccctccgtctggcttgcattggct
 ctgcattgtcaatttacccatcaccatcgacttgcgatatactgaaatctagaatagcaagaaa
 gggctgggttcagcttgcgttagatcgttgcggatcgtggctggaaatggaaaagct
 gaagatggtcatgattccatggcgtacaaatcgacacgcgtctgactggcctcagatgaaag
 ctgtgtccctactgtgcgtatattaaaaggatgttagttccactcagggtatgcattgac
 cgtggcaaccctcgaaactttaaaggaaaatggatcgatcgatccaaaggaaatgtggattcca
 atgcgtaaaggccattgtggaaaaggatgtgcgcacccattatcgatccaaatatttgcatt
 actcttccatgcacatgtttgactcttccctccaaatatttgcattgcattgcacacttccaa
 gcgtatcatcagtggccacaccattatcgatccaaatcgatccaaatcgatccaaatcgatccaa
 ttgtatgcaggccaaatgtgtttacttagtgcgttgcggccacaagaaacaaacgaaatct
 ttatctataaaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggcttcaaccatcaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaggatgtgcaggatgtttactactaacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tgattgcgcggcaaaactgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 taaaaaaaaaatgtgcgcgacaaatcgatcgccatggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tagtgcggaaacaaacactcgatcgatcgccatggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aagacctaatacccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaacggagaaatcgatcgatcg
 catgtgaggcgaaattaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctatgggtgcggatccaaaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcgtcatttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gaaaaataacttccctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgaaatgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaaaactatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttaaacagaaatccattatggcacaaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agacttcaatgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttctgtggaaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctttagggggaaaaaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cccgtcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cgacctgaaatgtggggaaaagctggggaaaagcgacccaaacttgcgttgcgttgcgttgc

도면25c

도면25d

ggcatgcctgcttgcgaatcatggggaaatggccgtttctggattcatcgactgt
 gcccgtgggtggcggaccgtatcaggacatagcgttgctaccctgtatattgtgaaga
 gtttgcggcgatggctgaccgttcctgtgtttacgttatcggctcccgattcgca
 cgcattgccttctatgccttgcgtacggatgttctgtacgcataccaaatcccttaacgt
 agtttcgttccactgagcgtcagacccctgtaaaaagatcaaaggatctttagatcc
 tttctgcgtatctgtgtttccgaaggtaactggcttgcagacgcagataccaa
 atactgtccttctagtgttagccgttaggttagccaccacttcaagaactctgttagc
 atacctcgctctgtatactgttaccgtggctgtccgtggcataagtctgttacc
 ggttggactcaagcgtatggcataacggcagcggctggctgaacgggggttcgt
 gcacacggccagttggcgtacccataccgaactcggatataccctacggctgagctat
 agaaacgcgcacgttcccgaaaggagaaaggcggacaggatccggtaacggcagggtcg
 acaggagagcgcacgcggggaaacgcctgttatcttatactgttgcctgtcggt
 ttccgcacctgtacttgacgcgtgatttgtatgtctgtcgatgggggggggg
 aaacgcgcacgcggcccttttacggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttccctgcgttccctgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgcgcgcagccgaacgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg
 gcggttttccttacgcatctgtcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atctgtctgtccgcatacgatgttttttttttttttttttttttttttt
 ggctgcggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg
 tccgcttacagacaagctgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caccgaacgcgcgaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg
 gacaccatcgaatgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 tcagggt
 tcagaccgttccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gaagcggcgtggcgagctgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 agtcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ggcgatataatctcgccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ttaactatccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gtatttctgtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgcgactggcggtggcgacatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 cattaaatctgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aattcagccgtatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 caaatgtgtatggggcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 cgacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ctgt
 atcgt
 ctctcccccgcgttggccgattcattatgtcgttgcgttgcgttgcgtt
 gggactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 (SEQ ID NO:33)

도면26



도면27a

도면27b

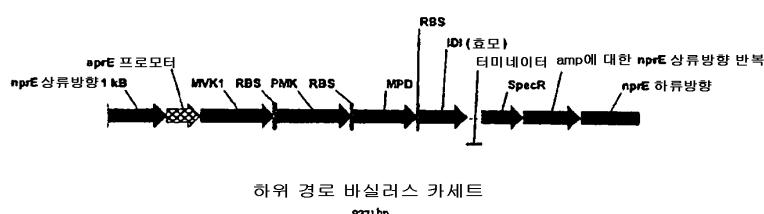
tgataaaaattagttttgtcccccttattatattgatatgacggcactggctgaaggcaga
aatgttagaccctggaaatttcataatttgtatggcaagccaaatggcggtaacccaatca
gccaagatgttgcacattgcggcagccatgcgcagaagccatgttgcaccaaagaataaaa
ggcattgtatgttgcggactgatgttgcgtatcgatcggatgttgcaccaaggcggcagg
gtttcacatcggttaatgggatcaacccttcgcgttgcaccaatcgatcggatgttgc
acggagcaacagcaggcttacagtttagataagaatcacgttagccttacatccagataaaaa
agtcttgtcgtagccgcatatgtcaaaatatggcttaatcttgcgggtgagccatcacaaagg
gctgggggggttgcacatgttgcgtatgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
tgcgtgcaccaagatatactatgcattttggcgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
tggcttgcaccaacccatccatcataatcttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
cgaaaaacgggttgcattttgcagattatgtgttgcgttgcacccatcataatggggatgttgc
gcaaaaaagccattatgcacccatcgccaccaactggacggacacggacaaatgttgc
ccgttatgaaaaagatatactgttgcgtatgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
ctggactcattccctttagaaaaatgcacccgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
tcagttatggtctgggtgttgcgtatgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
tcatt
tatgaaggcatgtttgcagaaaaatttttttttttttttttttttttttttttttttttt
aatatagtt
gtaccatattggaaatttgcacccatcatcatcatatgcgttgcacccgttgcaccaatgg
gcgcgttgcacccatcatcatcatatgcgttgcacccgttgcaccaatggggatgttgc
ggatgagaaatgttt
agaattttgcgttgcggccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
acgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
aataaaacgaaaggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
gttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
ggtggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg
ggatgccttt
atccgctcatgagacaataaccctgtataatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
cgccaccggccccccttcccaaaacagttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
tttccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
tgatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
ctcgtagatttatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
cagcccttgcgtatataatctccaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
agcagacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
taagccgc
ggtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
tcttccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
ccaaatggccggccaaacgatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
catagccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
cctccggccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
atcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
aatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
cttctacagcggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg

도면27c

도면27d

Atcaggcacctgagtcgtctttcgtagcattcgtgcgtgcgtacggctctggcgt
tgaatggggtaaatggcaactacaggcccttatggattcatgcaaggaaactaccataa
acaagaaaagcccgctcacgggcttcagggctttatggggctctgtatgttgtctatc
tgacttttgcgttcagacttcctgcctctgatttccagtcgtgaccacttcggattatc
cgtagaggcttcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggcta
(SEQ ID NO:46)

도면28



도면29a

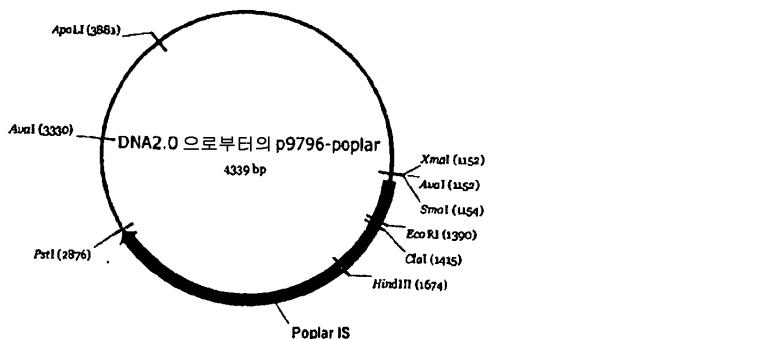
도면29b

도면29c

도면29d

Ataaaagctaatacgattccgatcataattgtatagacgaaattctgcatacggttcacgtggcat
gtgaaggatcgccgcgtccatgttaagacaaaacattgacaaaaaaatttattatgtcaaat
ttactattaatataatttgtatgtataataagattctccgtggccagggaatcttatttttgt
gaggatcattcatgtggaaaaatagtcccgacttaacgtctctaattcagctttgcccgtg
catatcacacccgatgacacaccccttattttgtatgttattatgcacaaaagatctcattaa
cggaaaaagatgtttatcgacatcgatcaaaaaatatgttcaagaaaatatgttttcaacaaagag
atcgccgaacgtcttcaaatgtatctgtggaaaaaaatttataatgggttcacaaaatccagctgt
ctccaaccccccttagcagctgttcttattgtggaaaagttctgcacaacgaattatctggg
ggggaaaaacagatgtcattttggagcgggactggatactttctgcittcggcatccagaattt
gaaaacacgttacacgggttccgaggttgcattccggccacacagcaattggaaaaaaataagc
tttgcggatgcacaaatctgggttcattttgttcttgcattttccacaaaaacccacccac
gttttgcgtatgtatcttcttagatgtggaaaaaaacacaaaaacattcttcgcaccccttc
ggagtgttcttattatgtacacccggagaaaaatgtcaagcttgcatttttgcaccaatttttgc
tcccgcttgcacgtcttatgttttgattatgtggacaaacacttttgcaccaaaaggac
gtcgaatcgatgttgcacatgtgtggatgtggctgcgcacagcgggaaaccgtatgt
tttccatataacagagatgttgcacatgt
(SEQ ID NO:47)

도면30

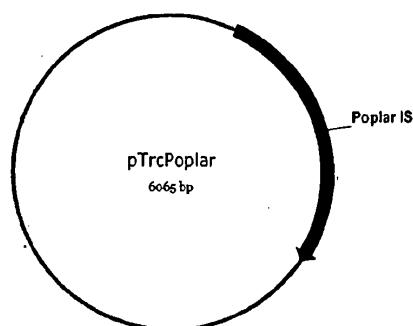


도면31a

도면31b

ggcacgtcagaggccactgcacctaccacaatggtacgcacatactagccggatgaaactgact
 cgtaaaacgtgtactgtctttatcaccaaccgattctgccgttgcacgttaactgcacgcgc
 aatcgaaaggcgacacaaaattttctaaatgcataataaataactgataaatcttagtt
 ttt
 att
 atcataataatagatgaatagtttaattataagggttcataatcgaaaaagcaacgtatctt
 atttaaagtgcgttgcttttctattataaggtaataattctcatatatcaagcaagt
 gacaggcgccctaataatattctgacaaatgctttccctaaactccccccataaaaaaaccg
 ccgaagcgggttttacgttatggcgattaaacgattactcgttatcagaaccggccagggg
 ccccgagtttaagactggccgtttttacaacacagaaagagttgttagaaacgcggaaaaaggcc
 atccgtcagggccctctgttagttgtatgcctggcagtttctactctcgccctccgttcc
 tcgctactgactcgctcgctcggtcgccgtcgccgacgggtatcagctactcaaagg
 cggtaatacggttatccacagaatcagggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcca
 gcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggcccggtgtctggcggtttccataggtccggccccc
 gacgacatcaaaaaaaaatcgacgtcaagtcaaggggtggcgaaaccccgacaggactataaagat
 accaggcgtttcccccggaaactccctcgctcgctccctgttccgaccctggcttacccg
 atacctgtccgccttctccctcggaagcggtggcgcttcatagctcacgctgttaggt
 ctcaagtccgtgttaggtcgctcgctcaagctgggtgtgtcacgaaccccggttacggcc
 accgtcgcccttacccggtaactatcgctttagtccaaacccggtaagacacgacttatcgcc
 actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgttaggcgtgtacagagttc
 ttgaagtggggctactacggctacactagaagaacagttttgtatctgcgtctgtga
 agccaggtaaccttccggaaaaagggtggtagctcttgcgtccggaaacaaaccaccgctggtag
 cgggttt
 ttatcttttctacggggctcgacgctcagtggaaacgcgcgcgttaactcacgttaaggat
 ttt
 (SEQ ID NO:48)

도면32



도면33a

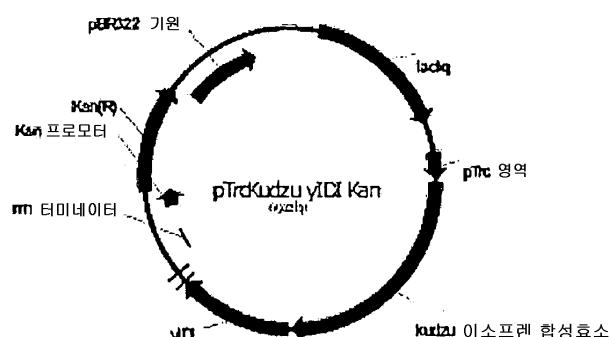
도면33b

cgtgtcgcccttattcccttttgcggcatttgccttcgtttgctacccagaaacgc
 tggtaaagtaaaagatgctgaatcagtgggtcacgagtggttatcatgaaactggatct
 caacacggtaagatcctgagatccgttgcggcaagaacgtttcaatgatgagcacttt
 aaagttctgtatgtggcggtattatccgtgtgacgcggcaagagaactcggtcgcc
 gcatacactatttcagaatgacttgcgtgagactcaccagtcacagaaaagcatcttacgga
 tggatgacataagagaatttatgcgtgtccataaccatgagtgataaacactgcggccaac
 ttactctgacaacgatcgaggagacgaaaggagctaacccgttttgcacaacatggggatc
 atgtactcgectgtatgttgcggacccggagctgaatgaaagccataccaaacgacgagcgtga
 caccacgatgcgttagaatggcaacaacgtgcgaaactattaactggcgaactacttact
 ctatgttcccgcaacaattaatagatgtgggggggataaaagtgcaggaccacttcgc
 gtcggccctccggctgtgttatgtgtataatctggagccgtgagctgggtctcg
 cggatcattgcagactggggccatgtgttaagccctccgtatcgttagttatctacagacg
 gggagttagggactatggatgaaacaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgatta
 agcattgttaactgtcagaccaatgttactcatataacttttagattaaaacttcatt
 ttaataaaaggatctgtgtgtaaagatcctttgataatctcatgacccaaatcccttaacgt
 gagtttcgttccactgagcgtcagaccggatgaaaagatcaaggatcttgcagatcctt
 ttttctgcgtatctgtgttgcacaaaaaccaccgtaaccagcgggttttt
 gccggatcaagagacttaccaacttttccggatggacttgcgttgcagagcgcagatacca
 aatactgtccttactgttagccgttaggtggccaccacttcagaactctgttagcaccgccta
 catactcgctgtctgtatctgttccgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgttcttac
 cgggtggactcaagacgatgttacccgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgttcttac
 tgacacagcccaacttgcgtggcgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgttcttac
 gagaacggccacccgttccggatgggggaaaggccgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgtt
 aacaggaggcggccacggggggatccgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgtgtccgt
 tttccgcacccctgttgcgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgtggcgtatgttgcgtt
 aaaacggcccaacgcggcccttttacccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgtggcgtatgtt
 ctttctgcgttatccctgttgcgtgttgcgttgcgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 gtcgtccgttgcgttgcgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 tgcgttgcgttgcgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 aatctgtctgtatccgttgcgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 tggcgtccgttgcgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 atccgttacacacaactgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 tcaccggaaacgcggccggcggcgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 tgacaccatcgatgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 ttcaagggtggatgtgaaaccactgttacccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 atccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 ggaaggccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 cagttgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 cggcgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgt
 attaactatccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 cgttatttctgtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 tacccgtacttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt
 ccattaaagtgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgtgtccgttgcgt

도면33c

aaattcagccatagcggaaacggaaaggcactggagtgccatgtccgtttcaacaaaccat
 gcaatgctgaatgagggcatgttccactgcgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 acggataccgaagacagactcatgttatatccggcgtcaaccaccatcaaacaggatttcg
 cctgtggggcaaccacggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aatcagttgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ccttcccccggccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 (SEQ ID NO:49)

도면34



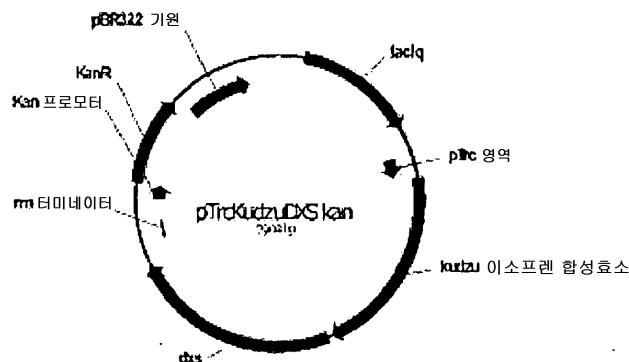
도면35a

도면35b

도면35c

gcatgcggccggtcgatcgcctgtatccggctactgcccattcgaccaccaagcgaaacatc
gatcgagcgacacgtactcgatggaaaggccgttgcatacgatctggacaaga
gcatcagggtcgccgcacccgaaactgtccgcagctcaaggcagatgccgcacggcag
gatctcgctgtgacccatggcgtctgttgcgatccatcgatgtggaaaatggccgttt
ctggatcatcgactgtggccgtgggttgccgacccgtatcgaggatatacgctgggtac
ccgtatgtcgaaagacttgcgcgaatggctgaccgccttcgtcttgcgtac
gcccgtcccgattcgcagcgcacgccttctatcgcttgcgtacgaggatcttcgc
aaatccctaactgtgtttcgccactgagcgtcagaccccgtagaaaaagatcaaaggat
ttcttcgtagatcttttctgcgtatcgatgtttcgatcgatccacccacccgttacc
agcgtgtttgttgcggatcaagactaccacacttttcgcggatactgttgc
agagcgcagataccaaatactgtcctctagtgtagccgtatggccaccacttcaagaact
ctgtacccgcctacataacttcgcctgtatctgttaccagtggctgtccgcagtgccga
taatgtcgcttacccgggttgactcaagacgtatgttacccgataacggcgcagcggtccgg
ttaacgggggttcgtgcacacagccccatgggagcgaacgacactacccgaaactgatacc
tacagcgtgagctatgaaaaagcgcacccgttcccgaaaggagaaacgcggacaggatccgg
aaggccggatccggatccggatccggatccggatccggatccggatccggatccgg
tatagtcctgtgggttcgtccgcacccctgtacttgatgtggctgtccgg
ggcggagccatggggaaacgcgcacacgcggccctttacgggttgcgttgc
ttttgcacatgttcttcgtgttacccctgttgcgttgcgttgcgttgc
gatgtggatccggatccggatccggatccggatccggatccggatccgg
cggaagagccgtatgggttccgcacccgttgcgttgcgttgcgttgc
gtgcacttcgtactacaatctgtctgtatggcccatagttaaacccgtatcc
tacgtactgtggatccggatccggatccggatccggatccggatccgg
(SEQ ID NO:50)

도면36



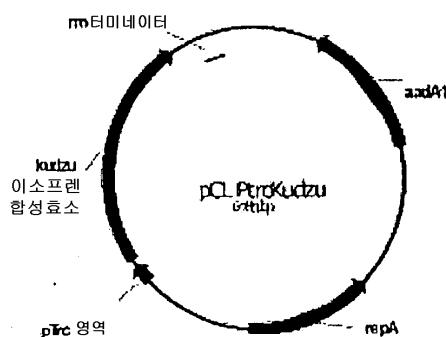
도면37a

도면37b

attaacaccctgcccactataatgaaactgttttctggactgtacaacaccgtaacgaca
 cgtccatttatctgaagagaaggcataacaacctgcctatctgacaaaactggcg
 tgaactgtcaaaaggcattctgcaagaggcgaatggcaacaacaaaattatccggcttc
 tccaagtacctgaaaaacgcccagcggttctctccgggttagcgtctggccgcttaact
 ttccgttatgccgcaggagacatctccgaccacgcgtcggtccctgaccgacttcca
 tggctggtgctctagctgcttatctccgctgtcaacgatctggccacctctgccc
 gagctggaacgtggcgagactaccattatcattagctacatgacgaaaacgatggatcca
 gcgaggaaacaggcccgcgaagaactgctgtaactgatcgacgcccgaatggaaaaagatgaatcg
 tgaacgcgttagcactccaccctgctgcttaaggcgtcatggaaatcgcaactatgca
 cgttccactgacccatcaggatggcgatgtcggtcccgactacgcgactgaaa
 accgcatcaaactgtgttgcgttgcgttcccgatataccagctgtatgtctaactgca
 ttcccttagggtaaaaacatgatgttgcataatccgaccctggcactgg
 tcgactccaccaggactacgttgcggaaagagaggttaccgaaactctgcaact
 gcccgttattactcgacagcgttgccgttcccgacttcgcctccggctggcag
 gtcaactgacccgttgcgtcactatgtcataacaccccgatgtgaccaattgtggatg
 tgggcatcaggcttccgcataaaatttgacccgacgcccgcacaaaatccgcaccatcc
 tcagaaaggcggctgcacccttccgtggcggcggaaagcgaatatgacgttataagcgtc
 gggattcatcaactccatcgtggcggaaatgttgcgttgcggcggaaaagaaagcga
 aaatcgccgcacccgttgcgttgcgtggcggatgtggcggatgtggcggatgtgg
 gatgaaatcgcggcgatatccgttgcgtatgtcggtatctcaacgacaatgatgc
 attccgaaaatgtcgccgcgtcaacaaccatctggcacagctgttccggtaagcttact
 ctcaactgcgcgaaggcggaaaaaaatgttctctggcgtccggcaatggcgtctca
 acgcaccgaagaacatattaaaggcgttgcgttgcgttgcggcggatgtggcgg
 aactacatccggccgtggcggatgtggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcaactgaaaggccgcgttccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 agaaaaagaccgcgttccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaaatgtcgccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cgaaagacaacaactgtgtggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttcaactatccggatcgctacttcqacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gtcgggtctggcgattggtggatcaaaaccattgtcgatgttactccacttctgc
 gcccattatgtcggatgtcgatgtccggatcaaaaggctccgttgcgttgcgt
 ccgcgcggcattttggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cgctcataccggaaatggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ataccggctatcactataacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaactggcgatcccttaactttgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 acgcacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cgcacccatgaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gtgaacgaagtgtgtggccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tcttattccgaaggactcaggaaatgcgcggcaactcggctcgttgcgttgcgt
 ggaagccaaaatcaaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tctagaacaaaactcatctcagaagaggatctgaaatgcgcgttgcgttgcgt
 catttagtttaacggtctccagttggctgtttggcggatgagagaagatgttgcgt
 acagattaaatcagaacgcagaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt

도면37c

(35Q 12 Nov. 5



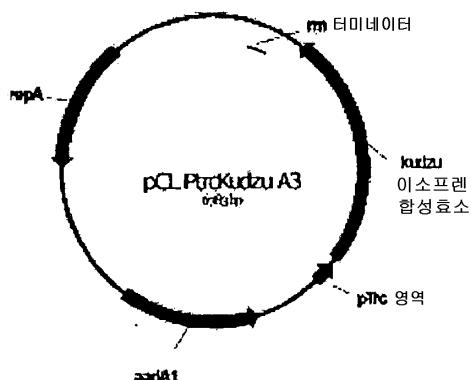
도면39a

도면39b

도면39c

atctgacaaaagctggcgtgaactgtgc当地有大量地名和人名，无法一一识别，建议使用全文本搜索功能进行查找。
(SEQ ID NO:52)

도면40



도면41a

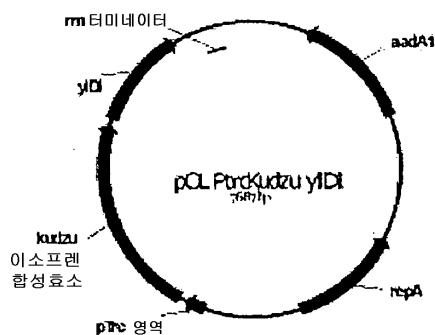
도면41b

tatgccgcatagttaagccagccccgacaccgcacaccccgctgacgagcttagtaaagcc
 ctcgctagatttaatgcggatgttgcattacttcgcaactattgcgataacaagaaaaagc
 cagccttcatgatatatctccaatttgcgttagggcttattatgcacgctaaaataaaa
 agcagacttgcattgttagttgcgttagcaattatgtgttagtgcacctaactgcgttgagt
 taagccgcgcgcgaagccgcgtggcttgcgttagcaactttgcgttagcattttgcgactac
 ggtatctcgccittacgttagccaaatttgcctcaactgtatctgcgcgcgaggccaaagcg
 tcttcttgcgttcaagaataagccgttgcgttagctcaagttatgcacggctgatactggccg
 ggcgcattgcgcgttgcgttagccatgcgcgcgttgcgttagtgcgttgcgttgcgt
 ccaatgcgggacacgtaaagccacttgcgtcatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
 catagcgttaggttgcgttgcctcaaatagatctgttgcgttagaaccggatcaaagagtt
 cctccgcgcgttgcgttagccaaaggccactgcgtatgttgcgttagtgcgttagcc
 atcaatgtcgatgttgcgttagtgcgttagccaaaggccactgcgttagtgcgttagcc
 aattgcgttgcgttagtgcgttagtgcgttagccaaaggccactgcgttagtgcgttagcc
 ctgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 caaagcgcgcgcgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tggttgcgttagccgcgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 gatggcgtcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 cctcatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 aacatcaacatgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagt
 ccccaaaaaaagcgtatcaaaacgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ggtcaagggttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 caggcttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tggcgcgcgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 cagcgtcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ccctggcttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 atgaagtgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagt
 tggacacggcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ggcacgtatcgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tggcaccaggctgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 gttctgtgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 agcgtatcttcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 tgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 gctgttacaactgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 ctgttctatttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 gtgcgtatggcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 gtcttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 gtatgttcttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 cttaacttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 gcatcgtagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 tttgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tagttcaacttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 ttgtgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 catggtagttttcaagcatgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 (SEQ ID NO:53)

도면41c

tttgtgagttttttgtttagtttttaataaccactataatcctcatagagtattt
 tttcaaaagacttaatgttccaggatataatttatgtatgtttaactggaaaagataag
 gcaatatcttcactaaaaactaattctaattttcgcttgcgttagaacttggcatagttgtca
 ctggaaaatctcaagccattaccaaaaggattctgttgcgttagtgcgttagtgc
 ctgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ggttataatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tgccacacagcataaaatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tcatttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tataccaaatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 ctgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 gtagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 aaaaaaaaaaaaaaaatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 gcaatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 aaaggcttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttag
 atcaggccatgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tgaatggggtaatggcactacaggcgccttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 acaaaaaagccgtacggcgttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 tgacttttgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 cgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgcgttagtgc
 (SEQ ID NO:53)

도면42



도면43a

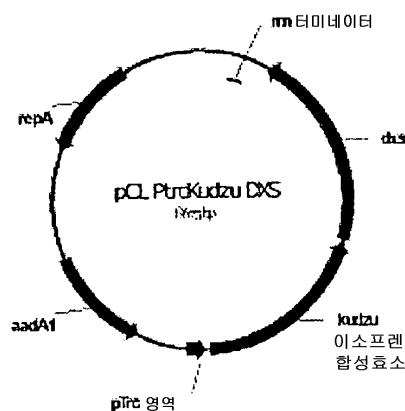
5' -
 ctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatccgtcccttccaaacagttgcgcagccgtaatggc
 gaatggcgctgtatgcgttatatttccttacgcattgtcggtatttcacccgcataatgg
 gcaacttcagtacaatctgtctgtatgcgcataagttaaagccctcgcttagatttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac
 cgcgtacgagcttagtaaagccctcgcttagatttaatgcggatgttgcgattacttcgccaac
 tattgcgataaaaaaaaagccacgttcatgatataatcccaattttgttagggcttatt
 atgcacgctaaaaataaaaaaaagcagacttgacctgtatgatgttgcgatggcaattatgtgc
 ttatgtcatctaacgtttagttaaagccgcgcqcaagcggcgtcgccgtqaacgaaattgtt
 gacattatttgcgactaccttggatctcgcccttacgtatggacaatttccaaactg
 atctgcgcgcgacggccaaacgcataatcttcttgcgatccatgcgtatgttcaatgtatg
 acggcgtatactggccggcgcgtccatgcggcgtccatgcggcgcgcacatccgcgcgc
 tttgcggtagtactgcgttgcgatccatgcggcgcgcacatccgcgcgc
 agccagtcggccggcgatgttccatagcgttaagggttcatgcgcctaaatagatccgt
 tcaggaaccggatcaaagagttccgcgcgttgcgatccatgcgtatgttccatgcgcgc
 cttttgtcagcaatgcgtatgcgtatgcgttgcgtccatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 acggcgtatactggccggcgcgtccatgcggcgcgcacatccgcgcgc
 ttcgtatgcgtatgcgttgcgatccatgcggcgcgcacatccgcgcgc
 aagttccaaaaggtcgatcaaagatgcgcgcgttgcgtatgcgcgc
 aaccagcaatataatactgtgttgcgttgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 acggccgcacgcgtcggtcgatggcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 atacttcggcgtatccatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 cgtaacatcgatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 gatgcggcggcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgcgtatgc
 cgcgttaccacccgtcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcattacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggtgtcggtcaccggcaaccttggcgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caagggtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttggcggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 gtttgcgtcccgccatgtgtatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caaggatctggatattcgtatcaccgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tgctttgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cgatgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cagatccttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agaacgaaccattggagatcacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gagctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tctgtatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc

도면43b

도면43c

atctgacgaaaagctggcgtaactgtgcaaaagctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaa
 caaaatttatcccgcttccaaagtacctggaaaacgcacgcgttctctcccggttagcg
 ctgcggccgcgttactttccgtatgccagcagcaggaaacatctccgaccacgcgcgtgc
 gttccctgaccgacttccatggctgtcgcttctagctgcgttatctccgcgtgcaacga
 tctggccacctcgccggagactggacactaccattatcattagctacatg
 cacaacacatgttaccagcggagacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgtcgacccg
 aatggaaaagatgaaatgtgaaacqcgtaqcgactccaccctgctgcttaaagcgatgg
 aatcgagttaaatggcacgtgttccactgcacccatcgatgtggatggctgg
 ccagactacgcgactgaaaactgcgtgacccttcccgatataaccagg
 tgatgtatgttactgcattccgtttagggtaaaaaaaaaaaaaatgactgcgacaacaatagta
 tgccccatgttgcgttactgttgcggaaacactgaaagacatgttgcgttgcgttgcgt
 ggaagagttccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aatgacgaaagcgggagaaacatgttttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttatggaaaatatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 caaggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 acacatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 taagattaaggcgcttacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gatggaaactaagacaagggttactttcaattttaaacagaaatccattatggcc
 atgaaaccatgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ctgtactgtcaacccaaacgttcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaaactatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 acttattcaactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tagaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaaactatctcaagaggatctgaatagccgtcgcattatcatcatcatcatcatcat
 taaaacggctccatggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 atcagaacgcgaaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cctgacccatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 atgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 catcaaattaaacgacaaggccatctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tttatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 caataat
 (SEQ ID NO:54)

도면44



도면45a

도면45b

도면45c

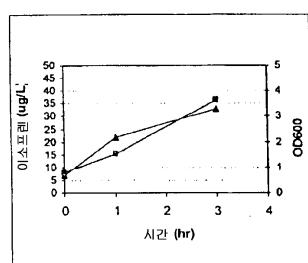
cttacggtaaccagcaaatcaatatactgtgtggccttcaggccgcatccactgcgg
 agcgatacaatgtacggccagaacatcggtcgatcgatgcacccaactaccc
 tgatagtttagtgcataacttcggcgataccgcctccatcatgtttaacttttttagg
 cgatcgccctgtcgatcacatcggtgtgcctccataacatcgaccccacggcgtaac
 ggcgttgcggatggatgcccggaggcatagactgtaccccaaaaaacagtctataacaaggcat
 gaaaacccgcaactgcgcgttaccaccgcgtcgatcgatcgatggccactgggtcgct
 tcatccgttccacgggtgcgtaccggcaaccttgggcagcagcgaagtgcgaggcattct
 gtctggctggcaacggcgaaggcgttgcgtccacgcgtcaggcatggccgttgc
 ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggcgttgcggcgcttgcgggtgtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggaaggcgagcatgtttgttgcggcagttgtatggaaacgggcgtgcgttgcgttgc
 ttgcactgcgggtcaaggatctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcttcaaggatcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttaatccccacgggtttgcggcggatggatggcggcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atcgagatccgggttgcgggttgcgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tttttccacggggaggcgtactggcccccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tctgtatctatcttttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tgaacgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agcataagaacccatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tatgttaggttaggaatctgtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtccggcggcttcgttatccaccaatttcatttgctgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgttcaaaacccattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gaactttaattcatcaaggctaattcttatattgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttataataaccactataatctcatagatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tatattttatgtatattttactggaaaagataaggcaataatcttcttcaatttca
 taattttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggattccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 catttccttactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acatacatctcaattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ataattactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atattcaagtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cggccctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cggcaatcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc

도면45d

Gtgcatttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cttttatggattcatgcaggaaactaccataatacaaggaaagccgtcaccggcttca
 gggcggttatgcgggtctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 (SEQ ID NO:55)

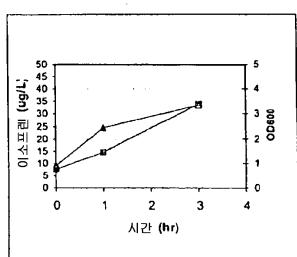
도면46a

A.



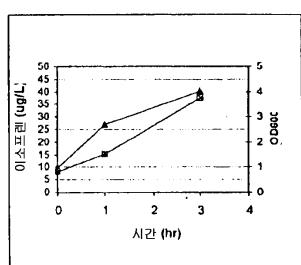
도면46b

B.



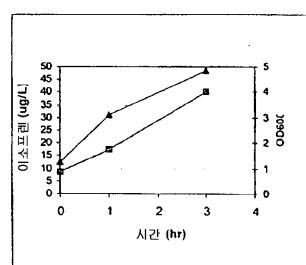
도면46c

C.



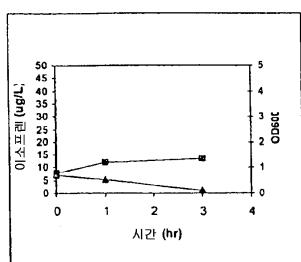
도면46d

D.

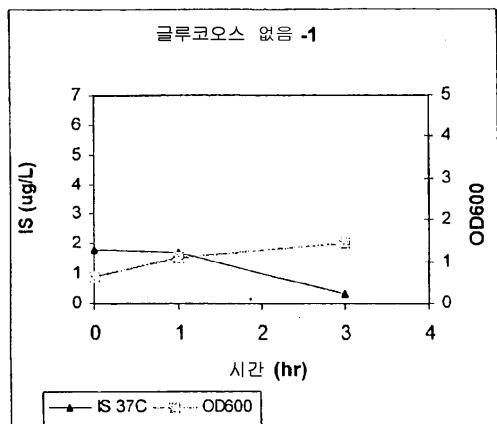


도면46e

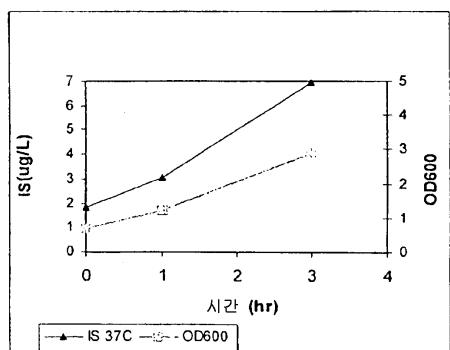
E.



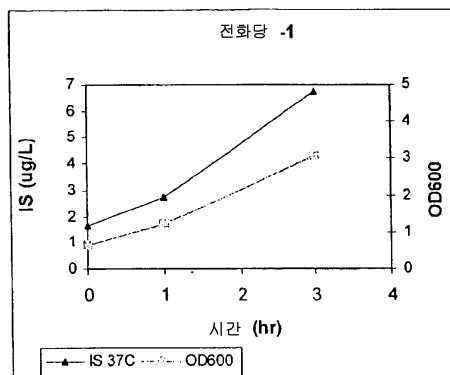
도면47a



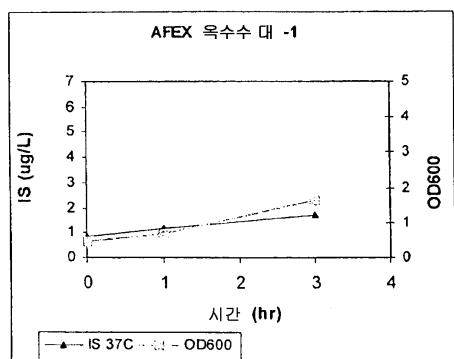
도면47b



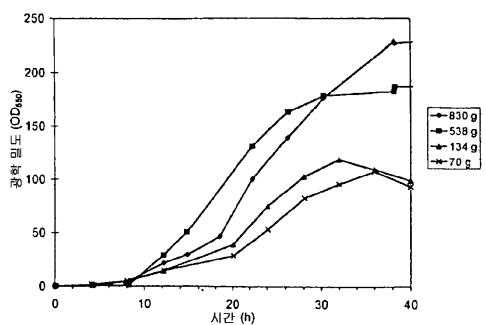
도면47c



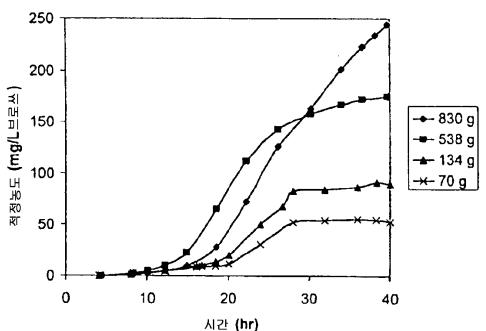
도면47d



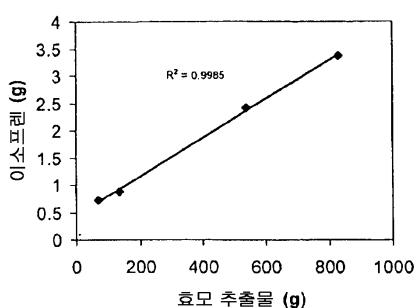
도면48a



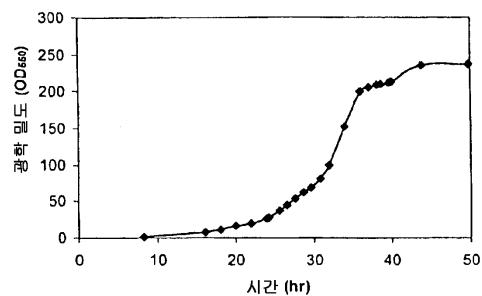
도면48b



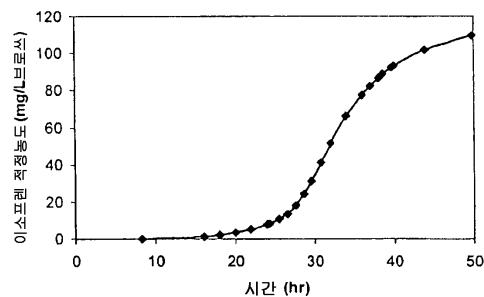
도면48c



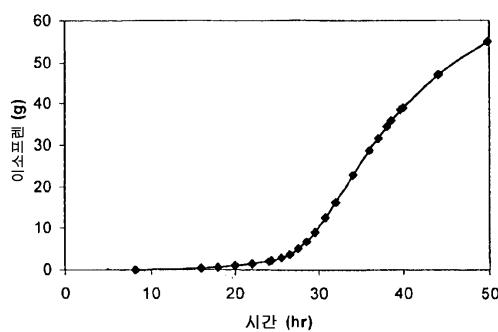
도면49a



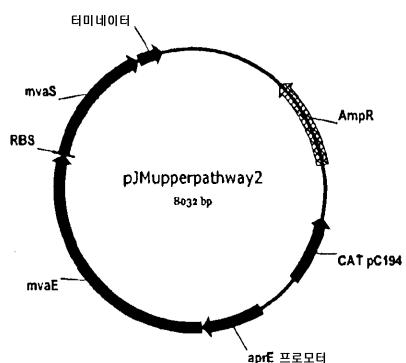
도면49b



도면49c



도면50

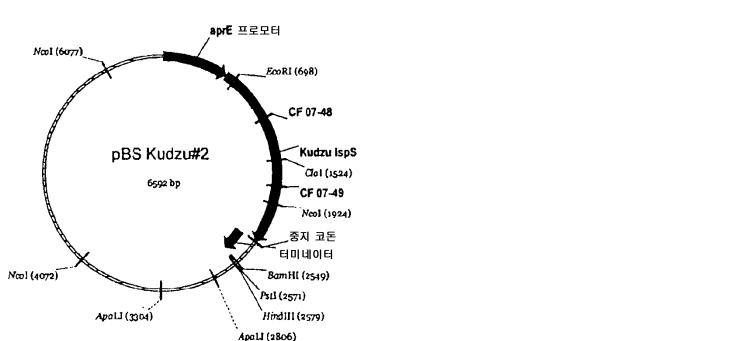


도면51a

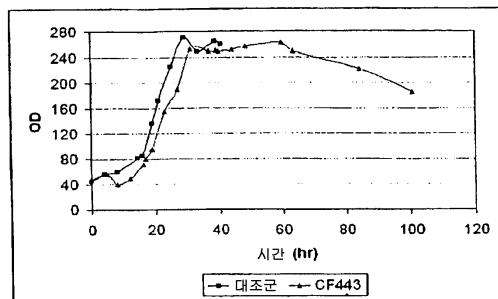
도면51b

도면51c

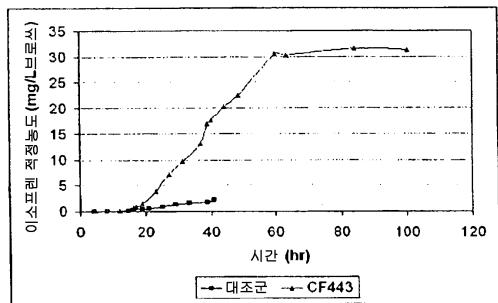
(SEQ ID NO:56)



