



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월20일
(11) 등록번호 10-1810580
(24) 등록일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/825 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0035133
(22) 출원일자 2017년03월21일
심사청구일자 2017년03월21일
(56) 선행기술조사문헌
JP2004008141 A
GenBank Accession Number NM_001011645
(2016.07.09.)

(73) 특허권자
세종대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
황성빈
서울특별시 송파구 송파대로28길 27, 102동 910호 (가락동, 송파성원쌍떼빌)
김동관
서울특별시 강남구 논현로 213, 107동 104호 (도곡동, 역삼럭키아파트)
고재홍
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16, 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
(74) 대리인
한윤호

전체 청구항 수 : 총 6 항

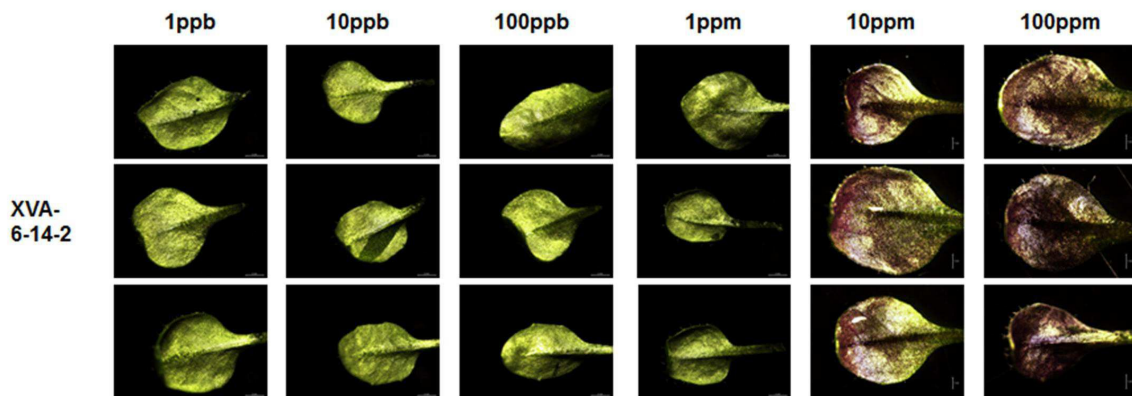
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **남성 환경호르몬 검출용 지표식물**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 기재되는 핵산서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVA 융합 전사인자를 암호화하는 유전자 및 상기 서열번호 2로 기재되는 핵산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 *PtrMYB119* 유전자가 상기 XVA 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 *OlexA-46* 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트에 형질전환된, 남성 환경호르몬 검출용 지표식물을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 15/8237 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3C8A6A06014500
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천연구개발사업
 연구과제명 내분비계 장애물질 대체소재의 내분비교란 활성 평가
 기여율 1/2
 주관기관 세종대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01060807
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원사업(기본연구)
 연구과제명 목본식물-특이적 생장/발달관련 새로운 포플러 R2R3-MYB 전사조절인자 규명
 기여율 1/2
 주관기관 경희대학교 산학협력단
 연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 핵산서열로 구성되는 안드로겐을 인식하는 XVA 융합 전사인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 핵산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 *PtrMYB119* 유전자가 상기 XVA 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 *OlexA-46* 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 안드로겐 검출용 지표식물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 안드로겐은 테스토스테론, 안드로스테론, 디히드로에피안드로스테론, 또는 아드레노스테론인, 안드로겐 검출용 지표식물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 *OlexA-46* 프로모터는 서열번호 7로 기재되는 핵산서열로 구성되는, 안드로겐 검출용 지표식물.

청구항 5

제1항의 안드로겐 검출용 지표식물의 형질전환된 종자.

청구항 6

제5항의 종자 또는 그로부터 발아한 새싹을 포함하는, 안드로겐 검출용 지표식물 키트.

청구항 7

제6항의 키트를 안드로겐이 포함된 토양 또는 수질에 노출시켜 안토시아닌 색소 과다 축적 여부를 육안으로 관찰하는, 안드로겐 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 환경호르몬 검출용 지표식물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 남성 환경호르몬 검출용 지표식물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환경호르몬은 내분비 교란물질(endocrine disruptor)로서, 생체 내분비계의 기능을 방해하거나 혼란을 야기하는 화학물질로 정의된다. 1997년 일본에서 "환경에 배출된 화학물질이 생물체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다"고 하여 '환경호르몬'이라 명명하였고, 생태계 및 인간의 호르몬계에 악영향을 미쳐 전 세계적으로 생물종에 위협이 될 수 있는 가능성 때문에 오존층파괴, 지구온난화 문제와 함께 세계 3대 환경문제로 부각되었다. 환경호르몬은 생체 내 수용단백질과 결합하여 신호전달을 통해 비정상적인 유전자 발현을 유도할 수 있기 때문에 국외의 연구에서는 지난 50년간 인간의 정자수가 반으로 줄어들었고(1992년 덴마크의 스카케백 교수), 야생동물의 생식기 이상/생식 불능 개체수 급증하였으며(세계자연보호기금) 국내의 경우, 어린이집과 유치원의 환경호르몬 수치가 미국 등지의 최대 11배 수준으로 증가하였다는 여러 피해사례가 보고되고 있다. 환경호르몬으로