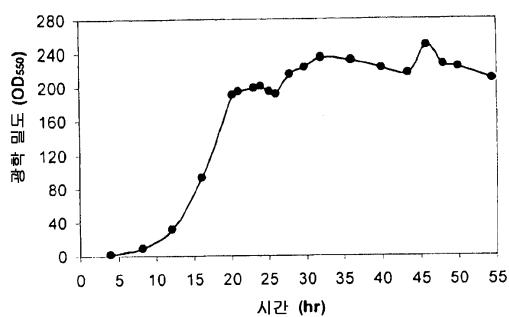
도면53a



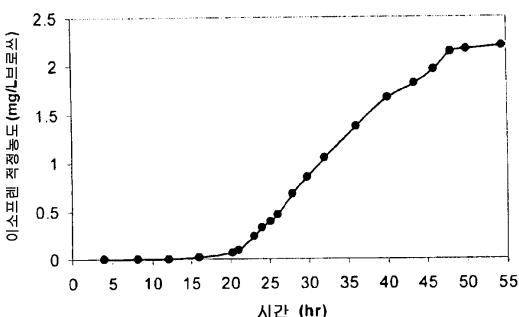
도면53b



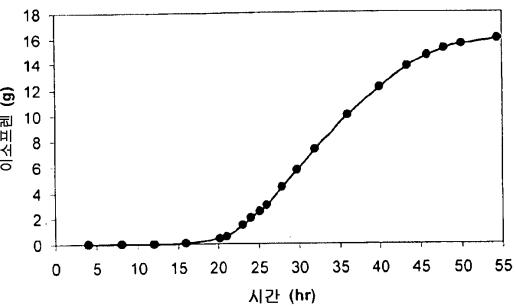
도면54



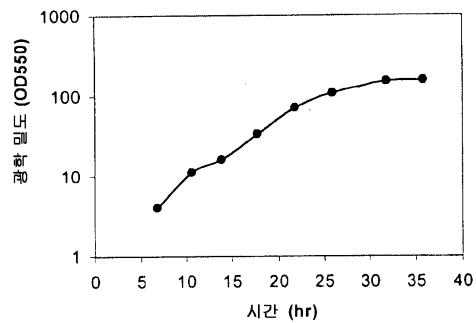
도면55



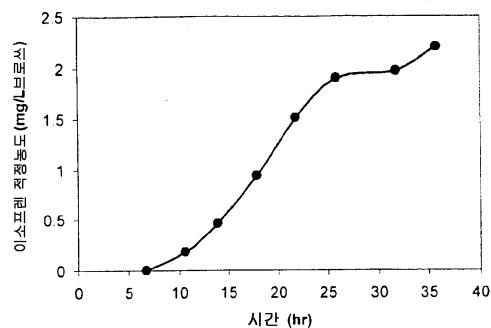
도면56



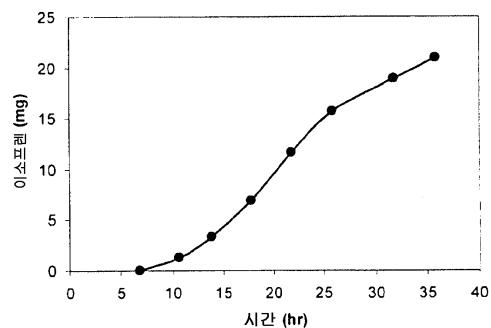
도면57



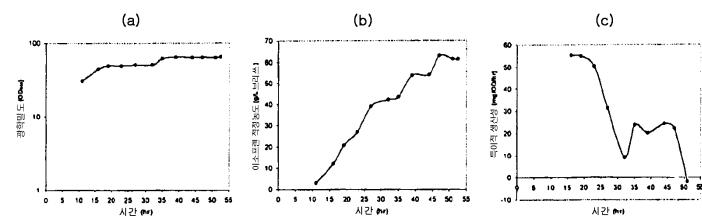
도면58



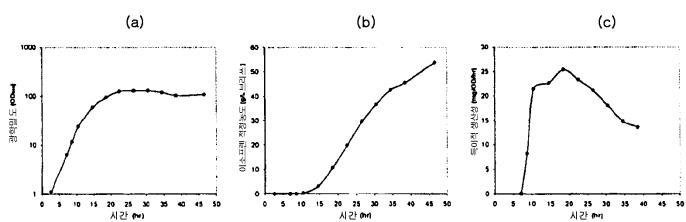
도면59



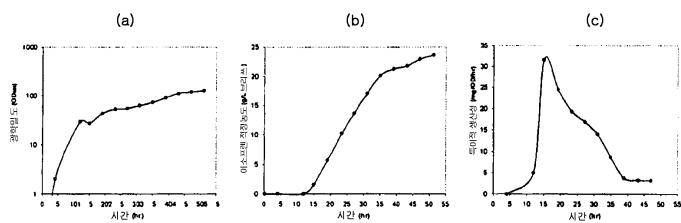
도면60



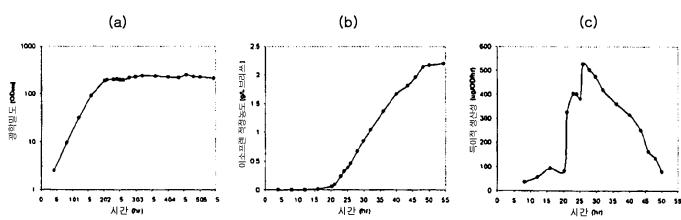
도면61



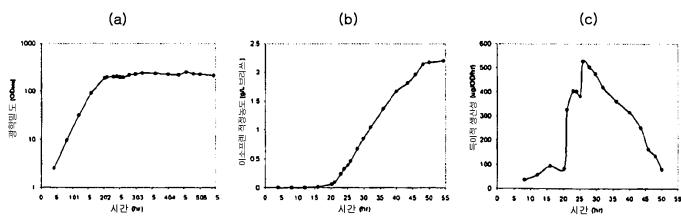
도면62



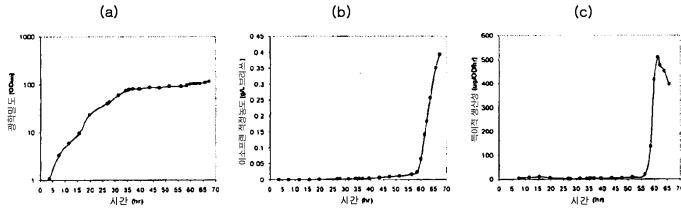
도면63



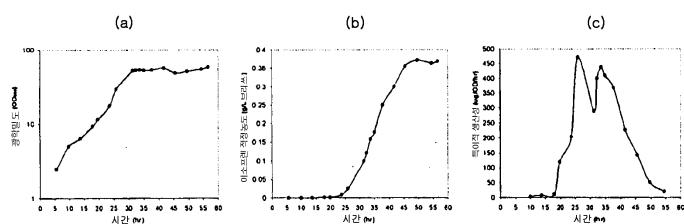
도면64



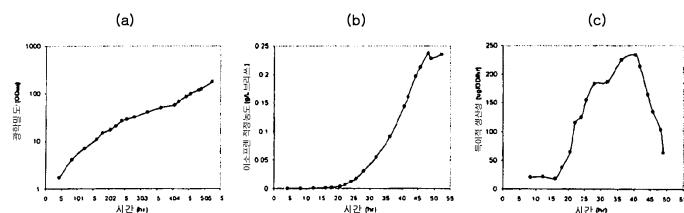
도면65



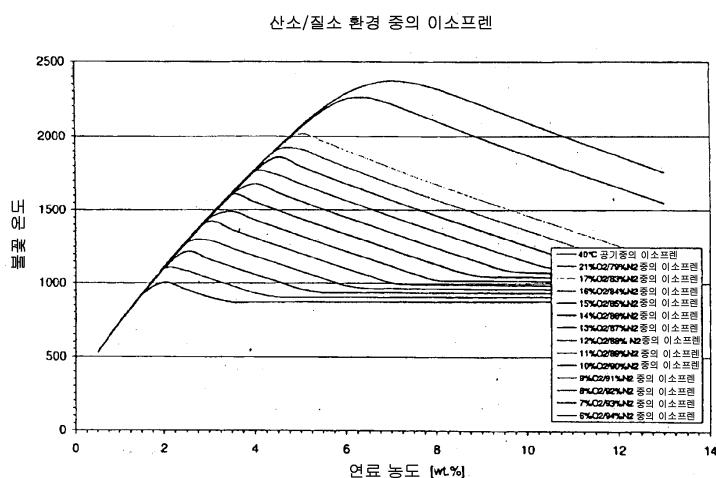
도면66



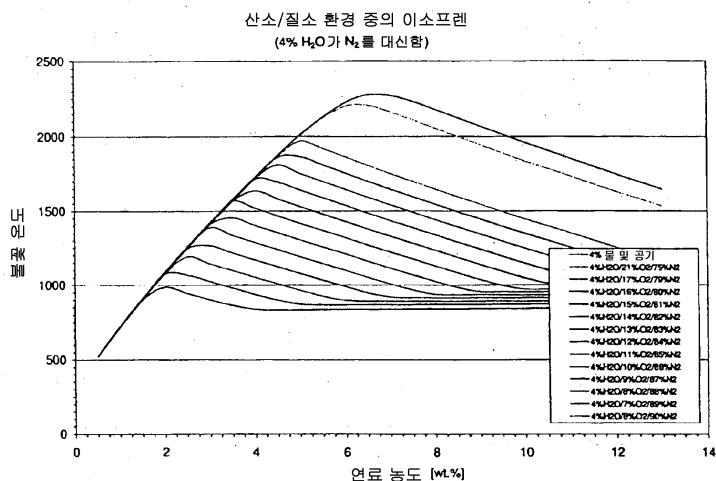
도면67



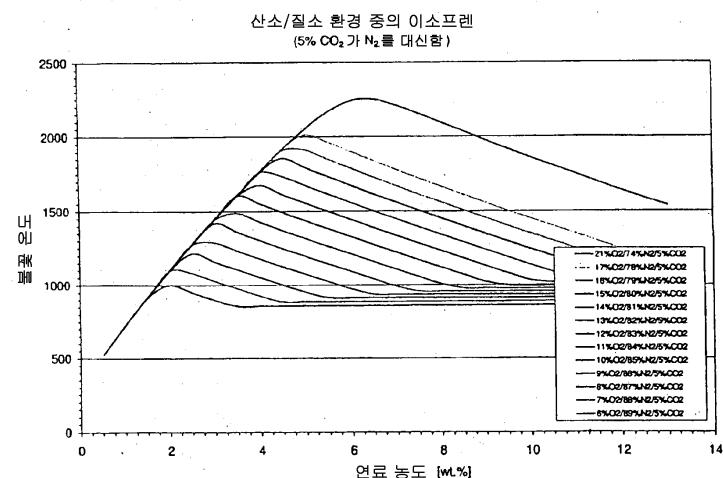
도면68



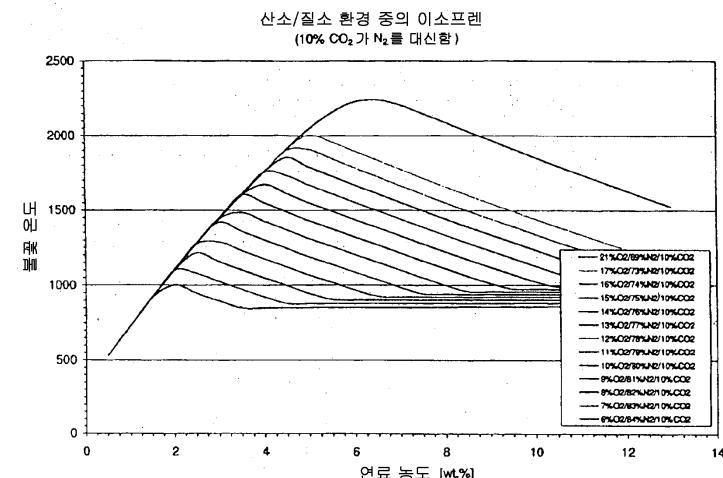
도면69



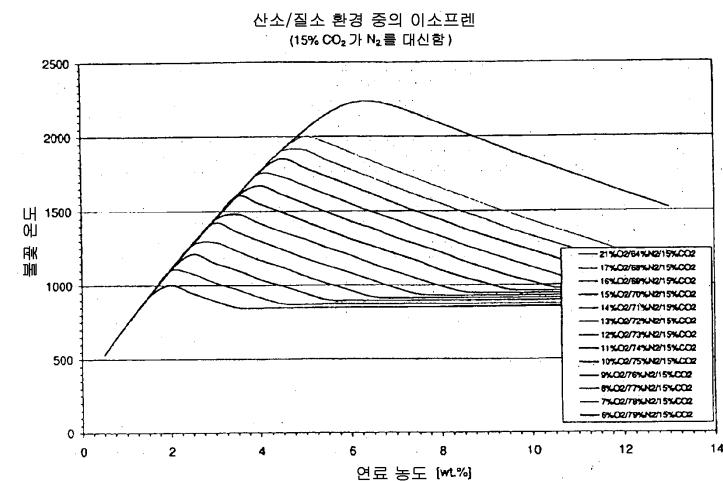
도면70



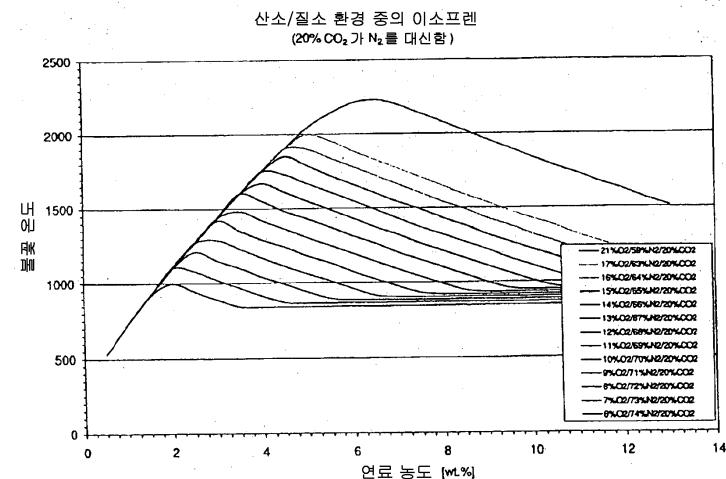
도면71



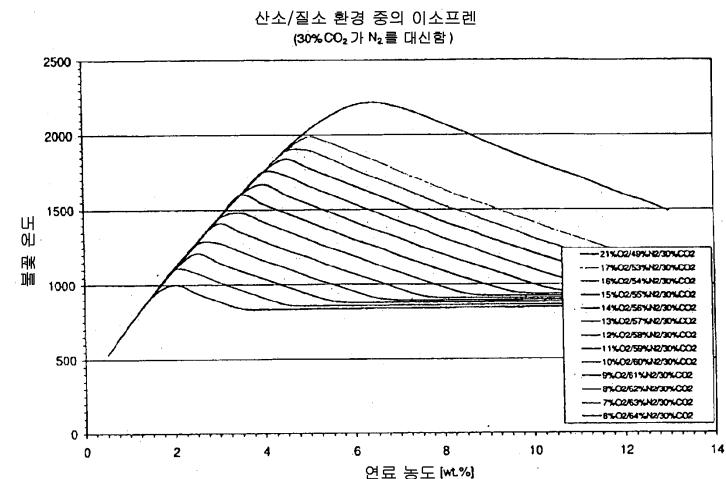
도면72



도면73



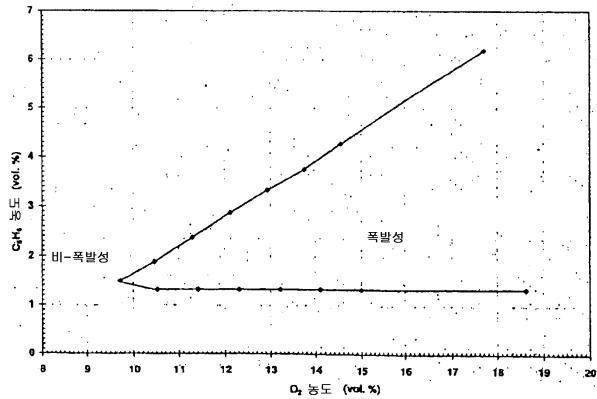
도면74



도면75a

연료 구성	산화제 구성	폭연시 농도						이상기체 법칙에 근거한 체적 농도							
		샘플 100g에 대한 물 농도													
연료 농도 (wt%)	산화제 농도 (wt%)	이소프렌 (wt%)	H ₂ O (wt%)	O ₂ (wt%)	N ₂ (wt%)	연료 농도 (wt%)	이소프렌 (mole)	H ₂ O (mole)	O ₂ (mole)	N ₂ (mole)	전체 (mole)	이소프렌 (vol. %)	O ₂ (vol. %)	N ₂ (vol. %)	H ₂ O (vol. %)
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	88.37	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	10.48	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	

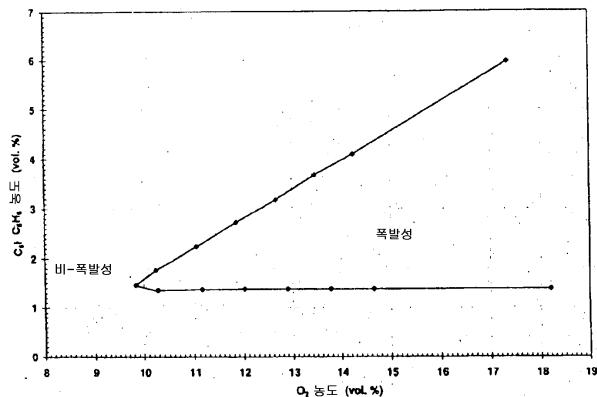
도면75b



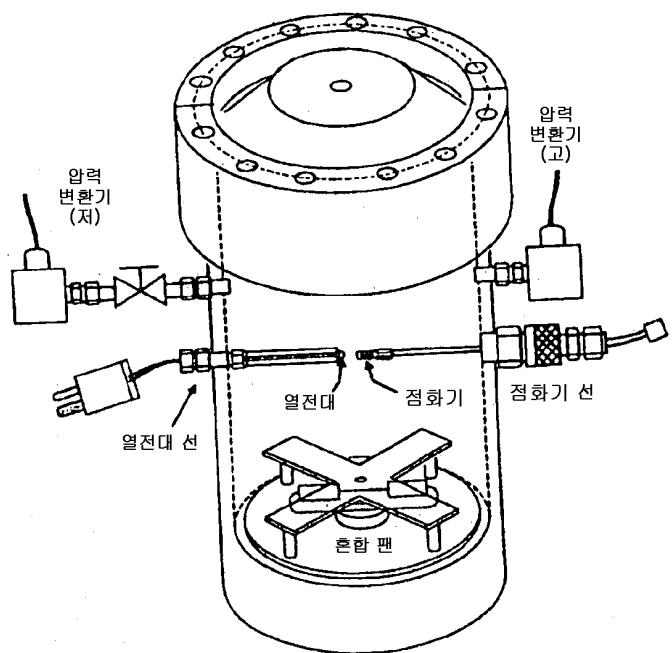
도면76a

연 료 농 도 (wt.%)	연 료 구 성	폭연시 농도						이상기체 법칙에 근거한 체적 농도			
		산화제 구성			샘플 100g에 대한 몰 농도			이소프렌	O ₂	N ₂	H ₂ O
		이소프렌	H ₂ O	O ₂	N ₂	이소프렌	H ₂ O	O ₂	N ₂	H ₂ O	
3.252	96.748	100	4	12	84	4.78	21.50	36.28	290.24	352.81	1.36
3.274	96.726	100	4	13	83	4.81	21.49	39.29	286.72	352.33	1.37
3.290	96.710	100	4	14	82	4.84	21.49	42.31	283.22	351.86	1.38
3.288	96.712	100	4	15	81	4.84	21.49	45.33	279.77	351.43	1.38
3.286	96.714	100	4	16	80	4.83	21.49	48.36	276.33	351.01	1.38
3.284	96.716	100	4	17	79	4.83	21.49	51.38	272.88	350.58	1.38
3.276	96.724	100	4	21	75	4.82	21.49	63.48	259.08	348.87	1.38
3.500	96.500	100	4	11.5	84.5	5.15	21.44	34.68	291.22	352.49	1.46
4.200	95.800	100	4	12	84	6.18	21.29	35.93	287.40	350.79	1.76
5.300	94.700	100	4	13	83	7.79	21.04	38.47	280.72	348.03	2.24
6.400	93.600	100	4	14	82	9.41	20.80	40.95	274.11	345.28	2.73
7.400	92.600	100	4	15	81	10.88	20.58	43.41	267.88	342.74	3.18
8.500	91.500	100	4	16	80	12.50	20.33	45.75	261.43	340.01	3.68
9.400	90.600	100	4	17	79	13.82	20.13	48.13	255.62	337.71	4.09
13.300	86.700	100	4	21	75	19.56	19.27	56.99	232.23	327.95	5.96

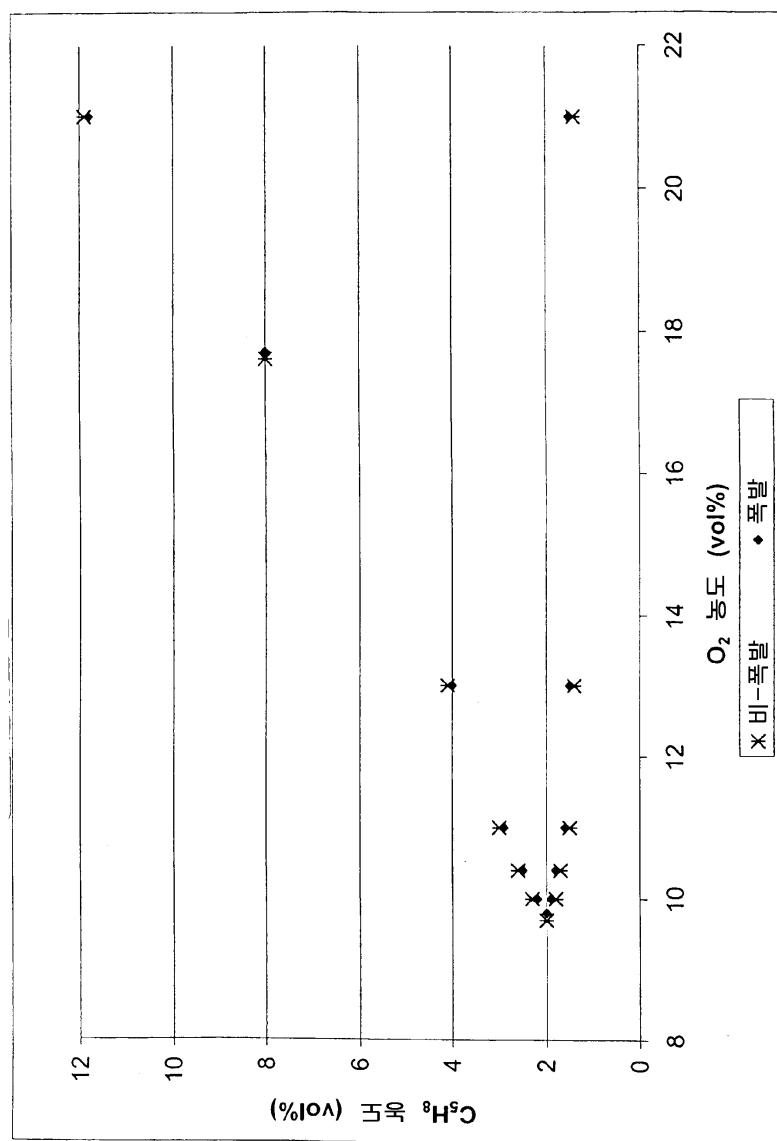
도면76b



도면77



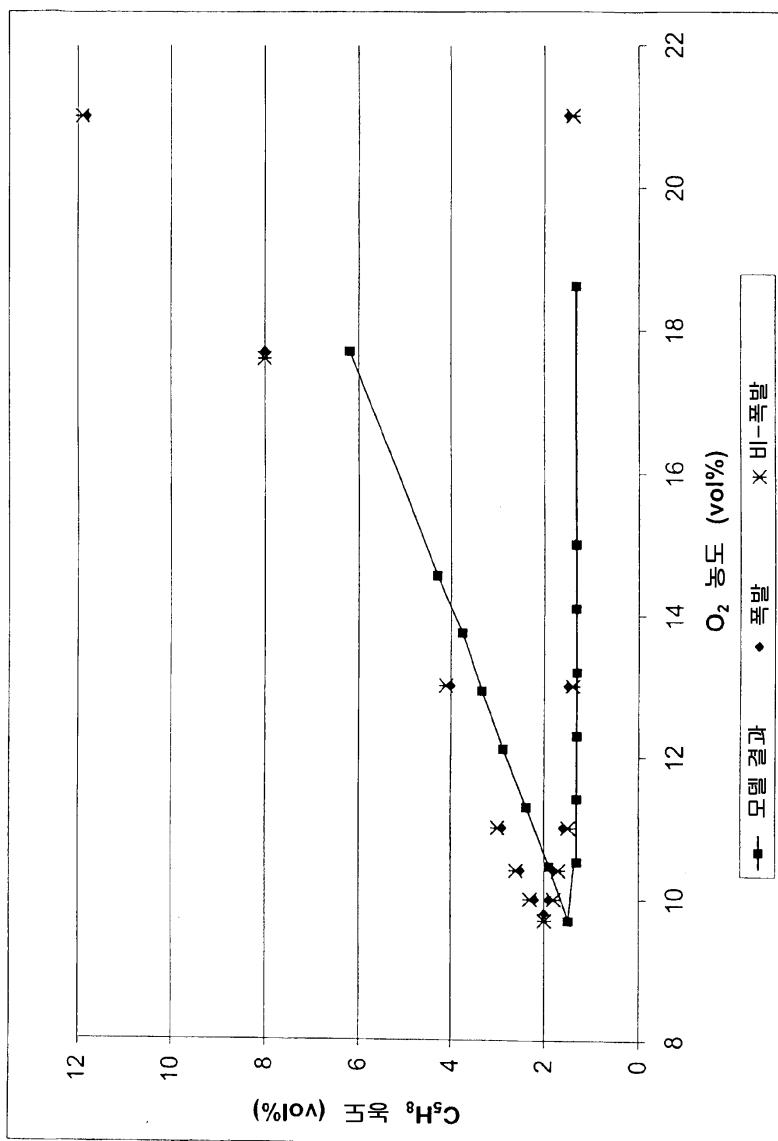
도면78a



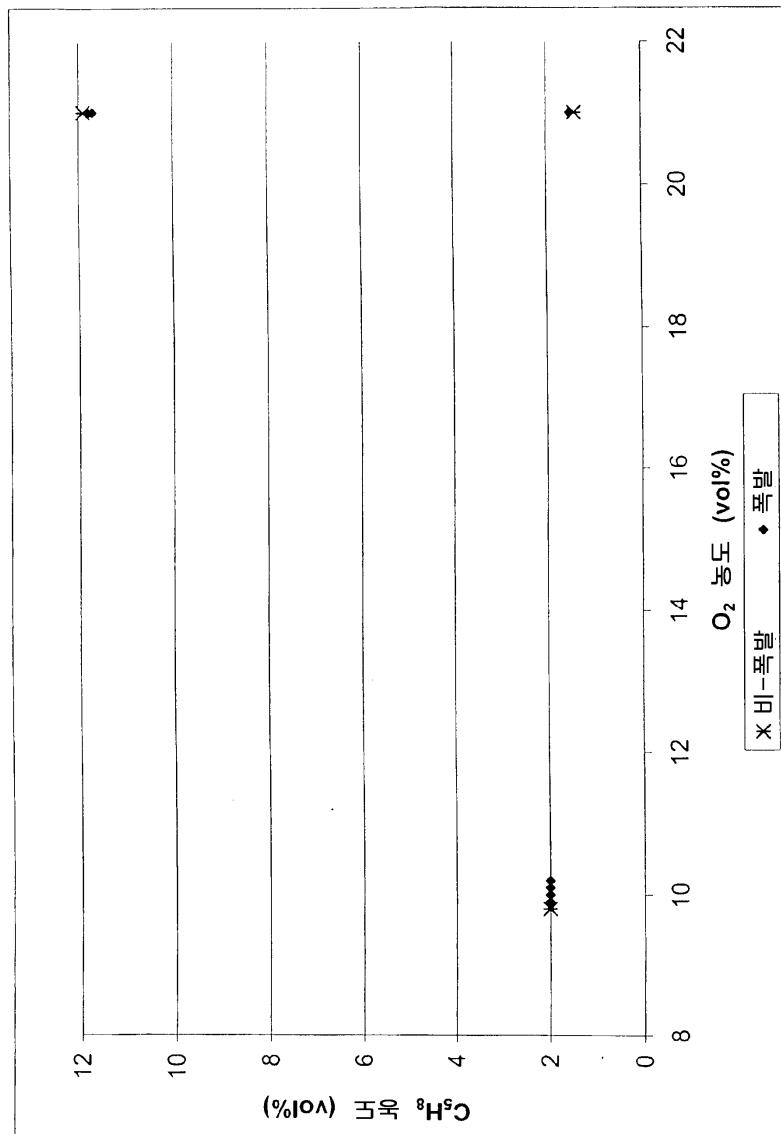
도면78b

비폭발		폭발	
O ₂ 농도 (vol. %)	C ₅ H ₈ 농도 (vol. %)	O ₂ 농도 (vol. %)	C ₅ H 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



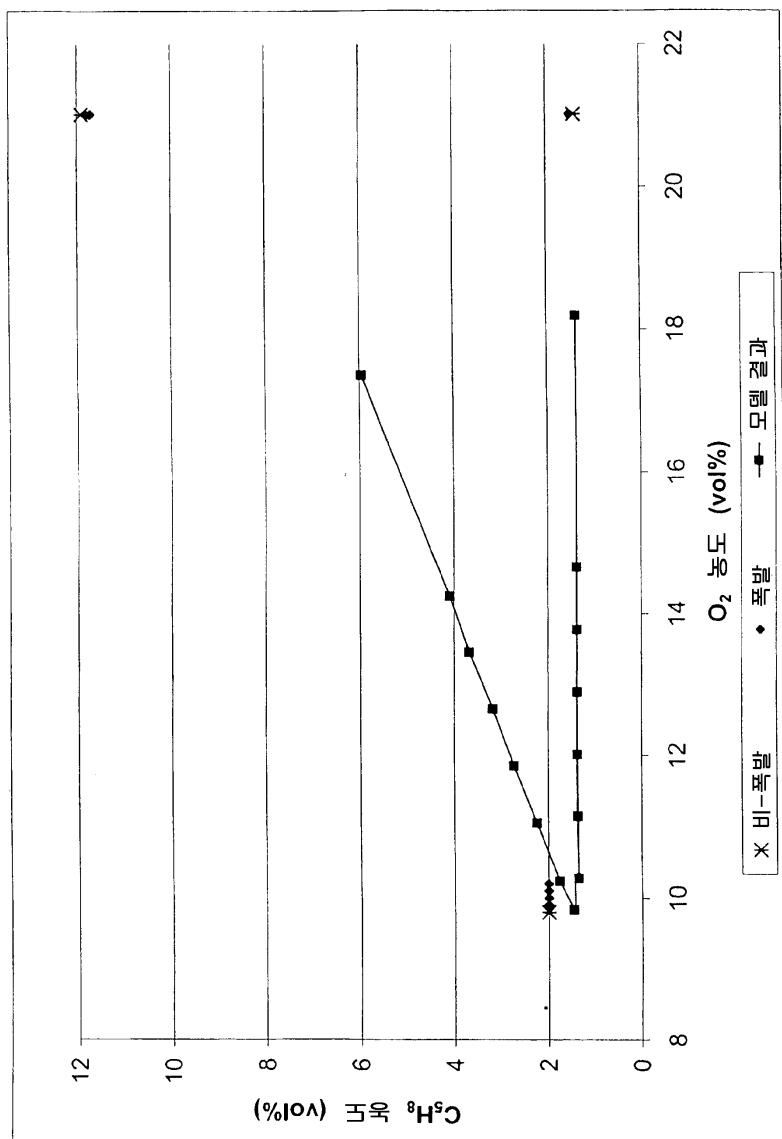
도면79a



도면79b

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

도면79c



도면80a

시험 시리즈 1

시험	데이터 파일명	온도 °C	초기압 bara	부분압 mbar			농도 vol. %			결과	Pex bara
				C ₅ H ₈	N ₂	O ₂	C ₅ H ₈	N ₂	O ₂		
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

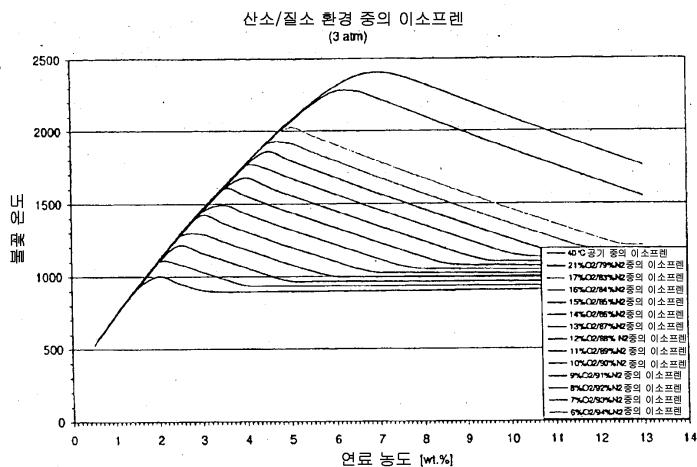
시험	데이터 파일명	온도 °C	초기압 bara	부분압			농도			결과	Pex bara
				C ₆ H ₆ mbar	N ₂ mbar	O ₂ mbar	C ₆ H ₆ vol. %	N ₂ vol. %	O ₂ vol. %		
40	T11130723	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.08
41	T11130724	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.05
42	T11130725	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	비-폭발	1.05
43	T11130726	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	178	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

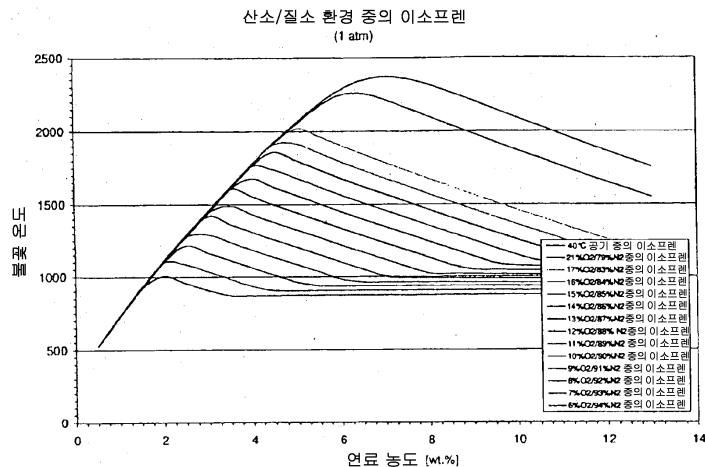
시험 시리즈 2

시험	데이터 파일명	온도 °C	초기압 bara	부분압			농도				결과	Pex bara	
				H ₂ O mbar	C ₆ H ₆ mbar	N ₂ mbar	O ₂ mbar	H ₂ O vol. %	C ₆ H ₆ vol. %	N ₂ vol. %	O ₂ 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

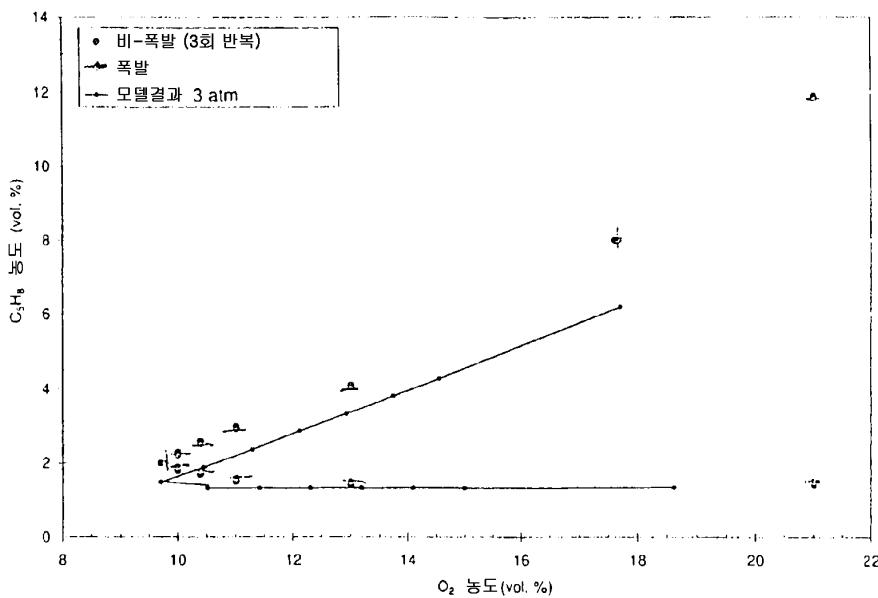
도면82



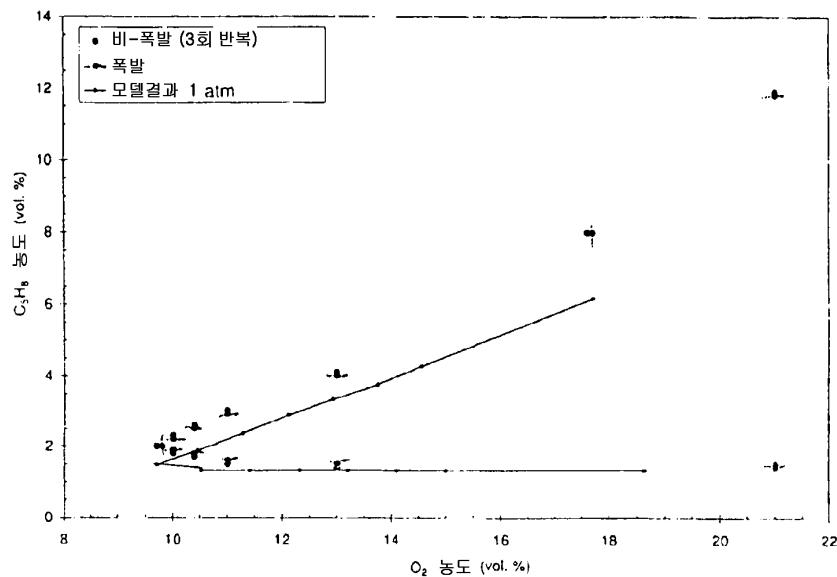
도면83



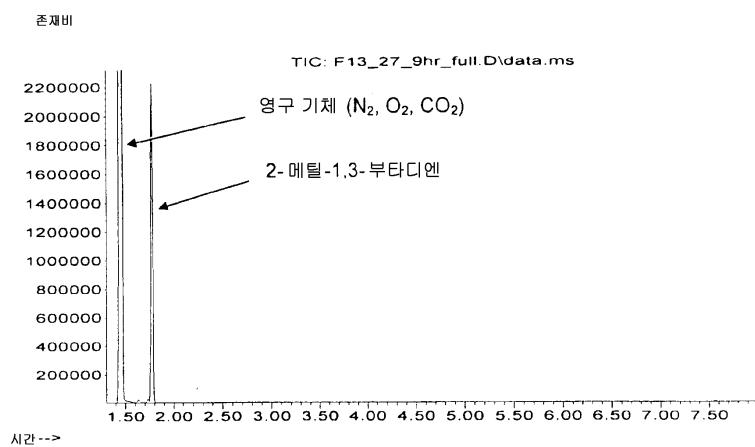
도면84



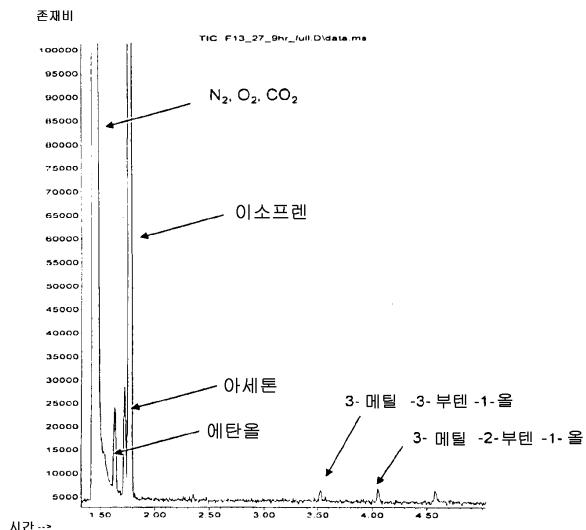
도면85



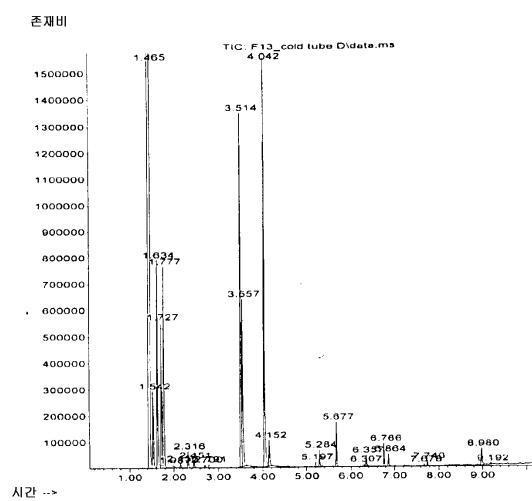
도면86a



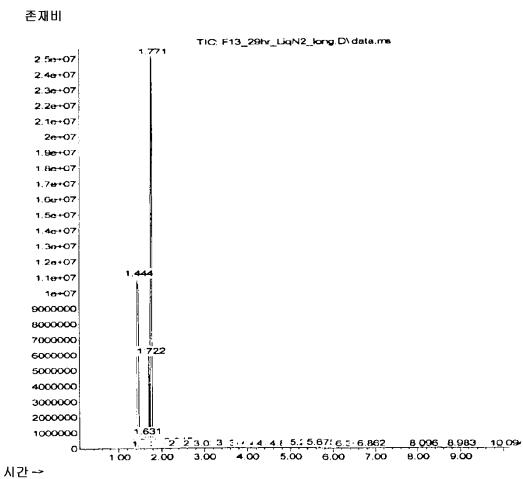
도면86b



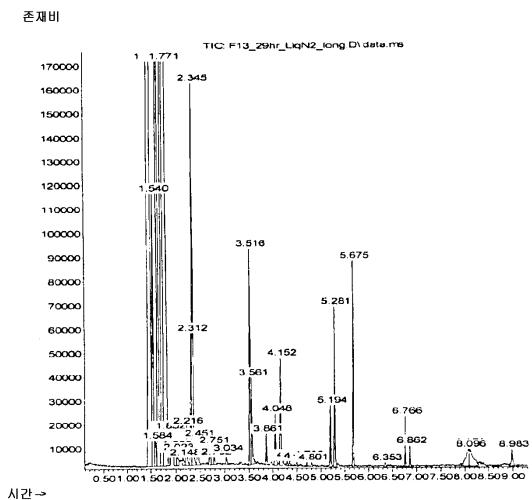
도면87a



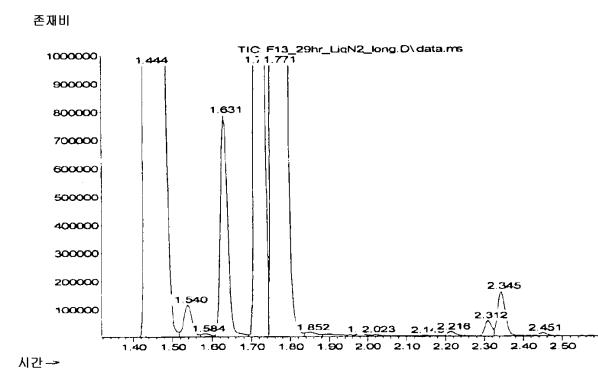
도면87b



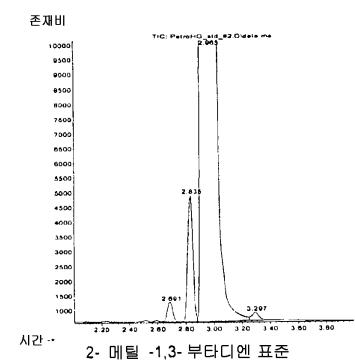
도면87c



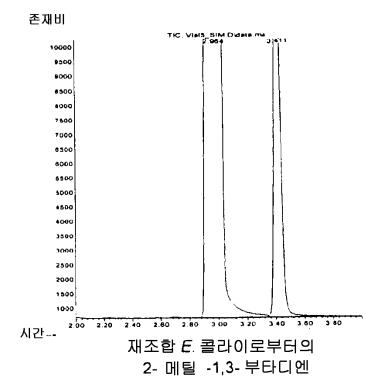
도면87d



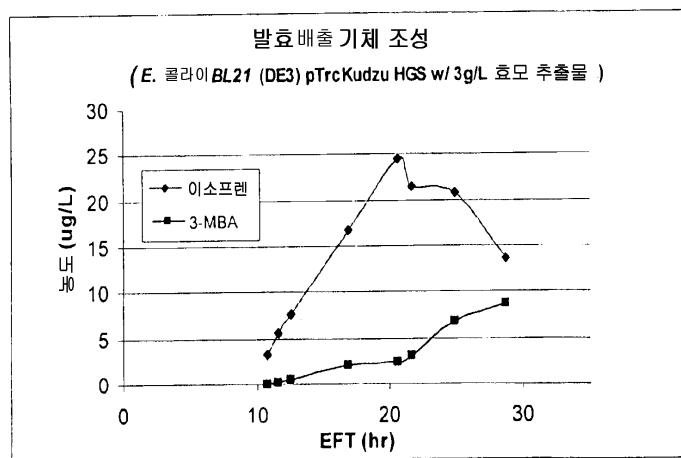
도면88a



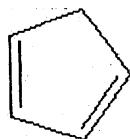
도면88b



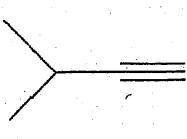
도면89



도면90



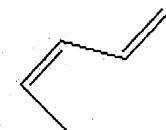
시클로펜타디엔



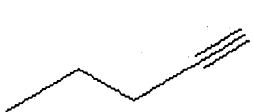
"이소프렌" = 3- 메 -1- 부탄



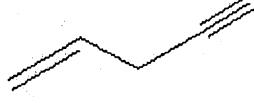
트랜스-피페릴렌



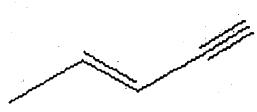
시스-피페릴렌



1- 펜틴



펜트-4-エン-1-인

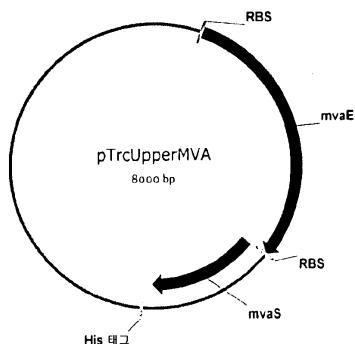


트랜스-펜트-3-엔-1-인



시스-펜트-3-엔-1-인

도면91



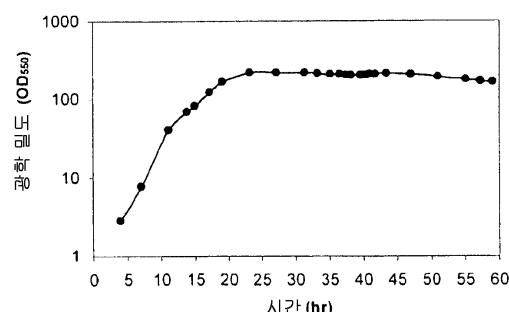
도면92a

도면92b

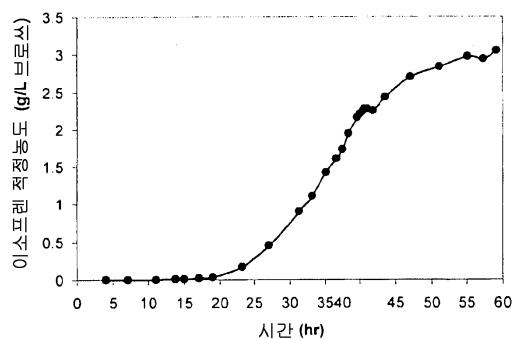
도면92c

(SEO ID NO:86)

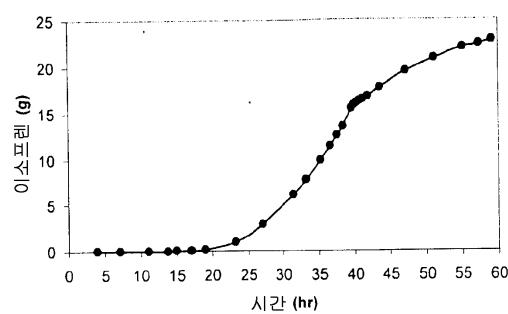
도면93



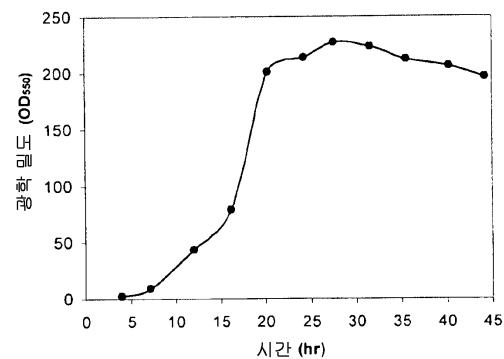
도면94



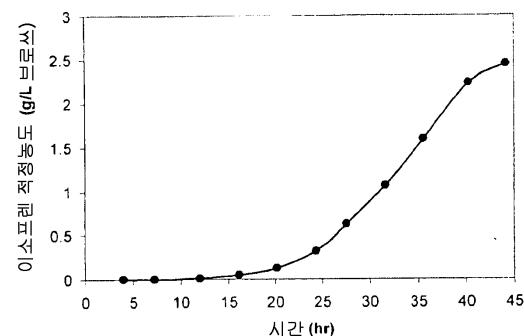
도면95

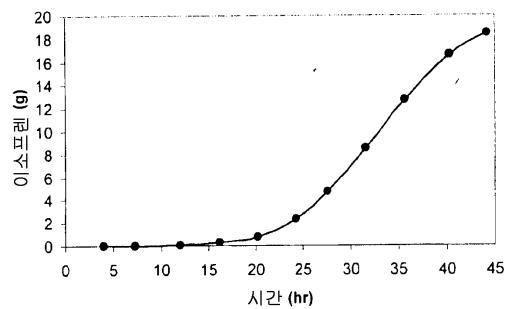
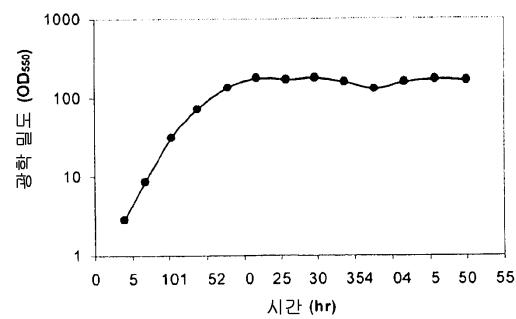
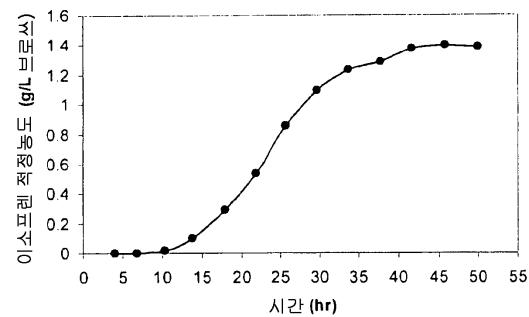
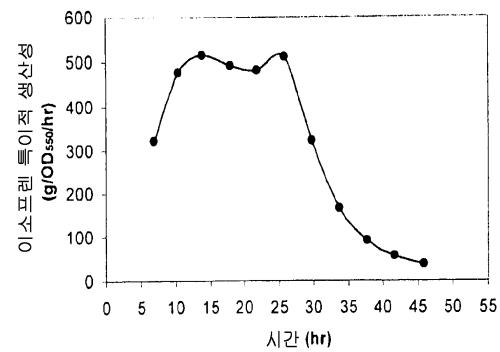


도면96

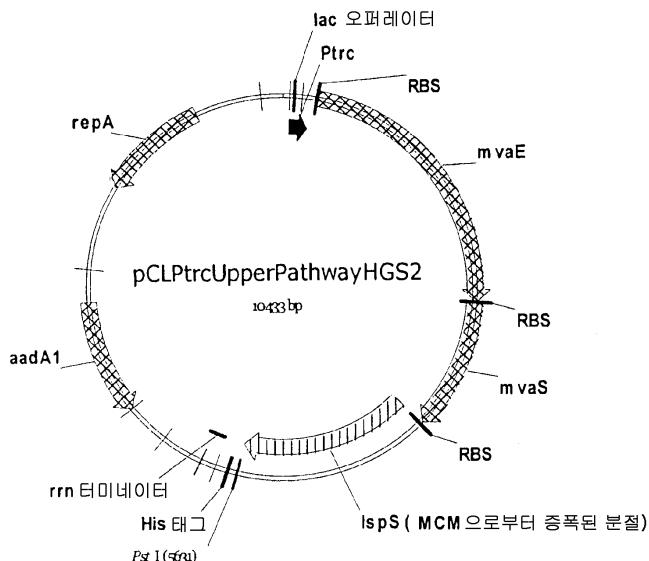


도면97



도면98**도면99****도면100****도면101**

도면102



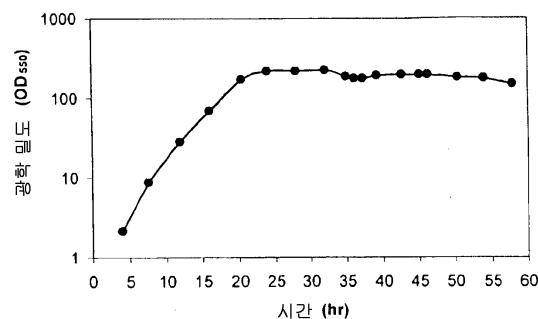
도면 103a

도면103b

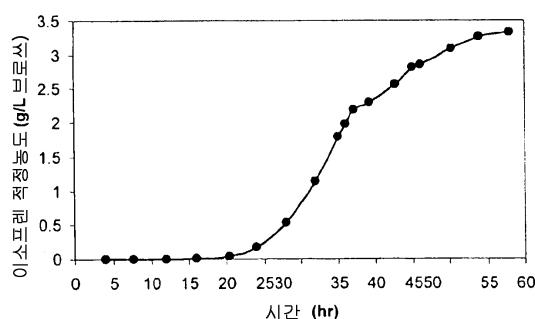
도면 103c

(SEQ ID NO:87)

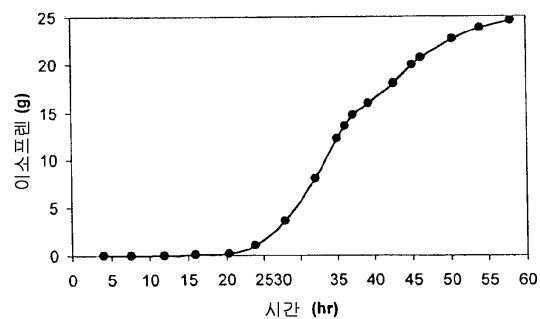
도면104



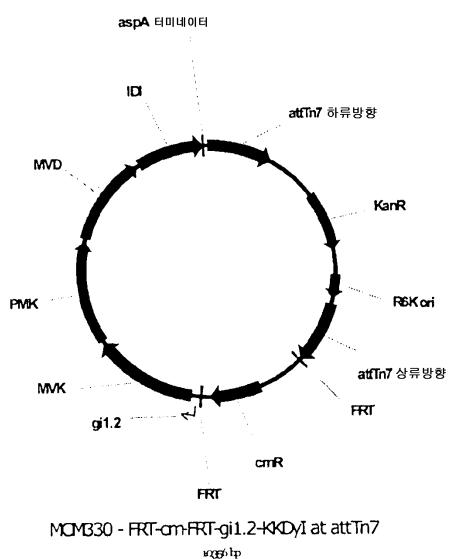
도면105



도면106



도면107



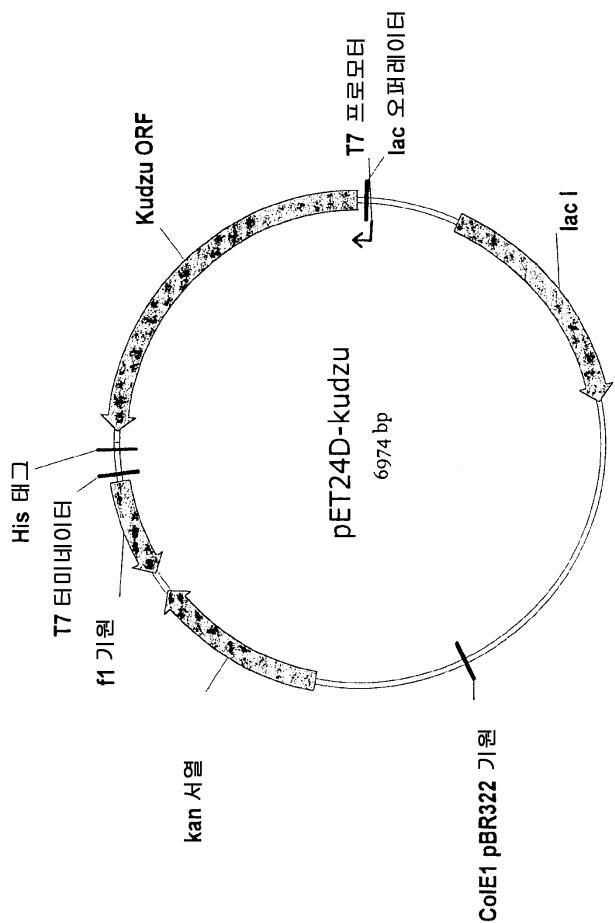
도면108a

도면108b

도면 108c

(SEQ ID NO:90)

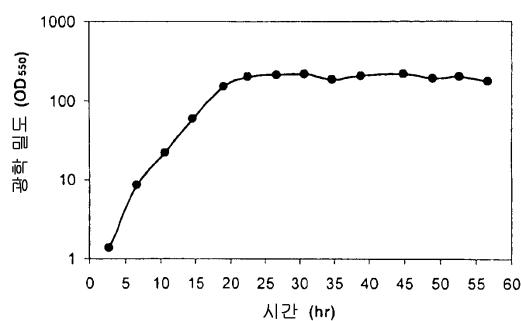
도면109



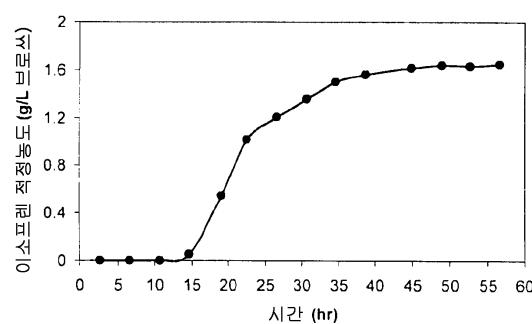
도면110a

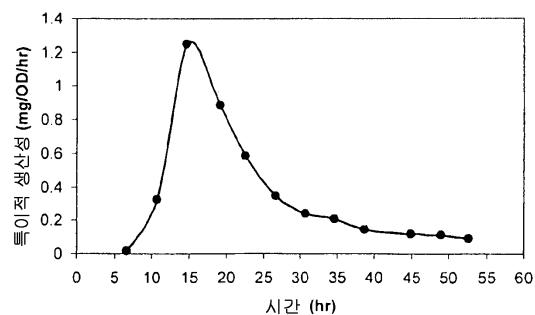
도면 110b

도면111a



도면111b



도면111c**서 열 목 록**

<110> Danisco US Inc.