분류되는 화학물질들은 대표적으로 프탈레이트, 비스페놀A, 노닐페놀 등으로 이를 포함하는 국내 제조량은 대폭 증가하고 있으며 환경호르몬이 동물 및 인체에 미치는 영향은 많이 연구되고 있으나, 생태계의 근본이 되고 인체유입의 통로가 되는 식물에 대한 연구는 특히 부족한 실정이고 식물(채소, 식량작물 등)의 환경호르몬 흡수, 축적 및 전환에 관한 연구, 환경호르몬 축적 식물을 동물이 섭취함에 따른 영향 연구가 매우 부족한 실정이다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2011-0130648호는 염분토양에서 지표식물로 사용가능한 유전자 및 형질전환체 제조방법을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0003] 그러나, 상기 선행기술의 경우, 항생제 저항성 마커를 포함하고 있으나 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 마커(색 변화)가 없는 문제점이 있다.
- [0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 환경호르몬 존재 시 이를 인식하여 모니터링이 가능한 남성 환경호르몬 검출용 지표식물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0005] 본 발명의 일 관점에 따르면 서열번호 1로 기재되는 핵산서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVA 융합 전사 인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 핵산서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 *PtrMYB119* 유전자가 상기 XVA 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 *OlexA-46* 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 지표식물이 제공된다.
- [0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 지표식물의 형질전환된 종자가 제공된다.
- [0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 종자 또는 그로부터 발아한 새싹을 포함하는, 환경호르몬 검출용 지표 식물 키트가 제공된다.
- [0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 키트를 환경호르몬이 포함된 토양 또는 수질에 노출시켜 안토시아닌 색소 과다 축적 여부를 육안으로 관찰하는, 환경호르몬 검출방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0009] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 남성 환경호르몬 존재 시 이를 인식하여 실시간 모니터링이 가능한 형질전환 식물체 생산효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 XVA 도메인을 제조하기 위한 개요도 및 Overlapping PCR에 의해 증폭을 확인한 겔 사진이다.
- 도 2는 식물로 형질전환이 가능한 pB2GW7 gateway binary vector를 주형으로 하여 Androgen(남성호르몬)을 인식하는 XVA domain을 삽입하고 환경호르몬에 대한 반응성을 육안으로 식별할 수 있도록 붉은 색소인 안토시아닌의 합성을 유도하는 전사인자(*PtrMYB119*)를 Gateway system으로 클로닝한 남성 환경호르몬 검출 지표식물 제작을 위한 벡터 컨스트럭트의 개요도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 형질전환체 애기장대 (T3 세대)에서 남성호르몬인 DHT를 농도별로 처리 후 적색변화 양상을 관찰한 사진이다.
- 도 4는 형질전환 식물체(T3)에서 남성호르몬 DHT 처리에 따른 안토시아닌 합성 전사인자(*PtrMYB119*)의 발현 양상을 분석한 그래프이다.
- 도 5는 남성호르몬 DHT의 농도별 처리에 따른 안토시아닌 생합성 유전자인 *AtCHS* 발현양상을 분석한 그래프이다.
- 도 6은 남성호르몬 DHT의 농도별 처리에 따른 안토시아닌 생합성 유전자인 *AtANS* 발현양상을 분석한

그래프이다.

도 7은 남성호르몬 DHT의 농도별 처리에 의한 안토시아닌 함량 변화를 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

용어의 정의:

[0012]

본 문서에서 사용되는 용어 "환경호르몬(endocrine disruptor)"은 내분비 장애물질이라고도 하며 사람이나 동물의 내분비 호르몬과 비슷하게 작용하는 외인성 화학물질로 사람이나 동물의 내분비계에 영향을 미쳐 인간이나 동물의 번식장애 등 건강에 위해를 주는 물질을 말한다.

[0013]

본 문서에서 사용되는 용어 "안드로겐(androgen)"은 남성 생식계의 성장과 발달에 영향을 미치는 호르몬의 총칭으로 남성의 2차 성징 발달에 작용하고 주로 남성의 정소에서 분비되며 일부는 부신피질과 여성의 난소에서도 분비된다. 탄소원자 19개를 가진 스테로이드로서 고환에서 분비되는 테스토스테론을 비롯하여 그것이 변하여 오줌 속에 배설되는 안드로스테론이나 디히드로에피안드로스테론(dehydroepiandrosterone) 등과 부신피질에서 분비되는 아드레노스테론 등이 포함된다.