The Goodyear Tire & Rubber Company

CALABRIA, Anthony Rudolf

CERVIN, Marguerite A.

CHOTANI, Gopal K.

MCAULIFFE, 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

atgtgtcgca cctttctca atttactcag attaccgagc ataattcccg tcgttccgca	60
aactatcagc caaacctgtg gaatttcgaa ttccctgcaat ccctggagaa cgacctgaaa	120
gtggaaaagc tggaggagaa agcgaccaa ctggaggaag aagttcgctg catgtcaac	180
cgttagaca cccagccgct gtccctgctg gagctgatcg acgatgtgca ggcgcgggt	240
ctgacctaca aatttgaaaa agacatcatt aaagccctgg aaaacatcgt actgctggac	300
gaaaacaaaa agaacaatac tgacctgcac gcaaccgctc tgtcttccg tctgctgcgt	360
cagcacggtt tcgaggtttc tcaggatgtt ttgagcggt tcaaggataa agaagggtggt	420
ttcagcggtg aactgaaagg tgacgtccaa ggcctgctga gcctgtatga agcgtttaac	480
ctgggttgc agggtgagaa cctgctggag gaggcgcgta cttttccat caccacactg	540
aagaacaacc taaaagaagg catataacc aaggttgcag aacaagttag ccacgcctg	600
gaactgcct atcaccagcg tctgcaccgt ctggaggcac gttgggtcct ggataaaatc	660
gaaccgaaag aaccgcata ccagctgctg ctggagctgg cgaagctgga ttttaacatg	720
gtacagaccc tgcaccagaa agagctgaa gatctgtccc gctggtgac cgagatggc	780
ctggctagca aactggattt tgtacgcac cgcctgatgg aagtttattt ctggcactg	840
ggtatgggc cagacccgca gtttggtaa tgtcgaaatg ctgttactaa aatgttttgt	900
ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac gtttatggca ctctggacga actgcaactg	960
ttcaccgatg ctgttagagcg ctgggacgtt aacgcttattt acaccctgcc ggactatatg	1020
aaactgtgtt tcctggact gtacaacacc gttaaacgaca cgtcttattt tattctgaaa	1080
gagaaaaggc ataacaacct gtcctatctg acgaaaagct ggcgtgaact gtgcaaagcc	1140
tttctgcaag aggcgaaatg gtccaaacaac aaaattatcc cggcttctc caagtacctg	1200
gaaaacgcca gctttccctc ctccgggtta ggcgtgtgg cggcttctta ctttccgta	1260
tgcacgcgc aggaagacat ctccgaccac ggcgtgcgtt ccctgaccga cttccatgg	1320

ctgggtgcgtt ctagctgcgt tatcttcgc ctgtcaacg atctggccac ctctgcggcg	1380
gagctggaac gtggcgagac taccaattct atcattagct acatgcacga aaacgatgg	1440
accagcgagg aacaggccc gagaactg cgtaaaactga tcgacgccga atggaaaaag	1500
atgaatcgta aacgcgttag cgactccacc ctgctgccta aagcgttcat ggaatcgca	1560
gttaacatgg cacgttttc ccactgcacc taccagtatg gcgttgtct gggtcgccca	1620
gactacgcga ctgaaaacccg catcaaactg ctgctgattg acccttccc gattaaccag	1680
ctgatgtatg tctaactgca g	1701
<210> 2	
<211> 6080	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

gtttgacagc ttatcatgca ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc	60
ggaagctgtg gtagggctgt gcaggtcgta aatcaactgca taattcgatgt cgctcaaggc	120
gcactccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaataattc	180
tgaaatgagc tggacaat taatcatccg gctcgataa tgtgtgaaat tgtgagcgga	240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgct gagaaaaaagc gaagcggcac tgctctttaa	300
caatttatca gacaatctgt gtgggactc gaccggatt atcgatatac tttattat	360

aaaattaaag aggtatataat taatgtatcg attaataag gaggaaataaa ccatgtgtgc	420
gacctttct caatttactc agattaccga gcataattcc cgctcgatcc caaactatca	480
gccaaacctg tggaaattcg aattcctgca atccctggag aacgacactga aagtggaaaa	540
gctggaggag aaagcgacca aactggagga agaagttcgc tgcatgatca accgtgtaga	600
caccctggcc cgatccctgc tggagctgtat cgacgatgtg cagcgccctgg gtctgaccta	660
caaatttggaa aaagacatca taaagccct ggaaaacatc gtactgctgg acgaaaacaa	720
aaagaacaaa tctgacactgc acgcaaccgc tctgttttc cgtctgctgc gtcagcacgg	780

tttcgagggt tctcaggatg ttttgagcg tttcaaggat aaagaagggtg gtttcagcgg	840
tgaactgaaa ggtgacgtcc aaggcctgtat gaggcgttat gaagcgtctt acctgggttt	900
cgagggttag aacctgctgg aggaggcgcc tacctttcc atcaccacc tgaagaacaa	960
cctgaaagaa ggcattaata ccaagggttgc agaacaagtg agccacccc tggaactgcc	1020
atatcaccag cgtctgcacc gtctggaggc acgttgggttc ctggataaat acgaaccgaa	1080

agaaccgcat caccagctgc tgctggagct ggcgaagctg gatTTtaaca tggTacagac	1140
cctgcaccag aaagagctgc aagatctgtc ccgctggTgg accgagatgg gcctggctag	1200
caaactggat ttTgtacgcg accgcctgat ggaagtttat ttctggcac tgggtatggc	1260
gccagacccg cagttggtg aatgtcgaa agctgttact aaaatgtttg gtctggTgac	1320
gatcatcgat gacgtgtatg acgtttatgg cactctggac gaactgcaac tggTaccga	1380
tgctgttagag cgctggacg ttaacgctat taacaccctg ccggactata tggaaactgtg	1440
tttcctggca ctgtacaaca ccgttaacga cacgtcttat tctattctga aagagaaagg	1500
tcataacaac ctgtcctatc tgacgaaaag ctggcgtgaa ctgtgcaaaag ccttctgca	1560
agaggcggaaa tggTccaaca acaaaattat cccggTTtc tccaagtacc tggaaaacgc	1620
cagcgTTcc tcTccggTg tagcgctgct ggccgcgtct tactttccg tatGCCGca	1680
cgaggaagac atctccgacc acgcgcgtgcg ttccctgacc gacttccatg gtctggTgCG	1740
ttcttagctgc gttatcttcc gcctgtgcaaa cgatctggcc acctctgcgg cggagctgga	1800
acgtggcgag actaccaatt ctatcattag ctacatgcac gaaaacgatg gtaccagcga	1860
ggaacaggcc cgcaagaac tgcgtaaact gatcgacgcc gaatggaaaa agatgaatcg	1920
tgaacgcgtt agcgactcca ccctgctgccc taaagcgttc atggaaatcg cagttacat	1980
ggcacgtgtt tcccaactgca cctaccagta tggcgtatgt ctgggtcgcc cagactacgc	2040
gactgaaaac cgcatcaaac tgctgctgat tgaccTTtc ccgattaacc agctgatgta	2100
tgtctaactg cagctggTAC catatggaa ttcaagctt tctagaacaa aaactcatct	2160
cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg	2220
tctccagctt ggctgtttg gcggatgaga gaagatttc agcctgatac agattaaatc	2280
agaacgcaga agcggTctga taaaacagaa ttgcctggc ggcagttagcg cggTggTccc	2340
acctgacccc atgccgaact cagaagtgaa acgcccgtac gccgatggta gtgtggggtc	2400
tccccatgCG agagtaggga actgccagac atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag	2460
actgggcctt tgcTTTATC tggTgtttgt cggTgaacgc tctcctgagt aggacaaatc	2520
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg agggtggcgg gcaggacgcc	2580
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcTTTTG	2640
cgtttctaca aactttttt gtttattttt ctaaatatcat tcaaataatgt atccgctcat	2700
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca	2760
acatttccgt gtcgcctta ttccctttt tgccggcattt tgccTTCTG tttttgtca	2820

cccagaaaacg ctggtaaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta	2880
catcgaaactg gatctcaaca gcggtaagat ctttgagagt ttgcgcgg aagaacgtt	2940
tccaatgatg agcactttt aagttctgt atgtggcggt gtattatccc gtgtgacgc	3000
cggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcg aatgacttgg ttgagactc	3060
accagtaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc	3120
cataaccatg agtataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa	3180
ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgt aactgcctt atcgttggga	3240
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgttagaat	3300
ggcaacaacg ttgcgaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca	3360
attaatagac tggatggagg cgataaaatg tgcaggacca cttctgcgt cggcccttc	3420
ggctggctgg ttatttgctg ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc gcggtatcat	3480
tgcagcaact gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag	3540
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa	3600
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca	3660
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ctttttgc aatctcatga cccaaatccc	3720
ttaacgtgag ttgcgttcc actgagcgtc agacccgtt gaaaagatca aaggatctt	3780
ttgagatcct tttttctgc gcttaatctg ctgcgttgc aaacaaaaac caccgttacc	3840
agcgtgggtt tggtgccgg atcaagagct accaactttt tttccgaagg taactggctt	3900
cagcagacgc cagataccaa atactgtct tcttagttag ccgttagttttag gccaccactt	3960
caagaactct gtacaccgc ctacatactt cgctctgtt atcctgttac cagtggctgc	4020
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	4080
ggcgcagcgg tcggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagttgg agcgaacgac	4140
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtt gctatgagaa agccacgc ttcccgaagg	4200
gagaaaggcg gacaggttac cggtaagcgg cagggtcgaa acaggagagc gcacgaggga	4260
gcttccaggg gggaaacgcctt ggtatcttta tagtctgtc gggttcgcc acctctgact	4320
tgagcgttca tttttgtat gctcgtagg gggggggagc ctatggaaaa acgcacgaa	4380
cgcggccttt ttacggttcc tggccctttt ctggccctt gctcacatgt tctttctgc	4440
gttatccccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgcctt gagtggactg ataccgtcg	4500
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgttcc agtgagcggag gaagcggaaag agccgttgc	4560

gcggtatTTT ctccTTacgc atctgtgcgg tattcacac cgcataatggT gcactctcag	4620
tacaatctgc tctgatgcgg catagttaag ccagtatACA ctccgcTATC gctacgtgac	4680
tgggtcatgg ctgcGCCCG acacCCGcca acacCCGCTG acgcGCCCTG acgggCTTGT	4740
ctgctCCCG catCCGCTTA cagacaAGCT gtgaccgtCT ccgggagCTG catgtgtcAG	4800
aggTTTcAC cgtcatcAcc gaaacgcgCg aggCAGCAGA tcaattcgCg cgcgaaggCg	4860
aagcggcatg cattacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aacCTTCGc ggtatggcat	4920
gatagcGCCc ggaagagagt caattcaggg tggtaatgt gaaaccagta acgttatacg	4980

atgtcgcaga gtaTgcccgt gtctttatc agaccgttC ccgcgtggT aaccaggCCA	5040
gccacgtttc tgcaaaaacg cggaaaaaag tggaaagcggc gaTggcggag ctgaattaca	5100
ttcccaacCG cgtggcacAA caactggcgg gcaaacAGTC gttgctgatt ggcgttgcCA	5160
cctccAGTCT ggccTgcAC ggcgcgtcG aaattgtcgc ggCgatTAaa tctcgccGCG	5220
atcaactggg tgcCAGCgtG gtggTgtcGA tggtagaACg aagcggcgtc gaaggctgtA	5280
aagcggcgtt gcacaatCTT ctgcgcAAC gcgtcAGTGG gctgatcATT aactatccgc	5340
tggatgacca ggaTgcccatt gctgtggaaG ctgcctgcAC taatgttccg gcgttatttc	5400

ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatTTT ctcccatgaa gacggtaacgc	5460
gactggcgT ggagcatctg gtcgcattgg gtcaccagca aatcgccgtg ttacgggCC	5520
cattaagtTC tgcTcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatAT ctcactcgca	5580
atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc gttttcaac	5640
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg ttcccactgc gaTgctggTT gccaacgatc	5700
agatggcgct gggcgcaatg cgccGCcatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata	5760
tctcggtagt gggatacgc acatccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgtcaacca	5820

ccatcaaaca ggatTTcgc ctgctgggc aaaccagcgt ggaccgcTT ctgcaactCT	5880
ctcagggCCA ggcggTgaag ggcaatcAGC tggTgcggCT ctcaCTggTG aaaagaaaaa	5940
ccacCCtggc gccaaatacG caaaccgcCT ctccccgcC gttggccgat tcattaatgc	6000
agctggcAcg acaggTTcc cgactggaaA gcgggcagtG agcgcaacgc aatTAatgtG	6060
agttagcgcg aattgatctg	6080

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 3

cgtgagatca tatgtgtgcg acctttctc 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 tcatacgataa gcttaatgc ggtagtttat cacagttaaa

60

ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgcctcatcg tcatacctcg

120

caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg ctggatgtg ccggtaactgc cgcccctt

180

gcgggatatac cgatatacgat tcctccttc agcaaaaaac ccctcaagac ccgttagag

240

gccccaaagggtt gtatgctat ttatgtctca gcgggtggcag cagccaactc agttccctt

300

cgggttttgt tagcagccgg atccctgcag ttagacatac atcagcttgt taatcggaa

360

agggtcaatc agcagcagtt ttagtcgggtt ttcaatgcgc tagtctggc gaccagacc

420

atcgcatac tggtaggtgc agtggaaac acgtgccatg ttaactgcga tttccatgaa

480

cgctttaggc agcagggtgg agtcgtaac gcgttacga ttcatcttt tccattcggc

540

gtcgatcgtt ttacgcgtt cttcgccggc ctgttctcg ctggtaaccat cgtttcgtg

600

catgtagcta atgatagaat tggtagtctc gccacgttcc agtccggcg cagaggtggc

660

cagatcggtt cacaggcggaa agataacgca gctagaacgc accagaccat ggaagtccgt

720

caggaaacgc agcgcgttgtt cggagatgtc ttccgtctgc tggcatacgg aaaagtaaga

780

cggccgcacgc agcgtacac cggaggagga aacgctggcg tttccaggt acttggagaa

840

agccggata atttgggtt tggaccattt cgccttgc agaaaggctt tgcacagtgc

900

acgcccacgtt ttctgtcagat aggacagggtt gttatgacct ttctttca gaatagaata

960

ggacgtgtcg ttaacgggtgt tgtacagtgc caggaaacac agttcatat agtccggcag

1020

gtaaagcggc ggtgcacaat cttctcgcc aacgcgtcag tgggctgate attaactatc	2940
cgctggatga ccaggatgcc attgctgtgg aagctgcctg cactaatgtt cggcggttat	3000
ttcttgatgt ctctgaccag acacccatca acagtattat ttctcccat gaagacggta	3060
cgcgactggg cgiggagcat ctggtcgat tggcacca gcaaatcgcg ctgttagcgg	3120
gcccattaag ttctgtctcg gcgcgtctgc gtctggctgg ctggcataaa tatctcactc	3180
gcaatcaaat tcagccgata gcggAACGGG aaggcgactg gagtgccatg tccggtttc	3240
aacaaaccat gcaaatgctg aatgaggcca tcgttccac tgcatgctg gttccaacg	3300
atcagatggc gctggcgca atgcgcgcca ttaccgagtc cggctgcgc gttggcg	3360
atatctcggt agtggatac gacgataccg aagacagctc atgttataatc ccgccttaa	3420
ccaccatcaa acaggatttt cgcctgctgg ggcaaaccag cgtggaccgc ttgctgcaac	3480
tctctcaggg ccaggcggtg aagggaatc agctgtgcc cgtctcactg gtgaaaagaa	3540
aaaccaccct ggcgccta atgcaaaccc cctctcccg cgcgtggcc gattcattaa	3600
tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcggca gtgagcgcaa cgcaattaat	3660
gtaagttagc tcactcatta ggcaccggga tctcgaccga tgcccttgag agcctcaac	3720
ccagtcagct cttccgggtg ggcgcggggc atgactatcg tcgcgcact tatgactgtc	3780
ttcttatca tgcactcggt aggacaggtg cccgcagcgc tctgggtcat tttcgcgag	3840
gaccgccttc gctggagcgc gacgatgatc ggcctgtcgc ttgcgttatt cgaaatcttgc	3900
cacgcctcg ctcaagcctt cgtactggc cccgcacca aacgttcgcc cgagaagcag	3960
gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcg ctggctacg tcttgctggc gttcgacgc	4020
cgaggctgga tggcctccc cattatgatt cttctcgctt ccggcgccat cggatgccc	4080
gcgtgcagg ccatgctgtc caggcaggta gatgacgacc atcaggaca gttcaagga	4140
tcgctgcgg ctcttaccag cctaacttcg atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt	4200
tatgccgcct cggcgagcac atgaaacggg ttggcatgga ttgtaggcgc cggcctatac	4260
cttgtctgcc tcccccggtt gcgtcggtt gcatggagcc gggccaccc gacgtaatg	4320
gaagccggcg gcacctcgct aacggattca ccactccaag aattggagcc aatcaattct	4380
tgcgagaac tgtgaatgcg caaaccaacc cttggcagaa catatccatc gctccgcca	4440
tctccagcag ccgcacgcgg cgcacgtcg gcagcggtgg gtcctggcca cgggtgcgc	4500
tgatcggtt cctgtcggtt aggacccggc taggctggcg ggggtgcctt actggtagc	4560
agaatgaatc accgatacgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgaaa acgtctgcga	4620
cctgagcaac aacatgaatg gtcttcggtt tccgttttc gtaaagtctg gaaacgcgg	4680
agtcaacgcgc ctgcaccatt atgttccgga tctgcacgcg aggatgctgc tggctaccct	4740

gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagg gctggcattt accctgagtg attttctct	4800
ggtcccgccg catccatacc gccagttgtt taccctcaca acgttcagt aaccggcat	4860
gttcatcatc agtaaccgt atcgtgagca tcctctctcg tttcatcggt atcattaccc	4920
ccatgaacag aaatccccct tacacggagg catcagtgac caaacaggaa aaaaccgccc	4980
ttaacatggc ccgtttatc agaagccaga cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc	5040
tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagctt	5100
accgcagctg cctcgccgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc	5160
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgcccggag cagacaagcc cgtcaggcgc	5220
cgtcagcggg tttggcggg tgcggggcg cagccatgac ccagtacgt agcgatagcg	5280
gagtgtaact tggcttaact atgcggcatac agagcagatt gtactgagag tgccatatat	5340
atgcgggttg aaataccgca cagatgcgtt aggagaaaaat accgcatcag gcgccttcc	5400
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgtcggc tgcggcggc ggtatcagct	5460
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	5520
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc	5580
cataggetcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	5640
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccctg gaagctccct cgtgcgtct	5700
cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggagcgtg	5760
gcgccttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcaaggcgg ttaggtcggt tcgcctcaag	5820
ctggcgtgtg tgacacgaaacc cccgttcag cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat	5880
cgtttgagt ccaacccgtt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	5940
aggattagca gagcgaggtt ttagggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggctaacc	6000
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccc	6060
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggttt	6120
tttgttgcgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcagaaga tccttgatc	6180
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaggat tttggctatc	6240
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca	6300
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtggcga	6360
cctatctcag cgtctgtct atttcgttca tccatagttt cctgactccc cgtctgttag	6420
ataactacga tacgggaggc cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgtt accgcgagac	6480

ccacgctcac	cggtccaga	tttatcagca	ataaacaggc	cagccggaag	ggccgagcgc	6540
agaagtggtc	ctgcaactt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaatttttg	ccggaaagct	6600
agagtaagta	gttgcgcagt	taatagtttgc	cgcaacgttg	ttgccattgc	tgcaggcatc	6660
gtgggtcac	gcicgtcgtt	tggatggct	tcatcagct	ccggttccca	acgatcaagg	6720
cgagttacat	gatccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	6780
gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	6840
tctcttactg	tcatgccatc	cgtaaagatgc	tttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	6900
tcattctgag	aatagtgtat	gccccgcaccg	agttgtctt	gcccggcg	aacacggat	6960
aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaa	gtgcacatca	ttggaaaacg	ttctcg	7020
cgaaaaactct	caaggatctt	accgctgttgc	agatccagtt	cgtgttaacc	cactcgtgca	7080
cccaactgat	cttcagcattc	ttttacttc	accagegtt	ctgggtgagc	aaaaacagga	7140
aggcaaaatg	ccgcaaaaaaa	gggataagg	gacacacgga	aatgttgaat	actcataactc	7200
ttcccttttc	aatattatttgc	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	7260
tttgaatgta	tttagaaaaaa	taaacaata	ggggtccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtgc	7320
ccacctgacg	tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	7380
acgaggccct	ttcgcttca	agaa				7404
<210>	6					
<211>	41					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	PCR Primer					
<400>	6					
catatgaaag	cttgtatcga	ttaataagg	aggaataaac	c		41
<210>	7					
<211>	6266					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	7					
cccgcttac	tgtcgaaat	tgcgttggc	cgattcat	atgcagctgg	cacgacaggt	60
ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	120
aggcacccca	ggcttacac	tttatgcttc	cggtcgat	tttgttgaa	attgtgagcg	180

gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gtatcgatta	240
aataaggagg aataaaccat gtgtgcgacc tcttctaat ttactcagat taccgagcat	300
aattcccgta gttccgcaaa ctatcagcca aacctgtgga atttcgaatt cctgaatcc	360
ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg gaggagaag cgaccaaact ggaggaagaa	420
gttcgctgca tgatcaaccg tgttagacacc cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac	480
gatgtgcagc gcctgggtct gacctacaaa tttgaaaaag acatcattaa agccctggaa	540
aacatcgta tacgtggacga aaacaaaaag aacaaatctg acctgcacgc aaccgctctg	600
tcttccgta tgctgcgtca gcacggttc gaggtttctc aggatgttt tgagcgtttc	660
aaggataaaag aagggtgtt cagcggtaa ctgaaaggta acgtccaagg cctgcgtgac	720
ctgtatgaag cgtcttacct gggttcgag ggtgagaacc tgctggagga ggcgcgtacc	780
ttttccatca cccacctgaa gaacaacctg aaagaaggca ttaataccaa gttgcagaa	840
caagtgagcc acgcctgga actgccatat caccagcgtc tgccacgtt ggaggcacgt	900
tggttctgg ataaatacga accgaaagaa ccgcattacc agctgctgt ggagctggcg	960
aagctggatt ttaacatggt acagaccctg caccagaaag agctgcaaga tctgtccgc	1020
tggtgaccc agatgggcct ggctagcaaa ctggattttg tacgcgaccg cctgatggaa	1080
gtttatttct gggcactggg tatggcaca gacccgcagt ttggtaatg tcgcaagct	1140
gttactaaaa tgggtgtt ggtgacgatc atcgatgacg tgtatgacgt ttatggact	1200
ctggacgaac tgcactgtt caccgatgtc gtagagcgtt gggacgttaa cgctattaac	1260
accctgcgg actatatgaa actgtgttc ctggcactgt acaacaccgt taacgacacg	1320
tcctattcta ttctgaaaga gaaaggtcat aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg	1380
cgtgaactgt gcaaaaggctt tctgcaagag gcgaaatggt ccaacaacaa aattatcccg	1440
gctttctcca agtacctgga aaacgccagc gtttccctt ccgggtgtac gctgctggcg	1500
ccgtcttact ttccgtatc ccagcagcag gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc	1560
ctgaccgact tccatggct ggtgcgtt agctgcgtt a tttccgcct gtcaacgat	1620
ctggccaccc tgcggcgga gctgaaacgt ggcgagacta ccaattctat cattagctac	1680
atgcacgaaa acgtggta cagcgaggaa caggccccg aagaactgca taaactgatc	1740
gacgccgaat ggaaaaagat gaatcgtaa cgccgttagcg actccaccct gctgcctaaa	1800
cggttcatgg aaatcgcaatcgtttaa catggca cgtgttccc actgcaccta ccagatggc	1860
gatggctgtt gtcgcccaga ctacgcact gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac	1920
ccttcccgta ttaaccagct gatgtatgtc taactgcagg tcgactctag aggtccccg	1980
ggtaccgagc tgcatttcac tggccgttgtt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg	2040

cgttacccaa ctaatcgcc ttgcagcaca tcccctttc gccagctggc gtaatagcga	2100
agaggcccgc accgatcgcc cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct	2160
gatgcgttat ttctccta cgcatctgtcg cggtatttca caccgcataat ggtgcactct	2220
cagtacaatc tgctctgtat ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc	2280
tgacgagctt agtaaagccc tcgcttagatt ttaatgcgga tggcgttgcatt acttcgc当地	2340
ctattgcgtt aacaagaaaa agccagcctt tcatgtatata tctcccaatt tgtgttaggc	2400
ttattatgca cgcttaaaaa taataaaaagc agacttgacc tgatagtttgcgttgagca	2460
attatgtgct tagtgcatct aacgcgtttag ttaagccgcg ccgcgaagcg gcgtcggctt	2520
gaacgaattt ttagacatta ttgcgcact accttgttgc tctgcctt cacgtatgg	2580
acaatttctt ccaactgatc tgccgcgcgag gccaaagcgat ctcttcttgc tccaagataa	2640
gcctgtctag ctcaagttt gacgggcttga tactggcccg gcaggcgctc cattgccag	2700
tcggcagcga catccttcgg cgcgattttgc cggttacttgc cgctgtacca aatgcgggac	2760
aacgtaaagca ctacatttcg ctcatcgcca gcccagtccgg gggcgagtt ccatacgctt	2820
aaggtttcat tttagccctc aaatagatcc tggcgttgcggatcaaa gagttccctcc	2880
gccgctggac ctaccaaggc aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagcaa gatagccaga	2940
tcaatgtcga tggcgttgcgg ctgcgttgcgcata cctgcgttgcgc tggcatttgc	3000
ccaaatttgcgtt agctggatca cggccacggaa tggatgtcgatc gtgcacaaca	3060
atggtgactt ctacagcgatc gagaatctcg ctctctccag gggaaaggccga agttccaaa	3120
aggtcggttga tcaaaatcgatc cggcggttgc tcatcaagcc ttacggtacatcgatc	3180
aaatcaatat cactgtgtgg cttagggccg ccatccacttgc cggagccgtt caaatgtacg	3240
gccagcaacg tgggttcggatggcgatcgatc gggccaaatccatcgatc tagttggatc	3300
gataacttcgg cgtatcaccgc ttccctcatg atgtttactt tgggtttagg ggcactgccc	3360
tgctcgtaa catcgatcgatc gtcgttgcgcataac atcaaaatcgatc gacccacggc gtaacgcgtt	3420
tgctgtttgg atggccgagg catagactgt accccaaaaaa aacagtcata acaagccatg	3480
aaaaccgcctt ctgcgcgtt accaccgttgcgtt cttcggttca aggttctggatccatcgatc	3540
gagcgatcatac gctacttgcata ttacagcttgcata cggatccatcgatc aggtttatgtt ccactgggtt	3600
cgtgccttca tccgtttccatcgatc cggatccatcgatc cttggccatcgatc cggatccatcgatc	3660
gaggcatttc tggcgttgcgtt ggcgaacgcgatcgatc cggatccatcgatc gatcgatc	3720
gcattggccgg cttcgatcgatc cttctacggc aaggtgtatcgatc gcacggatcgatc ggcctggctt	3780

caggagatcg gaagacctcg gccgtcgccgg cgcttgcggg tggcgtac cccggatgaa	3840
gtggttcgca tcctcggtt tctggaaaggc gagcatcggt tggtcgccca gcttcgttat	3900
ggAACGGGCA tgccgatcag tgagggttg caactgcggg tcaaggatct ggatttcgat	3960
cacggcacga tcatcggtcg ggaggcgaag ggctccaagg atcgggcctt gatgttaccc	4020
gagagcttgg cacccagcct gcgcgagcag gggaaattaat tcccacgggt tttgctgcc	4080
gcaaacggc tgttctgggt ttgcgtatgg tttatcgaaa tcgcagatcc ggcttcagcc	4140
ggtttgcgg ctgaaagcgc tatttttcc agaattgcca tgatttttc cccacgggag	4200
gcgtcactgg cttccgtgtt gtcggcagct ttgattcgat aagcagcatc gcctgtttca	4260
ggctgtctat gtgtgactgt tgagctgtaa caagttgtct caggtgttca atttcatgtt	4320
ctagttgctt tgtttactg gttcacctg ttctattagg tgttacatgc tgttcatctg	4380
ttacattgtc gatctgttca tggtaaacag cttgaatgc accaaaaact cgtaaaagct	4440
ctgatgtatc tatctttttt acaccgtttt catctgtgca tatggacagt ttccctttg	4500
atatgtaaacg gtgaacagtt gttctacttt tgttgttag tcttgatgtct cactgata	4560
atacaagagc cataagaacc tcagatcctt ccgtattttag ccagtgatgtt ctctagtg	4620
gttcgttgtt ttgcgtgag ccatgagaac gaaccattga gatcatactt actttgcatt	4680
tcaactaaaa atttgcctc aaaactggtg agctgaattt ttgcgtttaa agcatcggt	4740
agtgttttc tttagtccgtt atgttaggtag gaatctgtatg taatggttgt tggtat	4800
tcaccattca ttttatctg gttgttctca agttcggtta cgagatccat ttgtctatct	4860
agttaactt ggaaaatcaa cgtatcagtc gggccgcctc gcttatcaac caccaattt	4920
atattgctgt aagtgtttaa atctttactt attgggttca aaaccatttg gttaagcctt	4980
ttaaactcat ggttagttatt ttcaagcatt aacatgaact taaattcatc aaggcta	5040
tctatatttgc cttgtgagt ttctttgtt gttagttctt ttaataacca ctcataaaatc	5100
ctcatagagt atttgcgttca aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaattt	5160
ttaactgga aaagataagg caaatctct tcactaaaaa ctaattctaa ttttcgctt	5220
gagaacttgg catagttgtt ccactggaaa atctcaaagc cttaaccaa aggattccgt	5280
atccacacag ttctcgatcat cagctctgtt gttgtttagt ctaatacacc ataagcattt	5340
tccctactga tggcatcat ctgagcgat tgggtataag tgaacgatac cgtccgttct	5400
ttccctgttag ggtttcaat cgtgggttg agtagtgcca cacagcataa aattagctt	5460
gtttcatgtt ccgttaagtc atagcgacta atcgctagtt catttgcgtt gaaaacaact	5520

aattcagaca tacatctcaa ttggcttagg tgatTTAAT cactatacca attgagatgg	5580
gctagtcaat gataattact agtcCTTTC ctTTGAGTGT tgggtatctg taaATTCTGC	5640
tagacCTTG ctggaaaACT tGtaaATTCT GCTAGACCT CTGtaaATTc CGCTAGACCT	5700
tttgtGTTT ttttGTTA tATTCAGTG GTTATAATTt ATAGAATAAA GAAAGAAATAA	5760
aaaaAGATAA AAAGAATAGA TCCcAGCCT GTGTATAACT CACTACTTA GTCAGTTCG	5820
cAGTATTACA AAAGGATGTC GCAAACGCTG TTTGCTCCTC TACAAAACAG ACCTAAAC	5880
cCTAAAGGCT TAAGTAGCAC CCTCGCAAGC TCGGGCAAAT CGCTGAATAT TCCTTTGTC	5940

tccgaccatc aggcacctga gtcgctgtct tttcgtgac attcagttcg ctgcgtcac	6000
ggctctggca gtGAATGGGG Gtaaatggca ctacaggcgc ctTTTATGGA ttcatgcaag	6060
gaaACTACCC ATAATACAAG AAAAGCCCgt cacgggcttc tcagggcgTT ttatggcggg	6120
tctgttatgt ggtgttatct gactTTTGC tGTTcAGCAG ttctgtccct ctgattttcc	6180
agtctgacca ctTCGGATTA TCCGTGACA ggtcattcAG actggctaAT gcACCCAGTA	6240
aggcagcggT atcatcaaca ggctta	6266

<210> 8

<211> 1695

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 8

atgtgtcaa CCTCCTCCA gtttactcag attaccgagc ataattctcg acgatctgct	60
aactaccAGC cgaacCTTtG gaactttgag ttTCTCAGT ctctcgaaaa tgacctgaag	120
gtggaaaAGC tcgaggagaa ggcgacccaa ctcgaggagg aggtgcgatg tatgtcaac	180
agagttgaca cccaACCCt gtcttgctg gagctgatcg acgatgtgca gcggttgggt	240
ttgacttata aattcgagaa ggacattatc aaggcactgg agaacattgt gtcctcgac	300
gagaacaaga agaacaagtc tgatttcac gctaccgctc tctttccg acttttcga	360

caacacggct tcgaggtgtc gcaggacgtc ttGAGAGAT ttaaggacaa ggagggagga	420
tttagcggcg agctgaaggg agacgttcaG ggtttctct cttgtacga ggcgtctac	480
ctgggattcg agggagagaa CCTCCTGGAG gaagctcgta catTTCCAT cactcacTT	540
aagaataacc ttaaggaggg aattaacacc aaggTggccg agcaggTTc tcacGCCtG	600
gagctcccct accaccaacg gtcctcataga ctggaggctc gttggTtct ggacaaatat	660
gagccaaagg agcctcatca tcagttgtc ttggagtgg ccaagctgga cttcaatatg	720
gttcagacgc tgaccaaaa ggagttgcag gacctgtctc gatggTggac cgagatggga	780

ttggcctcgaa	agctggattt	tgtccgtgac	cga	cttatgg	agg	tctat	ttggccctt	840
ggaatggcg	ctgacccca	gtt	cggagag	tgccg	gaagg	cgg	tgcacgaa	900
ctt	gtgacta	tca	tgcacga	cgt	ctacgat	gtc	tacggca	960
ttc	acigacg	ccg	tcgagcg	atgg	gatgt	aac	gccat	1020
aag	ctgtgct	tc	cgttgc	tca	aca	act	gttgc	1080
gagaagg	gac	aca	acaat	ctc	cgtact	tat	cctcaag	1140
ttt	ctgcagg	agg	cta	ata	ac	a	gtcaagg	1200
gaaaatgc	cgt	gtcgag	ctc	tgc	gc	cc	ttc	1260
tgcc	cagc	agg	agg	at	ttc	cgat	cat	1320
ctc	gtgc	gt	at	ttt	tcg	ttt	cgat	1380
gag	ctgg	aa	cc	ttt	cg	ttt	cgat	1440
acat	ctga	ac	aa	ttt	cg	ttt	cgat	1500
atg	aac	ac	aa	ttt	cg	ttt	cgat	1560
gtg	aac	at	aa	ttt	cg	ttt	cgat	1620
gactacg	cgt	ctc	atgg	at	ttt	cgat	at	1680
ttgatgtac	gt	at	ttt	cgat	at	ttt	cgat	1695
<210>	9							
<211>	40							
<212>	DNA							
<213>	Artificial Sequence							
<220><223>	PCR Primer							
<400>	9							
gcttatggat	cctctagact	attacacgt	catcaattgg				40	
<210>	10							
<211>	30							
<212>	DNA							
<213>	Artificial Sequence							
<220><223>	PCR Primer							
<400>	10							
caccatgtgt	gcaac	ctc	c	ccc	agtt	ac	30	
<210>	11							
<211>	8190							

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

tcgaccggtg agaagaacag catcggaaca agggaaaggaa gaacaagac aaagaaaaca	60
aaagaaagca attaaaaaca aaacaaaaca atttcatc cttctttat cattcccttt	120
ctttctttt ctctcattca acgcactcca tcgtatccgt attccttta tttttctct	180
ttctctataat ccattcttt ctctcttaggt gtgtccttc tctctttca atttcttac	240
tccgcattcc aacgcattct tcccccaacc tcccatttcc tccttacggc ccgatagcga	300
tcgtcttcc ctgcgtatca ctgcgtaccg gcccctcctc tgacccgtaa cctccatcg	360
atttaccata tcataaagtt tttccgacg cttatcgctg accccctgtc gccccttat	420
tggcttcgg attatcttct tgtccataag gtgatccatg cttcctgaag attcccgaaa	480
tgtgtccact ttggcgggaa atcattccat ccacttctt ctctctcgct ttcctcatc	540
ggcgctcccc ttcccgctc cattggctt ccgctccgtt tttgcttgc cgatgttact	600
tggggagagg tgcgataatc cttcgcaaa aactcggtt gacgcctccc atggataaa	660
tagtgggtgg tggacaggtg cttcgctt tcttaagca agagaatccc attgtctga	720
ctatcacgaa ttacataca ttatgaagat caccgctgtc attgccctt tattctact	780
tgctgctgcc tcacccattc cagttgccga tcctgggtgt gttcagttt gcaagtcata	840
tgctgatttc cticgtgtt accaaagtgtt gaacactttt gctaattctg atagacccaa	900
ccttaagaag agaaatgata cacctgcaag tggatatcaa gttgaaaaag tcgtaatttt	960
gtcacgtcac ggtgttaggg cccctacaaa aatgactcaa accatgcgtg atgtcactcc	1020
taatacatgg ccagaatggc ccgttaaattt aggatattt acaccaagag gtgaacactt	1080
gatatcaattt atggcggtt ttaccgtca aaaattccag caacaaggaa tccttctca	1140
gggcctctgt cctactccta actccatata tgtctggct gacgtcgatc agcgtacttt	1200
aaaaacttgtt gaagcattcc ttgctggttt ggcaccacaa tggcttga caattcatca	1260
ccaacaaaat ctggagaaag ctgatccctt ttttcatccc gttaaagctg gAACCTGCTC	1320
tatggataaa actcaagttc aacaagctgt tgagaaggag gcacaaactc ctatagataa	1380
tttgaatcaa cattacatcc ctttttagc ttatgaat acaacattaa atttttagtac	1440
ttctgcctgg tgccaaaaac actctgctga taaatctgt gacctaggtt tatccatgcc	1500
ttctaaatttgc tccataaaag ataatggtaa caaggtcgca ttggatggag ctattggct	1560
atccctactt ttggccgaga tttttcttct tgaatatgct caaggcatgc ctcaagctgc	1620

ttgggttaac atccactcg agcaagagtg ggcttccttg ctaaaggatgc ataatgttca 1680
attcgattt atggcccgaa caccttatat tgctcgacat aacggactc ctttattgca 1740
agctatatca aatgcccta atccaaacgc cactgaatca aaacttccag atatttcacc 1800
tgataacaaa atattgttca ttgcaggtca tgacacaaaat attgctaata tagccggcat 1860
gttaaatatg cggtggacat taccaggta accagataat actcctccag gtgggtccct 1920
agtatttgaa cgtcttgctg ataaaagtgg aaaacaataat gtttctgtat ctatggttta 1980

tcaaacacta gaacaacttc gatcacagac tccccttct ctaaatcagc ctgccccgatc 2040
tgttcaactt aaaattccag gttgaatga tcaaacagcc gagggttact gtcctttc 2100
cactttaca agagttgtt cccaatctgt tgaacctgga tgccaaacttc aataatgagg 2160
atccaagtaa gggaaatgaga atgtgatcca ctttaattc ctaatgaata catgcctata 2220
gttctttct tttgttctt atgtcggtt tcgatggta ggcgcgtgtc aatctcagg 2280
tgtgtgctg gttgcagctt gtttcaaat ctgttcatct catgaatctt ttaccatttc 2340
accacacgtt tataccattc tctcatagaa tcttcatcaa accatctcggtt ggttagagtg 2400

gaaagaaaatg cttgttctt tatttcctt tttccatctt caaggcttt ctttcttcc 2460
tccctctgt tcatctigag gtttgacgtg tctgtttaga attttgagct gttgcagcat 2520
cttattttt gtttgcgaa aacgaagcgc tttactctt tcatcagttg gacgattgt 2580
ccttgaaaaa ccaactactt ttgcattgtt tgtatagaaa tcaatgatata tagaatccca 2640
tccttaattt tcttcaaag tagttgagct atagttaaatg gtaaggggccc tactgcgaaa 2700
gcatttgcca aggtttttt cattaatcaa gaacgaaatg tagggatcg aagacgatca 2760
gataccgtcg tagtcttaac cataaactat gccgactagg gatcggcaatg ttttcattt 2820

atcgacttgc tcggcacctt acgagaaaatc aaagtctttg gttccgggg ggagtatgg 2880
cgcaaggctg aaacttaaag gaattgacgg aagggcacca caatggagtg gagcctgcgg 2940
cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga catagtaagg attgacagat 3000
tgagagctt ttcttgattc tatgggtgtt ggtgcattgc cgttcttagt tggggagtg 3060
atttgcattgc ttaattgcga taacgaacga gacctaacc tgctaaatag ctggatcagc 3120
catttggct gatcatttagc ttcttagagg gactattggc ataaagccaa tggaagttt 3180
aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga ttttctgggc cgcacgcgcg ctacactgac 3240

ggagccaaacg agttgaaaaa aatctttga tttttatcc ttggccggaa ggtctgggt 3300
atcttgcattaa actccgtcg gctggggata gaggattgca attattgcgg cgcctctca 3360
attcgatgtt gcagattttta caagttttta aatgttattt cattattact ttttattatgc 3420
ctaataaaaaa agccatagtt taatctatag ataactttt ttccagtgca ctaacggacg 3480

ttacattccc atacaaaact gcgttagttaa agctaaggaa aagttaatat catgttaatt	3540
aaatacgcta ttacaataa gacattgaac tcatttatat cggtgaatat gaataaccaa	3600
tttcagcga ttttaacaa acatcgta cctcgtaa ggatatctt tgtatgggt	3660
gttgacttgc ttatcgaat aattaccgta cctgttaattt gcttgctgga tatagcgta	3720
gtctaatatc tagcaaaaat ctttgggtg aaaaggctt caatttcacg acaccgaact	3780
atttgtcatt tttataataag gaagtttcc ataaattcct gtaattctcg gttgatctaa	3840
ttgaaaagag tagtttgca tcacgatgag gaggccttt gttagaaagaa atacgaacga	3900
aacgaaaatc agcgttgcca tcgcttgga caaagctccc ttacctgaag agtcaattt	3960
tattgtgaa ctataactt ccaagcatgc aaaccaaaag ggagaacaag taatccaagt	4020
agacacggga attggattct tggatcacat gtatcatgca ctggctaaac atgcaggctg	4080
gagcttacga cttaactcaa gaggtgattt aatcatcgat gatcatcaca ctgcagaaga	4140
tactgctatt gcacttgta ttgcattcaa gcaggctatg ggtaacttt ccggcgtaa	4200
aagatttggaa catgcttatt gtccacttga cgaagcttt tctagaagcg tagttgactt	4260
gtcgggacgg ccctatgctg ttatcgatt gggattaaag cgtgaaaagg ttgggaaatt	4320
gtcctgtgaa atgatccctc acttactata ttcccttcg gtagcagctg gaattacttt	4380
gcatgttacc tgcttatatg gtagtaatga ccatcatcgt gctgaaagcg cttaatc	4440
tctggctgtt gccatgcgca cgctactag ttacttgaa agttctgaag tcccaagcac	4500
gaagggagtg ttgtaaagat gaattggatt atgtcaggaa aagaacgaca atttgcattc	4560
caaattgtct aaattttaga gttgctgaa aacaatagaa cttacttgc ttataatta	4620
cgttaattag aagcgttatac tcgtgaagga atatagtacg tagccgtata aattgaattt	4680
aatgttcage ttatagaata gagacacttt gctgtcaat gctgtcgtac ttaccatact	4740
cactttata tacgacttta agtataaact ccgcggttat ggtaaaatta atgatgcaca	4800
aacgtccgat tccatatggg tacactacaa ttaaataactt ttaagctgat cccccacaca	4860
ccatagcttc aaaatgttcc tactccttt ttactctcc agatttctc ggactccgca	4920
catgccgtt ccacttcaa acacccaagg acagcatact aaatttccc ttctttcc	4980
tctagggtgt cgtaattac ccgtactaaa ggtttggaaa agaaaaaaaga gaccgcctcg	5040
tttcttttc ttctgtgaaa aaggcaataa aaattttat cacgttctt ttcttgaaa	5100
ttttttttt tagttttttt ctcttcagt gacccctt gatatttaag ttaataaacg	5160
gtcttcaatt tctcaagttt cagtttcatt ttcttggtt tattacaact tttttactt	5220
cttggcattt agaaagaaag catagcaatc taatctaagg gctgtgttga caattatca	5280

tcggcatgt atatcgccat agtataatac gacaaggta ggaactaaac catggccaag	5340
ttgaccagt ccgttccgt gctcacccgcg cgacgtcg ccggagcggt cgagttctgg	5400
accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgcgg tttggtccgg	5460
gacgacgtga cccgttcat cagcgcggc caggaccagg tggtgccgga caacaccctg	5520
gcctgggtgt gggtgccgg cctggacgag ctgtacgcgg agtggtcgga ggtcggtcc	5580
acgaacttcc gggacgcctc cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca gccgtgggg	5640
cgggagttcg ccctgccgca cccggccggc aactgcgtc acttcgtggc cgaggagcag	5700
gactgacacg tccgacggcg gcccacgggt cccaggccctc ggagatccgt ccccctttc	5760
ctttgtcgat atcatgtaat tagttatgtc acgttatcat tacgcgcctc ccccacatc	5820
cgctctaacc gaaaaggaag gagtttagaca acctgaagtc tagtcccta tttatttttt	5880
tatagttatg tttagtattaa gaacgttatt tatatttcaa attttcttt ttttctgtat	5940
cagacgcgag ctcccagta aatgtgccat ctgcgtaggca gaaaacgggtt ccccgtagg	6000
gtctctctct tgccctcctt tctaggtcgg gctgattgtc ttgaagctc tctaggggg	6060
ctcacaccat aggcagataa ctttccccac cggctcgct cgttaagcgca caaggactgc	6120
tcccaaagat cctaggccggg attttgcga ttccggccta aaggaaccgg aacacgtaga	6180
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc gnatgaatgt cagctactgg gctatctgga	6240
caagggaaaa ccaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtggcgtt acatggcgat	6300
agctagactg ggcgtttta tggacagcaa gcgaaccggaa attgccagct ggggcgcct	6360
ctggtaaggt tggaagccc tgcaaagtaa actggatggc ttcttgccg ccaaggatct	6420
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcattgtt	6480
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgttgggtt ggagaggcta ttccgtatg	6540
actggcaca acagacaatc ggctgctctg atgcccggctg ttccggctg tcagcgagg	6600
ggccccggc tcttttgtc aagaccgacc tgcgtggc cctgaatgaa ctgcaggacg	6660
aggcageggcg gctatcggtt ctggccacga cggcggttcc ttgcgcagct gtgcgtcgac	6720
ttgtcactga agcggaaagg gactggctgc tattggcga agtgcgggg caggatctcc	6780
tgtcatctcg cttgtctctt ccgcgagaaag tatccatcat ggctgtatgca atgcggccgc	6840
tgcatacgct tgcgtccgtt acctgcccatt tcgaccacca agcgaacat cgcattcgac	6900
gagcacgtac tcggatggaa gccggcttg tcgatcgatggaa tgcgtggac gaagagcatc	6960
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc ggcgcattcccc gacggcgagg	7020

atctcgctgt gatccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtgaa aatggccgt	7080
tttctggatt caacgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcgac gacatagcgta	7140
tggatacccg tggatattgtt gaagagcttgc gcccgaatggctgaccgc ttccctgtgc	7200
tttacggtat cggcgctccc gattcgcaggc gcatgcctt ctatgcctt cttgacgagt	7260
tcttcgtaat tggaaaaggtt accaagtttca ctcataatata ctttagattt atttaaaact	7320
tcattttaa tttaaaaggtt tctaggtgaa gatccctttt gataatctca tgaccaaata	7380
cccttaacgt gagtttcgtt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc	7440

ttcttgagat ccttttttc tgcgctaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt	7500
accagcggtt gtttgttgc cgatcaaga gctaccactt cttttccga aggttaactgg	7560
cttcagcaga ggcagatac caaatactgt cttcttagtg tagccgtgt taggccacca	7620
cttcaagaac tctgttagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	7680
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac cgggttgac tcaagacgtt agttaccggaa	7740
taaggcgcag cggtcggtt gaaacgggggg ttctgtgcaca cagcccgact tggagcgaac	7800
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgctccccga	7860

agggagaaag gcccggacaggat atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	7920
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg	7980
acttggcggtt cgatTTTGT gatgctcgcc agggggcggtt agcctatggaa aaaacggccag	8040
caacgcggcc ttttacgggtt tcctggcctt ttgctggcctt tttgctcaca tttttttcc	8100
tgcgttatcc cctgattctg tggataacgg tattaccggc tttgagtgatc ctgataccgc	8160
tcgcgcgcaggc cgaacgcaggc agcgcaggcga	8190

<210> 12

<211> 1724

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 12

gaattcaaaa caaaatgtgtt gcaacctctt cccagtttac tcagattacc gagcataatt	60
ctcgacgatc tgcttaactac cagccgaacc ttggaaactt tgatTTCTC cagtcctcg	120
aaaatgacctt gaaggtggaa aagctcgagg agaaggcgac caaactcgag gaggagggtgc	180
gatgtatgtt caacagatgtt gacacccaaac ccctgtttt gctggagctg atcgacgtat	240
tgcagcggtt gggtttgact tataaattcg agaaggacat tatcaaggca ctggagaaca	300
tttgctcctt cgacgagaac aagaagaaca agtctgatct tcacgctacc gctctcttt	360

tccgacttct tcgacaacac ggcttcgagg tgtcgagga cgtttcgag agatthaagg	420
acaaggaggg aggatttagc ggcgagctga agggagacgt tcagggctt ctctccttgt	480
acgaggcgta ctacctggaa ttcgagggag agaacctcct ggaggaagct cgtacattt	540
ccatcactca ccitaagaat aacctaagg agggattaa caccaagggtg gccgagcagg	600
tttctcacgc cctggagctc ccctaccacc aacggctcca tagactggag gctcggttgt	660
tcctggacaa atatgagcca aaggagcctc atcatcagt gctgttgag ttggccaagc	720
tggacttcaa tatggttcag acgctgcacc aaaaggagtt gcaggacctg tctcgatggt	780
ggaccgagat gggattggcc tcgaagctgg atttgtccg tgaccgactt atggaggct	840
attttggc cctiggaatg ggcgcgtacc cccagttcg agagtccgg aaggcggtga	900
cgaagatgtt cggtcttgtg actatcatcg acgacgtcta cgatgtctac ggcacactcg	960
acgagttgca gctgttact gacgcccgtc agcgatggaa tgtgaacgcc attaataactc	1020
tccctgacta tatgaagctg tgcttcctgg ctctgtacaa cactgtcaac gataacctgt	1080
actctatcct caaggagaag ggacacaaca atctctccta cttagacaaa tcctggcag	1140
aactgtgcaa ggctttctg caggaggcta aatggtccaa taacaagatc attcctgctt	1200
tttctaaata cctggaaaat gcctcggtgt cgagctctgg cgtcgcctt ctggccctt	1260
cctacttctc cgctgtccag cagcaggagg atattccga tcatgctt agatcgctga	1320
ccgatttca cggcctcggtc cgatcttctt gcgtgatttt tcgggttgtt aatgaccttg	1380
cgacactctgc tgctgagctg gaacgaggcg agactacaaa ttccattatt tcttacatgc	1440
acgaaaacga tggAACATCT gaagaacagg ctagagagga actgcgaaag ttgatcgacg	1500
ccgagtggaa gaagatgaac agagagcggg tgtccgactc taccctgctt cccaggcct	1560
tcatggagat cggcgtaac atggctcgag ttcccattt tacttaccag tacggtgacg	1620
gcctgggtcg tccggactac gctacagaga accgaatcaa gctgctgctc atcgaccct	1680
tccctatcaa ccaatttgat tacgtgtaat agtcttagagg atcc	1724
<210> 13	
<211> 1701	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 13	
gaattcaaca aaaatgtgct ctgtttccac tgagaacgtg tccttactg agactgagac	60
tgaaggcacgt agaagcgcca actacgaacc caactcctgg gattatgact ttctgctg	120

ttctgacacc gacgagtcga tcgaggat taaggataag gccaagaaac ttgaggccga	180
ggtcagacga gagattaaca acgagaaggc cgagttcctg accttcttgc agctgtcgaa	240
caacgttcaa cgactggc ttggttaccg tttcgaaatcc gatatccgac gtgcattgga	300
tgcatttgc tcgtccggag gttcgatgg tgtgactaag acgtcgctgc acgccacagc	360
tcttccttc agactgttgc ggcagcatgg atttgagggtt tcccaggaag cctttctgg	420
tttcaaggat cagaacggaa acttttggaa gaatctcaag gaggacacca aggccatcct	480
gtcggttat gaggcctcg tccctggctct tgagggcgag aatattctgg atgaggctcg	540
gttttcgct atttcgcacc tgaaggagtt gtcggaggaa aagatcgaa aggaactggc	600
cgagcaggc aaccatgcac ttgaacttcc cctgcatcgac cgtaaccagc gactggaggc	660
cgtgtggagc atcgaggcgt acagaaaaaa ggaggatgct aatcaggatc tgctcgaact	720
cgctatcctc gactataaca tgattcagag cgtgtaccag cgtgacttgc gagagacaag	780
ccggtgttgg cgacgggtgg gactggccac gaagctccac tttgctaaag atcgattgat	840
tgagtcgttc tactggcag tgggtgtggc ctttgcgcct cagtactccg actggcggaaa	900
ctccgttgca aagatgtttt ctttgtcac tatcatcgac gacatctacg atgttacgg	960
cactctcgat gaactcgaaac tttcacggc cgctgtcgag cgatggatg tgaatgcatt	1020
taatgatctg ccagattata tgaagttgtg tttctggcg ctctacaaca caattatga	1080
aattgcctac gacaacctca aggacaaggg agagaacatt ctgccttacc ttactaaagc	1140
ctggccgac ctgtgtaacg ctttttgc ggaagccaag tggctctata acaaatttac	1200
tcctacattt gatgactact tcggcaacgc ttggagactt tccagcggcc ctctccagtt	1260
gatttcgct tactttgcag tggccagaa catcaagaaa gaggagattt agaacctcca	1320
gaagtatcac gacatcatct cccgacattc gcacatctt cgactgtgca atgacattgc	1380
ctccgcattcc gctgagattt cccgaggaga aacagccat tctgtgtcgt gttacatgcg	1440
tacaaaggc atctccgagg agctggctac cgagtctgtg atgaacctga tcgatgaaac	1500
ctgttaagaag atgaacaaag agaaactggg cggttcttg ttcgccaac catttggta	1560
aaccgcgtac aatctggctc gtcagtctca ttgtacttac cataacggtg acgcgcacac	1620
ttcggccgac gaattgaccc gtaagcgtgt gctttcggtt attaccgagc cgatcctgcc	1680
gttgcgaaaga taataggatc c	1701
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PCR Primer		
<400>	14		
gatcaagctt aaccggatt 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		
gatcatgcatt tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgaggtt ttgatattgc caaatacccg		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
gctggtagcc tatggattt cgaagttt tagaacaaaa actcatctca gaagaggatc 60
tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt ttaaacggtc tccagcttgg 120
ctgtttggc ggtatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 180
cggtctgata aaacagaatt tgcctggcg cagtagcgcg gtggcccac ctgaccat 240
gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggtctc cccatgcgag 300
agttaggaaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tggcctttc 360

gtttatctg ttgttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 420
atttgaacgt tgcaagcaa cggccggag ggtggcggc aggaccccc ccataaaactg 480
ccaggcatca aattaaggcag aaggccatcc tgacggatgg ctttttgcg tttctacaaa 540
ctcttttgt ttatttctt aaatacatcc aaatatgtat ccgcttaacc ggaattgcca 600
gctggggcgc cctctggtaa ggttggaaag ccctgcaaag taaactggat ggcttctcg 660
ccgccaagga tctgatggcg cagggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg 720
tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcgtt ggtggagagg 780

ctattcggt atgactggc acaacagaca atcggtcgct ctgatgccgc cgtgttccgg 840
ctgtcagcgc agggcgcggc ggttctttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 900
gaactgcaag acgaggcagc gcggtatcg tggctggcca cgacggcgt tcctgcga 960
gctgtgtcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc 1020
ggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgc tctgcccaga aagtatccat catggctgat 1080
gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 1140

catcgcatcg	agcgagcacg	tactcgatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	1200
gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctaa	ggcgagcatg	1260
cccgcacggcg	aggatctcg	cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgcgaa	tatcatggtg	1320
gaaaatggcc	gctttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	1380
caggacatag	cgttgctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcgccga	atgggctgac	1440
cgcttcctcg	tgcttacgg	tatcgccgt	cccgattcgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	1500
cttcttgacg	agtcttctg	acatgaccaa	aatccctaa	cgtgagttt	cgttccactg	1560
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatcctttt	ttctgcgcgt	1620
aatctgtgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggttgtt	tgccggatca	1680
agagctacca	actcttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	1740
tgtccttcta	gttagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1800
atacctcgct	ctgctaattcc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtctgtct	1860
tacgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	1920
gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	1980
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcgacaa	ggtatccggt	2040
aagccgcagg	gtcgaaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	2100
tctttatagt	cctgtcggt	ttcgccacct	ctgactttag	cgtcgatttt	tgtgtatgtc	2160
gtcaggggggg	cgagccatat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gccttttac	ggttcctggc	2220
ctttgtctgg	cttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtt	tcccctgatt	ctgtggataa	2280
ccgttattacc	gccttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	2340
cgagtcatgt	agcgaggaag	cgaaagagcg	cctgatgcgg	tatttctcc	ttacgcata	2400
gtgcgttatt	tcacaccgca	tatggtgac	tctcgtaca	atctgcctg	atgcgcata	2460
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	ccccgcacac	2520
ccgccaacac	ccgtgacgc	gccctgacgg	gcttgcgtgc	tccggcata	cgcttacaga	2580
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2640
cgcgcgaggc	agcagatcaa	ttcgccgcgc	aaggcgaagc	ggcatgcatt	tacgttgaca	2700
ccatcgaaatg	gtgaaaacc	tttcgcgtt	tggcatgata	gcccggaa	gagagtcaat	2760
tcagggtggt	gaatgtgaaa	ccagtaacgt	tatacgatgt	cgcagagtat	gccgggtct	2820
cttatcagac	cgttccgc	gtggtaacc	aggccagcca	cgttctgcg	aaaacgcggg	2880

aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac	2940
tggccggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc	3000
cgtcgcaaat tgtcgccgatc attaaatctc ggcgcgatca actgggtgcc agcgtggtg	3060
tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggccgtgcac aatcttcgt	3120
cgcaacgcgt cagtggctg atcatataact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg	3180
tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca	3240
tcaacagtat tatttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg	3300
cattgggtca ccagcaaatac gcgcgtttag cggcccatt aagttctgtc tcggcggtc	3360
tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctgcataatca aattcagccg atagcggAAC	3420
gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaacatc catgcaatg ctgaatgagg	3480
gcatcggtcc cactgcgtat ctgggtgca acgtatcgat ggccgtggc gcaatgcgcg	3540
ccattaccga gtccggcgtg cgccgtggcgt cgatatctc ggtatggta tacgacgata	3600
ccgaagacag ctatgttat atcccgcgt caaccacat caaacaggat tttcgctgc	3660
tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcgt gtgaaggcgt	3720
atcagctgtt gcccgtctca ctggtaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgaaaa	3780
ccgcctctcc cgcgcgttg ggcattcat taatgcagct ggcacgacag gtttccgac	3840
tggaaagcgg gcagtggcgca acgcatt aatgtgagtt agcgcgaaatt gatctggttt	3900
gacagcttat catcgactgc acgggtcacc aatgcgttcg gctcaggca gccatcgaa	3960
gctgtggat ggcgtgtcag gtcgtaaatc actgcataat tcgtgtcgct caaggcgcac	4020
tcccggtctg gataatgttt ttgcgcgaa catcataacg gttctggcaa atattctgaa	4080
atgagctgtt gacaattaat catccggctc gtataatgtg tgaaattgtg agcggataaac	4140
aatttcacac agaaaacacg gcccgtgaga aaaagcgaag cggcactgct cttaacaat	4200
ttatcagaca atctgtgtgg gcactcgacc ggaattatcg attaacttta ttataaaaaa	4260
ttaaagaggt atatattat gtatcgatta aataaggagg aataaaccat gtgtgcgacc	4320
tcttcctaatttactcgat taccgagcat aattccgcgtc gttccgcggaaatcatacgcca	4380
aacctgtgga atttcgaatt cctgcaatcc ctggagaacg acctgaaagt ggaaaagctg	4440
gaggagaaag cgaccaaact ggaggaagaa gttcgctgca tgcataaccg tgttagacacc	4500
cagccgctgt ccctgctgga gctgatcgac gatgtgcagc gcctgggtct gacccataaa	4560
tttggaaaag acatcattaa agccctggaa aacatcgatc tgctggacga aaacaaaaag	4620
aacaaatctg acctgcacgc aaccgcgtcg tcttcgcgtc tgctgcgtca gcacggttc	4680
gagggttctc aggatgttt tgagcggttc aaggataaag aaggtggttt cagcggtgaa	4740

ctgaaagggtg acgtccaagg cctgctgagc ctgtatgaag cgtttaccc gggtttcgag	4800
ggtgagaacc tgcgtggagga ggccgttacc tttccatca cccacctgaa gaacaacctg	4860
aaagaaggca ttaataccaa gtttgcagaa caagtgagcc acgcccctgga actgccatat	4920
caccagcgta tgacccgtct ggaggcacgt tggttctgg ataaatacga accgaaagaa	4980
ccgcatcacc agctgctgct ggagctggcg aagctggatt ttaacatggt acagaccctg	5040
caccagaaag agctgcaaga tctgtcccgcc tgggtggaccg agatgggcct ggcttagcaaa	5100
ctggattttg tacgcgaccg cctgatggaa gtttatttct gggacttggg tatggcgccta	5160
gaccgcagt ttggtaatg tcgcaaagct gttactaaaa tgggtgtct ggtgacgatc	5220
atcgatgacg tggatgacgt ttatggcact ctggacgaac tggactgtt caccgatgtc	5280
gttagagcgct gggacgttaa cgctattaac accctgcggg actatatgaa actgtgttc	5340
ctggcactgt acaaacccgt taacgacacg tcctattcta ttctgaaaga gaaaggtcat	5400
aacaacctgt cctatctgac gaaaagctgg cgtgaactgt gcaaaggcctt tctgcaagag	5460
gcgaaatggt ccaacaacaa aattatcccg gcttctcca agtacctgga aaacgccagc	5520
gtttccctct ccgggttagc gctgctggcg ccgttact tttccgtatg ccagcagcag	5580
gaagacatct ccgaccacgc gctgcgttcc ctgaccgact tccatggtct ggtgcgttct	5640
agctgcgtta tctccgcct gtgcaacgat ctggcacct ctggcgccgaa gctgaaacgt	5700
ggcgagacta ccaattctat cattagctac atgcacgaaa acgtggatc cagcgaggaa	5760
caggcccccgca aagaactgca taaactgatc gacgcccgaat ggaaaaagat gaatcgtgaa	5820
cgcgttagcg actccaccct gtcgcctaaa gcgttcatgg aaatcgagt taacatggca	5880
cgtttccc actgcaccta ccagtatggc gatggtctgg gtcgcccaga ctacgcgact	5940
gaaaaccgca tcaaactgct gctgattgac ctttcccgta ttaaccagct gatgtatgtc	6000
taactgcattt gcccttagga gtaaaaaaaa aatgactgcc gacaacaata gtatgcccc	6060
tgggtgcagta tctagttacg ccaaattagt gcaaaaaccaa acacctgaaag acattttgg	6120
agagtttcct gaaatttattc cattacaaca aagacctaattt acccgatcta gtgagacgtc	6180
aaatgacgaa agcggagaaa catgttttc tggatcatgat gaggagcaaa ttaagttaat	6240
gaatgaaaat tgtattgttt tggattggaa cgataatgct attgggtccgg gtaccaagaa	6300
agtttgtcat ttaatggaaa atattgaaaa gggtttacta catcgatgtcat tctccgtctt	6360
tatTTTcaat gaacaagggt aattactttt acaacaaga gcaactgaaa aaataacttt	6420
ccctgatctt tggactaaca catgctgctc tcatccacta tgtattgtatg acgaattagg	6480
tttgaagggt aagctagacg ataagattaa gggcgctattt actgcggccgaa tgagaaaact	6540
agatcatgaa ttaggtattc cagaagatga aactaagaca agggtaagt ttcactttt	6600

aaacagaatc cattacatgg caccaagcaa tgaaccatgg ggtgaacatg aaattgatta	6660
catcctattt tataagatca acgctaaaga aaacttgact gtcaacccaa acgtcaatga	6720
agttagagac ttcaaatggg tttcacaaa tgatttggaa actatgttg ctgacccaag	6780
ttacaagttt acgccttggt ttaagattat ttgcgagaat tacttattca actggtggga	6840
gcaattagat gaccttctg aagtggaaaa tgacaggcaa attcatagaa tgctataaca	6900
acgcgtctg cattcgccct taggaggtaa aaaaacatga gtttgatat tgccaaatac	6960
ccgaccctgg cactggtcga ctccacccag gagttacgac tggccgaa agagagtta	7020
ccgaaactct gcgacgaact gcgcccgtat ttactcgaca gcgtgagccg ttccagcggg	7080
cacttcgcct ccgggctggg cacggtcgaa ctgaccgtgg cgctgcacta tgtctacaac	7140
accccgttt accaattgtat ttggatgtg gggcatcagg cttatccgca taaaatttg	7200
accggacgcc gcgacaaaat cggcaccatc cgtcagaaag gcggtctgca cccgttccg	7260
tggcgccgcg aaagcgaata tgacgttata agcgtcggc attcatcaac ctccatcagt	7320
gccggaattt gtattgcgt tgctgccgaa aaagaaggca aaaatcgccg caccgtctgt	7380
gtcattggcg atggcgcgt taccgcaggc atggcgttt aagcgatgaa tcacgcggc	7440
gatatccgtc ctgatatgct ggtgattctc aacgacaatg aaatgtcgat ttccgaaaat	7500
gtcggcgcgc tcaacaacca tctggcacag ctgcttcgg gtaagcttta ctcttcactg	7560
cgcgaaggcg gaaaaaaagt ttctctggc gtgccgccaa ttaaagagct gctcaaacgc	7620
accgaagaac atattaaagg catggtagtg cctggcacgt tgtttgaaga gctggcttt	7680
aactacatcg gcccggtgga cggtcacgt gtgctgggc ttatcaccac gctaaagaac	7740
atgcgcgacc tgaaggcccc gcagttcctg catatcatga ccaaaaaagg tcgtggttat	7800
gaaccggcag aaaaagaccc gatcacttgc cacgcccgtc ctaaatttga tccctccagc	7860
ggtttgttgc cgaaaagtag cggcggttg ccgagctatt caaaaatctt tggcgactgg	7920
ttgtgcgaaa cggcagcgaa agacaacaag ctgatggcga ttactccggc gatgcgtgaa	7980
ggttccggca tggtcgagtt ttacgtaaa ttcccgatc getacttcga cgtggcaatt	8040
gccgagcaac acgcggtgac ctttgctgca ggtctggcga ttgggtggta caaacccatt	8100
gtcgcgattt actccacttt cctgcaacgc gcctatgatc aggtgctgca tgacgtggcg	8160
attcaaaagc ttccggtcct gttcgccatc gaccgcgcgg gcattgttgg tgctgacggt	8220
caaacccatc agggtgcattt tgatctct tacctgcgt gcataccgaa aatggtcatt	8280
atgaccccgaa gcgatgaaaaa cgaatgtcgc cagatgctct ataccggcta tcactataac	8340

gatggccgt cagcggtgcg ctacccgcgt ggcaacgcgg tcgggtggaa ctgacgcgc	8400
tggaaaaact accaatggc aaaggcattg tgaagcgtcg tggcgagaaa ctggcgatcc	8460
ttaactttgg tacgctgatg ccagaagcgg cgaaagtgcg cgaatcgctg aacgccacgc	8520
tggtcgatat gcgttttgta aaaccgcgtg atgaagcgtt aaitctggaa atggccgcca	8580
gccatgaagc gctggtcacc gtagaagaaa acgcattat gggcggcga ggcagcggcg	8640
tgaacgaagt gctgatggcc catcgtaaac cagtacccgt gctgaacatt ggcctgcccgg	8700
acttcttat tccgcaagga actcaggaag aaatgcgcgc cgaactcgcc ctcgatgccc	8760
ctggatgga 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 gcctatgcga aattagctt 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 aggaaaaaaaa catgtcag		38
<210>	25	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	25	
gtgctggaat tcgccctct gcagc		25
<210>	26	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	26	
gttagatgcat 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>	35	

<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 aacatgttg cgaccttcc tcaattttact		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	
gtttgacagg ttatcatgca ctgcacggtg caccaatgtt tctggcgtca ggcagccatc		60

sgaaagctgtg gtagggctgt gcaggtcgta aatcaactgca taattcgtgt cgctcaaggc	120
 gcactccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaataattc tgaatgagc ttttgcataat taatcatcg gctcgataa tgtgtggaa tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagcgccgt gagaaaaagc gaagcggcac tgctcttaa caatttatca gacaatctgt gtggcactc gaccggatt atcgattaac ttatttattaa aaaattaaag aggtatatat taatgtatcg attaaataag gaggaataaaa ccatggatcc gagctcgat ccactagtaa cggccgcccag tgtgctggaa ttgcgcctta ggaggtaaaa aaacatgtca ttaccgttct taacttctgc accggaaag gttatttattt ttggtaaca	180 240 300 360 420 480 540
 ctctgctgtg tacaacaagc ctggcgctgc tgctagtgtg tctgcgttga gaacctac gctaataagc gagtcatctg caccgatac tattgaattt gacttcccg acattagctt taatcataag tggccatca atgatttcaa tgccatcacc gaggatcaag taaactccaa aaaattggcc aaggctcaac aagccaccga tggctgtct caggaactcg ttagtcttt ggatccgttg ttagctcaac tatccgaatc ctccactac catgcagcgt ttttttct gtatatgttt gttgcctat gccccatgc caagaatatt aagtttctt taaagtctac tttacccatc ggtgctgggt tggctcaag cgccttatt tctgtatcac tggccttagc	600 660 720 780 840 900 960
 tatggctac ttgggggggt taataggatc taatgacttg gaaaagctgt cagaaaacga taagcatata gtgaatcaat gggccttcat aggtggaaag tgtattcag gtacccttc aggaatagat aacgctgtgg ccacttatgg taatgccctg ctatttggaa aagactcaca taatggaaca ataaacacaa acaattttaa gttcttagat gatttccag ccattccaaat gatcctaacc tatactagaa ttccaagggtc tacaaaagat cttgttgctc gcgttgtt gttggtcacc gagaatttc ctgaagttat gaagccaatt ctatgtccca tgggtgaatg tgccctacaa ggcttagaga tcatgactaa gttaagtaaa tgtaaaggca ccgatgacga	1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380
 ggctgttagaa actaataatg aactgtatga acaactattt gaattgataa gaataaatca tggactgctt gtcataatcg gtgtttctca tcctggatta gaacttatta aaaatctgag cgatgattt agaattggct ccacaaaact taccgggtct ggtggccggc gttgtcttt gactttgtta cgaagagaca ttactcaaga gcaaatttgc agcttcaaaa agaaatttgc agatgattt agttacgaga catttggaaac agacttgggt gggactggct gctgttttt aagcgcaaaa aatttgaata aagatcttaa aatcaaattcc ctgtattcc aattatttga aaataaaaact accacaaagc aacaatttga cgatcttattt ttgcaggaa acacgatattt	1440 1500 1560 1620 1680 1740 1800

accatggact tcataagcta atttgcata ggcctgcacc cttaggagg aaaaaaacat	1860
gtcagagtgc agagcctca gtccccagg gaaagcgta cttagtggg gatatttagt	1920
ttagataca aaatatgaag cattttagt cgattatcg gcaagaatgc atgcgttagc	1980
ccatcctac ggttcatgc aagggtctga taagttgaa gtgcgtgtga aaagtaaaca	2040
atttaaagat ggggagtggc tgtaccat aagtctaaa agtggctca ttccgttgc	2100
gataggcga tctaagaacc ctttcatga aaaagtatc gctaacgtat ttagctactt	2160
taaacctaact atggacgact actgcaatag aaacttgttc gttattgata tttctctga	2220
tgtatgcctac catttcagg agatagcgt taccgaacat cgtggcaaca gaagatttag	2280
ttttcattcg cacagaattt aagaagtcc caaaacaggc ctgggcctt cggcaggttt	2340
agtcacagtt ttaactacag cttggcctc cttttgtt tcggacctgg aaaataatgt	2400
agacaatat agagaagtta ttctataattt agcacaagtt gtcattgtc aagctcagg	2460
taaaatttggc agcgggttg atgtacggc ggcagcatat ggatctatca gatatagaag	2520
attcccaccc gcattaatct ctaatttgc agatatttggc agtgcactt acggcagtaa	2580
actggcgcatt ttgggtgatg aagaagactg gaatattacg attaaaagta accatttacc	2640
ttcgggatta actttatggc tggcgatataa taagaatggt tcagaaacag taaaactgg	2700
ccagaaggta aaaaatttggt atgattcgat tatgccagaa agttggaaaa tatatacaga	2760
actcgatcat gcaaattcta gatttatggc tggactatct aaactagatc gcttacacga	2820
gactcatgac gattacagcg atcagatatt tgagtcttt gagaggaatg actgtacctg	2880
tcaaaatgtt cctgaaatca cagaagttt agatgcgtt gccacaattt gacgttcctt	2940
tagaaaaata actaaagaat ctgggtccga tatcgaaacctt cccgtacaaa ctatgttatt	3000
ggatgattgc cagacctttaa aaggagttct tacttgctta atacctgggtt ctgggttta	3060
tgacgccatt gcagtgatta ctaagcaaga tggatctt aggctcaaa ccgctaatga	3120
caaaagattt tcttaagggtt aatggctggc tgtaactcag gctgactggg gtgttagaa	3180
agaaaaagat ccggaaacctt atcttgataa ataacttaag gtagctgcattt gcaatttcg	3240
cccttaagggc gggaaaaaaa atgaccgtt acacagcatc cgatccgc cccgtcaaca	3300
tgcacccctt taagtattgg gggaaaaggc acacgaagtt gaatctgccc accaattcgt	3360
ccatatcgtt gactttatcg caagatgacc tcagaacgtt gacctctgcg gctactgcac	3420
ctgagtttgc acgcacact ttgtggtaa atggagaacc acacagcatc gacaatgaaa	3480
gaactcaaaa ttgtctgcgc gacctacgccc aatggaaaa gggaaatggaa tcgaaggacg	3540
cctcattgcc cacattatctt caatggaaac tccacattgtt ctccggaaat aactttcttca	3600
cagcagctgg tttagcttcc tccgctgctg gctttgctgc attggctctt gcaattgcta	3660

agtataccca attaccacag tcaacttcag aaatatctag aatagaaga aagggtctg	3720
gttcagctt tagatcggtt ttggcggat acgtggctg gaaatggga aaagctgaag	3780
atggcatga ttccatggca gtacaaatcg cagacagctc tgactggcct cagatgaaag	3840
cttgcgtcct agttgtcagc gatattaaaa aggatgtgag ttccactcg ggtatgcaat	3900
tgaccgtggc aacctccgaa ctattnaaag aaagaattga acatgtcgta ccaaagagat	3960
ttgaagtcat gcgtaaagcc attgttggaaa aagatttcgc caccttgca aaggaaacaa	4020
tgtatggattc caactcttc catgccacat gtttggactc ttccctcca atattctaca	4080
tgaatgacac ttccaagcgt atcatcgtt ggtgccacac cattaatcag tttacggag	4140
aaacaatcgt tgcatacagc tttgatgcag gtccaaatgc tttttgtac tacttagtg	4200
aaaatgagtc gaaactctt gcatttatct ataaattgtt tggctctgtt cctggatgg	4260
acaagaaatt tactactgag cagtttgagg cttcaacca tcaattgaa tcatctaact	4320
ttactgcacg tgaattggat cttgagttgc aaaaggatgt tgccagagt atttaactc	4380
aagtccgttc agccccacaa gaaacaaacg aatcttgat tgacgcaaag actggctac	4440
caaaggaata agatcaattc gtcgtatcg ccttaggagg taaaaaaaaa tgactgcga	4500
caacaatagt atgccccatg gtgcgtatc tagttacgcc aaatttgtc aaaaccaaac	4560
acctgaagac attttggaaag agtttctgtt aattttcca ttacaacaaa gacctaatac	4620
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tttttctgt gtcgtatgt	4680
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattt tattttttt gattggacg ataatgtat	4740
tggtgccggt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg gtttactaca	4800
tcgtgcattc tccgtttta tttcaatga acaaggtgaa ttactttac aacaaagagc	4860
cactgaaaaa ataactttcc ctgatcttg gactaacaca tgctgtctc atccactatg	4920
tattgtatgac gaatttagtt tgaaggtaa gctagacgt aagattaagg ggcgttattac	4980
tgcggcgtt agaaaaacttag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag	5040
gggttaagttt cacttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg aaccatgggg	5100
tgaacatgaa attgattaca tccttta taagatcaac gctaaagaaaa acttgactgt	5160
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaatg attgaaaac	5220
tatgtttgct gaccaagtt acaagttac gccttggttt aagattttt gcgagaatta	5280
cttattcaac tggtgggagc aatttagatga ctttctgaa gtggaaaatg acaggcaat	5340
tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca ttgccttta ggaggtaaaa aaacatgtgt	5400
gcgaccttctt ctcaatttac tcagattacc ggcataatt cccgtcggtt cgcaactat	5460
cagccaaacc tgtggattt cgaattcctg caatccctgg agaacgacct gaaagtggaa	5520

tcagaacgca gaagcggctc gataaaacag aatttgcctg gcggcagtag cgccgtggc	7320
ccacctgacc ccatgccaa ctcagaagtg aaacgccgt a gcccgatgg tagtgtggg	7380
tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctca gtaaa	7440
agactggcc tticgtttt tctgtgttt gtccgtgaac gctctctga gttaggacaaa	7500
tccggccggaa gcggatttga acgttgccaa gcaacggccc ggagggtggc gggcaggacg	7560
cccgccataaa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggccttt	7620
tgcgttctca caaactcttt ttgttttattt ttctaaatac attcaaataat gtatccgctt	7680
aaccggaatt gccagctggg gcgcctctg gtaagggtgg gaagccctgc aaagtaaact	7740
ggatggctt ctcgcgcca aggatctgtat ggcgcaggaa atcaagctt gatcaagaga	7800
caggatgagg atcgttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggat tctccggccg	7860
cttgggtgga gaggctattt ggctatgact gggcacaaca gacaatcgcc tgctctgatg	7920
ccgcccgtt ccggctgtca ggcgcaggccc gcccggttct tttgtcaag accgacctgt	7980
ccgggtccctt gaatgaactg caagacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg	8040
cggttccttgc cgagctgttgc tcgcacgttgc tcactgaagc gggaaaggac tggctgctat	8100
tggcgaagt gcccggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat	8160
ccatcatggc tggatcaatg cggcgctgc atacgtttga tccggctacc tgccattcg	8220
accaccaagc gaaacatcgc atcgagcggc cacgtactcg gatggaaagcc ggtttgtcg	8280
atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgc agccgaactg ttcggcaggc	8340
tcaaggcgag catgcccgc ggcgaggatc tcgtcgatccat gctggcgat gcctgcttgc	8400
cgaatatcat ggtggaaaat ggccgtttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggt	8460
tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccgtga tattgctgaa gagcttggcg	8520
gcgaatggc tgaccgcttc ctgcgtctt acggatcgc cgccgtccat tcgcagcga	8580
tgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgcacat gacccaaatc ctttaacgt	8640
agtttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgcgat	8700
ctttttctt ggcgtatc tgcgtcttgc aaacaaaaaa accaccgtt ccagcgggtgg	8760
tttggcc ggtcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttcagcagag	8820
cgcagataacc aaataactgtc cttctgttgc agccgttgc aggccaccac ttcaagaact	8880
ctgttagcacc gcctacatac ctgcgtctgc taatccttgc accagtggct gctgccagtg	8940
gcgataagtc gtgttttacc ggggtggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc	9000
ggtcggcgtt aacgggggggt tcgtgcacac agcccgatgg gggcgaacg acctacacgg	9060
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gttcccgaa gggagaaagg	9120

cgacaggta tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagttccag	9180
ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg tcggtttcg ccacctctga cttgagcgtc	9240
gattttgtg atgctcgta gggggcggaa gcctatggaa aaacgccagc aacgcggct	9300
tttacggtt ccigcctt tgctggcctt ttgcacat gtcttcct gcgttatccc	9360
ctgattctgt ggataaccgt attaccgc ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc	9420
gaacgaccga ggcgcagcag tcagttagcg aggaagcgaa agagcgctg atgcgttatt	9480
ttctccttac gcacatgtgc ggtatttac accgcatacg gtgcactctc agtacaatct	9540
gctctgtatgc cgcatagttt agccagttt cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat	9600
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacggcctt gtctgcctcc	9660
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccggagc tgcatgtgtc agaggtttc	9720
accgtcatca ccgaaacgca cgaggcagca gatcaattcg cgccgaaagg cgaagcggca	9780
tgcatttacg ttgacaccat cgaatggtgc aaaacccccc gggatggc atgatagcgc	9840
ccgaaagaga gtcatttcag ggtggtaat gtgaaaccag taacgttata cgtatgtcga	9900
gagttatgcgg gtgtcttta tcagaccgtt tccccgtgg tgaaccaggc cagccacgtt	9960
tctgcgaaaa cgcggaaaaa agtggaaagcg gcatggcgg agctgaatttta cattccaaac	10020
cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacccatgt	10080
ctggccctgc acgcggcgtc gcaaattgtc gcccggatata aatctcgccg ccatcaactg	10140
ggtgccagcg tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaaggctg taaagcggcg	10200
gtgcacaatc ttctcgca acgcgtcgtt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac	10260
caggatgcca ttgtgtgga agtgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc	10320
tctgaccaga cacccatcaa cagtattttt ttctccatg aagacggtaac ggcactggc	10380
gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgccg tggatgggg cccatataat	10440
tctgtctcg cgctctgcg tctggctggc tggataaaat atctactcg caatcaaatt	10500
cagccgatag cggaaacggga aggcaactgg agtgcctatgt ccggtttca acaaaccatg	10560
caaattgtca atgagggcat cttccact gcatgtctgg ttgccaacga tcagatggcg	10620
ctggcgcaaa tgccgcctt taccgagtcc gggctgccc ttgggtgcggaa tatctcggtt	10680
gtggatagc acgataccga agacagctca tggttatcc cgcgtcaac caccatcaa	10740
caggattttc gcctgctggg gcaaccaggc gtggaccgt tgctgcaact ctctcaggc	10800
caggcgtga agggcaatca gctgtgtccc gtctactgg taaaagaaaa aaccaccctg	10860
gcgcaccaata cggaaacccgc ctctcccccgc gcgttggccg attcattat gcatgtggca	10920
cgacaggtt cccactggaa aagcggcag tgagcgcaac gcaattatg tgatggcg	10980

cgaattgatc 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	
tttataatc ccaattgtca tgttttta ctccttat tgtttctta 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 agatcttag ttcgataag aacgaacggt	40
<210> 38	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PCR Primer	
<400>	38	
atgaaaacag tagtattat tgatgc		26
<210>	39	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	39	
atgttattgt ttcttaat catttaaat 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	
ttagttcga 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	
gctatgttc attagatcct tatcg		25
<210>	45	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	45	
gaaacctaca tc当地atctt tgccc		25
<210>	46	
<211>	8703	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	46	
cccgctttac tgtcggaat tc当地gttggc cgattcatta atgcagattc t当地aaatgagc		60
tgttgacaat taatcatcg gctcgataa tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc		120
acacaggaaa cagcgcgcgt gaaaaaagc gaagcggcac tgctttaa caatttatca		180
gacaatctgt gtggcactc gaccggatt atcgattaac tt当地atttataa aaaattaaag		240
aggtatatat taatgtatcg attaataag gaggaataaa ccatggatcc gagctcagga		300
ggtaaaaaaa catgaaaaca gtagttata tt当地atgcatt acgaacacca attggaaaat		360
ataaaggcag ctaagtcaa gtaagtgcgc tagacttagg aacacatgtt acaacacaac		420
ttttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgatca agtaatctt ggaaatgttt		480

tacaagctgg aaatggccaa aatccgcac gacaaatagc aataaacagc ggtttgtc	540
atgaaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctcgccgatc aggaatgaag gccgttattt	600
tggcgaaca attgattcaa ttaggagaag cggaagttt aattgctggc gggattgaga	660
atatgtccca agcacctaata ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc tacgatgc	720
ctttttctag tatgatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag gcaatggct	780
taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtaactag agaagagcaa gatcaatttt	840
ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaaggcaga agggatattc gctgacgaaa	900
tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaagggatt cgcctaatt	960
cgagcgttga gaagcttagga acgcttaaaa cagttttaa agaagacggt actgtaacag	1020
cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg cttctgctt gattattgct tcacaagaat	1080
atgccgaagc acacggtctt ctttatatttgc ctattattcg agacagtgtg gaagtggta	1140
ttgatccagc ctatatggga atttcgcccga ttaaagccat tcaaaaactg ttagcgc	1200
atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt gcagcaactt	1260
caatcgttgtt ccaaagagaa ctggcttac cagagaaaa ggtcaacattt tatggtg	1320
gtatttcatt aggtcatgctg attggtgcca caggtgctcg tttatatacg agtttaagtt	1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaatatg gagtggttc tttatgtatc ggcgggt	1440
taggactcgc tatgctacta gagagacctc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaa	1500
tgagtcctga ggaacgcctg gcttccttc ttaatgaagg ccagatttct gctgatacaa	1560
aaaaagaattt tgaaaatacg gctttatctt cgcagattgc caatcatatg attggaaatc	1620
aaatcagtga aacagaagtgcg ccgatggcg ttggcttaca ttaacagtgc gacgaaactg	1680
attatgggtt accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgccgtttt agtaatggtg	1740
caaaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg	1800
tttttacga ttttgccat cccgagtcat tgattgataa actacaagta agagaagcgg	1860
aagttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc ggcggctaa	1920
gagatttgca atatcgtact ttgtatgaat cattttatc tgctgacttt tttagtagat	1980
ttaaggatgc aatggggca aatatcgta acgctatgtt ggaagggtgtg gccgagtgt	2040
tccgtgaatg ttggcgag caaaagattt tattcgtat ttaagtaat tatgccacgg	2100
agtccgttgt tacgtgaaa acggcttac cagtttacgc ttaagtaag gggagcaatg	2160
gccggaaat tgcgtaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcattt gatccttac	2220
gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgttagtt ttagctacag	2280
gaaatgatac acgcgtgtt agcgcttctt gtcgtatgtt tgccgtgaag gaaggcgct	2340


```
accgctgcgt tcggtaagg ttctggacca gttgcgttag cgccatacgct acttgcatta 6000  
cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcattcc gtttccacgg 6060  
tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtgcgag gcatttctgt cctggctggc 6120  
gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgcg tcgtcaggca ttggcggct tgctgttctt 6180
```

ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcgaa gacctcgcc	6240
gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggtttct	6300
ggaaggcgg catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc ggatcagtga	6360
gggttgcaa ctgcgggtca aggatctgga tttcgatcac ggcacgatca tcgtgcggga	6420
gggcaaggc tccaaggatc gggccttgat gttacccgag agcttggcac ccagcctgcg	6480
cggcggggg aattaattcc cacgggtttt gctgccgc aacgggctgt tctggtgttg	6540
ctagttgtt atcagaatcg cagatccggc tttagccgggt tgccggctg aaagcgctat	6600

tctttccaga attgccatga tttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgc	6660
ggcagcttg attcgataag cagcatgcc ttttcaggc tgtctatgtg tgactgtta	6720
gctgtAACAA gttgtcttag gtgttcaatt tcatagttcta gttgtttgt tttactggtt	6780
tcacctgttc tattagggtt tacatgtgt tcatactgttta cattgtcgat ctgttcatgg	6840
tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcggtt aaaagctctg atgttatctat ctttttaca	6900
ccgttttcat ctgtgcataat ggacagttt ccctttgata tgtaacggtg aacagtttt	6960
tcacttttgtt ttgttagtct tgatgttca ctgtatagata caagagccat aagaacctca	7020

gatccttcggattttagccatgttgtctc	7080
tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcattgtca	7140
actggtgagc tgaatttttgcagttaaagcatcgtagt	7200
tatgttaggaa tctgtatgtaa tggttgttgg tattttgtca	7260
gttctcaagt tcgggtacgatccatttg tctatctagt	7320
atcagtcggccgcctcgcttatcaaccac caatttcata	7380
tttacttatt gggttcaaaa cccattggtt aagccttta	7440
aactcatggtagttat	

aagcattaaac atgaacttaa attcatcaag gctaatctct atatttgccct tgtgagttt	7500
cttttgtgtt agttctttta ataaccactc ataaaatcctc atagagtatt tgtttcaaa	7560
agacttaaca tggccagat tatattttat gaatttttt aactggaaaa gataaggcaa	7620
tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttgcgttgag aacttggcat agtttgtcca	7680
ctggaaaatc tcaaaggcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag	7740
ctctctgggtt gcttagctt atacaccata agcattttcc ctactgtatgt tcatacatcg	7800

agcgattttgg ttataagtga acgataccgt ccgttcttc ctgttagggt tttcaatcgt	7860
gggttgagt agtgcacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctcg ttaagtcata	7920
gcgactaatc gctagttcat ttgcttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattt	7980
gtcttaggtga tttaatcac tataccaatt gagatggct agtcaatgtat aattactgt	8040
cctttcctt tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag accttgctg gaaaacttgt	8100
aaattctgct agaccctctg taaattccgc tagaccttg tgtgttttt ttgtttatat	8160
tcaagtgggtt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc	8220
cagccctgtg tataactcac tactttagtc agttccgcag tattacaaaa ggatgtcgca	8280
aacgctgttt gctctctac aaaacagacc taaaacctt aaaggcttaa gtagcaccc	8340
cgcaagctcg gccaatcgc tgaatattcc tttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc	8400
gctgtcttt tcgtacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatggggta	8460
aatggcacta caggcgcctt ttatggattc atgcaaggaa actaccata atacaagaaa	8520
agcccgtcac gggctctca gggcgttta tggcggtct gctatgtggt gctatctgac	8580
ttttgtgt tcagcagttc ctgcccttg atttccagt ctgaccactt cgattatcc	8640
cgtgacaggt cattcagact ggctaattc cccagtaagg cagcggtatc atcaacagggc	8700
tta	8703
<210> 47	
<211> 9371	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 47	
tgtaaccttt gcttcaaattt gaggatggaaat aatgcacatc catgttgta tcgtgcaat	60
aaagtgtttc atccgttagga aaaaatgact ttagtatctg ttccgcttt tctgtatgaaa	120
tgtgctcccc gacaaaattt gatgaatcat ggacatttc tggcttgat acagcggaaag	180
cagccgttcc tatgttatat atcggattt aacgcaggac aaaaaacacc atgacagcca	240
tcgtcaccca ctattcaca cgcacataaa cctttctga ctttggAAC agatgtatgc	300
tcatcaaaaa tcccgccatt gccaataaa tcgtatatgg cattactgca ccataatctt	360
ttgagattt gatggatattt ggcgcaagca gcaagacaag cagtcggata atcagcgat	420
aaaataagcc tagtaagatc ttatccgttc tccaaatcag cttgaaaaac actacattca	480
acgcaatggg aagagtgtatc atgaaaaaca gaaacacgaa tgcaatccgc tccatccat	540

ccgggttattc ctccaatac gaaaagaaac taaaaatcat ttgtacgatc ggcaaactga	600
caacagcaag gtcaacgta taaaacttac ccttccgcc atgatcacgc ggcacatcaga	660
tatagtaaaa agccgtcagc agcacatatac cgtataacaa aaaatgcagc agcggcagca	720
gttctttcc gtcctcttta aagtaagcgc tggtaagtt tggattgc acctggtaa	780
taaggtaaac agacactccc gccagcagca caatccgaa tataacaccc gccaagaaca	840
ttgtgcgctg ccggtttattt tggttatgtat gcaccaaaag atataagccc gccagaacaa	900
caattgacca ttgaatcagc agggtgctt gtctgttataa tataaataa cgttcgaat	960
gcaatacata atgactgaat aactccaaca cgaacaacaa ctccatttc ttctgtatc	1020
aaaataacag acicgtgatt ttccaaacga gcttcaaaa aagcctctgc cccttgaaaa	1080
tcggatgcct gtcataaaaa ttcccgatat tggtaaaca gcgccgcaat ggcggccca	1140
tctgatgtct ttgcttggcg aatgttcatc ttatttcttc ctccctctca ataattttt	1200
cattctatcc ctittctgta aagtttattt ttcaaaaaatac tttatcatc atgctttgaa	1260
aaaatatacata gataatatcc attgttctca cggaaggcaca cgtaggtcat ttgaacgaat	1320
ttttcgaca ggaatttgcc gggactcagg agcatttaac ctaaaaaaagc atgacatttc	1380
agcataatga acatttactc atgtcttattt tcgttcttt ctgtatgaaa atagtttattt	1440
cgagtctcta cgaaatagc gagagatgat atacctaaat agagataaaaa tcatctcaaa	1500
aaaatgggtc tactaaaata ttattccatc tattacaata aattcacaga atagtcattt	1560
aagtaagtct actctgaatt ttttaaaag gagaggtaa agagtgtcat taccgttctt	1620
aactctgca ccggaaagg ttattattt tggtaaacac tctgctgtgt acaacaagcc	1680
tgccgtcgct gctagtggt ctgcgttgag aacctacctg ctaataagcg agtcatctgc	1740
accagataact attgaattgg acttccggaa cattagctt aatcataagt ggtccatcaa	1800
tgatttcaat gccatcaccc aggtcaagt aaactccaa aaattggcca aggctcaaca	1860
agccaccgat gggttgtctc aggaactcgtagtcttttg gatccgtgt tagtcaact	1920
atccgaatcc ttccactacc atgcagcgat ttgttccctg tatatgtttt tttgcctatg	1980
cccccatgcc aagaatatta agtttcttt aaagtctact ttacccatcg gtgctgggtt	2040
gggctcaagc gcctcttattt ctgtatcact ggccttagct atggctact tgggggggtt	2100
aataggatct aatgacttgg aaaagctgtc agaaaacgt aagcatatag tgaatcaatg	2160
ggcccttcata ggtgaaaagt gtattcacgg tacccttca ggaatagata acgctgtggc	2220
cacttatggt aatgcctgc tatttggaaaa agactcacat aatggaacaa taaacacaaa	2280

caattttaag ttcttagatg atttccagc cattccaatg atcctaacct atactagaat 2340
tccaagggtct acaaaagatc ttgttgctcg cgttcggtgt tggtcaccc agaaatttc 2400
tgaagttatg aagccaaatc tagatgccat gggtaatgt gccctacaag gcttagagat 2460
catgactaag ttaagtaat gttaaggcac cgatgacgag gctgtagaaa ctaataatga 2520
actgtatgaa caactattgg aattgataag aataaatcat ggactgcttg tctcaatcgg 2580
tgtttctcat cctggattag aacttattaa aaatctgagc gatgatttga gaattggctc 2640
cacaaaactt accgggtctg gtggccgcgg ttgctttt actttgttac gaagagacat 2700
tactcaagag caaattgaca gcttcaaaaa gaaattgcaa gatgattta gttacgagac 2760

atttgaaca gacttgggtg ggactggctg ctgtttgtt a诶cgcaaaaa atttgaataa 2820
agatcttaaa atcaaatccc tagtattcca attatttga aataaaacta ccacaaagca 2880
acaaattgac gatctattat tgccaggaaa cacgaattt ccatggactt cataaaagga 2940
gaggggtgtca gagttgagag cttcagtgc cccagggaaa gcgttactag ctggtgata 3000
tttagtttta gatacaaaaat atgaagcatt tgttagtcgg ttatcgcaaa gaatgcattgc 3060
tgttagcccat cttacggtt cattgcaagg gtctgataag ttgaaatgc gtgtgaaaag 3120
taaacaattt aaagatgggg agtggctgta ccatataagt cctaaaagtg gttcattcc 3180

tgtttcgata ggcggatcta agaacccttt cattgaaaaa gttatcgcta acgtatTTAG 3240
ctactttaaa cctaacatgg acgactactg caatagaaac ttgttcgtt ttgatatttt 3300
ctctgtatgt gcctaccatt ctcaggagga tagcgttacc gaacatcggt gcaacagaag 3360
attgagttt cattgcaca gaattgaaga agttccaaa acagggctgg gtcctcgcc 3420
aggtttatgc acagttttaa ctacagctt ggcctcctt ttgttatcggt acctggaaaa 3480
taatgttagac aaatatagag aagttattca taatttagca caagttgctc attgtcaagc 3540
tcagggtaaa attggaagcg ggtttatgtt agcggccggca gcatatggat ctatcagata 3600

tagaagattc ccacccgcat taatctctaa ttggccagat attggaagtg ctactacgg 3660
cagtaaactg ggcatttgg ttgatgaaga agactgaaat attacgatta aaagtaacca 3720
tttaccttcg ggattaactt tatggatggg cgtatattaag aatggttcag aaacagtaaa 3780
actggtccag aaggtaaaaa attggatgtt ttcgtatgtt ccagaaagct tgaaaatata 3840
tacagaactc gatcatgcaattcttagatt tatggatggc ctatctaaac tagatcgctt 3900
acacgagact catgacgattt acagcgatca gatatttgag tctcttgaga ggaatgactg 3960
tacctgtcaa aagtatcctg aaatcacaga agttagagat gcagttgcca caatttagacg 4020

tcccttaga aaaataacta aagaatctgg tgccgatatac gaacctcccg tacaaactag	4080
cttattggat gattgccaga ccttaaaagg agttcttact tgcttaatac ctggtgctgg	4140
tggtatgac gccattgcag tgattactaa gcaagatgtt gatcttaggg ctcaaaccgc	4200
taatgacaaa agatTTcta aggttcaatg gctggatgt aactcaggctg actgggtgt	4260
taggaaagaa aaagatccgg aaacttatct tgataaataa aaggagaggg tgaccgtta	4320
cacagcatcc gttaccgcac ccgtcaacat cgcaaccctt aagtattggg ggaaaaggga	4380
cacgaagttg aatctgccc ccaattcgtc catatcagtg actttatcgc aagatgacct	4440
cagaacgttg acctctgcgg ctactgcacc tgagttgaa cgcgacactt tgtggttaaa	4500
tggagaacca cacagcatcg acaatgaaag aactcaaat tgctgcgcg acctacgca	4560
attaagaag gaaatggaat cgaaggacgc ctcattgccc acattatctc aatgaaact	4620
ccacattgtc tccgaaaata acttcctac agcagcttgt tttagcttcc cgctgtgg	4680
ctttgctgca ttggctctg caattgctaa gttataccaa ttaccacagt caacttcaga	4740
aatatctaga atagcaagaa aggggtctgg tttagcttgt agatcgttgt ttggcggata	4800
cgtggcctgg gaaatggaa aagctgaaga tggcatgat tccatggcag tacaaatcgc	4860
agacagctct gactggcctc agatgaaagc ttgtgccta gttgtcagcg atattaaaaa	4920
ggatgtgagt tccactcagg gtatgcaatt gaccgtggca acctccgaac tatttaaga	4980
aagaattgaa catgtcgtaa caaagagatt tgaagtcatg cgtaaagcca ttgtgaaaa	5040
agatttcgcc accttgcaa agggaaacaat gatggattcc aactcttcc atgccacatg	5100
tttgactct ttccctccaa tattctacat gaatgacact tccaagcgta tcatcagtt	5160
gtgccacacc attaatcagt ttacggaga aacaatcgaa gcatcacgt ttgtgcagg	5220
tccaaatgct gtgtgtact acttagctga aaatgagtcg aaactcttg catttatcta	5280
taaattgttt ggctctgttc ctggatggga caagaaattt actactgagc agcttgaggc	5340
tttcaaccat caatttgaat catctaactt tactgcacgt gaattggatc tttagttgca	5400
aaaggatgtt gccagagtga tttaactca agtcggttca ggcccacaag aaacaacgaa	5460
atcttgatt gacgcaaaga ctggtctacc aaaggaataa aaggagaggg tgactgccga	5520
caacaatagt atgccccatg gtgcagttac tagttacgcc aaattagtgc aaaaccaaac	5580
acctgaagac attttggaaag agtttctgtaa attattcca ttacaacaaa gacctaatac	5640
ccgatctagt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tttttctgt gtcatgatga	5700
ggagcaaatt aagttaatga atgaaaattt tattttttt gattgggacg ataatgttat	5760
tggtgccggt accaagaaag ttgtcattt aatggaaaat attggaaaagg gtttactaca	5820
tcgtgcattc tccgttttta ttttcaatga acaagggtgaa ttactttac aacaaagagc	5880

cactaaaaaa ataacttcc ctgatcttg gactaacaca tgctgcctc atccactatg	5940
tattgatgac gaatttagtt tgaaggtaa gctagacat aagattaagg gcgttattac	6000
tgcggcggtg agaaaactag atcatgaatt aggtattcca gaagatgaaa ctaagacaag	6060
ggtaagttt cacttttaa acagaatcca ttacaatggca ccaagcaatg aaccatgggg	6120
tgaacatgaa attgattaca tccttattta taagatcaac gctaaagaaaa acttgactgt	6180
caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaaatg atttggaaac	6240
tatgttgct gaccaagtt acaagttac gccttgggtt aagattattt gcgagaatta	6300
cttattcaac tggtgggagc aatttagatga ctttctgaa gtggaaaatg acaggcaaat	6360
tcatagaatg ciataaaaaa aaccggccit ggccccccg gtttttattt atttttttc	6420
ctccgcgtgt tcaatccgct ccataatcga cgatggctc cctctgaaaaa ttttaacgag	6480
aaacggcggtt tgacccggc tcagtcggc aacggccaag tcctgaaacg tctcaatcgc	6540
cgcttcccggtt tcgttccgtca gctcaatgcc gtaacggtcg gcggcggtttt cctgataccg	6600
ggagacggca ttctgttattt gaatacatac gaacaaatata ataaagtgaa aaaaatactt	6660
cggaaacatt taaaaataa ctttatttgtt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt	6720
ggactaaaac caaatagtga tcttgactttt tttagtcgtcg tatctgaacc attgacagat	6780
caaagtaaag aaataacttat aaaaaaaaaaattt agacctattt caaaaaaaaaat aggagataaa	6840
agcaacttac gatataattga attaacaattt attattcagc aagaaatggt accgtgaaat	6900
catcctccca aacaagaattt tatttatgaa gaatggttac aagagcttta tgaacaagga	6960
tacattccctc agaaggaattt aaattcagat ttaaccataa tgctttacca agcaaaacgaa	7020
aaaaataaaaaa gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt	7080
tctgtatgtga gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat	7140
gatgaaacca actctatattt aactttatgc cgtatgattt taactatgga cacggtaaa	7200
atcataccaaa aagatattgc gggaaatgca gtggcgtat ctttcattt agaacatagg	7260
gagagaattttt ttttagcgt tcgtatgtt cttggagaga atattgaatg gactaatgaa	7320
aatgtaaattt taactataaa ctattnaat aacagattaa aaaaattata atgttaacctt	7380
tgcttcaaa tgagtagaaa taatgcacat ccatgtttgtt atcgtgcaaa taaagtgttt	7440
catccgtagg aaaaaatgac tttagtatctt gttccgcctt ttctgtatgaa atgtgcctcc	7500
cgacaaaattt gaatgaatca tggacatttg ctggcttga tacagcgaaa gcagccgttc	7560
ctatgttata tatcgattt aacagcagga caaaaaacac catgacagcc atcgtcaccc	7620
acttatttac acgcacataa acctttccctg acttttgaa cagatgatag ctcatcaaaa	7680
atcccgccat tgccaaataa atcgtatgt gcattactgc accataatct tttgagattt	7740

gattggata tggcgcaagc agcaagacaa gcagtcgat aatcagcgta taaaataagc	7800
ctagtaagat ctatccgtt ctccaataca gcttgaaaaa cactacattc aacgcattgg	7860
gaagagtgtat gatgaaaaac agaaacacga atgcaatcggtt ccacatccca tccgggtatt	7920
ccttccaata cgaaaagaaa ctaaaaatca ttgtacgtat cggcaaactg acaacagcaa	7980
ggtcgaacgt ataaaactta cccttccgc catgatcacg cggcatcagc atatagtgaa	8040
aagccgtcag cagcacatat ccgtataaca aaaaatgcag cagcggcagc agtttttc	8100
cgtcctctt taagtaagcg ctggtaagt ttgttattt cacctggta ataagttcaa	8160
cagacactcc cggcaggcagc acaatccgca atataacacc cgccaagaac attgtgcgt	8220
gccggtttat ttgggatga tgccacaaaaa gatataagcc cgccagaaca acaattgacc	8280
attgaatcg cagggtgctt tgtctgctta atataaaata acgttcgaaa tgcaatacat	8340
aatgactgaa taactccaac acgaacaaca aaagtgcgc tttataaaa gctaattgatt	8400
cagtccacat aattgataga cgaattctgc tacaggcac gtggctatgt gaaggatcgc	8460
gcgtccagtt aagagcaaaa acattgacaa aaaaattttt ttatgctaaa atttactatt	8520
aatatatttg tatgtataat aagattctcc tggccagggg aatcttattt ttgtggagg	8580
atcatttcat gagaaaaat gagtcagct taacgtctt aatttcagct ttggccgtg	8640
catatcacag ccgatatgac acaccttta ttttgatga tttatcgca aaagatctca	8700
ttaacgaaaa agagtttac gacatcgta aaaatgtat tcaagaaata tcgttttca	8760
acaaagagat cggcgaaacgt cttcaaaatg atcctgaaaaa aatattaaaa tgggttgac	8820
aaatccagct gtcctcaacg cccctagcac gtgccttta ttgtgaaaaa gtctgcaca	8880
acgaattaat cttggggca aaacagtatg tcattttgg agcgggactg gatactttct	8940
gtttcggca tccagaatta gaaaacagct tacaggttt cgaggtgtat catcggcca	9000
cacagcaatt gaaaaaaat aagctgaagg atgcaaactt gacaattccg ggtcatttc	9060
attttgttcc tatggatttc accaaaacgt ttgcgtatga tcctcttta gatgaaggat	9120
ttaaaaacac aaaaacattt ttcagcttcc tcggagtgtc ttattatgtt acacggaaag	9180
aaaatgcaag ctgtatcagc aattttttt ctcatgtccc gcctgaaagc tctatttttt	9240
ttgattatgc ggacgaaaca cttttacag caaaaggac gtcgaatcgat gttgaacata	9300
ttgtgaagat ggctgcccga agcggggac cgtgaaatc atgtttact 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
ccatatttt gaaaaagccg tttctgtat gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat	120
aggatggcaa gatcctggta tcggctcgatc attccgactc gtccaacatc aataacaacct	180
attaattcc cctcgtcaaa aataaggta tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact	240
gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc attttttcc agacttgttc aacaggccag	300
ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc	360
gcctgagcga ggcgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgag	420
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat ttccaccta atcaggatata	480
tcttctaata cctggaacgc tgttttccg gggatcgcatc tggtgagtaa ccatgcatca	540
tcaggaggatc ggataaaatg cttgatggc ggaagtggca taaattccgt cagccagttt	600
agtctgacca tctcatctgt aacatcattt gcaacgctac ctggccatg ttccagaaac	660
aactctggcg catcgggctt cccatataag cgatagattt tcgcaccta ttgcccaca	720
ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca ttttggaaatt taatcgccgc	780
ctcgacgtt cccgttgaat atggctcata ttcttcctt ttcaatatta ttgaaggatt	840
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtattttagaa aaataaaca	900
ataggggtca gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag cccatttata	960
cctgaatatg gctcataaca ccccttggttt gcctggcgcc agtagcgccg tggcccacc	1020
tgaccccatg ccgaactcag aagtggaaacg ccgttagcgcc gatggtagtg tggggactcc	1080
ccatgcgaga gtggaaact gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact	1140
gggccttcg cccggctaa ttaggggttg tcgccttta gtgcgtgaac atgtgctctg	1200
tttctaccga gaacgttcc ttcaactgaga cggaaaccga ggcacgtcgt agcgcgaact	1260
acgagccgaa tagctggac tacgattcc tgctgtcttc cgataactgac gaatctattt	1320
aggtgtacaa agacaaagca aagaaactgg aggctgaatg gcgcgcgaa attaacaacg	1380
agaaagctga attctgact ctgctggac tgatcgatca cgtacagcgc ctgggtctgg	1440
gttaccgctt cgaatctgat atccgtcgac cactggatcg ttctgtatgc agcggcggtt	1500
tcgatggcgat gaccaaaacg agcctgcacg ctaccgcgt gtccttcgt ctgcgtgc	1560

agcacggctt cgaagttct caggaagcat tctccggttt caaagatcaa aacggtact	1620
tcctggaaaa cctgaaagaa gacactaagg cgatcctgag cctgtatgag gcaagcttc	1680
tggccctgga gggtgagaac atcctggatg aggcgcgcgt attcgccatc tcccatctga	1740
aagagctgtc tgaagagaaa atcggtaagg aactggcaga gcaggttaat cacgactgg	1800
aactgccgtc gcatcgtcgt acccagcgtc tggaggcggt ttggccatc gaagcgtacc	1860
gcaaaaagga ggtatctaacc caggttctgc tggaactggc catcctggac tacaacatga	1920
tccagtcgt ttaccagcgt gatctgcgtg aaacctcccg ttggtggcgc cgtgtggcc	1980
tggcgaccaa actgcacttc gctaaggacc gcctgattga gtcttttac tggcagtgc	2040
gcgttgcgtt cgaacctcag tattctgact gccgtAACAG cgttgcgaaa atgttcagct	2100
tcgttactat tatcgacgc atctacgcg tttacggta tctggacgag ctggactgt	2160
ttaccgacgc tgtcgAACGT tggatgtt acggcatcaa cgatctgcct gactacatga	2220
aactgtgtt cctggactg tataaacacga tcaacgaat tgcatACGAC aacctgaaag	2280
acaaaggtaaa aaacatcctg ccgtacctga ctAAAGCGTG ggccggatctg tgtaacgtt	2340
ttctgcaaga agcggaaatgg ctgtataaca aatccactcc gaccttgac gattattcg	2400
gcaatgcctg gaaatccagc tctggcccgc tgcaactgat ctgcgttat tttgcgttg	2460
tccaaaacat caaaaaggag gaaattgaaa acctgcaaaa ataccacgat atcattagcc	2520
gtccttcata tatTTTCGC ctgtgcaacg acctggcaag cggtccgca gagatcgac	2580
gtggcgaaac cgcttaactct gttcctgtc acatgcgcac caagggcatt tccgaagagc	2640
tggcaaccga gagcgtaatg aatctgtatcg acgaaacctg taagaaaatg aacaaagaaa	2700
aactgggtgg ctccctgttc gctaaaccgt tcgttagagac tgctattaac ctggcacgtc	2760
agagccactg cacctaccac aatggtgacg cacatactag cccggatgaa ctgactcgta	2820
aacgtgtact gtctgttatac accgaaccga ttctggcgtt cgaacgttaa ctgcagcgtc	2880
aatcgaaagg gcgacacaaa atttattcta aatgcataat aaatactgat aacatcttata	2940
agtttgtatt atatTTGTA ttatcggtga catgtataat tttgatatac aaaactgatt	3000
ttccctttat tatTTGAG atttatttc ttaattctct ttaacaaact agaaatattg	3060
tatataaaaa aaatcataaa taatagatga atagttat tataggtgtt catcaatcgaa	3120
aaaagcaacg tatcttattt aaagtgcgtt gctttttct catttataag gttaaataat	3180
tctcatatat caagcaaagt gacaggcgcc cttaaatatt ctgacaaatg ctcttcct	3240
aaactcccc cataaaaaaa cccggccgaag cgggtttta cgttatttgc ggattaacga	3300

ttactcgta tcagaaccgc ccagggggcc cgagcttaag actggccgtc gtttacaac	3360
acagaaaagag ttttagaaa cgcggaaagg ccatccgtca gggcccttct gcttagtttgc	3420
atgcctggca gtccctact ctgccttc gcttctcgc tcactgactc gctgcgtcg	3480
gtcggtcgcc tgccggcggc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca	3540
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac	3600
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	3660
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg	3720

tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct cctgtccga ccctgccgt tacggatac	3780
ctgtccgcct ttccccccttc gggaaagcgtg ggcgtttctc atagctcagc ctgttagtat	3840
ctcagttcgg tgttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggtcag	3900
cccgaccgct ggcgtttatc cggtaactat cgtttgagt ccaaccggta aagacacgac	3960
ttatgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt	4020
gctacagagt tcttgaagtgt gtgggctaactacggctaca cttagaagaac agtatttttgt	4080
atctgcgttc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgtatccggc	4140

aaacaaacca ccgtggtag cggtggttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga	4200
aaaaaaaggat ctcagaaga tccttgcata ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC	4260
gacgcgcgcg taactcacgt taagggattt tggtcatgag ctggccgt 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
gcactccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc	180
tgaaatgagc ttttgacaat taatcatcg gctcgataa tgtgtgaaat tgtgagcgga	240
taacaatttc acacaggaaa cagcgcgcgt gaaaaaaagc gaagcggcac tgctttaa	300
caatttatca gacaatctgt gtggcactc gaccggatt atcgatataac tttatttata	360
aaaattaaag aggtatataat taatgtatcg attaataag gaggaataaa ccatgtgtc	420

tgtttctacc gagaacgtt cttcactga gacggaaacc gaggcacgtc gtagcgcgaa	480
ctacgagccg aatagctggg actacgattt cctgctgtct tccgatactg acgaatctat	540
tgagggtac aaagacaaag caaagaaaact ggaggctgaa gtgcgcgcg aaattaacaa	600
cgagaaagct gaattcctga ctctgctgga gctgatcgat aacgtacagc gcctgggtct	660
gggttaccgc ttcaaatctg atatccgtcg cgcaactggat cgttcgtaa gcagcggcgg	720
tttcgatggc gtgaccaaaa cgagcctgca cgctaccgcg ctgtccttcc gtctgctgct	780
tcagcacggc ttcaagttt ctcaggaagc attctccgtt ttcaaagatc aaaacggtaa	840
cttcctggaa aacctgaaag aagacactaa ggcatcctg agcctgtatg aggcaagctt	900
tctggccctg gagggtgaga acatcctgga tgaggcgcgc gtattcgcca tctccatct	960
aaaagagctg tctgaagaga aaatcggtaa ggaactggca gagcaggtaa atcacgact	1020
ggaactgccc ctgcattcgatc gtacccagcg tctggaggcg gttggtcca tcgaagcgta	1080
ccgaaaaag gaggatgcta accaggttct gctggaactg gccatcctgg actacaacat	1140
gatccagtc gttaccagc gtatctgctg tgaaacctcc cggtggcgc gccgtgtgg	1200
cctggcgcacc aaactgcact tcgctaaggc ccgcctgatt gagttttt actggcagt	1260
cggcggtcg ttcgaacctc agtattctga ctgcgttaac agcggtcgaa aatgttcag	1320
cttcgttact attatcgacg acatctacga cgttacggt actctggacg agctggaact	1380
gtttaccgac gctgtcgaac gttggatgt taacgcattc aacgatctgc ctgactacat	1440
gaaactgtgc ttccggcac tgtataaacac gatcaacgaa attgcatacg acaacctgaa	1500
agacaaaggt gaaaacatcc tgccgtacct gactaaagcg tggcgatc tgtgtacgc	1560
ttttctgcaa gaagcgaaat ggctgtataa caaatccact ccgaccttgc acgattat	1620
cggaatgcc tggaaatcca gctctggccc gctgcaactg atctcgctt atttgcgg	1680
tgtccaaaac atcaaaaagg agggaaattga aaacctgcaa aaataccacg atatcattag	1740
ccgtccttct catatcttc gcctgtgca cgacctggca agcggtccg cagagatcg	1800
acgtggcgaa accgctaact ctgtttctg ctacatgcgc accaaggcgca tttcgaaaga	1860
gctggcaacc gagagcgtaa tgaatctgat cgacgaaacc tgaagaaaa tgaacaaaga	1920
aaaactgggt ggctccctgt tcgctaaacc gttcgttagag actgctatta acctggcagc	1980
tcagagccac tgacacttacc acaatggtga cgacataact agcccgatg aactgactcg	2040
taaacgtgta ctgtctgtta tcaccgaaacc gattctggcg ttcaacgtt aactgcagct	2100
ggtaccatat gggaaattcgaa agctttctag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga	2160

atagccgt cgaccatcat catcatcatc attgagttt aacggctcc agctggctg	2220
tttggcga tgagagaaga tttcagct gatacaggatt aaatcagaac gcagaagcgg	2280
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc	2340
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcggca tggtagtgtg gggctcccc atcgagagt	2400
aggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gccttcgtt	2460
ttatctgtt tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccggc ggagcggatt	2520
tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcggcagg acgcccggca taaactgcca	2580
ggcatcaaata taagcagaag gccatcctga cggatggcct tttgcgtt ctacaaactc	2640
tttttgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	2700
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtagttagt attcaacatt tccgtgtcgc	2760
ccttattccc tttttgcgg catttgcct tcctgtttt gtcacccag aaacgctggt	2820
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacatcg aactggatct	2880
caacagcggta aagatccttg agagtttcg ccccgaagaa cgttttccaa ttagtggcac	2940
ttttaaagtt ctgctatgtg ggcggattt atccctgtt gacgcccggc aagagcaact	3000
cggtcgcgcg atacactatt ctcagaatga cttgggttag tactcaccag tcacagaaaa	3060
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gtcgcataa ccatgagtga	3120
taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgttt	3180
tttgcacaac atggggatc atgtaactcg cttgtatcgt tggaaaccgg agctgaatga	3240
agccatcca aacgacgacg gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg	3300
caaactatta actggcgaac tacttactct agcttccgg caacaattaa tagactggat	3360
ggaggcggat aaagttgcag gaccactct ggcgtcgcc cttccggctg gctggtttat	3420
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgt atcattgcag cactggggcc	3480
agatggtaag ccctccgtt tcgtatgtt ctacacgacg gggagttagt caactatggaa	3540
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctactg attaaggatt ggtactgtc	3600
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa ctcatttt aattttaaag	3660
gatcttaggtg aagatccttt tgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagtttc	3720
gttccactga ggcgtcggacc ccgtagaaaa gatcaaagga tttctttagt atccctttt	3780
tctgcgcgtt atctgctgtc tgcaaaacaaa aaaaccacccg ctaccagcgg tggttttt	3840
gccggatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat	3900
accaaatact gtccttctag tgcgtcgta gttaggccac cacttcaaga actctgtac	3960
accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa	4020

gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg	4080
ctgaacgggg gttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca ccgaacttag	4140
ataacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccgacag	4200
gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa	4260
cgctggtat cttagatgc ctgtcggtt tcgcccaccc tgacttgagc gtcgatttt	4320
gtgatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttacg	4380
gttcctggcc tttgctggc ctttgccta catgttctt cctgcgttat cccctgattc	4440
tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctgcgcga gccgaacgac	4500
cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcgg attttctct	4560
tacgcacatcg tgcgttattt cacaccgcat atggtgact ctcaactaa tctgctctga	4620
tgcccatag ttaagccagt atacactcgg ctatcgctac gtgactgggt catggctg	4680
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg ctgtctgct cccggcatcc	4740
gtttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttacccgtca	4800
tcaccgaaac gcgcgaggca gcagatcaat tcgcgcgcga aggcgaagcg gcatgcatt	4860
acgttgacac catcaaatgg tgcaaaacct ttgcggtat ggcatgatag cgccggaaag	4920
agagtcaatt cagggtggtg aatgtgaaac cagtaacgtt atacgatgtc gcagagtatg	4980
ccggtgtctc ttatcagacc gttcccgcg tggtaacca ggccagccac gtttctgcga	5040
aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgcgtgg	5100
cacaacaact ggccggcaaa cagtcgttgc tgattggcgt tgccacactcc agtctggccc	5160
tgcacgcgcc gtcgcaaatt tcgcggcga ttatctcg cgccgatcaa ctgggtgcc	5220
gcgtgggtgt gtgcgtggta gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaagcg gcggtgcaca	5280
atcttctcgc gcaacgcgtc agtggctga tcattaacta tccgctggat gaccaggatg	5340
ccattgttgtt ggaagctgcc tgcactaaatgg ttccggcgtt atttctgtat gtctctgacc	5400
agacacccat caacagtatt atttctccc atgaagacgg tacgcgactg ggcgtggagc	5460
atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc gggccattaa agttctgtct	5520
cgccgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga	5580
tagcggaaacg ggaaggcgac tggagtgcga tgtccggttt tcaacaaacc atgcaaatgc	5640
tgaatgaggg catgttccc actgcgtgc tggttgcacaa cgatcagatg ggcgtggcg	5700
caatgcgcgc cattaccgag tcgggctgc gcgttggcgc ggatatctcg gtatggat	5760
acgacgatac cgaagacgc tcatgttata tccgcgcgtc aaccaccatc aaacaggatt	5820
ttcgcctgct gggcaaaacc agcgtggacc gcttgcgtca actctctcag ggccaggcgg	5880

tgaaggcaa tcagctgtt cccgtctcac tggtaaaaa aaaaaccacc ctggcgccca	5940
atacgaaac cgccctccc cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	6000
tttcccgact gaaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagttt gcgcaattt	6060
atcttg	6065
<210> 50	
<211> 6912	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 50	
ttgtctgttc cggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatttg	60
tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgcgcgaa	120
ggcgaagcgg catgcattt cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcgtatg	180
gcatgatagc gccggagaaga gagtcaattt agggtggta atgtgaaacc agtaacgtt	240
tacgatgtcg cagagtatgc cgggtctt tttccgcgt ggtgaaccag	300
gccagccacg tttctgcgaa aacgcggaa aaagtggaaag cgccgatggc ggagctgaat	360
tacatttcca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgc tattggcggt	420
gccaccccca gtctggccct gcacgcggc tcgcaaattt tcgcggcgat taaatctcgc	480
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggt tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc	540
tgtaaagcgg cggtgaccaa tttctcgca caacgcgtca gtgggtgtat cattaaactat	600
ccgctggatg accaggatgc cattgtgtt gaagctgcct gcactaatgt tccggcgta	660
tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtattt tttcttcca tgaagacgg	720
acgcgactgg gctggagca tctggcgca ttgggttacc agcaaatcgc gctgttagcg	780
ggcccatcaa gtctgtctc ggccgtctg cgtctggctg gctggataa atatctact	840
cgcaatcaa ttccggat agcggaaacgg gaaggcact ggagtgccat gtccggttt	900
caacaaacca tgcatttttcaatgtt gaatgaggccatcgttccatcgttgc gttgccaac	960
gatcagatgg cgctggcgcc aatgcgcgccc attaccgagt ccggctgcg cttgggtgcg	1020
gatatactcg tagtggata cgacgatacc gaagacagct catgttat cccggcgta	1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgtt gggcaaacca gctggaccg cttgtgtca	1140
ctctctcagg gccaggcggtt gaaggcataat cagctgttgc cctgtctact ggtgaaaaga	1200
aaaaccaccc tggcgccaa tacgcaaaacc gccttcccc ggcgttggc cgattcatta	1260

atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa	1320
tgtgagttag cgcgaaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa	1380
tgcttciggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggatgg ctgtcaggt cgtaaatcac	1440
tgcataattc gtgtcgctca aggcgactc ccgttctgga taatgtttt tgccgacaca	1500
tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca tccggctcgat	1560
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcgc cgctgagaaa	1620
aagcgaagcg gcactgctct ttaacaattt atcagacaat ctgtgtggc actcgaccgg	1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa	1740
taaggaggaa taaaaccatgt gtgcgaccc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa	1800
ttcccgctgt tccgcaaact atcagccaaa cctgtggaaat ttcaattcc tgcaatccct	1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt	1920
tcgctgcatg atcaaccgtg tagacaccca gccgctgtcc ctgctggagc tgatcgacga	1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaaatt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa	2040
catcgtactg ctggacgaaa aaaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgctctgc	2100
ttccgtctg ctgcgtcagc acggttcga ggttctcag gatgttttg agcgttcaa	2160
ggataaagaa ggtggttca cgccgtgaact gaaagggtgac gtccaaggcc tgctgagcct	2220
gtatgaagcg tcttacctgg gtttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt	2280
ttccatcacc cacctgaaga acaacctgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca	2340
agtgagccac gccctgaaac tgccatatca ccagcgtctg caccgtctgg aggcacgtt	2400
gttcctggat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgtgg agctggcgaa	2460
gctggatttt aacatggta agaccctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccctg	2520
gtggaccgag atggccctgg ctagcaaact ggatttgtt cgcgaccgcc tcatggaagt	2580
ttatcttctgg gcactggta tggccaga ccccgagtt ggtgaatgtc gcaaagctgt	2640
tactaaaatg ttgggtctgg tgacgatcat cgatgaacgtg tatgacgttt atggcactt	2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgctgg gacgttaacg ctattaacac	2760
cctgccccgac tatatgaaac tgtgtttctt ggcactgtac aacaccgtt acgacacgtc	2820
ctattctatt ctgaaagaga aaggtataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg	2880
tgaactgtgc aaagccttgc tgcaagagggc gaaatggtcc aacaacaaaa ttatccggc	2940
tttctccaag tacctggaaa acgcccaggt ttccctctcc ggtgtagcgc tgctggcgcc	3000

gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttcct	3060
gaccgacttc catggctgg tgcgttctag ctgcgttatac ttccgcctgt gcaacgatct	3120
ggccacctct gcggcgaggc tgAACgtgg cgagactacc aattctatca ttagctacat	3180
gcacgaaaac gatggatcca gcgaggaaca ggcccgcga gaactgcgt aactgatcga	3240
cggcgaatgg aaaaagatga atcgtaacg cgtagcgtac tccaccctgc tgcctaaagc	3300
tttcatggaa atcgcagtta acatggcagc tgTTTcccac tgacacctacc agtatggcga	3360
tggctcggtt cggccagact acgcgactga aaaccgcac aactgctgc tgattgaccc	3420
tttcccattt aaccagctga tgtatgtcta actgcattgc ctttaggagg taaaaaaaaaa	3480
tgactgccga caacaatagt atgccccatg gtgcagtatc tagttacgcc aaattagtgc	3540
aaaaccaaac acctgaagac attttggaaag agtttctga aattattcca ttacaacaaa	3600
gacctaatac ccgtatctgtt gagacgtcaa atgacgaaag cggagaaaca tgTTTCTG	3660
gtcatgtga ggagcaaatt aagttaatga atgaaaatg tattgtttt gattggacg	3720
ataatgttat tggtgccgtt accaagaaag tttgtcattt aatggaaaat attgaaaagg	3780
gtttactaca tcgtgcattc tccgtctta tttcaatga acaaggtaaa ttacttttac	3840
aacaaagagc cactgaaaaa ataactttcc ctgattttgc gactaacaca tgctgcctc	3900
atccactatg tattgtatgc gaatttaggtt tgaaggtaa gctagacgt aagattaagg	3960
gcgcattttac tgcggcggtg agaaaactag atcatgaatt agtattcca gaagatgaaa	4020
ctaagacaag ggttaagttt cacttttaa acagaatcca ttacatggca ccaagcaatg	4080
aaccatgggg tgaacatgaa attgattaca tcctatTTTA taagatcaac gctaaagaaa	4140
acttgactgtt caacccaaac gtcaatgaag ttagagactt caaatgggtt tcaccaatg	4200
atttgaaaac tatgtttgtt gaccaagtt acaagtttac gccttgggtt aagattttt	4260
gcgagaattt ctattcaac tggtgggagc aatttagatga ctttctgaa gtggaaaatg	4320
acaggcaaat tcatagaatg ctataacaac gcgtcctgca gctggatcca tatggaaatt	4380
cgaagcttca tagaacaaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtagcaccat	4440
catcatcatc atcattgagt ttaaacggtc tccagcttgg ctgtttggc ggatgagaga	4500
agatTTTcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggctgtata aaacagaatt	4560
tgcctggcgg cagtagcgcgtt gtggtcccac ctgacccat gccgaactca gaagtgaaac	4620
gccgttagcgc cgatggatgtt gtggggtctc cccatgcgag agtagggaaac tgccaggcat	4680
caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tggcccttc gtttatctg ttgtttgtcg	4740

gtgaacgctc tcctgagtag gacaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcaagcaa	4800
cggcccgagg ggtggcgggc aggacgccc ccataaaactg ccaggcatca aattaagcag	4860
aaggccatcc tgacggatgg ctttttgcg tttctacaaa ctcttttgt ttatttct	4920
aaatacattc aaatatgtat ccgcttaacc ggaatigcca gctgggcgc cctctggaa	4980
ggttggaaag ccctgcaaag taaactggat ggcttctcg cgccaaagga tctgatggcg	5040
caggggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg ttgcgtatga ttgaacaaga	5100
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcgct atgactggc	5160
acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgttccgg ctgtcagcgc agggcgccc	5220
gtttctttt gtcaagaccc acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc	5280
gccccatcg tggctggcca cgacggcgt tccttgcgc gctgtgtcg acgtgtcac	5340
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc tcctgtcatc	5400
tcaccttgct cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	5460
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgatcg agcgagcagc	5520
tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcagggct	5580
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctaa ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcg	5640
cgtgacccat ggcgatgcct gtttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttctgg	5700
attcatcgac tggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cggtggctac	5760
ccgtgatatt gctgaagagc ttggccgcg atggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	5820
tatcgccgct cccgattcgc agcgatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttttctg	5880
acatgaccaa aatccctaa cgtgatgtt cgttccactg agcgatcgac cccgtagaaa	5940
agatcaaagg atttcttga gatcctttt ttctgctgatc aatctgtgc ttgcaaaaca	6000
aaaaaccacc gctaccagcg gtggttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc	6060
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgacgata taccaaatac tgccttcta gtgtggcg	6120
agttggcca ccacttcaag aactctgtat caccgcgtat atacctcgat ctgctaatcc	6180
tgttaccatg ggctgctgcc agtggcgata agtctgtatc taccgggttg gactcaagac	6240
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	6300
gcttggagcg aacgacccatc accgaactga gataacctaca gcgtgagctt tgagaaagcg	6360
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaaacag	6420
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcggt	6480
ttcgccaccc ctgacttgcg cgtcgatcc tgcgtatgc gtcagggggg cggagccat	6540
ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttccgtgc cttttgtgg cctttgtcc	6600

acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	6660
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaaag	6720
cggaaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggatt tcacaccga	6780
tatggcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gtaagccag tatacactcc	6840
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc	6900
gccctgacgg gc	6912
<210> 51	
<211> 7902	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 51	
ttgtctgctc cggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatttg	60
tcagagggtt tcacccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag cagatcaatt cgccgcgaa	120
ggcgaagcgg catgcattta cgttgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggat	180
gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc agggtggta atgtgaaacc agtaacgtta	240
tacgatgtcg cagagtatgc cgggtctct tatcagaccg tttccgcgt ggtgaaccag	300
gccagccacg ttctgcgaa aacgcggaa aaagtggaaag cggcgatggc ggagctgaat	360
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcggcaaac agtcgttgct gattggcg	420
gccacctccca gtcggccct gcacgcgcgc tcgcaaattt tcgcggcgat taaatctcg	480
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggt tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc	540
tgtaaagcgg cggtgaccaa tcttctcgca caacgcgtca gtggcgat cattaactat	600
ccgctggatg accaggatgc cattgcgttg gaagctgcct gcactaatgt tccggcgta	660
tttcttgcgtg tctctgatc gacaccatc aacagtattt tttctccca tgaagacggt	720
acgcgactgg gctggagca tctggcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg	780
ggcccatataa gttctgtctc ggccgcgtctc cgtctggctg gctggcataa atatctact	840
cgcaatcaaa ttccggatc agcggaaacgg gaaggcgact ggagtccat gtccggttt	900
caacaaacca tgcaaatgct gaatgaggcc atcgatccca ctgcgtatgt gtttgcac	960
gatcagatgg cgcgtggcgcc aatgcgcgc attaccgagt ccggcgatcg cgttggcg	1020
gatatctcggtt tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccggcgta	1080
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaacca gcgtggaccg cttgcgtcaa	1140

ctcttcagg gccaggcggt gaaggcaat cagctttgc ccgtctact ggtgaaaaga	1200
aaaaccaccc tggccccaa tacgcaaacc gcctccccc gcgcgttgc cgattcatta	1260
atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcggc agtgagcgca acgcaattaa	1320
tgtgagttag cgcaattga tctggtttga cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa	1380
tgcttcggc gtcaaggcagc catcgaaagc tgtggatgg ctgtgcaggt cgttaatcac	1440
tgcataattc gtgtcgctca aggccgcactc ccgttctgga taatgtttt tgccgcaca	1500
tcataacggt tctggcaat attctgaaat gagctgttga caattatca tccggctcgt	1560
ataatgttg gaatttgttag cgatataacaa ttccacacag gaaacagcgc cgctgagaaa	1620
aagcgaagcg gcaactgctt ttaacaattt atcagacaat ctgtgtggc actcgaccgg	1680
aattatcgat taactttatt attaaaaatt aaagaggtat atattaatgt atcgattaaa	1740
taaggaggaa taaaccatgt gtgcgaccc ttctcaattt actcagatta ccgagcataa	1800
ttcccgctgt tccgcaaact atcagccaaa cctgtggaat ttcaattcc tgcaattccct	1860
ggagaacgac ctgaaagtgg aaaagctgga ggagaaagcg accaaactgg aggaagaagt	1920
tcgctgcatt atcaaccgtg tagacaccca gccgtgtcc ctgtggagc tgatcgacga	1980
tgtgcagcgc ctgggtctga cctacaattt tgaaaaagac atcattaaag ccctggaaaa	2040
catcgtaactg ctggacgaaa acaaaaagaa caaatctgac ctgcacgcaa ccgtctgtc	2100
tttccgtctg ctgcgtcagc acggttcga ggttctcag gatgttttg agcgtttcaa	2160
ggataaaagaa ggtggttca gcggtaact gaaaggtgac gtccaaaggcc tgctgagcct	2220
gtatgaacgac tcttacctgg gttcgaggg tgagaacctg ctggaggagg cgcgtacctt	2280
ttccatcacc cacctgaaga acaacctgaa agaaggcatt aataccaagg ttgcagaaca	2340
agtgagccac gccctggAAC tgccatatca ccagcgctg caccgtctgg aggcacgttgc	2400
gttccctggat aaatacgaac cgaaagaacc gcatcaccag ctgctgtgg agctggcga	2460
gctggatTTT aacatggta acaccctgca ccagaaagag ctgcaagatc tgtcccgtg	2520
gtggaccgag atgggcctgg ctagcaaact ggatTTTgta cgccacgccc tgatgaaagt	2580
ttatTTTctgg gcactggta tggcgccaga ccccgatTTT ggtgaatgtc gcaaagctgt	2640
tactaaaatg ttggctctgg tgacgatcat cgatgacgtg tatgacgtt atggcactct	2700
ggacgaactg caactgttca ccgatgctgt agagcgctgg gacgttaacg ctattaacac	2760
cctggccggac tataatggaaat tggatTTTctgg ggcactgtac aacaccgttac acgacacgtc	2820
ctatttctttt ctgaaagaga aaggtcataa caacctgtcc tatctgacga aaagctggcg	2880
tgaactgtgc aaaggcttcc tgcaagaggc gaaatggtcc aacaacaaa ttatccggc	2940
tttctccaag tacctggaaa acgccagctt ttcctccctt ggtgttagcgc tgctggcgc	3000

gtcttacttt tccgtatgcc agcagcagga agacatctcc gaccacgcgc tgcgttccct	3060
gaccgacttc catggctctgg tgcgttctag ctgcgttatac ttccgcctgt gcaacgatct	3120
ggccacacct gcggcgaggc tggaacgtgg cgagactacc aattctatca ttagctacat	3180
gcacgaaaac gatggatcca gcgaggaaca ggcccgcga gaactgcgt aactgatcga	3240
cggcgaatgg aaaaagatga atcgtgaacg cgtagcgcac tccaccctgc tgcctaaagc	3300
gttcatggaa atcgcagtta acatggcacf tgttccac tgacacctacc agtatggcga	3360
tggctgggt cggccagact acgcgactga aaaccgcac aaactgctgc tgattgaccc	3420
tttcccattt aaccagctga tgtatgtcta actgcattcg cccttaggag gtaaaaaaac	3480
atgagtttg atattgccaat acccgacc ctggcactgg tcgactccac ccaggagtttta	3540
cgactgtgc cggaaagagag ttaccgaaa ctctgcgacg aactgcgcgc ctatttactc	3600
gacagcgtga gccgttccag cgggcacttc gcctccggc tggcacggc cgaactgacc	3660
gtggcgtgc actatgtcta caacaccccg tttgaccaat tgattggga tgtgggcat	3720
caggcttatac cgcataaaat tttgacccgga cgccgcgaca aaatcggcac catccgtcag	3780
aaaggcggtc tgcacccgtt cccgtggcgc ggcgaagcg aatatgacgt attaagcgtc	3840
gggcatttcat caacccat cagtggcggaa attggatttgc cggttgctgc cgaaaaagaa	3900
ggcaaaaatc gcccacccgt ctgtgttatttgc ggcgtggcgc cgattaccgc aggcatggcg	3960
tttgaagcga tgaatcacgc gggcgatatac cgtccgtata tgcgttgat tctcaacgac	4020
aatgaaatgt cgatttccga aaatgtcgcc ggcgtcaaca accatctggc acagctgttt	4080
tccggtaaac ttactcttc actgcgcgaa ggcggggaaaa aagtttttc tggcgtggc	4140
ccaattaaag agctgctcaa acgcacccgaa gaacatatta aaggcatggt agtgcctggc	4200
acgtgtttt aagagctggg cttaactac atcgccccgg tggacggtca cgatgtgctg	4260
gggcttatac ccacgctaaa gaacatgcgc gacctgaaag gcccgcgtt cctgcataatc	4320
atgaccaaaa aaggtcgtgg ttatgaacccg gcagaaaaag acccgatcac ttccacgc	4380
gtgcctaaat ttgatccctc cagcggttgt ttggcgaaaa gtagcgccgg tttggcggc	4440
tattcaaaaa tctttggcga ctgggtgtgc gaaacggcag cggaaagacaa caagctgatg	4500
gcgattactc cggcgatgcg tgaagggtcc ggcgtggcag agttttcagc taaattcccg	4560
gatcgctact tcgacgtggc aattggcgag caacacgcgg tgcgttgc tgcgggtctg	4620
gcgatgggt ggtacaaacc cattgtcgcc atttactcca ttccctgca acgcgcstat	4680
gatcagggtgc tgcgtacgtt ggcgttccaa aagttccgg tccgttgcg catgcaccgc	4740

gcggcattg ttggtgctga cggtaaacccatcagggtg ctttgatct ctcttacctg	4800
cgctgcatac cgaaatggc cattatgacc ccgagcgatg aaaacgaatg tcgccagatg	4860
ctctataccg gctatcacta taacgatggc ccgtcagcgg tgcgtaccc gcgtggcaac	4920
gcggtcggcg tgaaactgac gccgctggaa aaactaccaa ttggcaaagg cattgtgaag	4980
cgtcgccgcg agaaaactggc gatcctaacc ttggtagc tgcgtccaga agcggcgaaa	5040
gtcggccaat cgctgaacgc cacgctggc gatatgcgtt ttgtgaaacc gcttgcgtaa	5100
gcgttaattc tgaaatggc cgccagccat gaagcgctgg tcaccgtaga agaaaacgcc	5160
attatggcg ggcaggcag cggcgtgaac gaagtgcgtt tgcccattcg taaaccagta	5220
cccggtgtga acattggcct gccggacttc ttattccgc aaggaactca ggaagaaatg	5280
cgcggcaac tcggcctcgta tgccgctggatggagcca aaatcaaggc ctggctggca	5340
taactgcgcg tggtaaccata tggaattcg aagcttctaaacaacaaatcatactcaga	5400
agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcatacatcat cattgagttt aaacggctc	5460
cagcttggct gtttggcgg atgagagaag atttcagcc tgatacagat taaatcagaa	5520
cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttgcctggcgtt gtagcgcgtt ggtccacct	5580
gaccatgc cgaactcaga agtgaacacgc cgtagcgccg atggtagtgtt ggggtctccc	5640
catgcgagag taggaaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg	5700
ggcccttcgt tttatctgtt gtttgcgtt gaacgccttc ctgagtagga caaatccgc	5760
gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcggcag gaccccccc	5820
ataaaactgcc aggcataaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc ttttgcgtt	5880
tctacaaact cttttgttt attttctaa atacattcaa atatgtatcc gcttaaccgg	5940
aattgccagc tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg	6000
ctttcgcgcc gccaaggatc tgcgtgcga gggatcaag ctctgatcaa gagacaggat	6060
gaggatcggt tcgcattgtt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgttggg	6120
tggagaggctt attcggtat gactggcac aacagacaat cggctgtct gatggcccg	6180
tgttccggct gtcagcgac gggcgcccg ttcttttgtt caagaccgac ctgtccggtg	6240
ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc ggctatcgat gctggccacg acggcggttc	6300
cttgcgcagc tgcgtcgac gttgtactg aagcggaaag ggactggctg ctatggcgc	6360
aagtgcggg gcaggatcgc ctgtcatc acctgtcc tgcgtggaaa gtatccatca	6420
tggctgtgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgtatccgc tacctgcccattcgacc	6480

aaggcggaaaca	tcgcacatcgag	cgagcacgta	ctcggtatgga	agccgggttt	gtcgatcagg	6540
atgatcttggaa	cgaagagcat	caggggctcg	cggccagccga	actgttcgccc	aggctcaagg	6600
cgagcatgcc	cgacggcgag	gatctcgatcg	tgaccatgg	cgatgcctgc	ttggccaaata	6660
tcatgggttggaa	aatatggccgc	ttttctggat	tcatcgactg	tggccggctg	ggtgtggcgg	6720
accgctatca	ggacatagcg	ttggcttaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	6780
gggctgaccg	cttcctcgat	ctttacggta	tcgcccgtcc	cgattcgcag	cgcatcgcc	6840
tctatcgcc	tcttgacgag	ttcttctgac	gcatgaccaa	aatccctaa	cgtgagttt	6900
cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttgc	gatcctttt	6960
ttctgcgcgt	aatctgtgc	ttgcaaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtgggttgg	7020
tgccggatca	agagctacca	actcttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	7080
taccaaatac	tgtccttcta	gtgttagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	7140
caccgcctac	atacctcgat	ctgcataatcc	tgttaccagt	ggctgcgtcc	agtggcgata	7200
agtctgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	7260
gtctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	7320
gataacctaca	gcgtgagcta	tgagaaaagcg	ccacgcttcc	cgaaggggaga	aaggcggac	7380
ggtatccgt	aagcggcagg	gtcggAACAG	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	7440
acgcctggta	tctttatagt	cctgtcggtt	tgcggcacct	ctgactigag	cgtcgatttt	7500
tgtgtatgtc	gtcagggggg	cgaggcctat	ggaaaaaacgc	cagcaacgcg	gccttttac	7560
ggttcttgcc	cttttgcgg	cctttgcgc	acatgttctt	tccctgcgtt	tccctgtatt	7620
ctgtggataa	ccgtattacc	gccttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	7680
ccgagcgcac	cgagtcgtgt	agcgaggaag	cggaaagagcg	cctgtatgcgg	tatttctcc	7740
ttagcgcac	gtgcggattt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcgttaca	atctgtctg	7800
atgcccgcata	gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	7860
gccccgacac	ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gc		7902
<210>	52					
<211>	6783					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	52					
ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgacccga	tcgccttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	60

tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtcggtta tttcacaccg	120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca	180
cccgccaaca cccgctgacg agcttagtaa agccctcgct agatttaat gcggatgttgc	240
cgattacttc gccaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gccttcatg atatatctcc	300
caatttgtt agggcttatt atgcacgctt aaaaataata aaaggcagact tgacctgata	360
gttggctgt gagcaattat gtgcttagtg catctaacgc ttgagtttaag ccgcggcg	420
aagccgcgc ggcttgaacg aattgttaga cattattgc cgactacctt ggtgatctcg	480
ccttcacgt agtggacaaa ttcttccaaac tgatctgcgc gcgaggccaa gcgatctct	540
tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg ggccggcagg	600
cgctccattt cccagtcggc agcgacatcc ttccggcgta tttggcggt tactgcgttgc	660
taccaaattgc gggacaacgt aagcactaca ttccgtcat cgccagccca gtcggcg	720
gagttccata gcgttaaggt ttcatttagc gcctcaaata gatcctgttca aggaaccgga	780
tcaaagagtt cctccggccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctt tgctttgtc	840
agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgta gctggctcgaa agataacctgc aagaatgtca	900
ttgcgtgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca cggaatgtat	960
tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca ggcggagaa tctcgctctc tccagggaa	1020
gccgaagttt ccaaagggtc gttgatcaaa gctcgccgta tttttcatc aagccttacg	1080
gtcacccgtaa ccagcaaatc aatatcactg tgtggcttca ggccgcccac cactgcggag	1140
ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggt tcgagatggc gtcgatgac gccaactacc	1200
tctgatagtt gagtcgatac ttccggatc accgcttccc tcatgatgtt taactttgtt	1260
tttagggcgac tgcctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa acatcgaccc	1320
acggcgtaac gcgcttgctg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc aaaaaaacag	1380
tcataacaag ccatgaaaac cgccactgctg ccgttaccac cgctcggttc ggtcaagggtt	1440
ctggaccagt tgcgtgagcg catacgctac ttgcattaca gettacgaac cgaacaggct	1500
tatgtccact gggttcggtc cttcatccgt ttccacgggtg tgcgtcaccc ggcaacccttgc	1560
ggcagcagcg aagtgcggc atttctgtcc tggctggcga acgagcgcac ggttgcggtc	1620
tccacgcac tgcaggcatt ggcggccttgc ctgttcttct acggcaaggt gctgtgcacg	1680
gatctgcctt ggcttcagga gatcggaga cctcggccgt cgccggcctt gccgggtgg	1740
ctgaccccgat atgaagtggt tcgcatttc ggtttctgg aaggcgagca tcgtttgttc	1800

gcccagcttc tcatggaaac gggcatgcgg atcagtgagg gtttcaact gcgggtcaag	1860
gatctggatt tcgatcacgg cacgatcatc gtgcgggagg gcaaggcgc caaggatcg	1920
gccttgatgt tacccgagag cttgcaccc agcctgcgcg agcagggaa ttaattcca	1980
cgggttttgc tgccgc当地 cgccgttgtc tggtgtct agtttttat cagaatcgca	2040
gatccggctt cagccggtt gccggctgaa agcgctattt ctccagaat tgccatgatt	2100
ttttccccac gggaggcgtc actggctccc gtgtgtcgg cagctttagt tcgataagca	2160
gcatgcctg ttccaggctg tctatgtgtc actgttgagc tgtaacaagt tgtctcagg	2220
gttcaatttc atgttctagt tgctttgttt tactggttc acctgttcta ttaggttta	2280
catgcgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcaiggtg aacagcttig aatgcaccaa	2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct ttttacacc gtttcatct gtgcataatgg	2400
acagtttcc ctgtatatg taacggtgaa cagttgtct actttgttt gttagtcgg	2460
atgcttcaact gatagataca agagccataa gaacctcaga tcctccgta tttagccagt	2520
atgttctcta gtgtggttcg ttgttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca	2580
tacttacttt gcatgtcact caaaaatttt gcctcaaaaac tggtgagctg aatttttgc	2640
gttaaagcat cgtgttagt tttcttagt ccgttatgta ggttaggaatc tgatgtaatg	2700
gttgggtta tttgtcacc attcatttt atctggttgt tctcaagttc gttacgaga	2760
tccatttgc tatctatgtc aacttggaaa atcaacgtat cagtcggcgc gcctcgctta	2820
tcaaccacca attcatatt gctgttagt tttaaatctt tacttattgg tttcaaaaacc	2880
cattggtaa gcctttaaa ctcatggtag ttatcttcaa gcattaacat gaacttaaat	2940
tcatcaaggc taatctctat atttgccttg tgagtttct tttgtgttag ttcttttaat	3000
aaccactcat aaatcctcat agagtattt tttcaaaaag acttaacatg ttccagatta	3060
tatTTTATGA ATTttttAA ctggAAAAGA taaggcaata tctcttcaCT AAAAActAAT	3120
tctaattttt cgcttgagaa ctggcatag ttgtccact ggAAAtCtC AAAGCCTTA	3180
accaaaggat tcctgatttc cacagtctc gtcatacgat ctctgggtc tttagctat	3240
acaccataag catTTCCt actgtatgttc atcatctgag cgtattgggt ataagtgaac	3300
gataccgtcc gtttttccT tgtagggTT tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag	3360
cataaaatta gcttggTTc atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcatt	3420
gcttgaaaa caactaatttC agacatacat ctcaattggT ctaggtgatt ttaatcacta	3480
taccaattga gatgggctag tcaatgataa ttactagtc ttcccttg agttgtgggt	3540
atctgttaat tctgttagac ctttgctgga aaacttgtaa attctgttag accctctgtA	3600
aattccgcta gaccttggT tgTTTTTTT gtttatattc aagtggTTt aatttataga	3660

ataaagaag aataaaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta	3720
ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgaaa cgctgttgc tcctctaca	3780
aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcaccctcg caagctcggg caaatcgctg	3840
aataticctt ttgtctccga ccatcaggca cctgagtgcg tgcgttttc gtgacattca	3900
gttcgcgtcg ctcacggctc tggcagtcaa tggggtaaa tggcactaca ggcgccttt	3960
atggattcat gcaaggaaac taccataat acaagaaaag cccgtcacgg gcttctcagg	4020
gcgtttatg gccccgtctgc tatgtggtgc tatctgactt ttgcgtttc agcagttct	4080
gccctctgat ttccagtcg gaccactcg gattatccc tgacaggta ttcagactgg	4140
ctaattgcacc cagaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgctta ctgtcggaa	4200
ttcgcgttgg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc	4260
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgcgc	4320
tgagaaaaag cgaaggcgcgca ctgcttttta acaatttac agacaatctg tgtggcact	4380
cgaccggaaat tatcgattaa cttttatttta aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc	4440
gattaaataa ggaggaataa accatgtgtg cgacctttc tcaatttact cagattaccg	4500
agcataattc ccgtcggtcc gcaaactatc agccaaacct gtggaaatttca gaattcctgc	4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcggacc aaactggagg	4620
aagaagttcg ctgcatgatc aaccgtgttag acacccagcc gctgtccctg ctggagctga	4680
tcgacgtatgt gcagcgcctg ggtctgaccc acaaatttga aaaagacatc attaaagccc	4740
tggaaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaacaa atctgacccgt cacgcaaccg	4800
ctctgtcttt ccgtctgctg cgtcagcagc gtttcgaggt ttctcaggat gttttgagc	4860
gtttcaagga taaaaggat ggtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggcctgc	4920
tgagcctgta tgaagcgtct tacctgggtt tcgagggtga gaacctgctg gaggaggcgc	4980
gtaccttttc catcacccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcatata accaagggttgc	5040
cagaacaagt gagccacgcc ctggaactgc catatcacca gctctgcac cgtctggagg	5100
cacgttgggtt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagg	5160
tggcgaagct ggatttaac atggtacaga ccctgcacca gaaagagctg caagatctgt	5220
cccgctggtg gaccgagatg ggcctggcta gcaaactgga tttgtacgc gaccgcctga	5280
tggaaagtta ttctggcata ctgggtatgg cgccagaccc gcagtttgtt gaatgtcgca	5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggtga cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg	5400
gcactctgga cgaactgcaa ctgttcaccc atgctgtaga gcgctggac gttaacgcata	5460
ttaacaccct gccggactat atgaaactgt gtttcctggc actgtacaac accgttaacg	5520

acacgtccta ttctattctg aaagagaaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa	5580
gctggcgtga actgtcaaa gccttctgc aagaggcgaa atggccaac aacaaaatta	5640
tccggcttt ctccaagttac ctggaaaacg ccagcgtttc ctctccggt gtacgcgtgc	5700
tggcccgctc ttactttcc gtatgccagc agcaggaaga catctccgac cacgcgtgc	5760
gttcctgac cgacttccat ggtctggtgc gttctagctg cgttatcttc cgccgtgca	5820
acgatctggc cacctctgctg gcgagactgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta	5880
gctacatgca cggaaaacgt ggtaccagcg aggaacaggc ccgcgaagaa ctgcgtaaac	5940
tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc accctgctgc	6000
ctaaagcggt catggaaatc gcagttaca tggcacgtgt ttcccactgc acctaccagt	6060
atggcgatgg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcataaaa ctgctgtga	6120
ttgacccttt cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcagctggta ccatatggga	6180
attcgaagct ttctagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac	6240
catcatcatc atcatcattt agtttaaacg gtctccagct tggctgttt ggcggatgag	6300
agaagattt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggcttg ataaaacaga	6360
atttgcctgg cggcagtagc gcggtggtcc cacctgaccc catgccgaac tcagaagtga	6420
aacggccgtag cgccgatggt agtgtgggt ctccccatgc gagagttaggg aactgccagg	6480
catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactggcct ttctttttat ctgttgttg	6540
tcggtaacg ctctcctgag taggacaaat ccggccggag cggatttggaa cggtgcgaag	6600
caacggcccg gagggtggcg ggcaggacgc ccgcataaaa ctgcaggca tcaaattaag	6660
cagaaggcca tcctgacgga tggcttttt gcgttctac aaacttttt tgtttatttt	6720
tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttaat	6780
aat	6783
<210> 53	
<211> 6783	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 53	
ccgtcttac tgtcggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt	60
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtattttagaa aaataaaca	120
aaagagttt tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggcctctgc ttaattttagat	180

gcctggcagt ttatggcgaa cgtcctgecc gccaccctcc gggccgttgc ttgcacacgt	240
tcaaatccgc tccggcgga ttgtcctac tcaggagac gttcaccgac aaacaacaga	300
taaaaacgaaa gccccagtc ttgcactgag ccttcgttt tatttgatgc ctggcagttc	360
cctactctcg catggggaga ccccacacta ccatacgccg tacggcggtt cacttctgag	420
ttcgcatgg ggtcagggtgg gaccaccgcg ctactgccgc caggcaatt ctgtttatc	480
agaccgcttc tgcgttctga ttaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcatccgcca	540
aaacagccaa gctggagacc gtttaactc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc	600
tattcagatc ctcttctgag atgagtttt gttctagaaa gttcgaatt cccatatgg	660
accagctgca gttagacata catcagctgg ttaatcgaa aagggtcaat cagcagcagt	720
ttgatgcgtt ttcatgcgc gtagtctgg cgacccagac catgccata ctggtagtg	780
cagtggaaa cacgtccat gttaaactgcg atttccatga acgctttagg cagcagggtg	840
gagtcgctaa cgcgttcacg attcatctt ttccattcgg cgtcgatcag tttacgcgt	900
tcttcgcggg cctgttcctc gctggatcca tcgtttcggt gcatgttagt aatgatagaa	960
ttggtagtct cgcacgttc cagctccgc gcagaggtgg ccagatcggt gcacaggccc	1020
aagataacgc agctagaacg caccagacca tggaagtgg tcagggaaacg cagcgcgtgg	1080
tcggagatgt ctctctgctg ctggcatacg gaaaagtaag acggcgcacag cagcgtaca	1140
ccggaggagg aaacgcgtggc gttttccagg tactggaga aagccggat aatttttgtt	1200
ttggaccatt tcgcctttt cagaaaggct ttgcacagg tttcgatcaga	1260
taggacaggt ttttatgacc tttcttttca agaatagaat aggacgtgtc gttaacgggt	1320
ttgtacagt ccagggaaaca cagtttcata tagtccggca ggggttaat agcgttaacg	1380
tcccagcgct ctacagcatc ggtgaacagt tgcgttctgt ccagagtgcgataaaacgtca	1440
tacacgtcat cgtatgtatgtt caccagacca aacattttag taacagctt ggcacattca	1500
ccaaactgct ggtctggcgc cataccagt gcccagaaat aaacttccat caggcggcgt	1560
cgtacaaaat ccagttgtt agccaggccc atctcggtcc accagggaa cagatctgc	1620
agcttttctt ggtgcagggt ctgttccatg ttaaaatcca gttcgccag ctccagcgc	1680
agctgggtat ggggttctt cgggtcgat ttatccagga accaactgtc ctccagacgg	1740
tgcagacgct ggtgatgtt cagttccagg gcgtggctca ctgttctgc aaccttggta	1800
ttaatgcctt ctttcagggtt gttttcagg tgggtatgg aaaaggtaacg cgccttcc	1860
agcagggttctt caccctcgaa acccaggtaa gacgcttcat acaggctcag caggccttgg	1920

acgtcacctt tcagttcacc gctgaaacca ctttttat cttgaaacg ctaaaaaca	1980
tcctgagaaa cctcgaaacc gtgctgacgc agcagacgga aagacagagc gttgcgtgc	2040
aggtcagatt tttttttt gtttgcgtcc agcagtacga tgtttccag ggcttaatg	2100
atgtctttt caaatttgta ggtcagaccc aggcgctgca catcgatcagatccagc	2160
agggacacgc gctgggtgtc tacacggtt atcatgcgcgaaacttcttc ctccagtttgc	2220
gtcgcttct cctccagtttccacttcc aggtcgatccagggatttgcagaaatttgc	2280
aaattccaca gtttggctg atagttgcg gaacgacggg aattatgctc ggtaatctgat	2340
gtaaatttgcg aagaggtcgc acacatggtt tattcccttcttatataatcg atacattaat	2400
atataccctt ttaattttta ataataaagt taatcgataa ttccggtcga gtgcccacac	2460
agattgtctg ataaatttgtt aaagagcagt gcccgttcgc ttttctcag cggcgctgtt	2520
tcctgtgtga aattgttatac cgctcacaat tccacacatt atacgagccg gatgattaat	2580
tgtcaacacgc tcatttcaga atctggcgtatcgaaga ggccgcacc gatgccctt	2640
ccaaacagtt ggcgcgcctg aatggcgaat ggccgcgtatcgtt cccttacgc	2700
atctgtgcgg tatttcacac cgcatatgtt gcactctcgtatcgtc tctgtatgcgc	2760
catagtttaag ccagccccga cacccgccaac cacccgctga cgagcttagt aaagccctcg	2820
cgtttttttt atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc	2880
cagccittca tggatatatct ccaatttgtt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaataa	2940
taaaaggcaga ctggacctga tagttggctt gtgagcaatt atgtgcttag tgcataaac	3000
gcttggatgtt agccgcgcgc cgaaggccgg tcggcttgcgaa cgaatttttgc gacattttt	3060
ggccactacc ttggatgtt cgccttccat gtagtgaccaatttcttccactgatctgc	3120
ggccggaggcc aagcgatctt cttttgtcc aagataagcc tgtctagttt caagtatgac	3180
gggctgatac tggccggca ggcgcctccat tgcccgatcg gcagcgacat ctttcggcgc	3240
gattttgcgcgttactgcgttaccaat gcccggacaaac gtaagcacta catttcgttc	3300
atcgccagcc cagtcggcgcg gcgaggatcca tagcgatcgtt gtttcatatc ggcctcaaa	3360
tagatccgtt tcagggatccat gatcaaagat ttcctccgc gctggaccta ccaaggcaac	3420
gctatgttctt ctgttttttgcgttaccaat gcccggacaaac gtaagcacta catttcgttc	3480
ttggatataatgcgacccgatccat gatcgatcg tggctggcttgcgttaccaat	3540
ttggatataatgcgacccgatccat gatcgatcg tggctggcttgcgttaccaat	3600
aatctcgatc tctccagggg aagccgaatgttccaaagg tcgttgcgttac aagctcgccg	3660

cgttgttca tcaaggctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt	3720
caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg	3780
gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgt acttcggcga tcaccgcttc	3840
cctcaigtatg ttiaactttt ttttagggcg actgccitgc tgcttaacat cgttgtct	3900
ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgttgc tgcttgatg cccgaggcat	3960
agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc	4020
accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgt acttgcatta	4080
cagcttacga accgaacagg ctatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc gttccacgg	4140
tgtgcgtcac ccggcaacct tggcagcag cgaagtgcag gcatttctgt cctggctggc	4200
gaacgagcgc aaggttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggct tgctgttctt	4260
ctacggcaag gtgtgtgca cggatctgccc ctgggttcag gagatggaa gacctggcc	4320
gtcgcggcgc ttgcccgtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttgcacatcc tcggtttct	4380
ggaaggcgag catgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acggcatgc ggatcagtga	4440
gggttgtcaa ctgcgggtca aggatctgga ttctgatcac ggcacgatca tcgtgcggga	4500
ggcaaggcgtc tccaaggatc gggccttgc gttaccggag agcttggcac ccagcctgcg	4560
cgagcaggaa attaattcc cacgggttt gctgccccca aacgggctgt tctgggttg	4620
ctagttgtt atcagaatcg cagatccggc ttccgggtt ttggcggctg aaagcgctat	4680
ttctccaga attccatga tttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgc	4740
ggcagcttg attcgataag cagcatcgcc tggttcaggc tgctatgtg tgactgtga	4800
gctgtacaa gttgtctcg gtgtcaatt tcatgttcta gttgtttgt tttactgggtt	4860
tcacctgttc tattaggtgt tacatgtgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg	4920
tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgtaaaaagctctg atgtatctat ctttttaca	4980
ccgtttcat ctgtcgatata ggcagtttt cccttgcata tgtaacggtg aacagttgtt	5040
ctactttgtt ttgttagtct tcatgttca ctgtatgata caagagccat aagaacctca	5100
gatccttcgttat tagtgcgttc tagtgcgttt cgttgcgttt cggtgagcca	5160
tgagaacgaa ccattggat catacttact ttgcgttca ctcaaaaatt ttgcctcaaa	5220
actgggtgac tgaatttttg cagttaaagc atcggttagt gttttctta gtccgttatg	5280
taggtggaa tctgtatgtaa tggttgcgtt gatgttgcata ccattcattt ttatctgg	5340
gttctcaagt tcggttacga gatccatttgc tctatctgt tcaacttgaa aatcaacgt	5400
atcagtcggc cgccctcgct tatcaaccac caatttcata ttgcgttcaag tggtttaatc	5460
tttacttatt gtttcaaaa cccattgggtt aagccttta aactcatggt agttatccc	5520

aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaatctt atattgcct tgtgagttt	5580
cttttgtt agttcttta ataaccactc ataaatcc tc atagagtatt tgtttcaaa	5640
agacttaaca tggccagat tatattttt gaattttt aactggaaaa gataaggcaa	5700
tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttgcgtttag aacttggcat agtttgtcca	5760

ctggaaaatc tcaaggcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc tcgtcatcag	5820
ctctctggtt gcttagcta atacaccata agcatttcc ctactgatgt tcatcatctg	5880
agcgatattgg ttataagtga acgataccgt ccgttcttc ctgttagggt ttcaatcgt	5940
ggggtttagt agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg ttaagtata	6000
gcgactaatac gctagttcat ttgcttigaa aacaactaat tcagacatac atctcaattt	6060
gtcttaggtga tttaatcac tataccaatt gagatggct agtcaatgat aattactagt	6120
cctttccctt tgagggtgg gatatgtaa attctgttag accttgctg gaaaacttgt	6180

aaattctgct agaccctctg taaattccgc tagactttg tgtttttt ttgttatat	6240
tcaagtggtt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa gaatagatcc	6300
cagccctgtg tataactcac tacttagtc agtccgcag tattacaaaa ggtatgtcgca	6360
aacgctgtt gctctctac aaaacagacc ttaaaaacctt aaaggcttaa gtagcaccct	6420
cgcaagctcg ggcaaatcgc tgaatattcc tttgtctcc gaccatcagg cacctgagtc	6480
gctgtttt tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatggggta	6540
aatggcacta caggcgcctt ttatggattc atgcaagaa actaccata atacaagaaa	6600

agcccgtaac gggctctca gggcggttta tggcggtct gctatgtgg gctatctgac	6660
ttttgtgt tcagcagttc ctgccctctg atttccagt ctgaccactt cgattatcc	6720
cgtgacaggt cattcagact ggctaattgca cccagtaagg cagcggatc 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 cgccctgatgc ggtatccc cttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg	120
catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca	180

cccgccaaca cccgctgacg agcttagtaa agccctcgct agatTTTaaT gggatgttg	240
cgattacttc gccaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcTTTCatg atatATCTCC	300
caatttGTgt agggcttatt atgcacgctt aaaaATAATA aaAGCAGACT tgacctgata	360
gtttGGCTgt gagcaattat gtGCTTAGtG catctaACGc tTGAGTtaAG ccGCGCCGcG	420
aAGCGGCgtc ggCTGAACG aATTGTTAGA cATTATTGc CGACTACCTT ggtgatCTCG	480
ccttcacgt agtggacaaa ttcttccaaT tgatCTGCGC GCGAGGCCA GCGATTTCT	540
tcttgtccaa gataAGCCTG tCTAGCTTCA agtatGACGG GCTGATACTG GGCAGGcagg	600
CGCTCCATTG CCCAGTCGGC AGCGACATCC TtCGGCGGA TTTGCGGT TACTGCGCTG	660
TACCAAATGC GGGACAACGT AAGCACTACA TTtCGCTCAT CGCCAGCCa GTCGGGCGC	720
GAGTCCATA GCGTTAAGGT TtCATTTAGC GCCTCAAATA GATCCTGTT AGGAACCGGA	780
TCAAAGAGTT CCTCCGCCGC TGGACCTACC AAGGCAACGc TATGTTCTC TGCTTTGTC	840
AGCAAGATAG CCAGATCAAT GTGATCGTG GCTGGCTCGA AGATAACCTGc AAGAATGTCA	900
ttgcgcgtcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataACGCCA CGGAATGATG	960
tcgtcgtgca caacaatggT gacttctaca GCGCGGAGAA tctcgctctc TCCAGGGAA	1020
GCCGAAGTTT CAAAAGGTC GTTGTCAAA GCTCGCCGCG TTGTTTCATC AAGCCTAACG	1080
gtcacccgtaa ccAGCAAATC AATATCACTG TGTGGCTTCA GGCGCCATC CACTGCGGAG	1140
CCGTACAAT gtacggccAG CAACGTGCGT TCGAGATGGC GCTCGATGAC GCCAACtACC	1200
TCTGATAGTT GAGTCGATAC TTcGGCGATC ACCGCTCCC TCATGATGTT TAACTTGTT	1260
ttAGGGCGAC TGCCTGCTG CGTAACATCG TTGCTGCTCC ATAACATCAA ACATCGACCC	1320
acggcgtaac gcgcttgctg ctTGGATGCC CGAGGCATAG ACTGTACCCC AAAAaacAG	1380
tcataacaag ccatgaaaac CGCCACTGCG CGTTACAC CGCTCGTTC GGTCAAGGTT	1440
ctggaccagt TCGTGTAGCG CATAcGCTAC TTGcATTACA GCTACGAAC CGAACAGGCT	1500
TATGTCCTACT GGGTTCGTGC CTTCATCCGT TTCCACGGTG TGCGTACCCC GGCAACCTTG	1560
GGCAGCAGCG AAGTCGAGGC ATTTCGTCC TGGCTGGCGA ACGAGCGAA GTTTCGGTC	1620
TCCACGCTAC GTCAGGCATT GGCGGCCTTG CTGTTCTCT ACGGCAAGGT GCTGTGCACG	1680
GATCTGCCCT GGCTTCAGGA GATCGGAAGA CCTCGGCCGT CGCGCGCTT GCCGGTGGTG	1740
ctgaccccgg atgaagtggT tcgcATCCTC GGTtTCTGG aAGGCGAGCA TCGTTTGTTC	1800
GGCCAGCTTC TGTATGGAAC GGGCATGCGG ATCAGTGGAGG GTTGCACtG GCGGGTCAAG	1860
GATCTGGATT TCGATCACGG CACGATCATC GTGCGGGAGG GCAAGGGCTC CAAGGATCGG	1920
GCCTTGTGT tacCCGAGAG CTTGGCACCC AGCCTGCGCG AGCAGGGGAA TTAATTCCCA	1980
CGGGTTTGC TGCCCGAAAC CGGGCTGTTc TGGTGTTGCT AGTTGTTAT CAGAATCGCA	2040

gatccggctt cagccggttt gccggctgaa agcgctattt ctccagaat tgccatgatt	2100
ttttccccac gggaggcgtc actggctccc gtgttgtcg cagtttgat tcgataagca	2160
gcatcgctg ttccaggctg tctatgtgtg actgttgagc tgtaacaagt tgtctcaggt	2220
gttcaatttc atgttctagt tgctttgtt tactggttc acctgttcta ttagtgtta	2280
catgtgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcatggtg aacagcttg aatgcaccaa	2340
aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct ttttacacc gtttcatct gtgcataatgg	2400
acagtttcc ctttgatatg taacggtaa cagttgttct acttttgtt gttagtttg	2460
atgcttcaact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttcgta tttagccagt	2520
atgttctcta gtgtggttcg ttgttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca	2580
tacttacttt gcatgtcaact caaaaatttt gcctcaaaac tggtagctg aatttttca	2640
gttaaagcat cgtagtgtt ttttcttagt ccgttatgta ggttaggaatc tgatgtat	2700
gttgggtta tttgtcacc attcatttt atctgggtgt tctcaagttc ggtagcaga	2760
tccatttgtc tatctagttc aacttggaaa atcaacgtat cagtcggcg gcctcgctta	2820
tcaaccacca atttcatatt gctgtaaatg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc	2880
cattggtaa gcctttaaa ctcatggtag ttatattcaa gcattaacat gaacttaaat	2940
tcatcaaggc taatcttat atttgcctt tgagtttct tttgtgttag ttcttttaat	3000
aaccactcat aaatcctcat agagtattt ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta	3060
tattttatga attttttaa ctggaaaaga taaggcaata tcttttcaact aaaaactaat	3120
tctaattttt cgcttgagaa ctggcatag ttgtccact ggaaaatctc aaaggctta	3180
accaaaggat tcctgatttc cacagttctc gtcatacgat ctctgggtgc tttagctaat	3240
acaccataag catttccct actgatgttc atcatctgag cgtattgggt ataagtgaac	3300
gataccgtcc gtttttccct tgggttttt tcaatcggtt ggtaggttgc tgccacacag	3360
cataaaattt gcttggttcc atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagtctattt	3420
gcttgaaaa caactaattt cagacatacat ctcaattggc ctagggatt ttaatcaacta	3480
taccaattga gatggctag tcaatgataa ttactagttcc tttcccttg agttgtgggt	3540
atctgttaat tctgttagac ctggctggaa aaacttgtaa attctgttag accctctgtta	3600
aattccgcta gacctttgtt tgggtttttt gtttatattt aagtgggtt aatttataga	3660
ataaagaaag aataaaaaaaa gataaaaaaga atagatccca gcccgtgtta taactcaacta	3720
ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgaaa cgctgttgc tcctctacaa	3780

aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcaccctcg caagctcggg caaatcgctg	3840
aatattccctt ttgtctccga ccatcaggca cctgagtcgc tgtcttttc gtgacattca	3900
gttcgcgtcgctc tcacggctc tggcagtgaa tggggtaaa tggcactaca ggcgccttt	3960
atggattcat gcaaggaaac taccataat acaagaaaag cccgtcacgg gcttctcagg	4020
gcgtttatg gccccgtcg tatgtgtgc tatctgactt ttgcgttgc agcagttct	4080
gccctctgat ttccagtct gaccactcg gattatcccg tgacaggta ttcagactgg	4140
ctaattgcacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt acccgctta ctgtcggaa	4200
ttcgcgttgg ccgattcatt aatgcagatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc	4260
ggctcgata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagcgcgc	4320
ttagaaaaag cgaagcggca ctgctttta acaatttac agacaatctg tgtggcact	4380
cgaccggaaat tatcgattaa ctttattttt aaaaattaaa gaggtatata ttaatgtatc	4440
gattaaataa ggagaataa accatgtgtc cgacctcttc tcaatttact cagattaccg	4500
agcataattc ccgtcggtcc gcaaactatc agccaaacct gtggatttc gaattctgc	4560
aatccctgga gaacgacctg aaagtggaaa agctggagga gaaagcgacc aaactggagg	4620
aagaagttcg ctgcatgatc aaccgtgttag acacccagcc gctgtccctg ctggagctga	4680
tcgacgatgt gcagcgcctg ggtctgaccc acaaatttga aaaagacatc attaaagccc	4740
tggaaaaacat cgtactgctg gacgaaaaca aaaagaacaa atctgacccgt caccaaccg	4800
ctctgtctt ccgtctgctg cgtcagcagc gttcgaggt ttctcaggat gttttgagc	4860
gtttcaagga taaaagaaggt gtttcagcg gtgaactgaa aggtgacgtc caaggctgc	4920
tgagcctgta tgaagcgtct tacctgggtt tcgagggtga gaaacctgctg gaggaggcgc	4980
gtaccttttc catcacccac ctgaagaaca acctgaaaga aggcatata accaaggttg	5040
cagaacaagt gagccacgccc ctggaactgc catatcacca gctgtgcac cgtctggagg	5100
cacgttggtt cctggataaa tacgaaccga aagaaccgca tcaccagctg ctgctggagc	5160
tggcgaagct ggattttaac atggtagaca ccctgcacca gaaagagctg caagatctgt	5220
cccgctggtg gaccgagatg ggcctggcta gcaaactgga tttgtacgc gaccgcctga	5280
tggaagtttta ttctggca ctgggtatgg cgccagaccc gcagttgggt gaatgtcgca	5340
aagctgttac taaaatgttt ggtctggta cgatcatcga tgacgtgtat gacgtttatg	5400
gcactctggaa cgaactgcaat ctgttcaccc atgctgtaga gcgctggac gttaacgcta	5460
ttaacaccct gccggactat atgaaactgt gttcctggc actgtacaac accgttaacg	5520

acacgtccta ttctattctg aaagagaaaag gtcataacaa cctgtcctat ctgacgaaaa	5580
gctggcgtga actgtcaaa gccttctgc aagaggcgaa atggccaac aacaaaatta	5640
tcccgctt ctccaagtac ctggaaaacg ccagcgttc ctccctcggt gtacgctgc	5700
tggcccgctc ttactttcc gtatgccagc agcaggaaga caictccgac cacgcgtgc	5760
gttccctgac cgacttccat ggtctggtgc gttctagctg cgttatctc cgcctgtgca	5820
acgatctggc caccctgctcg gcggagctgg aacgtggcga gactaccaat tctatcatta	5880
gctacatgca cgaaaacgat ggtaccagcg aggaacagggc ccgcgaagaa ctgcgtaaac	5940
tgatcgacgc cgaatggaaa aagatgaatc gtgaacgcgt tagcgactcc accctgctgc	6000
ctaaagcgtt catgaaatc gcagttaca tggcacgtgt ttcccactgc acctaccagt	6060
atggcgatgg tctgggtcgc ccagactacg cgactgaaaa ccgcatcaaa ctgctgtga	6120
ttgacccttt cccgattaac cagctgatgt atgtctaact gcatgcct taggaggtaa	6180
aaaaaaatga ctgcccacaa caatagtatg ccccatggtg cagtatctag ttacgcaaa	6240
ttagtgc当地 accaaacacc tgaagacatt ttggaagagt ttccctgaaat tattcatta	6300
caacaaagac ctaatacccg atctagttag acgtcaaatg acgaaagcgg agaaacatgt	6360
ttttctggtc atgatgagga gcaaattaag ttaatgaatg aaaattgtat tgtttggat	6420
tgggacgata atgtattgg tgccggtacc aagaaagtt gtcatatggggaaatatt	6480
gaaaagggtt tactacatcg tgcattctcc gtcttattt tcaatgaaca aggtgaatta	6540
c当地tacaac aaagagccac tgaaaaataa actttccctg atcttggac taacacatgc	6600
tgctctcatc cactatgtat tgatgacgaa ttaggttga agggtaagct agacgataag	6660
attaaggcgc ctattactgc ggccgtgaga aaactagatc atgaatttagg tattccagaa	6720
gatgaaacta agacaagggg taagttcac ttttaaaca gaatccatta catggcacca	6780
agcaatgaac catgggtga acatgaaatt gattacatcc tatattataa gatcaacgct	6840
aaagaaaaact tgactgtcaa cccaaacgta aatgaagttt gagacttcaa atgggttca	6900
ccaaatgatt tggaaaactat gtttgctgac ccaagttaca agttacgcc ttgggttaag	6960
attatttgcg agaattactt attcaactgg tgggagcaat tagatgaccc ttctgaagtg	7020
gaaaatgaca ggcaattca tagaatgcta taacgacgct tcctgcagct ggtaccatata	7080
gggaattcga agtttctag aacgaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgcgt	7140
cgaccatcat catcatcatc attgagttt aacggctcc agcttggctg tttggcggaa	7200
tgagagaaga tttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa	7260
cagaatttgc ctggccggcag tagcgccgtg gtcccccacctg accccatgcc gaactcagaa	7320
gtgaaacgcc gtagcgcgcgaa tggttagtgc gggctcccc atgcgagagt aggaaactgc	7380

caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gccttcgtt ttatctgttgc	7440
tttgtcggtg aacgctctcc ttagtaggac aaatccgcgg ggagcggatt tgaacgttgc	7500
gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcataaactgccat ggcataaat	7560
taagcagaag gccatcctga cgatggct ttttgcgtt ctacaactc ttttgttta	7620
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatacgac aataaccctg ataaatgtt	7680
caataat	7687
<210> 55	
<211> 8675	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 55	
cccgctttac tgtcggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagatta ttgaagcatt	60
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa	120
aaagagttt tagaaacgca aaaaggccat ccgtcaggat ggccttctgc ttaatttgat	180
gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgecc gccaccctcc gggccgttgc ttgcacagt	240
tcaaataccgc tccggcggaa ttgtcctac tcaggagac gttcacggac aaacaacaga	300
taaaacgaaa gccccagtct ttgcactgag cctttcgitt tatttgcattc ctggcagttc	360
cctactctcg catgggaga ccccacacta ccatacgccgc taaggcggtt cacttctgag	420
ttcgccatgg ggtcaggatgg gaccacccgcg ctactgcccgc caggcaatt ctgtttatc	480
agaccgccttc tgcgttctga ttaatctgt atcaggctga aaatcttctc tcatccgc	540
aaacagccaa gctggagacc gtttaaactc aatgatgatg atgatgatgg tcgacggcgc	600
tattcagatc ctcttctgag atgagttttt gttctagaaaa gttcgaatt cccatatgg	660
accagctgca gtatgccag ccaggccttgc atttggctt ccataccagc ggcacgcgg	720
ccgagttcgcc cgccgatttc ttccgttgcgtt ccttgcggaa taaagaatgc cggcaggcca	780
atgttcagca cgggtactgg ttacgttgcg gccatcagca cttcgatgc acgcgttgc	840
gcgcgcgcgc taatggcgtt ttcttctacg gtgaccagcg ctgcgttgc ggcggccatt	900
tccagaattt acgttcatc aacgggttca aaaaacgca tatcgaccag cgtggcgttc	960
agcgattcgg cgacttcgcg cgttctggc atcagegtac caaagttaaag gatgcgc	1020
ttctcgccac gacgcttcac aatgccttg ccaattggta gttttccag cggcgtcgt	1080
tccacgcgca cgcgttgcc acgcgggttag cgcaccgcgt acggccatc gttatagtga	1140

tagccggat agagcatctg gcgcacattc tttcatcg tcgggtcat aatgaccatt
tccgttatgc agcgcaggta agagagatca aaagcacccct gatgggtttg accgtcagca
ccaacaatgc ccgcgcggc gatggcgaac aggacggaa gctttgaat cgccacgtca
tgcagcacct gatcataggc gcgttgcagg aaagtggagt aaatcgac aatgggttg
taccaccaa tcgcccagacc cgcagcaaag gtcaccgcgt gttgctcgcc aattgccacg

tcgaagtagc gatccggaa ttacgtgaa aactcgacca tgccggAAC ttcacgcac
gccggagtaa tcgccccatcg cttgttgtct ttgcgtgcg ttgcgcacaa ccagtcgcca
aagatTTTg aatacgctgg caaaccccg ctatTTTcg gcaaaacaacc gctggaggaa
tcaaatttag gcacggcgtg gaaagtgtatc gggctttt ctgcgggttc ataaccacga
cctttttgg tcatgatatg caggaactgc gggcctttca ggtcgccat gttcttagc
gtggtgataa gccccagcac atcggtaccg tccaccggc cgtatgtatTTTaaagccagc
tcttcaaaaca acgtgccagg cactaccatg ctttaatat gttctcggt gcgtttagc

agctcttaa ttggcggcac gccagagaaa actttttcc cgccttcgca cagtgaagag
taaagcttac cgaaaaagcag ctgtgccaga tgggttgtga ggcgcggcac atttcgaa
atcgacatTTTt cattgtcgTTt gagaatcacc agcatatcg gacggataic gcccgcgtga
ttcatcgctt caaacccat gcctgcggta atcgccatcg ccacatgac acagacggtg
cgccgattt tgccttctt ttgcggcagca accgcaatac caattccggc actgtatggag
gttcatgtatc gcccgcgtca taatacgatc tattcgctt cgcgcgcac cgggaacggg
tgcagaccgc ctttctgacg gatggtgccg atttgcgtc ggcgtccggc caaaatttt

tgcggataag cctgatgccc cacatccaa atcaattggt caaacgggt gttgtagaca
tagtgcagcg ccacggtcag ttgcaccgtg cccagccgg aggcaagtg cccgctggaa
cggtcacgc tgtcgagtaa atagggcgc agttcgatcg agatTTTcg taaactct
ttcggcaaca gtcgtaaactc ctgggtggag tgcaccagtgc ccagggtcg gtatTTTggca
atataaaaaac tcatgtttt ttaccccta agggcaatgc cgttagaca tacatcgatc
gtttaatcg gaaagggtca atcagcagca gttgtatgc gtttgcgtc gcgtatct
ggcgaccagg accatcgccca tactggtagg tgcagtggaa aacacgtgcc atgttaactc

cgatttccat gaacgcctta ggcagcagg ggagtcgt aacgcgttca cgattcatct
tttccattc ggcgtcgatc agttacgca gttcttcgca ggcctgttcc tcgcgtggatc
catcgatTTTt gtgcgtatcg ctaatgtatc aattggatgt ctgcgcacgt tccagtc
ccgcagagg ggccagatcg ttgcacaggc ggaagataac gcagctagaa cgcaccagac
catggaaatgc ggtcaggaa cgcagcgcgt ggtcggagat gtttgcgtc tgctggcata
2760
2820
2880
2940
3000

cgaaaaagta agacggcgcc agcagcgcta caccggagga ggaaacgctg gcgtttcca	3060
ggtacttgaa gaaagccggg ataatttgt tggatggacca ttgcgcctct tcggaaaagg	3120
ctttgcacag ttacgcccag ctgtcgtaa gataggacag gtgttatga ccttccttt	3180
tcaaataga ataggacgtg tcgttaacgg tggtgtacag tgccaggaaa cacagttca	3240
tatagtcgg cagggtgtta atagcgtaa cgtcccagcg ctctacagca tcggtaaca	3300
gttgcagtgc gtccagatgt ccataaacgt catacacgtc atcgatgtc gtcaccagac	3360
caaacattt agtaacagct ttgcgacatt caccaaactg cgggtctggc gccataccca	3420
gtgcccgaaa ataaacttcc atcaggcggt cgctacaaa atccagttt ctagccaggc	3480
ccatctcggt ccaccagcg gacagatctt gcagctttt ctggtgagg gtctgtacca	3540
tgttaaaatc cagttcgcc agtccagca gcagctggtg atcggttct ttgggtcg	3600
atttatccag gaaccaacgt gcctccagac ggtgcagacg ctgggtatat ggcagttca	3660
gggcgtggct cacttgttct gcaaccttgg tattaatgcc ttcttcagg ttgttctca	3720
ggtgggtat gaaaaaggta cgcgcctct ccagcaggtt ctcaccctcg aaaccagg	3780
aagacgttc atacaggctc agcaggcctt ggacgtcacc ttgcgttca ccgtgaaac	3840
cacttcttt atccttgaaa cgctaaaaa catcctgaga aacctgaaa ccgtgctgac	3900
gcagcagacg gaaagacaga gcggttgctt gcaggtcaga ttgttcttt ttgtttcg	3960
ccagcgtac gatgtttcc agggcttaa tggatgtttt ttcaatttt taggtcagac	4020
ccagggcgtg cacatcgctg atcagctca gcagggacag cggctgggtg tctacacgg	4080
tgtatcatgca gcaacttct tcctccagg tggatcgctt ctccctccagc tttccactt	4140
tcaggtcggtt ctccaggat tgcaggatt cgaaattcca caggttgcc tggatgttt	4200
cggaacgacg ggaattatgc tcggtaatct gagtaattt agaagaggc gcacacatgg	4260
tttattccctt ctatataat cgatacatta atatataacct cttaatttt taataataaa	4320
gttaatcgat aattccggc gaggatgtc acagattgtc tgataattt taaagagca	4380
gtgcgcgttc gtttttctc agcggcgctg ttccgtgtt gaaattgtta tccgctaca	4440
attccacaca ttatacgagc cggatgatta attgtcaaca gctcattca gaatctggcg	4500
taatagcgaa gaggccccca ccgtatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga	4560
atggcgctg atgcggattt ttctccatc gcatctgtgc ggtatttac accgcatatg	4620
gtgcactctc agtacaatct gctctgtatc cgcatatgtt agccagcccc gacacccccc	4680
aacacccgct gacgagctt gtaaagccct cgctagattt taatgcggat gttgcgat	4740

cttcgccaac tattgcata acaagaaaaa gccagcctt catgatata ctcccaattt	4800
gtgttagggct tattatgcac gcttaaaaat aataaaagca gacttgacct gatagttgg	4860
ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcata acgcttgagt taagccgcgc cgcaagcg	4920
cgtcggttg aacgaattgt tagacattat ttgccacta cttggtgat ctcgccttc	4980
acgtgttgc caaattcttc caactgtat gcgcgcgagg ccaagcgatc ttcttctgt	5040
ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat actggccgg caggcgctcc	5100
attgcccaatg cggcagcgc accttcggc gcgatttgc cggttactgc gctgtaccaa	5160
atgcgggaca acgttaagcac tacatttgc tcataccag cccagtcggg cggcagttc	5220
catagcgtta agtttcatt tagcgctca aatagatcct gttcaggaac cggatcaaag	5280
agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgttatgtt ctctgcctt tgtcagcaag	5340
atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac ctgcaagaat gtcattgcgc	5400
tgccattctc caaattgcag ttgcgccta gctggataac gccacggaaat gatgtcg	5460
tgcacaacaa tggtgacttc tacagcgcgg agaatctcgc tctctccagg ggaagccaa	5520
gtttccaaaa ggtcggtat caaagctcgc cgcgtgttt catcaagcct tacggtaacc	5580
gtaaccagca aatcaatatac actgtgtggc ttcaaggccgc catccactgc ggagccgtac	5640
aaatgtacgg ccagcaacgt cgggtcgaga tggcgctcga tgacgccaac tacctctgat	5700
agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct tccctatga tgtttaactt tgtttaggg	5760
cgactgcct gctgcgtaac atcggtgtc ctccataaca tcaaacatcg acccacggcg	5820
taacgcgtt gctgcttggc tgcccggggc atagactgta ccccaaaaaa acagtataa	5880
caagccatga aaaccggccac tgcgcgtta ccaccgctgc gttcggtcaa gttctggac	5940
cagttgcgtg aggcatacg ctacttgcatac tacagcttac gaaccgaaca ggcttatgtc	6000
cactgggttc gtgccttcat ccgttccac ggtgtgcgtc acccgcaac cttggcagc	6060
agcgaagtcg aggcatattt gtcctggctg gcgaacgagc gcaaggttt ggtctccacg	6120
catgtcagg cattggggc cttgtgttc ttctacggca aggtgtgtg cacggatctg	6180
ccctggcttc aggagatcg aagacctcg ccgtcgccgc gttgcccgtt ggtgtgacc	6240
ccggatgaag tggttcgat cctcggttt ctggaggcg agcatgttt gttcgcccag	6300
cttctgtatg gaacgggcat gcggatcagt gagggttgc aactgcgggt caaggatctg	6360
gatttcgatc acggcacatc catgtgcgg gaggcaagg gtcggcaagg tcggccctt	6420
atgttacccg agagttggc acccagcctg cgcgagcagg ggaattaatt cccacgggtt	6480

tgtctgcccc caaacgggct gttctgggt tgctagttt ttagatcataat cgcagatccg	6540
gcttcagccg gtttgccggc tggaaaggcatttcttcca gaattgccat gatTTTCC	6600
ccacggggagg cgtaactggc tcccggttg tcggcagctt tgattcgata agcagcatcg	6660
cctgtttcag gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtac aagttgtctc aggtgtcaa	6720
tttcatgttc tagttgtttt gttttactgg ttccacctgt tctatttaggt gttacatgtt	6780
gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc ttgaatgca caaaaaactc	6840
gtaaaagctc tggatgtatct atcttttta acccgtttc atctgtgcat atggacagtt	6900
ttcccttga tatgttaacgg tgaacagttt ttctactttt gtttggtagt ctgtatgtt	6960
cactgataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatTTAGC cagtatgttc	7020
tcttagtgtgg ttctgtgtttt ttgcgtgagc catgagaacg aaccatttagt atcataacta	7080
ctttgcatgt cactcaaaaa ttgcctca aaactggtga gctgaatttt tgcaGTTAA	7140
gcatcgtgtt gtgttttct tagtccgtta tggtaggtt aatctgtatgtt aatgggttt	7200
ggtagttttgtt caccattcat ttatctgg ttgttctcaaa gttcggttac gagatccatt	7260
tgttatctca gttcaacttg gaaaatcaac gtatcgtcg ggccggctcg cttatcaacc	7320
accatTTCA tattgcgtta agtgtttaaa tctttactta ttggTTCAA aacccattgg	7380
ttaaggcTTT taaactcatg gtagtttattt tcaagcatta acatgaactt aaattcatca	7440
aggctaattt ctatatttgc ttgtgagtt ttctttgtt tagttcttt taataaccac	7500
tcataaatcc tcatagagta ttgtttca aaagacttaa catgttccag attatatttt	7560
atgaattttt ttaactggaa aagataaggc aatatctttt cactaaaaac taattctaat	7620
ttttcgcttg agaacttggc atagttgtc cactggaaaa tctcaaagcc tttaaccaaa	7680
ggattccctga ttcccacagt tctcgatc acgtctctgg ttgttttagt taataacacca	7740
taaggcattt ccctactgtat gttcatcatc tgtagcgtatt ggttataagt gaacgataacc	7800
gtccgTTCTT tccttggtagg gtttcaatc gtgggggttga gtagtgccac acagcataaa	7860
attagcttgg ttcatgttc cgttaagtca tagcgactaa tcgctagttc atttgcttgc	7920
aaaacaacta attcagacat acatctaat tggtaggtt gatTTAATC actataccaa	7980
ttgagatggg ctgtcaatg ataattacta gtcctttcc ttgagatggt gggtagtctgt	8040
aaattctgtt agaccttgc tggaaaactt gtaattctg ctagaccctc tgtaaattcc	8100
gctagacattt tgggtttttt attcaagtgg ttataattta tagaataaaag	8160
aaaagaataaa aaaagataaa aagaatagat cccagccctg tgtataactc actactttag	8220
tcaagtccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt ttgtcctct acaaaaacaga	8280
ccttaaaacc ctaaaggctt aagttagcacc ctgcagact cggccaaatc gctgaatatt	8340

ccttttgct ccgaccatca ggcaccttag tcgctgtctt ttcgtgaca ttcatcgcc
tgcgtcact gctctggcag tgaatgggg taaatggcac tacaggcgcc ttttatggat
tcatgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct cagggcgtt
tatggcggtt ctgctatgtg gtgctatctg acttttgct gttcagcagt tcctgccctc 8580

tgattttcca gtctgaccac ttccggattat cccgtgacag gtcattcaga ctggctaatt
cacccagtaa ggcagcggtt tcatcaacag gctta 8675

<210> 56
<211> 8032
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 56

tcgctgcgtt cggtcggtcg gctgcggcga ggggtatcg ctactcaaa ggccgttaata 60
cggttatcca cagaatcagg ggataaacgca gaaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 120
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgttt tccataggct ccgcggccct 180

gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 240
agataccagg cgttcccccc tggaagctcc ctgtgcgtt ctccgttcc gaccctgcgc 300
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca 360
cgctgttagt atctcgttcc ggttaggtc gttcgctcca agctggctg tgtgcacgaa 420
cccccggttcc agcccgaccc ctgcgcctta tccggtaact atcgttctga gtccaaacccg 480
gtaagacacg acttacgccc actggcgacca gccactggta acaggattag cagagcgagg 540
tatgttaggcg gtgctacaga gttctgaag tggggccta actacggcta cactagaaga 600

acagttttg gatatcgcc tctgtgaag ccagttaccc tcggaaaaag agttggtagc 660
tcttgatccg gcaaacaac caccgttgtt agcggtggtt tttttgtttt caagcagcag 720
attacgcgcgca gaaaaaaaaagg atctcaagaa gatcccttga tctttctac ggggtctgac 780
gctcagtggaa acgaaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 840
ttcacctaga tcctttaaa taaaaatga agtttaat caatctaaag tatatatgag 900
taaacttggt ctgacagttt ccaatgctt atcgtgagg cacctatctc agcgatctgt 960
ctatccgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcggtt agataactac gatacgggag 1020

ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 1080
gatttatcag caataaaccat ggcagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 1140

ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccggaaag ctagagtaag tagttcgcca	1200
gttaatagg tgcgcaacgt tggccatt gctacaggca tcgtgggtc acgctcg	1260
tttggtatgg ctccattcag ctccgggtcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	1320
atgttgtaa aaaaagcggt tagctccctc ggccctccga tcgttgtcag aagtaagt	1380
gccgcagtgt tataactcat ggttatggca gcactgcata attctttac tgtcatgcca	1440
tccgtaagat gctttctgt gactggtag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt	1500
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	1560
agaacttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcaaaaact ctcaaggatc	1620
ttaccgtgt tgagatccag ttgcgttaa cccactcgac caccaactg atcttcagca	1680
tctttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgcccaaaa	1740
aaggaaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tttttttt tcaatattat	1800
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa	1860
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt cccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa	1920
accattattt tcatgacattt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc	1980
gcgcgtttcg gtgtgacgg taaaacccctc tgacacatgc agctccggaa gacggtcaca	2040
gcttgtctgt aagcgatgc cgggagcaga caagccgtc agggcgcgtc agcgggttt	2100
ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac	2160
catagatctg gagctgtat ataaaaaccc ttctcaacta acggggcagg tttagtgcacat	2220
tagaaaaccc actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa gccagtcatt	2280
aggcctatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcgtat aaccatcaca	2340
aacagaatga ttttccgtt aagatagcg taaatattt gaattacctt tattatggaa	2400
ttttccgtt gtaataatgg gtatggatattt ttattgtat ttaagttaaa	2460
cccgatataat gaatgtccatg gaataataga aagagaaaaa gcattttcag gtatgggt	2520
tttggaaac aatttcccg aaccattata ttctctaca tcagaaaggt ataaatcata	2580
aaacttttgc aagtcttttgc ttacaggatc ccaaatacca gagaatgtt tagatacacc	2640
atcaaaaattt gtataaagtgc gtcataactt atcccaataa cctaactctc cgtcgtatt	2700
gttaaccagg tttttttttt tttttttttt ttatccctt gtcaactaaga aaataatgc	2760
agggtttttt ttatccctt ttatccctt ttatccctt ttatccctt ttatccctt ttatccctt	2820
tgtgggtata cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	2880
ccaaatgtct aatcaattt tattaaatgtt catttgcattt gcctccatc tttttttttt	2940
aagtgtttttt aggaggcttta cttttttttt ttatccctt ttatccctt ttatccctt ttatccctt	3000

gtcaatatta ctgtaacata aatatataatt taaaaat cccactttat ccaatttcg	3060
tttggtaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaaaga cctatgcggt gtgaaatacc	3120
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa	3180
ctgttggaa gggcgatcg tgccggcctc ttgcgtatca cgccagctgg cgaaaggggg	3240
atgtgctgca aggcgattaa gttggtaac gccagggtt tcccagtac gacgttgaa	3300
aacgacggcc agtgccaagc ttgcattgcct gcactccatt ttcttcgtct atcaaataa	3360
cagactcgat atttccaaa cgagcttca aaaaagcctc tgcccttgc aaatcgatg	3420
cctgtctata aaattcccgaa tattggtaa acagcggcgc aatggcggcc gcacatgtat	3480
tcttgcttg gcaaatgttc atcttatttc ttcccttc tcaataatit tttcattcta	3540
tccctttct gtaaagttta ttttcagaa tactttatc atcatgtttt gaaaaatata	3600
cacgataata tccattgttc tcaacggaaac acacgcaggat catttgaacg aatttttcg	3660
acaggaattt gccgggactc aggagcattt aacctaaaaa agcatgacat ttcagcataa	3720
tgaacattta ctcatgtcta tttcggttct ttctgtatg aaaatagttt tttcgagct	3780
ctacggaaat agcgagagat gatataccta aatagagata aaatcatctc aaaaaatgg	3840
gtctactaaa atattattcc atcttattaca ataaattcac agaatagtct tttaagtaag	3900
tctactctga attttttaa aaggagaggg taaagagtga aaacagtatg tattattgat	3960
gcattacgaa caccaattgg aaaatataaa ggcagcttaa gtcaagtaag tgccgttagac	4020
tttaggaacac atgttacaac acaactttta aaaagacatt ccactatttc tgaagaaatt	4080
gatcaagtaa tcttgaaaa tttttacaa gctggaaatg gccaaaatcc cgacgacaa	4140
atagcaataa acagcggttt gtctcatgaa attccgcac tgacggttaa tgaggctgc	4200
ggatcaggaa tgaaggccgt tattttggcg aaacaattga ttcaattagg agaagcggaa	4260
gttttaatttgc ctggcggat tgagaatatg tcccaagcac ctaaattaca acgtttat	4320
tacgaaacag aaagctacga tgcccttt tcttagtata tttatgtatgg attaacggat	4380
gccttagtg gtcaaggaaact gggcttaact gctgaaaatg tggccgaaaa gtatcatgt	4440
actagagaag agcaagatca atttctgtatcattcacaat taaaagcagc tcaagcacaa	4500
gcagaaggaa tattcgctga cgaaatagcc ccattagaag tatcaggaac gtttgaggag	4560
aaagatgaag ggattcgccc taattcgagc gttgagaagc taggaacgct taaaacagtt	4620
tttaaagaag acggactgtt aacagcgggg aatgcataa ccattaaatga tggggcttct	4680
gcttgatttttgc ttgttcaca agaatatgcc gaagcacacg gtcttcctta ttttagctatt	4740

attcgagaca gtgtggaagt cggatttatccagccata tggaaatttc gcccattaaa	4800
gccattcaaa aactgttagc gcgcataatcaa cttactacgg aagaatttga tctgtatgaa atcaacgaag cattgcagc aacttcaatc gtggtccaaa gagaactggc tttaccagag gaaaaggta acatttatgg tggcggtatt tcattaggtc atgcgattgg tgccacaggt gctcgtttat taacgagttt aagttatcaa ttAAATCAAA aaaaaaAGAA atatggagtg gcttctttat gtatcggcgg tggcttagga ctgcgtatgc tactagagag acctcagcaa aaaaaaaaaca gccgattta tcaaattgagt cctgaggaac gcctggcttc tcttcttaat gaaggccaga ttctgctga tacaaaaaaa gaatttggaa atacggctt atcttcgcag	4860 4920 4980 5040 5100 5160 5220
attgccaatc atatgattga aaatcaaatc agtggaaacag aagtgcgcgttggc ttacatttaa cagtggacga aactgattat ttgggtaccaa tggcgacaga agagccctca gttattgcgg cttttagttaa tggtgcaaaa atagcacaag gattttaaac agtgaatcaa caacgcttaa tgcgtggaca aatcgaaaa tacatgttgc cagatcccga gtcattgatt gataaaactac aagtaagaga agcggaaagtt tttcaacaag cagagttaaat ttatccatct atcgtaaac gggccggcgg cttaaagatgt ttgcaatatc gtactttga tgaatcattt gtatctgtcg acttttagt agatgttaag gatgcaatgg gggcaaatat cgttaacgct	5280 5340 5400 5460 5520 5580 5640
atgttggaaatgtgtggccga gttgttccgt gaatggtttgcggagcaaaa gattttattc agtattttaa gtaattatgc cacggatcg gttgttacga tggaaacggc tattccagtt tcacgtttaa gtaaggggag caatggccgg gaaattgctg aaaaattgt ttttagttca cgctatgctt cattagatcc ttatcggca gtcacgcata acaaaggaat catgaatggc attgaagctg tagtttagc tacaggaaat gatacacgctg ctgttagcgc ttcttgtcat gctttgcgg tgaaggaagg tcgctaccaa ggcttgacta gttggacgct ggttggcga caactaatttgcgtt gtaaaatttc agttccgtt gcttttagcca cggttggcgg tgccacaaaa	5700 5760 5820 5880 5940 6000 6060
gtcttaccta aatctcaagc agctgtgtatgtttagcag tgacggatgc aaaagaacta agtgcgatgt tagggctgt tggtttggca caaaatttgcggcgatgttgc ggccttagtc tctgaaggaa ttcaaaaagg acacatggct ctacaaggcac gtttttagc gatgacggtc ggagctactg gtaaaagaatgt gaggcgttc gctcaacaat taaaacgtca aaaaacgtatg aaccaagacc gagccatggc tattttaaat gatgttggaa aacaataaaa ggagagggtg acaatggaa ttgtataat tagttttttgtggccctt attatattgtatgtacggca ctggctgaag ccagaaatgt agaccctggaa aatgttccata ttggatttgg gcaagaccaa	6120 6180 6240 6300 6360 6420 6480

atggcgtga acccaatcag ccaagatatt gtgacatttgcagccaatgc cgcagaagcg	6540
atcttgacca aagaagataa agaggccatt gatatggtga ttgtcgggac tgagtccagt	6600
atcgatgagt caaaagcggc cgcagttgtc ttacatcgtaaatgggat tcaaccttc	6660
gctcgcttt tcgaatcaa ggaagcttgt tacggagcaa cagcaggctt acagttagct	6720
aagaatcactg tagccttaca tccagataaa aaagtcttgg tcgtagcggc agatattgca	6780
aaatatggct taaattctgg cggtgagcct acacaaggag ctggggcggt tgcaatgtta	6840
gttgcttagt aaccgcgtt aagaggata atgtgatgct gacgcaagat	6900

atctatgact ttggcggtcc aacaggccac ccgtatccta tggtcgatgg tcctttgtca	6960
aacgaaaacct acatccaatc ttttgccaa gtcggatg aacataaaaa acgaaccgg	7020
cggattttgc cagattatga tgcttagcg ttccatattc cttacacaaa aatggc	7080
aaaggcttat tagcaaaaat ctccgaccaa actgaagcag aacaggaacg aattttagcc	7140
cgttatgaag aaagtatcgctatagtcgt cgcgtaggaa acttgtatac gggttcactt	7200
tatctggac tcattccct ttagaaaaat gcaacgactt taaccgcagg caatcaaatt	7260
gttttattca gtatggttc tggtgctgtc gctgaatttt tcactggta attagtagct	7320

gttatcaaa atcatttaca aaaagaaaact cattagcac tgctggataa tcggacagaa	7380
cattttatcg ctgaatatga agccatgttt gcagaaactt tagacacaga cattgatcaa	7440
acgttagaag atgaattaaa atatagtatt tctgttattataataaccgt tcgttcttat	7500
cggaaactaaa aaaaaccggc cttggcccg ccggttttt attatttttc ttccctccga	7560
tgttcaatcc gctccataat cgacggatgg ctccctctga aaattttAAC gagaaacggc	7620
gggttgaccc ggctcagtcg cgtAACGGCC aagtctgaa acgtctcaat cgccgcttcc	7680
cggtttccgg tcaagtcataat ggcgtAACGGT tcggcggcg tttcctgata ccggagacg	7740

gcattcgtaa tcgggatccc cgggtaccga gctcgaatttgcataatcatgt catagctgtt	7800
tcctgtgtga aattgttatac cgctcacaat tccacacaaac atacgagccg gaagcataaa	7860
gtgtaaagcc tgggtgcct aatgagttagt ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact	7920
ccccgttttc cagtcggaa acctgtcgcc cagctgtcat taatgaatcg gccaacgcgc	7980
ggggagagggc ggttgcgtt tggcgttcc tcgtcactg ac	8032

<210> 57

<211> 6592

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

gaattgctcc atttcttct gctatcaaaa taacagactc gtgatttcc aaacgagctt	60
tcaaaaaagc ctctgcccct tgcaaatcggtgcctgtct ataaaattcc cgatattggtaaaacagcgccgatcgatgtcttgc ttggcgaatgttcatcttat	120
ttcttcctcc ctctcaataatccattctatccctttctgtaaatgtttca	180
gaataactttt atcatcatgc ttgaaaaaa tatcacgata atatccattgttcctcacgga	240
agcacacgca ggtcatttga acgaatttt tcgacaggaa ttgcgggaa ctcaggagca	300
tttaacctaa aaaagcatga catttcagca taatgaacat ttactcatgt ctatccgt	360
tccttcgt atgaaaatag ttatccgag tctctacgga aatagcgaga gatgatatac	420
ctaaatagataaaatcat ctcaaaaaaa tgggtctact aaaatattat tccatctatt	480
acaataaatt cacagaatag tccttaagt aagtctactc tgaattttt taaaaggaga	540
ggtaaagatgtgtgcac ctcttctcaa ttactcaga ttaccgagca taatccgt	600
cgttccgaa actatcagcc aaacctgtgg aatttcaat tcctgcaatc cctggagaac	660
gacctgaaatggaaaagct ggaggagaaa gcgaccaac tggaggaaga agttcgctgc	720
atgatcaacc gtgttagacac ccagccgctg tccctgctgg agctgatcga cgtgtgcag	780
cgccctggtc tgacctacaa attgaaaaaa gacatcatta aagccctgga aaacatcgta	840
ctgcgtggacg aaaacaaaaaa gaacaaatct gacgtgcacg caaccgcctgtcttccgt	900
ctgctgcgtc agcacggttt cgaggttct caggatgtttt tgagcggtt caaggataaa	960
gaaggtggtt tcagcgtga actgaaaggt gacgtccaag gcctgctgag cctgtatgaa	1020
gcgttacc tgggttcga gggtgagaac ctgctggagg aggccgtac ctccatc	1080
acccacctga agaacaacct gaaagaaggc attaatacca aggttgcaga acaagtgagc	1140
cacccctgg aactgccata tcaccagcgt ctgcaccgtc tggaggcacg ttggccctg	1200
gataaaatcg aaccgaaaga accgcatcac cagctgctgc tggagctggc gaagctggat	1260
tttaacatgg tacagaccct gcaccagaaa gagctgcaag atctgtcccg ctggtgacc	1320
gagatggcc tggctagcaa actggattt gtacgcgacc gcctgatgga agtttatttc	1380
tggcactgg gtatggcgc agacccgcag ttgggtgaat gtgcacaaagc tgtaactaaa	1440
atgttgttc tggtgacgat catcgatgac gtgtatgacg ttatggcac tctggacgaa	1500
ctgcaactgt tcaccgatgc tgttagagcgc tggacgtt acgctattaa caccctgcgg	1560
gactatatga aactgtgtttt cctggcactg tacaacacccg ttaacgacac gtcctattct	1620
	1680

attctgaaag agaaaggta taacaaccc tcctatctga cgaaaagctg gcgtgaactg	1740
tgcaaaggct ttctgcaaga ggcaaatgg tccacaaca aaattatccc ggcttctcc	1800
aagtacctgg aaaacgccag cgttcctcc tccggtag cgctgctggc gccgtttac	1860
ttttccgtat gccaggcagca ggaagacatc tccgaccacg cgctgcgttc cctgaccac	1920
ttccatggtc tggtgcgttc tagctgcgtt atctccgcc tgtcaacga tctggccacc	1980
tctgcggcgg agcttggaaacg tggcgagact accaattcta tcattagcta catgcacgaa	2040
aacgatggta ccagcgagga acaggcccgc gaagaactgc gttaactgtat cgacgccgaa	2100
tggaaaaaga tgaatcgtga acgcgttagc gactccaccc tgctgcctaa agcgttcatg	2160
aaaatgcag ttaacatggc acgtgttcc cactgaccc accagtatgg cgatggctcg	2220
ggtcgcccag actacgcgac taaaaccgc atcaaactgc tgctgattga cccttcccg	2280
attaaccacg tgaatgtatgt ctaaaaaaaaa cggccttgg cccgcgggt ttttattat	2340
ttttcttcct ccgcatgttc aatccgtcc ataatgcacg gatggctccc tctgaaaatt	2400
ttaacgagaa acggcgggtt gacccggctc agtcccgtaa cggccaagtc ctgaaacgac	2460
tcaatcgccg ctccccgtt tccggtagc tcaatgcgtt aacggctggc ggcgtttcc	2520
tgataccggg agacggcatt cgtaatcgga tcctctagag tcgacactgca ggcgtcaag	2580
ctttgcctcg cgctttcg tggatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctccggag	2640
acggtcacag ctgtctgtt aacggatgcc gggagcagac aagccgtca gggcgctca	2700
gcgggtgttg gccccgtcg gggcgaccc atgaccagt cacgtacgca tagggagtg	2760
tatactggct taactatgcg gcatcagac agattgtact gagagtgcac catatgcgtt	2820
gtgaaataacc gcacagatgc gtaaggagaa aatacccat caggcgctt tccgcttc	2880
cgctcactga ctgcgtgcgc tcgggttcggc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa	2940
aggccgtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc agggaaagaaac atgtgagcaa	3000
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc	3060
tccggccccc tgacgagcat cacaatc gacgtcaag tcagagggtgg cgaaaccgaa	3120
caggactata aagataccag gcgttcccc ctggaaacgc cctcggtgcgc tctcgttcc	3180
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttggaaagc gtggcgctt	3240
ctcaatgctc acgctgttagg tatctcgtt cgggttagt cttcgctcc aagctggct	3300
gtgtgcacga acccccggtt cagccgcacc gctgcgcctt atccgttaac tatcgtttt	3360
agtccaaacc ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	3420
gcagagcagc gtagttaggc ggtgctacag agttttgaa gtgggtgcct aactacggct	3480
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttggaaaaaa	3540

gagttggtag ctttgatcc ggcaaacaaa ccaccgtgg tagcggttgtt	3600
gcaaggcaga gattacgcgc agaaaaaaag gatctaaga agatccttt atctttcta	3660
cgggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatgggtc atgagattat	3720
caaaaaggat cgaagtcggt tcagaaaaag aaggatatgg atctggagct gtaatataaa	3780
aaccttcttc aactaacggg gcaggttagt gacattagaa aaccgactgt aaaaagtaca	3840
gtcggcatta tctcatatta taaaagccag tcattaggcc tatctgacaa ttccgtata	3900
gagttcataa acaatcctgc atgataacca tcacaaacag aatgtatgtac ctgtaaagat	3960
agcgttaaat atattgaatt accttttata atgaattttc ctgctgtaat aatgggtaga	4020
aggttaattac tattattatt gatatttaag ttaaaccag taaatgaagt ccatggata	4080
atagaaagag aaaaagcatt ttcaaggtata ggtgtttgg gaaacaattt aaaagaacca	4140
tttatattct ctacatcaga aaggtataaa tcataaaact ctttgaagtc attcttaca	4200
ggagtccaaa taccagagaa tgttttagat acaccatcaa aaattgtata aagtggctct	4260
aacttatccc aataacctaa ctctccgtcg ctattgtaac cagttctaaa agctgtattt	4320
gagtttatca cccttgcac taagaaaata aatgcagggt aaaatttata tccttctgt	4380
tttatgttcc ggtataaaac actaatatca atttctgtgg ttatactaaa agtcgtttgt	4440
tggttcaat aatgattaaa tatctcttt ctcttccaat tgtctaaatc aattttatta	4500
aagttcattt gatatgcctc ctaaattttt atctaaagt aattnaggag gcttacttgt	4560
ctgcttctt cattagaatc aatcctttt taaagtcaat attactgtaa cataaaatata	4620
tatTTaaaa atatcccact ttatccaatt ttgtttttttt gaactaatgg gtgttttagt	4680
tgaagaataa agaccacatt aaaaaatgtg gtcttttg tttttttaaa ggatttgagc	4740
gtacgcgaaa aatccttttc ttctttttt atcttgataa taaggtaac tattgccgt	4800
tgtccattca tggctgaact ctgcttcctc tggctgatc acacacatca tctcaatatc	4860
cgaatagggc ccatcagtct gacgaccaag agagccataa acaccaatag ccttaacatc	4920
atccccatattt ttatccaata ttgtttttt aatttcatga acaatctca ttctttttc	4980
tctagtcatt attattggtc cattcaatat tcttattttt tttcattttt attttagatt	5040
tgctttctta aataagaata ttggagagc accgttctta ttcatgtatt aataactcg	5100
cttcctaagc atccttaat ctttttaata acaattatag catctaattt tcaacaaact	5160
ggcccgtttgg ttaactact cttaataaa ataattttt cgtcccaat tccacattgc	5220
ataaatagaa aatccatctt catcggttt ttgtcatca tctgtatgaa tcaatcgcc	5280
ttcttctgtt tcatcaaggt ttaattttt atgtattttt ttaacaaac caccatggaa	5340
gattaacctt ttacgggtta aaccccttcctc caaatcagac aaacgtttca aattttttc	5400

ttcatcatcg gtcataaaat ccgtatcctt tacaggatat tttgcagttt cgtcaattgc	5460
cgattgtata tcggatttat atttattttt cggtgaatc atttgaactt ttacatttg	5520
atcatagct aatttcattt ccttttcca aaattgaatc cattgtttt gattcacgta	5580
gtttctgtt attctaaaat aagttggttc cacacatacc attacatgca tgtgtgatt	5640
ataagaatta tcttattat ttattgtcac atccgttgca cgcataaaac caacaagatt	5700
tttattaatt ttttatattt gcatcattcg gcgaaatcct tgagccatat ctgtcaaact	5760
cttatttaat tcttcgccat cataaacatt tttaactttt aatgtgagaa acaaccaacg	5820
aactgttggc ttttgtttaa taacttcagc aacaaccttt tgtgactgaa tgccatgttt	5880
cattgtctc ctccagttgc acattggaca aagcctggat ttgcaaaacc acactcgata	5940
ccactttctt tcgcctgttt cacgattttt tttatactt aatatttcag cacaatctt	6000
tactcttca gccttttaa attcaagaat atgcagaagt tcaaagtaat caacattagc	6060
gattttctt tctctccatg gtctcaattt tccactttt gtcttgcca ctAAAACCT	6120
tgattttca tctgaataaa tgctactatt aggacacata atattaaag aaACCCCAT	6180
ctatttagtt atttgttag tcacttataa cttaacaga tgggtttt ctgtgcaacc	6240
aatttaagg gtttcaata cttaaaaca catacatacc aacacttcaa cgcaccttc	6300
agcaactaaa ataaaaatga cgttatttct atatgtatca agataagaaa gaacaagttc	6360
aaaaccatca aaaaaagaca cttttcagg tgctttttt attttataaa ctcatccct	6420
gatctcgact tgcgtttttt ttaccttc ggttatgagt tagttcaaat tgcgttttt	6480
taggttctaa atcgtgtttt tcttggatt gtgcgtttt atccttacc ttgtctacaa	6540
accccttaaa aacgttttta aaggctttt aagccgtctgt acgttccctta ag	6592
<210> 58	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 58	
gacatcaattt gctccattttt cttctgctat c	31
<210> 59	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR Primer
<400> 59
attgagaaga ggtcgacac actcttacc ctctccttt a 41
<210> 60
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR Primer
<400> 60
taaaaggaga gggtaagag tgtgtgcac ctcttc当地 41
<210> 61
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR Primer
<400> 61
ccaaggccgg ttttttag acatacatca gctggtaat c 41

<210> 62
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR Primer
<400> 62
gattaaccag ctgatgtatg tctaaaaaaa accggccttg 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 gtcatttt cttctgctat c		31
<210>	65	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	65	
gacatgaatt ctcatttt cttctgc		27
<210>	66	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	66	
aggagagggt aaagagttag		20
<210>	67	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	67	
ctttccatc acccacatc ag		22
<210>	68	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	68	
ggcgaaatgg tccacaacaaca aaattatc		28
<210>	69	

<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	69	
ggtaattca gtctactgg gattccaaa tctatatata ctgcaggtga c		51
<210>	70	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	70	
gcagggtggaa aactatgcac tcc		23
<210>	71	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	71	
cctgaattct gtggattgg 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	

ggtggcccg catttgcca cctacaagcc ag	32
<210> 74	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 74	
ggtgaattct agaggatccc aacgctgttgcctacaacgg	40
<210> 75	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 75	
ggtgcggccg ctgtctggac ctggtgagtt tccccg	36
<210> 76	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 76	
ggtggccca ttaaatcagt tatcgtttat ttgatag	37
<210> 77	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 77	
ggtgaccagc aagtccatgg gtggtttcatgg	35
<210> 78	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR Primer

<400> 78

ggtgcgcccg ccttggagt acgactccaa ctatg 35

<210> 79

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 79

gcggccgcag actaaattta tttcagtc 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 gctccatattt cttctgc 27

<210> 83

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	PCR Primer	
<400>	83	
caataataac tactgtttc actcttacc ctctccttt 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 gccggtttt tttagttcg ataagaacga acggt		45
<210>	86	
<211>	7999	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	86	
gttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc		60
ggaagctgtg gtagggctgt gcaggtcgta aatcaactgca taattcggtgt cgctcaaggc		120
gcactccgt tcggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaataattc		180
tgaatgagc tggacaat taatcatcgg gctcgataa tgtgtggaat tgtgagcgga		240
taacaatttc acacaggaaa cagcgccgt gagaaaaagc gaagcggcac tgctcttaa		300
caatttatca gacaatctgt gtggcactc gaccgaaatt atcgatataac tttatttata		360
aaaattnaaag aggtatataat taatgtatcg attaataag gagaaataaa ccatggatcc		420
gagctcagga gttaaaaaaa catgaaaaca gtagttatta ttgatgcatt acgaacacca		480
attggaaaat ataaaggcag cttaaatcaa gtaagtgcgt tagacttgg aacacatgtt		540
acaacacaac tttaaaaag acattccact atttctgaag aaattgtatca agtaatctt		600

ggaaatgtt tacaagctgg aaatggccaa aatccgcac gacaaatgc aataaacgc	660
ggttgtctc atgaattcc cgcaatgacg gttaatgagg tctcgaggatc aggaatgaag	720
gccgttattt tggcaaaca attgattcaa ttaggagaag cgaaagttt aattgctggc	780
gggattgaga atatgtccca agcacctaaa ttacaacgtt ttaattacga aacagaaagc	840
tacgtgcgc cttttctag tatgtatgtat gatggattaa cggatgcctt tagtggtcag	900
gcaatggct taactgctga aaatgtggcc gaaaagtatc atgtactag agaagagcaa	960
gatcaattt ctgtacattc acaattaaaa gcagctcaag cacaagcaga agggatattc	1020
gctgacgaaa tagccccatt agaagtatca ggaacgcttg tggagaaaga tgaaggatt	1080
cgcctaatt cgagcgttga gaagcttagga acgctaaaa cagttttaa agaagacggt	1140
actgtaacag cagggaatgc atcaaccatt aatgatgggg ctctgcctt gattattgt	1200
tcacaagaat atgccaaagc acacggctt ctttatggat ctattattcg agacagtgt	1260
gaagtcgta ttgatccagc ctatatgggat tttcgccga ttaaagccat tcaaaaactg	1320
ttagcgcga atcaacttac tacggaagaa attgatctgt atgaaatcaa cgaagcattt	1380
gcagcaactt caatcgttgt ccaaagagaa ctggcttac cagagaaaaa ggtcaacatt	1440
tatggtgccg gtatttcatt aggtcatgctt attggtgcca caggtgctcg tttattaacg	1500
agttaagtt atcaattaaaa tcaaaaagaa aagaatatg gagtggttc tttatgtatc	1560
ggcggtgct taggactcgc tatgtacta gagagaccc agaaaaaaaaaa aaacagccga	1620
ttttatcaaa ttagtcctga ggaacgcctg gcttctctt ttaatgaagg ccagattct	1680
gctgatacaa aaaaagaatt tgaaaatgc gcttatctt cgagattgc caatcatatg	1740
attgaaaatc aaatcgtga aacagaagtgc cggatggcg ttggcttaca tttacagtgc	1800
gacgaaactg attatggatc accaatggcg acagaagagc cctcagttat tgccgttt	1860
agtaatggtg caaaatagc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt	1920
ggacaaatcg tttttacga tggatcgat cccgactatc tgattgataa actacaagta	1980
agagaagcgg aagttttca acaaggcagag ttaagttatc catctatcgt taaacggggc	2040
ggcggcttaa gagatttgcg atatcgtact tttgtatgaat cattttatc tgtcgacttt	2100
tttagtagatg ttaaggatgc aatggggca aatatcgta acgctatgtt ggaaggtgt	2160
gccgagttgt tccgtgaat gtttgcggag caaaagattt tattcgtat tttaaatgt	2220
tatgccacgg agtcggttgt tacgatgaaa acggcttac cagtttcacg tttaaatgt	2280
gggagcaatg gccggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgcta tgcttcattt	2340

gatccttatac gggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgttagtt	2400
ttagctacag gaaatgatac acgcgctgtt agcgcttctt gtcatgctt tgccgtgaag	2460
gaaggctcgct accaaggctt gactagttgg acgctggatg gccaacaact aattggtaaa	2520
atttcagttc cgcttgctt agccacggtt ggccgtgccca caaaagtctt acctaaatct	2580
caagcagctg ctgattttttt agcagtgcac gatgcacaaag aactaagtgc agtagtagcg	2640
gctgttggtt tggcacaaaa tttagcggcg ttacggcct tagtctctga aggaattcaa	2700
aaaggacaca tggctctaca agcacgttct tttagcgatga cggtcggagc tactggtaaa	2760
gaagttgagg cagtgcgtca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgtgaacca agaccgagcc	2820
atggctattt taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg	2880
attgataaaa tttagttttt tggccccct tattatattt atatgacggc actggctgaa	2940
gccagaaatg tagaccctgg aaaatttcat attggatttgg ggcaagacca aatggcggtg	3000
aacccaatca gccaagatat tggacattt gcagccaatg ccgcagaagc gatcttgcacc	3060
aaagaagata aagaggccat tgatatggtg attgtcggtt ctgagttccag tatcgatgag	3120
tcaaaaaggccgg ccgcagttgt cttacatcgt ttaatgggaa ttcaaccttt cgctcgctt	3180
ttcgaaatca aggaagcttgc ttacggagca acagcaggct tacagtttgc taagaatcac	3240
gtagccttac atccagataa aaaagtcttg gtcgtagcgg cagatattgc aaaatatggc	3300
ttaaattctg gcggtgagcc tacacaagga gctggggcgg ttgcaatgtt agttgttgt	3360
gaaccgcga tttggctt aaaagaggat aatgtgtatgc tgacgcaaga tatctatgac	3420
ttttggcgcc caacaggcca cccgtatctt atggcgatg gtccttgc aaacgaaacc	3480
tacatccaaat ctttgccta agtctggat gaacataaaa aacgaaccgg tcttgatttt	3540
gcagattatg atgcttttagc gttccatatt ctttacacaa aaatggccaa aaaagccta	3600
ttagcaaaaaa tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaatttttagc ccgttatgaa	3660
gaaagtatcg tctatagtcg tcgcgttagga aacttgtata cgggttact ttatctggaa	3720
ctcattttccc ttttagaaaaa tgcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaattt tggttattt	3780
agttatggtt ctggcgctgt cgctgaattt ttcaactgggtt aatttagtagc tggttatcaa	3840
aatcatttac aaaaagaaaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc	3900
gctgaatatg aagccatgtt tgccagaaact tttagacacag acattgtatca aacgttagaa	3960
gatgaattaa aatatagttat ttctgttattt aataataccg ttctgttcttca tcgaaactaa	4020
gagatctgca gctggatcca tatggaaattt cgaagttgg gcccgaacaa aaactcatct	4080

cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcattga gtttaaacgg	4140
tctccagct ggctgtttg gcggatgaga gaagatttc agcctgatac agattaaatc	4200
agaacgcaga agcggcttga taaaacagaa tttgcctggc ggcagttagcg cggtggtccc	4260
acctgaccc atgccgaact cagaagtga acgcccgtac gccgatggta gtgtgggtc	4320
tccccatgct agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag	4380
actgggcctt tcgtttatc tggtgttgt cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc	4440
cgcggggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccg agggtggcgg gcaggacgcc	4500
cgcataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggccttttg	4560
cgtttctaca aactttttt gtttatttt ctaaatacat tcaaataatgt atccgctat	4620
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca	4680
acatttccgt gtgcctta ttccctttt tgccgcattt tgcccttcgt ttttgccta	4740
cccgaaaaacg ctggtaaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta	4800
catcgaaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt ttgcggcccg aagaacgtt	4860
tccaatgatg agcactttt aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgtgacgc	4920
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc	4980
accagtaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc	5040
cataaccatg agtataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa	5100
ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actgccttg atcgttgga	5160
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgttagaat	5220
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccgcaaca	5280
attaatagac tggatggagg cgatggaaatg tgcaggacca cttctgcgt cggcccttcc	5340
ggctggctgg ttatttgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat	5400
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag	5460
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgttag ataggtgcct cactgattaa	5520
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaactca	5580
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttgtat aatctcatga cccaaatccc	5640
ttaacgtgag tttcgttcc actgagcgtc agacccgtg gaaaagatca aaggatctc	5700
ttgagatcct ttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaaa aaaaaaaaaac caccgctacc	5760
agcgggtggtt ttttgcggg atcaagagct accaactttt tttccgaagg taactggctt	5820
cagcagagcg cagataccaa atactgtct tctagtgtag ccgttagttt gccaccactt	5880
caagaactct gtgcaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	5940

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	6000
ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac	6060
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa aggccacgc ttcccgaagg	6120
gagaaaaggcg gacaggtatc cggttaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga	6180
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatctta tagtctgtc gggttcgcc acctctgact	6240
tgagcgtcga ttttgtat gctcgtcagg gggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa	6300
cgcggcctt ttacggttcc tggcctttt ctggccttt gtcacatgt tcttcctgc	6360
gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgcctt gagtgagctg ataccgctcg	6420
ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtc agtgagcggag gaagcggaaag agccctgat	6480
gcggtatattt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag	6540
tacaatctgc tctgatgccg catagttaa ccagtataca ctccgtatc gctacgtgac	6600
tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acacccgctg acgcgcctg acgggcttgt	6660
ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccggagctg catgtgtcag	6720
aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggacgcaga tcaattcgcg cgcgaaggcg	6780
aagcggcatg catttacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aaccttcgc ggtatggcat	6840
gatacgccc ggaagagagt caattcaggg tggtagatgt gaaaccagta acgttatacg	6900
atgtcgcaga gtagccgggt gtctcttate agaccgttcc ccgcgtgggt aaccaggcca	6960
gccacgtttc tgcaaaaacg cggaaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca	7020
ttcccaaccg cgtggcacaa caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca	7080
cctccagtct gcccctgcac gcgcgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcggc	7140
atcaactggg tgccagcgtg gtgggtcga tggttagaacg aagcggcgtc gaaggctgt	7200
aagcggcgtt gcacaatctt ctgcgcac acgtcgttgg gctgtatcatt aactatccgc	7260
tggatgacca ggtatgccatt gctgtggaa ctgcctigcac taatgttccg gcgttatttc	7320
ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattattt ctccatgaa gacgtacgc	7380
gactggcgtt ggacgtctg gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgtt ttagcggccc	7440
cattaagttc tgtctcgccg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcactcgca	7500
atcaaattca gccgatagcg gaacggaaag gcgactggag tgccatgtcc gttttcaac	7560
aaaccatgca aatgtgaat gagggcatcg tcccactgcg atgctgggtt ccaacgtca	7620
gatggcgtt ggcgcaatgc gcgcattac cgagtcggg ctgcgcgtt gtgcggatat	7680
ctcgtagtg ggatacgacg ataccgaaga cagctcatgt tatatcccgc cgtcaaccac	7740
catcaaacag gatttcgcc tgctgggca aaccagcgtg gaccgcttgc tgcaactctc	7800

tcagggccag	gccccgtgaagg	gcaatcagct	gttgcggcgc	tcaactggta	aaagaaaaac	7860
caccctggcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcg	ttggccgatt	cattaaatgca	7920
gctggcacga	caggttccc	gactggaaag	cgggcagtga	gcccacgca	attaatgtga	7980
gttagcgcga	attgatctg					7999
<210>	87					
<211>	10433					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	87					
cccgctttac	tgtcggaaat	tgcgttggc	cgattcatta	atgcagattc	tgaaatgagc	60
tgttgacaat	taatcatccg	gctcgataa	tgtgtgaaat	tgtgagcgga	taacaatttc	120
acacaggaaa	cagcgccgct	gagaaaaaagc	gaagcggcac	tgtctttaa	caatttatca	180
gacaatctgt	gtgggcactc	gaccggaaatt	atcgattaaac	tttatttatta	aaaattaaag	240
aggtatatat	taatgtatcg	attaaataag	gaggaataaa	ccatggatcc	gagctcagga	300
ggtaaaaaaa	catgaaaaca	gtagttatta	ttgatgcatt	acgaacacca	attggaaaat	360
ataaaggcag	cttaagtcaa	gtaagtgcgc	tagacttagg	aacacatgtt	acaacacaac	420
ttttaaaaag	acattccact	atttctgaag	aaattgtatca	agtaatctt	gaaaatgttt	480
tacaagctgg	aaatggccaa	aatccgcac	gacaaatagc	aataaacagc	ggttgtctc	540
atgaaattcc	cgcacatgacg	gttaatgagg	tctgcggatc	aggaatgaag	gccgttattt	600
tggcgaaaca	attgattcaa	ttaggagaag	cggaagtttt	aattgtggc	gggattgaga	660
atatgtccca	agcacctaaa	ttacaacgtt	ttaattacga	aacagaaagc	tacgatgcgc	720
ctttttctag	taatgtatgtat	gatggattaa	cggatgcctt	tagtggtag	gcaatggct	780
taactgtga	aaatgtggcc	gaaaagtatc	atgttaacttag	agaagagcaa	gatcaatttt	840
ctgtacattc	acaattaaaa	gcagctcaag	cacaaggcaga	agggatattc	gctgacgaaa	900
tagccccatt	agaagtatca	ggaacgcttg	tggagaaaga	tgaagggatt	cgcctaatt	960
cgagcgttga	gaagcttagga	acgcttaaaa	cagttttaa	agaagacggt	actgtAACAG	1020
caggaaatgc	atcaaccatt	aatgatgggg	cttctgcttt	gattattgtct	tcacaagaat	1080
atgccgaagc	acacggtctt	ctttatattag	ctattattcg	agacagtgtg	gaagtccgta	1140
ttgatccagc	ctatatggga	atttcggca	ttaaagccat	tcaaaaactg	ttagcgcga	1200
atcaacttac	tacggaagaa	attgatctgt	atgaaatcaa	cgaagcattt	gcagcaactt	1260

caatcggtt ccaaagagaa ctggctttac cagaggaaaa ggtcaacatt tatggtgccg	1320
gtatttcatt aggtcatgctg attggtgcca caggtgctcg tttattaacg agttaagtt	1380
atcaattaaa tcaaaaagaa aagaataatg gagtggttc ttatgtatc ggcgggtggct	1440
taggactcgc tatgtacta gagagaccc agcaaaaaaa aaacagccga ttttatcaa	1500
ttagtccctga ggaacgcctg gttctcttc ttaatgaagg ccagattct gctgatacaa	1560
aaaaagaatt tgaaaatacg gctttatctt cgcatgtc caatcatatg attgaaaatc	1620
aaatcagtga aacagaagtg ccgatggcg ttggctaca ttaacagtg gacgaaatcg	1680
attatgggt accaatggcg acagaagac cctcgttat tgccgcttg agtaatggtg	1740
caaaaatgc acaaggattt aaaacagtga atcaacaacg cttaatgcgt ggacaaatcg	1800
tttttacga ttttgcat cccgagtcat tgattgataa actacaagta agagaagcgg	1860
aagttttca acaagcagag ttaagttatc catctatcg taaacgggc ggcggctaa	1920
gagatttgca atatcgact ttgtatgaat cattgtatc tgtcgactt ttagtagatg	1980
ttaaggatgc aatggggca aatatcgta acgctatgtt ggaagggtgtg gccgagtgt	2040
tccgtgaatg ttgcggag caaaagattt tattcgtat ttaagtaat tatgccacgg	2100
agtccgttgt tacgtgaaa acggctattc cagttcacg ttaagtaag gggagcaatg	2160
gccgggaaat tgctgaaaaa attgttttag cttcacgta tgttcattt gatccttac	2220
ggcagtcac gcataacaaa ggaatcatga atggcattga agctgtatgtt ttagctacag	2280
gaaatgatac acgcgctgtt agcgcttctt gtcatgctt tgccgtgaag gaaggcgct	2340
accaaggctt gactagttgg acgctggatg gcgaacaact aattggtaaa atttcgttc	2400
cgcgtctt agccacggtt ggccgtgcca caaaagtctt acctaaatct caagcagctg	2460
ctgatgtttt agcagtgcg gatgcggaa aactaagtgc agtagtagcg gctgttggtt	2520
tggcacaaaa tttagcggcg ttacggcct tagtctctga aggaattcaa aaaggacaca	2580
tggctctaca agcacgttct ttagcgatga cggcggagc tactggtaaa gaaggtaggg	2640
cagtcgtca acaattaaaa cgtcaaaaaa cgtatgaacca agaccgagcc atggctat	2700
taaatgattt aagaaaacaa taaaggaggt aaaaaaacat gacaattggg attgataaaa	2760
ttagttttt tggccccct tattatattt atatgacggc actggctgaa gccagaaatg	2820
tagaccctgg aaaatttcat attggatgtt ggcaagacca aatggcggtg aacccaatca	2880
gccaaatgtatg tggacatggt gcagccatg ccgcagaagc gatcttgacc aaagaagata	2940
aaggccat tggatgggtt attgtcggga ctgagtcag tatcgatgag tcaaaagcgg	3000

ccgcagttt ctacatcgt ttaatggga ttcaacctt cgctcgctt ttgaaatca	3060
aggaagctt ttacggagca acaggaggct tacagttac taagaatcac gtggcattac	3120
atccagataa aaaagtctt gtcgtacgg cagatattgc aaaatatggc ttaaattctg	3180
gcggtgagcc tacacaagga gctggggcggtt gcaatgtt agttgttagt gaaccgcga	3240
ttttggctt aaaagaggat aatgtgtatgc tgacgcaaga tatctatgac tttggcgctc	3300
caacaggcca cccgtatcct atggtcgtatgc ttccttgc aaacgaaacc tacatccat	3360
ctttgccca agtctggat gaacataaaa aacgaaacgg tcttgattt gcagattatg	3420
atgccttagc gtccatatt cttacacaa aaatggcaa aaaagccta ttagcaaaaa	3480
tctccgacca aactgaagca gaacaggaac gaattttac ccgttatgaa gaaagtatcg	3540
tctatagtc tcgcgtatggaa aacttgtata cgggttact ttatctggaa ctcatttccc	3600
ttttagaaaa tcaacgact ttaaccgcag gcaatcaaatttgc agttatggtt	3660
ctgggtctgt cgtgtatatttttcaactggat aatttagtgc tggttatcaa aatcattac	3720
aaaaagaaac tcatttagca ctgctggata atcggacaga actttctatc gctgaatatg	3780
aagccatgtt tgcagaaact ttagacacag acattgtatca aacgttagaa gatgaattaa	3840
aatatagtagtatt aataataccg ttgcgttctta tcgaaactaa agatctgcat	3900
cctgcattcg cccttaggag gtaaaaaaac atgtgtgcga cctcttctca atttactcag	3960
attaccgagc ataattcccg tcgttccgca aactatcagc caaacctgtg gaatttgcggaa	4020
ttcctgcaat ccctggagaa cgacctgaaa gtggaaaagc tggaggagaa agcggacaaa	4080
ctggaggaag aagttcgctg catgtcaac cgtgtagaca cccagccgct gtccctgctg	4140
gagctgatcg acgatgtgca ggcctgggt ctgacactaca aatttggaaaa agacatcatt	4200
aaagccctgg aaaacatcgatcgactgctggac gaaaacaaaa agaacaatc tgacactgcac	4260
gcaaccgctc tgtcttccg tctgctgcgt cagcacgggt tcgaggatcc tcaggatgtt	4320
tttggcggtt tcaaggataa agaagggttgtt ttcagcggtg aactgaaagg tgacgtccaa	4380
ggcctgtatgcgcgtatgaa ggcgtttaac ctgggtttcg agggtgagaa cctgctggag	4440
gaggcgctatgccttccat cacccacctg aagaacaacc tggaaagg cattaatacc	4500
aaggttgcag aacaagttag ccacgcctg gaactgccccat atcaccagcg tctgcaccgt	4560
ctggaggcac gtgggttcct ggataaaatc gaaccgaaag aaccgcataa ccagctgctg	4620
ctggagctgg cgaagctgga tttaacatg gtacagaccc tgcaccagaa agagctgcaa	4680
gatctgtccc gctgggtggac cgagatgggc ctggctagca aactggattt tgtacgcac	4740

cgcctgatgg aagtttattt ctgggcactg ggtatggcgc cagaccgcga gtttggtgaa 4800
tgtcgcaaag ctgttactaa aatgttttgtt ctggtgacga tcatcgatga cgtgtatgac 4860
gttatggca ctctggacga actgcaactg ttccaccatgt ctgttagagcg ctgggacgtt 4920
aacgcttata acaccctgcc ggactatatg aaactgtgtt tcctggcaact gtacaacacc 4980
gttaacgaca cgtccttattc tattctgaaa gagaaggcata aacaacct gtcctatctg 5040
acgaaaagct ggcgtgaact gtgcaaagcc tttctgcaag aggcaaatg gtccaacaac 5100
aaaattatcc cgcttictc caagtacctg gaaaacgcca gcgtttccctc ctccgggtta 5160

gcgctgctgg cgccgtctta ctttccgtta tgccagcagc aggaagacat ctccgaccac 5220
gchgctgcgtt ccctgaccga cttccatggt ctggtgctt cttagctgcgt tatcttccgc 5280
ctgtgcaacg atctggccac ctctgcccgg gagctggAAC gtggcgagac taccattct 5340
atcatttagct acatgcacga aaacgatggt accagcgagg aacaggcccgg cgaagaactg 5400
cgtaaactga tcgacgcccga atggaaaaag atgaatcgtg aacgcgttag cgactccacc 5460
ctgctgccta aagcgttcat ggaaatcgca gttAACatgg cacgtgtttc ccactgcacc 5520
taccagtagt gcgatggtct gggtcgcccga gactacgcga ctgaaaaccg catcaaactg 5580

ctgctgatgt acccttcccc gattiaaccag ctgatgtatg tctaaactgca gctggtaacca 5640
tatggaaatt cgaagcttgg gcccgaacaa aaactcatct cagaagagggta tctgaatagc 5700
gcccgtcgacc atcatcatca tcatacatgtgat gttAAACGGT tctccagett ggctgttttgc 5760
gccccatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc agaacgcaga agcggctgt 5820
taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cgggtggccc acctgacccc atgcccac 5880
cagaagtgaa acgcccgtac gcccgtggta gtgtgggtc tccccatgac agagtagggta 5940
actggccagggc atcaaataaaa acgaaaggct cagtcgaaag actggccctt tcgtttatc 6000

tgttgggttggt cggtgaacgc tctctgttgtt aggacaaatc cgccggggagc ggatttgaaac 6060
gttgcgaagc aacggcccg agggtggcg gcaggacgcgc cgccataaac tgccaggcat 6120
caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggccttttgcgttctaca aacttttttgcgtt 6180
gtttatgttctaaatcat tcaaataatgtt atccgctcat gagacaataa ccctgtataaa 6240
tgcttcaata atctggcgta atagcgaaga gcccgcacc gatgcgcctt cccaaacagg 6300
gcccggcgtt aatggcgat ggcgcctgtat ggggttttgcgttctacgc atctgtgcgg 6360
tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgcccgcatagttaa 6420

ccagccccga cacccgccaac cacccgctga cgagcttagt aaagccctcg ctagattttatc 6480
atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc cagccttca 6540
tgcataatctt cccaaatgtt gtagggctta ttatgcacgc taaaaataaa taaaaggcaga 6600

cttgacacctga tagttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcataaac gctttagtta	6660
agccgcgcgcg cgaaggcgccg tcgggttcaa cgaattgtta gacattttt gccgactacc	6720
tttgtatct cgccttcac gtatggaca aattttcca actgatctgc gcgcgaggcc	6780
aagcgatctt ctctttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac gggctgatac	6840

tggccggca ggcgctccat tgcccagtgc gcagcgacat cttcggcgc gat tttgccg 6900
gttactgcgc tgtaccaa at gcgggacaac gtaaggacta catttcgcgc atcgccagcc 6960
cagtcggcgc gcgagttcca tagcgtaag gttcatttgcgcctcaaa tagatcctgt 7020
tcaggaaccg gatcaaagag ttccctcgcc gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct 7080
cttgctttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggcgc gaagataacct 7140
gcaagaatgt cattgcgcgt ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc tggataaacgc 7200
cacggaatga tgcgtcggtc cacaacaatgc gtgacttctca cagcgcggag aatctcgctc 7260

tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg cgttgttca	7320
tcaaggccta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaaatatcac tgtgtggctt caggccgcca	7380
tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagaatg ggcgtcgatg	7440
acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc cctcatgatg	7500
tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgctgct ccataaacatc	7560
aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggatg cccgaggcat agactgtacc	7620
ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgccgttacc accgctcgct	7680

tccgtcaagg ttctggacca gttgcgttag cgcatacgct acttgcattt cagttacga	7740
accgaacagg cttatgtcca ctgggatcggt gccttcattt gttccacgg tgtgcgtcac	7800
ccggcaacct tggcagcagc cgaagtggatgc gcatattttgtt cctggctggc gaacgagcgc	7860
aagggttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggct tgctgttctt ctacggcaag	7920
gtgttgttgcg cggatctgcc ctgggttcag gagatcgaa gacctcgccc gtgcggcgc	7980
ttgcgggtgg tgctgacccc ggatgaagtgg ttcgcattt tcggttttctt ggaaggcgag	8040
catcggttgcg tgcggccatct tctgtatggaa acggggatgc ggatcagtggatggtttgc	8100

ctgcgggtca aggatctgga tttcgatcac ggacgatca tcgtgcggga gggcaaggc	8160
tccaaggatc gggctttagt gttaccggag agcttggcac ccagcctgct cgagcagggg	8220
aattaattcc cacgggtttt gctgccgc aacgggttgt tctggtgtt ctagtttgtt	8280
atcagaatcg cagatccggc ttccgggtt tgccggctg aaagcgctat ttcttcaga	8340
attgccatga tttttcccc acgggaggcg tcactggctc ccgtgttgc ggcagcttg	8400
attcgataag cagcatcgcc tgttttaggc tgtctatgtg tgactgttga gctgtaaaca	8460

gttgtctcag gtgtcaatt tcatgttcta gttgcttgtt ttactgggt tcacctgttc	8520
tatttaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat ctgttcatgg tgaacagctt	8580
tgaatgcacc aaaaactcgtaaaagctcg atgttatctat ctttttaca cggtttcat	8640
ctgtgcataat ggacagttt cccttgata tgtaacgggt aacagtgtt ctactttgt	8700
ttgttagtct ttagtgcata ctgatagata caagagccat aagaacctca gatcctccg	8760
tatttagcca gtatgttctc tagtgtgggt cggttttt gcgtgagcca tgagaaccaa	8820
ccattgagat catacttact ttgcataatgtca ctcaaaaatt ttgcctcaaa actggtgagc	8880
tgaattttg cagttaaagc atcgtgttgtt gttttctta gtccgttatg tagtaggaa	8940
tctgatgtaa tggttgttgg tattttgtca ccattcattt ttatctgggtt gttctcaagt	9000
tcgggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgaa aaatcaacgt atcagtcggg	9060
cggcctcgct tatcaaccac caatttcata ttgctgttaag tgtttaatc tttacttatt	9120
ggtttcaaaa cccattgggtt aaggctttta aactcatggt agttatttc aagcattaac	9180
atgaacttaa attcatcaag gctaattctt atattgcct tggatgtttt ctgttgcgtt	9240
agttctttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt tgtttcaaa agacttaaca	9300
tgttccagat tatattttat gaattttttt aactggaaaa gataaggcaa tatctttca	9360
ctaaaaacta attctaattt ttgcgtttag aacttggcat agtttgcca ctggaaaatc	9420
tcaaaaggctt taaccaaagg attccctgatt tccacagttc tgcgtcatcg ctctctgtt	9480
gcttttagcta atacaccata agcatttcc ctactgtatgt tcatcatctg agcgtattgg	9540
ttataagtga acgataccgt ccgttcttc cttgttaggtt ttcaatcggtt ggggttgagt	9600
agtgccacac agcataaaaat tagttgggtt tcatgtccg ttaagtctata gcgactaatac	9660
gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac atctcaattt gtcttaggtga	9720
tttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgtt aattactgtt cctttcctt	9780
tgagttgtgg gtagtctgtaa attctgttagt acctttgtgt gaaaacttgtt aaattctgt	9840
agacccctcgtaaattccgc tagacctttg tgggtttttt ttgtttatat tcaagttgggtt	9900
ataatttata gaataaaagaa agaataaaaaa aagataaaaaa gaatagatcc cagccctgtg	9960
tataactcac tactttagtc agttccgcag tattacaaaaa ggatgtcgca aacgctgttt	10020
gctccctac aaaaacagacc taaaacccctt aaaggcttaa gtagcaccct cgcaagctcg	10080
ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgcgttcc gaccatcagg cacctgagtc gctgtttttt	10140
tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg aatgggggtt aatggcacta	10200

caggcgccctt	ttatggattc	atgcaaggaa	actaccata	atacaagaaa	agcccgtaac	10260
gggcctctca	ggcggttta	tggcgggtct	gctatgttgt	gctatctgac	ttttgtgt	10320
tcagcagttc	ctgccctctg	atttccagt	ctgaccactt	cggattatcc	cgtgacaggt	10380
cattcagact	ggctaattgca	cccagtaagg	cagcggtatac	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	ctcaaccgt	accgatttg	60
ccaggttacg	cggctggta	acgtcggtgc	ctttgatcag	cgcgcacatgg	taagccagca	120
gctgcagcgg	aacggtgtag	aagatcggtg	caatcacctc	ttccacatgc	ggcatctcga	180
tgatgtgcat	gttatcgcta	cttacaaaac	ccgcattctg	atcgccgaag	acataacaact	240
gaccgccacg	cgcgcgaact	tcttcaatgt	tggatttcag	ttttccagc	aattcggtgt	300
tcggtgcaac	aacaataacc	ggcatatcg	catcaattag	cgcgcgg	ccgtgtttca	360
gttgcgcagc	agcgtaggct	tcagcgtgaa	tgtaagagat	ctcttcaac	ttcaatgcgc	420
cttccagcgc	gattgggtac	tgatgccac	ggcccaggaa	cagcgcgtga	tgtttgtcag	480
agaaatcttc	tgccagcgct	tcaatgcgtt	tgtcctgaga	cagcatctgc	tcaatacgcc	540

tcggcagcgc ctgcagacca tgcacgatgt catgttaat ggaggcatcc agaccttca	600
ggcgagacag cttgccacc agcatcaaca gcacagttaa ctgagtggtg aatgtttag	660
tggatgccac gccgatttct gtacccgcgt tggcatttag cgccagatcg gattcgccca	720
ccagagaaga acccggAACG ttacagattt ccagtgaacc aaggtaaccc agctttcg	780
acagacgcag gccagccagg gtatccgcgg ttgcggcaga ctgtacgcacg atgccttc	840
ccaacagttt cgccgcctat acgtacggca gtttaagggt tacacctata aaagagagag	900
ccgttatcgt ctgttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgcgg ggcgacggat	960
ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctccgtg aactttaccc	1020
ggtgtgtcat atcggggatg aaagctggcg catgtgacc accgatatgg ccagtgtgcc	1080
ggtctccgtt atcggggaaag aagtggctga tctcagccac cgcaaaaatg acataaaaaa	1140
cgcattaaac ctgatgttct gggaaatata aatgtcaggc atgagattat caaaaaggat	1200
cttcacctag atcctttca ctagaaagc cagtcgcag aaacgggtct gacccggat	1260
aatgtcagc tacggcata tctggacaag ggaaaacgca aegcacaaga gaaagcaggt	1320
agcttgcagt gggttacat ggcatagct agactggcg gtttatgga cagcaagcga	1380
accgaaattt ccagctgggg cgcctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg	1440
gatggcttc tcggcccaa ggatctgatg ggcgcaggga tcaagctctg atcaagagac	1500
aggatgagga tcgttcgca tgattgaaca agatggatg cacgcagggtt ctccggccgc	1560
ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgtatgc	1620
cggcgttcc cggctgtcag cgcaggggcg cccgggttt tttgtcaaga ccgacctgtc	1680
cgggccctg aatgaactgc aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg	1740
cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaaggact ggctgtatt	1800
ggcgaagtgc cggggcagg atctcctgtc atctcacctt gtcctgccc agaaagtatc	1860
catcatggct gatgcaatgc ggccgtgc tgcgttgc tccgttgc tccgttgc	1920
ccaccaagcg aaacatcgca tgcggcgcgc acgtactcggtt atggaaagccg gtctgtcgat	1980
tcaggatgtt ctggacgaag agcatcagggtt gctcgccca gccaactgt tcgcccaggct	2040
caaggcgagc atgcccgcgc gcgaggatct cgtcgatgc catggcgttgc tccgttgc	2100
gaatatcatg gtggaaaatg gccgttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt	2160
ggcggaccgc tatcaggaca tagcggttgc taccgttgc attgtcaag agctggcg	2220
cgaatggctt gaccgttcc tcgtgttta cggatcgcc gtcctggattt cgcagcgcat	2280

cgccttctat cgcccttcttg acgagttctt ctgaattatt aacgcttaca atttcctgat	2340
cggttatttt ctcccttacgc atctgtgcgg tattcacac cgcatacagg tggcacttt	2400
cgggaaatg tgccggaaac ccctattgt ttattttct aaatacatc aaatatgtat	2460
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttaataat agcacgttag gagggccacc	2520
atggcaagt tgaccagtgc cgttccggtg ctccacgcgc ggcacgtcgc cggagcggtc	2580
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cctagtaacg gcccagtg tgctggaatt	2640
caggcagttc aacctgttga tagtacgtac taagctctca tgttcacgt actaagctct	2700
catgttaac gtactaagct ctcatgttta acgaactaaa ccctcatggc taacgtacta	2760
agctctcatg gctaactgtac taagctctca tgttcacgt actaagctct catgttigaa	2820
caataaaatt aatataaaatc agcaacttaa atagcctcta aggttttaag ttttataaga	2880
aaaaaaagaa tatataaggc tttaaagct tttaagggtt aacggtgtg gacaacaaggc	2940
cagggatgta acgcactgag aagcccttag agcctctcaa agcaatttc agtgacacag	3000
gaacacttaa cggctgacag cctgaattct gcagataatct gttttccac tcttcgttca	3060
ctttcgcccag gtacgtggc aagacgaagg aagtcccgga gccatctgca cggcgtacta	3120
cagcaatgtt ttgtgaaggc agtttcagac ccggattcag tttggcgatg gttcatcat	3180
cccaacttctt gattttgccc aggttagatgt cgccgagggt tttaccatcc agcaccagtt	3240
cgccagactt cagccctgga atgttaaccg ccagcaccac gccgccaatc acggtcggga	3300
actgaaacag accttcgttga gccagtttt cgtcagacag cggcgcgtca gaggcaccaa	3360
aatcaacggt attagcgata atctgttttta cgccaccgga agaacccgata ccctggtagt	3420
taactttatt accggtttct ttctggtaag tgcagccca tttggcatac accggcgcag	3480
ggaagggtgc acctgcacct gtcaggcttgc ttctgcaaa cacagagaaa gcactcatcg	3540
ataaggcgc ggcgacaaca gttgcgacgg tggtaacgc aactttcata atgtctcctg	3600
ggaggattca taaaggatttgc tttgtggct acgagaagca aaataggaca aacaggtgac	3660
agtttatatgt aaggaatatg acagttttat gacagagaga taaagtcctc agtctgattt	3720
aaataaggct tgatattcag tcaattacaa acattaataa cgaagagatg acagaaaaat	3780
tttcattctg tgacagagaa aaagtagccg aagatgacgg tttgtcacat ggagtggca	3840
ggatgttgc taaaagcaa ttaaccctca ctaaaggcg gcccgaagt tcctattctc	3900
tagaaagtat aggaacttca ttctaccggg tagggaggc gctttccca aggcaactcg	3960
gagcatgcgc tttagcagcc ccgctggca cttggcgcta cacaagtggc ctctggcctc	4020
gcacacattc cacatccacc ggtaggcgcc aaccggctcc gttctttgtt ggcccttcg	4080
cgccaccccttc cactcctccc ctagtcagga agttcccccc cggccgcag ctcgcgtcgt	4140

gcaggacgtg acaaatggaa gtagcacgtc tcactagtct cgtgcagatg gacagcaccg 4200
ctgagcaatg gaagcgggta ggccttggg gcagcggcca atagcagtt tgctcattcg 4260
cttctggc tcagaggctg ggaaggggtg ggtccgggg cgggctcagg ggcggctca 4320
gggcggggc gggcgcccga aggtcctcg gaggcccgac attctgcacg cttcaaaagc 4380

gcacgtctgc cgcgctgttc tcctttcct catctccggg ctttcgacc tgcagcagca 4440
cgtgttgcaca attaatcatc ggcatagtat atcggcatag tataatacga caaggtgagg 4500
aactaaacca tggagaaaaa aatcaactgga tataccaccc ttgatatac ccaatggcat 4560
cgtaaagaac attttgaggc atttcagtc gttgtcaat gtacctataa ccagaccgtt 4620
cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacaa gtttatccg 4680
gcctttatc acattcttc cgcctgatg aatgctcatc cgaaattccg tatggcaatg 4740
aaagacggtg agctggtgat atggatagt gttcacccctt gttacaccgtt tttccatgag 4800

caaactgaaa cgtttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg gcagttctta 4860
cacatatatt cgcaagatgt ggcgtttac ggtgaaaacc tggcctattt ccctaaagg 4920
tttattgaga atatgtttt cgtctcagcc aatccctggg tgagttcac cagtttgc 4980
ttaaacgtgg ccaataitga caactcttc gccccgtt tcaccatggg caaatattat 5040
acgcaaggcg acaagggtgt gatgccgtg gcgattcagg ttcatcatgc cgtttgtat 5100
ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgtga gtggcagg 5160
ggggcgtaag cgggactctg gggttcgaat aaagaccgac caagcgacgt ctgagagctc 5220

cctggcgaat tcggtaccaa taaaagagct ttatttcat gatctgtgtg ttggttttg 5280
tgtgcggcgc ggaagtctt attctctaga aagtatagga acttcctcga gccctatagt 5340
gagtcgtatt agcccttgac gatgccacat cctgagcaaa taattcaacc actaattgt 5400
agcggataac acaaggagga aacagctatg tcattaccgt tcttaacttc tgccacgg 5460
aaggttatta ttttgggtga acactctgt gttacaaca agcctgcccgt cgctgttagt 5520
gtgtctgctg tggaaaccta cctgtataa agcgagtcat ctgcaccaga tactattgaa 5580
ttggacttcc cggacattag cttaatcat aagtggtcca tcaatgattt caatgcac 5640

accgaggatc aagtaaactc ccaaaaattt gccaaggctc aacaagccac cgatggctt 5700
tctcaggAAC tcgttagtct ttggatccg ttgttagctc aactatccga atccttccac 5760
taccatgcag cgtttgttt cctgtatatg tttgtttgcc tatgccccca tgccaa 5820
attaagttt cttaaagtc tactttaccc atcgggtgt ggttgggtc aagcgccct 5880
atttctgtat cactggcctt agctatggcc tacttggggg ggttaatagg atcta 5940
ttggaaaagc tgtcagaaaaa cgataagcat atagtgaatc aatggccctt cataggtgaa 6000

aagtgtattc acggtaaaaa ttccatggata gataacgctg tggccactta tggttatgcc	6060
ctgcattttt aaaaagactc acataatgga acaataaaca caaacaattt taagttctta	6120
gatgattcc cagccattcc aatgatccta acctataacta gaattccaag gtctacaaaa	6180
gatcttgttgc tcgcgttc tggttggtc accgagaaat ttccctgaagt tatgaagcca	6240
attcttagatg ccatgggtga atgtgcccta caaggcttag agatcatgac taagtttgt	6300
aatgtaaag gcaccgatga cgaggctgta gaaactaata atgaactgta tgaacaacta	6360
ttgaaattga taagaataaa tcatggactg ctgtctcaa tcgggtttc tcatcctgga	6420
ttagaactta ttaaaaatct gagcgatgtat ttgagaattg gctccacaaa acttaccggt	6480
gctggtggcg gcggttgctc ttgactttt tacgaagag acattactca agagcaaatt	6540
gacagctca aaaagaaattt gcaagatgtat tttagttacg agacatttga aacagacttg	6600
ggtggactg gctgctgtt gtaagcgca aaaaatttga ataaagatct taaaatcaaa	6660
tccctagttt tccaattttt taaaataaa actaccacaa agcaacaaat tgacgtctta	6720
ttattgccag gaaacacgaa ttaccatgg acttcataag ctaatttgcg ataggcctgc	6780
acccttaagg agaaaaaaa catgtcagag ttgagagcct tcagtcccc agggaaagcg	6840
ttactagctg gtggatattt agtttttagat acaaaatatg aagcatttgt agtcggatta	6900
tcggcaagaa tgcgtgtgtt agcccatect tacggttcat tgcaagggtc tgataagttt	6960
gaagtgcgtg taaaagttt acaattttaa gatggggagt ggctgtacca tataagtct	7020
aaaagtggct tcattcctgt ttcgatagcc ggatctaaga acccttcat taaaatgtt	7080
atcgctaacg tatttagcta cttaaacctt aacatggacg actactgcaa tagaaacttg	7140
ttcggttattt atatttctc tggatgtgcc taccattctc aggaggatag cggttaccgaa	7200
catcggtggca acagaagattt gagttttcat tcgcacagaa ttgaagaagt tccaaaaca	7260
gggctggct cctcgccagg tttagtcaca gtttaacta cagcttggc ctccttttt	7320
gtatcgacc tggaaaataa tgttagacaaa tatagagaag ttattcataa tttagcacaa	7380
gttgcttattt gtcagatca gggtaaaattt ggaagcggtt ttgatgtage ggcggcagca	7440
tatggatcta tcagatatacg aagattccca cccgcattaa tctctaattt gccagatatt	7500
ggaagtgcata ctacggcag taaactggcg cattttgtt atgaagaaga ctggaaatatt	7560
acgattaaaa gtaaccattt accttcggga ttaactttat ggtatggcga tattaaat	7620
ggttcagaaaa cagtaaaactt ggtccagaag gtaaaaattt ggtatgattc gcatatgcca	7680
gaaagcttga aaatatatac agaactcgat catgcaattt ctagattttt ggtatggacta	7740

tctaaactag atcgcttaca cgagactcat gacgattaca gcgtcagat atttgagtct	7800
ctttagagga atgactgtac ctgtcaaaag tatccctaaaa tcacagaagt tagagatcaa	7860
gttgcacaa tttagacgttc ctttagaaaa ataactaaag aatctggtgc cgatatcgaa	7920
cctccgtac aaactagctt attggatgt tgccagacct taaaaggagt tcttaatgc	7980
ttaatacctg gtgctggtgg ttatgacgcc attgcagtga ttactaagca agatgttgat	8040
cttagggctc aaaccgctaa tgacaaaaga ttttctaagg ttcaatggct ggatgtact	8100
caggctgact ggggtgttag gaagaaaaaa gatccggaaa cttatcttga taaaataactt	8160
aaggtagctg catgcagaat tcgcccattaa ggagaaaaaa aaaatgaccg tttacacagc	8220
atccgttacc gcacccgtca acatcgcaac ccttaagtat tggggaaaaa gggacacgaa	8280
gttgaatctg cccaccaatt cgtccatatac agtgacttta tcgcaagatg acctcagaac	8340
gttgacctct gggctactg cacctgagtt tgaacgcac actttgttgt taaatggaga	8400
accacacagc atcgacaatg aaagaactca aaattgtctg cgcgacccat gccaattaag	8460
aaaggaaatg gaatcgaagg acgcctcatt gcccacatata tctcaatggaa aactccacat	8520
tgtctccgaa aataacttcc ctacagcagc tggtagtct tcctccgctg ctggcttgc	8580
tgcattggtc tctgcaattt ctaagttata ccaattacca cagtcaactt cagaaatatc	8640
tagaatagca agaaagggtt ctggttcagc ttgttagatcg ttgtttggcg gatacgtggc	8700
ctggaaatg gaaaaagctg aagatggtca tgattccatg gcagtacaaa tcgcagacag	8760
ctctgactgg cctcagatga aagttgtgt cctagttgtc agcgatatta aaaaggatgt	8820
gagttccact caggttatgc aattgaccgt ggcaacctcc gaactatTTT aagaaagaat	8880
tgaacatgtc gtaccaaaga gatttgaagt catgcgtaaa gccatttttg aaaaagattt	8940
cgccaccttt gcaaaggaaa caatgatggaa ttccaaactt ttccatgcca catgtttggaa	9000
ctctttccct ccaatattt acatgaatga cacttccaag cgtatcatca gttggtgcca	9060
caccattaaat cagtttacg gagaacaat cgttgcatac acgtttgtatc caggtccaaa	9120
tgctgttgt tactacttag ctgaaaatga gtcgaaactc tttgcattta tctataaatt	9180
gtttggctct gttcctggat gggacaagaa atttactact gagcagcttgg aggcttcaa	9240
ccatcaattt gaatcatcta actttactgc acgtgaattt gatcttgagt tgcaaaagga	9300
tgttgccaga gtgattttaa ctcaagtcgg ttcaggccca caagaaccaa acgaatcttt	9360
gattgacgca aagactggtc taccaaagga ataagatcaa ttgcgtcat cgccctttagg	9420
aggtaaaaaaa aaatgactgc cgacaacaat agtgcgtcccc atggcgtatc atcttagttac	9480
gccaaatttgc tgcacaaaccat aacacctgaa gacatTTTgg aagagttcc tgaattttt	9540
ccattacaac aaagacctaa taccgcgtatc agtgagacgt caaatgacga aagcggagaa	9600

acatgtttt ctggcatga tgaggagcaa attaagttaa tgaatgaaaa ttgtattgtt	9660
ttggattggg acgataatgc tattgggcc ggtaccaaga aagttgtca ttatggaa	9720
aatattgaaa aggttact acatcgtca ttctccgtct ttatttcaa tgaacaaggt	9780
gaattactt tacaacaaag agccactgaa aaaataactt tccctgatct ttggactaac	9840
acatgctgct ctcatccact atgtattgtat gacgaattag gttgaaggg taagcttagac	9900
gataagatta agggcgctat tactgcggcg gtgagaaaac tagatcatga attaggtatt	9960
ccagaagatg aaactaagac aagggttaag tttcacttt taaacagaat ccattacatg	10020
gcaccaagca atgaaccatg gggtaacat gaaattgatt acatccatt ttataagatc	10080
aacgctaaag aaaacttgac tgtcaaccca aacgtcaatg aagttagaga cttcaaatgg	10140
gtttcaccaa atgattgaa aactatgtt gctgacccaa gttacaagtt tacgccttg	10200
ttaagatta ttgcgagaa ttacttattc aactggtggg agcaattaga tgaccttct	10260
gaagtggaaa atgacaggca aattcataga atgctataac aacgcgtcta caaataaaaa	10320
aggcacgtca gatgacgtgc ctttttctt gggccc	10356
<210> 91	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 91	
gcatgctcga gccccgcctt ttaatcaaac atcctgccaa ctc	43
<210> 92	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 92	
gatcgaaggg cgatcgtgac acagtctggc gaaacccg	37
<210> 93	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	

<400>	93	
ctgaattctg cagatatctg ttttccact cttcggtcac ttt		43
<210>	94	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	94	
tctagaggc ccaagaaaaa tgccccgtt acg		33
<210>	95	
<211>	111	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	95	
gatcgccggc gcgccttga cgatgccaca tcctgagcaa 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	
gatcgccggcc caagaaaaaa ggcacgtcat ctgacgtgcc tttttattt gtagacgcgt		60
tgttatagca ttcta		75
<210>	97	
<211>	81	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR Primer	
<400>	97	
aaagttagccg aagatgacgg ttgtcacat ggagttggca ggatgttgaa ttaaaaagcaa		60
ttaaccctca ctaaaggcg g		81

<210> 98
<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR Primer
<400> 98
agagtgttca cccaaaataa taaccttcc cggtgcagaa gtttggaaacg gtaatgacat 60
agctgtttcc tccttgtt atccgctcac aatttgtt ttttgcattttt gctcaggatg 120
tggcatcgta aaggctaat acgactcaat ataggcctcg 160
<210> 99
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223>
> PCR Primer
<400> 99
gatcatgcat tcgcccttag gaggtaaaaa aacatgttg cgacccttc tcaatttact 60
60
<210> 100
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR Primer
<400> 100
cggtcgacgg atccctgcag ttagacatac atcagctg 38
<210> 101
<211> 6974
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 101

gtgcggccgc aagcttgtcg acggagctcg aattcggttc cctgcagttt gacatacatc 60
agctggtaa tcggaaagg gtcaatcagc agcagttga tgccgtttc agtcgcgtag 120
tctggcgac ccagaccatc gccatactgg taggtgcagt gggaaacacg tgccatgtta 180

actgcgattt ccatgaacgc tttaggcagc agggtggagt cgctaacgcg ttcacgattc	240
atcttttcc attcggcgtc gatcagttt cgcagttt cgcggccctg ttccctcgctg	300
gtaccatcgt ttcgtgcat gtagctaattt atagaatttg tagtctcgcc acgttccagc	360
tccggccagc aggtggccag atcgttgac aggccaaaga taacgcagct agaacgcacc	420
agaccatgga agtcggtcag ggaacgcgcg gcgtggctgg agatgtcttc ctgtgtcg	480
catacgaaa agtaagacgg cgccagcgcg gctacaccgg aggagggaaac gctggcg	540
tccaggtact tggagaaagc cggataatt ttgttgttgg accatttcgc ctcttcgaga	600
aaggcttgc acagttcacg ccagctttc gtcagatagg acaggtgtt atgaccttc	660
tcttcagaa tagaatagga cgtgtcgta acggtgttgc acagtccag gaaacacagt	720
ttcatatagt ccggcagggt gtaatagcg ttaacgtccc agcgctctac agcatcggt	780
aacagttgca gtcgtccag agtgcataaa acgtcataca cgtcatcgat gatgtcacc	840
agaccaaaca ttttagtaac agctttgcga cattcaccaa actgcgggtc tggccata	900
cccaatgtcccc agaaataaac ttccatcagg cggtcgcgtaa caaaatccag tttgttagcc	960
aggcccatct cggccacca gggggacaga tcttcgcgtt cttctggc cagggtgt	1020
accatgttaa aatccagtt cggccagctcc agcagcagct ggtgtatgcgg ttcttcgg	1080
tcgtatttat ccaggaacca acgtgcctcc agacgggtca gacgctggc atatggcagt	1140
tccagggcgt ggctcaacttgc ttctgcacc ttgttattaa tgccttcctt caggttggc	1200
ttcaggtggg ttagggaaaa ggtacgcgc tcctccagca ggttctcacc ctgcggaaacc	1260
aggttaagacg cttcatacag gtcagcagg cttggacgt cacccatcg ttcaccgt	1320
aaaccaccc ttatcctt gaaacgcgtca aaaacatcct gagaaacccctc gaaaccgtgc	1380
tgacgcagca gacggaaaga cagagcggtt gcgtgcaggc cagattgtt cttttgttt	1440
tcgtccagca gtacgtatgtt ttccagggtt ttaatgtatgtt cttttcaaa tttgttaggtc	1500
agacccagggc gtcgcacatc gtcgtatcgc tccagcaggc acagcggcgt ggtgtctaca	1560
cgggtgtatca tgacgcgtac ttcttcctcc agtttggcgt ctttccttc cagctttcc	1620
actttcaggc ctttcctccag ggattgcagg aattcgaaat tccacagggtt tggctgtatag	1680
tttgcggAAC gacggAAATT atgctcggtt atctgagttt attgagaAGA ggtcgacAC	1740
atggatatC tccttcttAA agttAAACAA aatttttCT agagggAAAT tggtatCCG	1800
tcacaattCC cctatagtGA gtcgttAAAC ttgcggGA tcgagatCTC gatccTCAc	1860
gccggacgCA tcgtggCCGG catcaccGGC gccacaggTG cggttgcTTGG cgcctatATC	1920
gccgacatCA ccgtggGGGA agatcgGGGT cggccactTCG ggctcatGAG cgcttgcTT	1980
ggcgtggta tgggtggcagg ccccggtggcc gggggactgt tgggcggccat ctccttgcAt	2040

gcaccattcc ttggcgccgc ggtgctcaac ggcctaacc tactactgg ctgcttcata	2100
atgcaggagt cgccataaggg agagcgtcga gatccggac accatcgaaat ggccaaaac	2160
ctttcgggt atggcatgat agcgcggga agagagtcaa ttcagggtgg tgaatgtgaa	2220
accagtaacg ttatacgatg tcgcagagta tgccgggtgc tcttatcaga cggttcccg	2280
cgtggtaac caggccagcc acgttctgc gaaaacggg gaaaaagtgg aagcggcgt	2340
ggcggagctg aattacattc ccaaccgcgt ggcacaacaa ctggcgggca aacagtcgtt	2400
gctgattggc gttgccacct ccagtctggc cctgcacgcg ccgtcgaaa ttgtcgccg	2460
gattaaatct cgcccgatc aactgggtgc cagcgtggtg gtgtcgatgg tagaacgaag	2520
cgccgtcgaa gcctgtaaag cggcggtgca caatttctc ggcacacgc tcagtggct	2580
gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct gtggaaagctg cctgcactaa	2640
tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc atcaacagta ttatttctc	2700
ccatgaagac ggtacgcgac tggcggtgga gcatctggc gcattgggtc accagcaat	2760
cgcgtgtta gggggccat taagttctgt ctggcggtt ctgcgtctgg ctggctggca	2820
taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcgaa cggaaaggcg actggagtgc	2880
catgtccggt ttcaacaaa ccatgcaat gctgaatgag ggcacatcgatccactgcgt	2940
gctggttgcc aacgatcaga tggcgctggg cgcaatgcgc gccattaccg agtccggct	3000
gcgcgttgtt gggatatct cggtagtggg atacgacgtt accgaagaca gctcatgtta	3060
tatcccggcg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg ctggggcaaa ccagcgtgga	3120
ccgcgtgtcg caactctctc agggccaggc ggtgaaggc aatcagctgt tgccgtctc	3180
actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgtt	3240
ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca gtttccgat ctggaaagcg ggcagtgagc	3300
gcaacgcaat taatgtaaat tagctcactc attaggcacc gggatctcgatccgcct	3360
ttagagcctt caaccagtc agtccttcc ggtggcgccg gggcatgact atcgtcgccg	3420
cacttatgac tgtttcttt atcatgcaac tcgttaggaca ggtgccggca ggcgttgtgg	3480
tcatttcg cgaggaccgc ttgcgtggc ggcgcacgtt gatggcctg tgcgttgccg	3540
tattcgaaat ctgcacgccc ctgcgtcaag ctttcgtcac tggtcccgcc accaaacgtt	3600
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcgcccc acgggtgcgc atgatcgatc	3660
tcctgtcggtt gaggaccggc ctggctggc ggggttgct tactggtagt cagaatgaat	3720
caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact gctgcgtcaaa aacgtctgcg acctgagcaa	3780

caacatgaat ggtttcggt ttccgtgtt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc	3840
cctgcaccat tatgttccgg atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggAACAC	3900
ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt gaccctgagt gatTTTCTC tggtcccGCC	3960
gcatccatac cgccagttgt ttaccctac aacgtccag taaccggca tttcatcat	4020
cagtaacccg tategtgagc atcctctc gtttcatcg tatcattacc cccatgaaca	4080
gaaaatcccc ttacacggag gcatcagtga ccaaacagga aaaaaccGCC cttAACATGG	4140
cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg	4200
atgaacaggc agacatctgt gaatcgctc acgaccacgc tggatgagctt taccgcagct	4260
gcctcgccg tticggtgat gacggtgaaa accctgaca caigcagctc ccggagacgg	4320
tcacagcttgc tctgttaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcaggc gcgtcagcgg	4380
gtgttggcgg gtgtcgggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata	4440
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt	4500
gaaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgccttc cgcttcctcg	4560
ctcaactgact cgctgcgc tc ggtcggtcg ctgcggcag cggtatcagc tcactcaaag	4620
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	4680
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgTTTT ccataggctc	4740
cgcggccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca	4800
ggactataaa gataccaggc gttccccct ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg	4860
accctgcgc ttacggata cctgtccgc tttccctt cgggaagcgt ggcgcTTCT	4920
catagctcac gctgttaggtt tctcgttgc gtgttaggtc ttgcctccaa gctggcgtgt	4980
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgccgcTTT cggtaacta tcgttttag	5040
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	5100
agagcggagg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac	5160
actagaagga cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga	5220
gttggtagct ctgtatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggTTTTTTTTTGTTGC	5280
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccttgc tttttctacg	5340
gggtctgacg ctcaatggaa cggaaactca cgttaaggaa tttggcgtat gaacaataaa	5400
actgtctgct tacataaaca gtaataacaag ggggtttatg agccatattc aacggaaac	5460
gtcttgctct aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataatg	5520
ggctcgcat aatgtcgggc aatcagggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagccccGA	5580
tgcgccagag ttgttctga aacatggcaa aggttagcgtt gccaatgtatg ttacagatga	5640

gatggtcaga ctaaacatggc tgacggatt tatgcctttt ccgaccatca agcatttat	5700
ccgtactcct gatgtatgc ggttactcac cactgcgtc cccggaaaaa cagcattcca	5760
ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattttt gatgcgttgg cagtgttctt	5820
gcgcgcgttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgttattcg	5880
tctcgcttag ggcgaatcac gaatgaataa cggtttgggtt gatgcgttgg attttgcgtt	5940
cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgcatt	6000
ctcacccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctactt gataacctta ttttgcgtt	6060
ggggaaatta ataggttgcgtt ttgtatggtgg acgagtcgga atcgacacc gataccaggaa	6120
tcttgccatc ctatggactt gcctcggtga gtttctcct tcattacaga aacggcttt	6180
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatataa gaataaattt cagtttcattt tgatgcgtt	6240
tgagtttttc taagaattaa ttcatgagcg gatacatattt tgaatgtattt tagaaaaata	6300
aacaaaatagg gttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaaattt gtaaacgtt	6360
atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcattttt aaccaatagg	6420
ccgaaatcgaa caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtttgcgtt	6480
ttccagtttgcgtt gaacaagagt ccactattaa agaacgttgg ctccaaacgtc aaaggcgaa	6540
aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgtaccatc accctaataa agttttttgg	6600
ggtcgagggttgcgtt ccgtaaagca ctaaatcggtt accctaaagg gagccccggaa ttttagagctt	6660
gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa ggagcggcg	6720
ctagggcgctt ggcaagtgtt ggcgtcacgc tgccgttaac caccacaccc gcccgcgtt	6780
atgcgcgcgtt acagggcgcg tcccatcgcc caatccggat atagttcctc ctttcagcaaa	6840
aaaacccctc aagaccgtt tagaggcccc aagggttat gcttagttt gctcagcggtt	6900
ggcagcagcc aactcagttt ctttcgggtt tttgttagca gcccgttcc agtgggttgtt	6960
gtggtgggtgc tcgtt	6974
<210> 102	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 102	
accgttcgtt ctatcgaaa ctaaaaaaaaaa ccggccttgg ccccg	45