[0014]

본 문서에서 사용되는 용어 "안토시아닌(anthocyanin)"은 꽃이나 과일 등에 포함되어 있는 안토시아닌의 색소 배당체(色素配當體: 색소 글리코시드)로 가수분해에 의해 하나 또는 둘의 당당류와 아글리콘으로 분류된다.

[0015]

발명의 상세한 설명:

[0016]

본 발명의 일 관점에 따르면 서열번호 1로 기재되는 핵산서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVA 융합 전사 인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 핵산서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 *PttrMYB119* 유전자가 상기 XVA 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 *OlexA-46* 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 지표식물이 제공된다.

[0017]

상기 환경호르몬 검출용 지표식물에 있어서, 상기 환경호르몬은 안드로젠일 수 있고 상기 안드로젠은 테스토스테론, 안드로스테론, 디히드로에피안드로스테론, 또는 아드레노스테론일 수 있고 상기 *OlexA-46* 프로모터는 서열번호 7로 기재되는 핵산서열로 구성될 수 있다.

[0018]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 지표식물의 형질전환된 종자가 제공된다.

[0019]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 종자 또는 그로부터 발아한 새싹을 포함하는, 환경호르몬 검출용 지표식물 키트가 제공된다.

[0020]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 키트를 환경호르몬이 포함된 토양 또는 수질에 노출시켜 안토시아닌 색소 과다 축적 여부를 육안으로 관찰하는, 환경호르몬 검출방법이 제공된다.

[0021]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0022]

실시예 1: XVA 유전자의 증폭

[0023]

본 발명의 일 실시예에 따라 남성호르몬 유사 환경 호르몬을 인식 할 수 있는 XVA 유전자부분은 주형이 되는 pMDC7 벡터에 존재하는 XVE(X: LexA로 부터 유래된 DNA 결합 도메인, V: VP16으로부터 유래된 전사활성 부위, E: 인간 여성호르몬 수용체) 영역(region)으로부터 XV 도메인을 증폭하였다. PCR 조건은 포워드(XVE_SpeI_F, 서열번호 3) 및 리버스 프라이머(XV_pA_R, 서열번호 4) 세트를 이용하여 95℃ 5분 pre-denaturation, 95℃ 30초 denaturation, 65℃ 30초 annealing, 72℃ elongation 30초, 30cycles, 72℃ post-elongation 5분 조건으로 증폭하였다.

[0024]

또한, 인간 남성호르몬 수용체(androgen)로부터 남성호르몬 리간드 결합 도메인(ligand binding domain)은 포워드(pXV_A_F, 서열번호 5) 및 리버스 프라이머(A_SpeI_R, 서열번호 6) 세트를 이용하여 95℃ 5분 pre-denaturation, 95℃ 30초 denaturation, 67℃ 30초 annealing, 72℃ elongation 1분, 30cycles, 72℃ post-elongation 5분의 조건으로 증폭한 뒤(XV와 A domain은 서로 linker site포함) 상기 두 가지 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 SpeI linker site를 가지는 포워드(XVE_SpeI_F, 서열번호 3) 및 리버스 프라이머(A_SpeI_R, 서열번호 6)로 overlapping PCR을 수행하여 XVA(서열번호 1) 유전자부위를 확보하였다(도 1). 상기

PCR 증폭에 사용된 프라이머의 핵산서열을 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

프라이머	핵산서열(5'→3')	서열번호
XVE_SpeI_F	TTTACTAGTATGAAAGCGTTAACGGCCAG	3
XV_pA_R	TCGGGCTGGTTGTTtagacggatccccaccgtactcgtc	4
pXV_A_F	gtgggatccgtctACAACCAGCCCGACTCCTTTGCA	5
A_SpeI_R	TTT ACTAGT TCACTGGGTGTGGAAATAGATG	6

실시예 2: 마커 유전자 디자인

남성호르몬과 환경호르몬에 대한 반응성을 육안으로 식별할 수 있도록, 붉은 색소인 안토시아닌을 식물에 축적시키는 마커시스템 활용하였다. 구체적으로 본 발명에서는 LAP 프로모터(*OlexA-46*, 서열번호 7): FLAG tag(T:27 bp, 서열번호 8) : *PtrMYB119*(LTM)의 융합단백질을 마커 유전자로 사용하였다. 상기 *PtrMYB119* 유전자(서열번호 2)는 포플러 유래 안토시아닌 생합성 촉진 전사인자이며 이를 이용한 LTM domain을 게이트웨이 시스템(gateway system)을 이용하여 최종 식물형질 전환용 벡터인 pB2GW7 벡터로 서브-클로닝(sub-cloning)하였다. 그 후, 제한 효소 *SpeI*로 절단한 overlapping PCR product XVA 유전자를 *SpeI*으로 절단한 pB2GW7_LTM 벡터로 서브-클로닝하여 최종 지표식물 벡터 컨스트럭트(vector construct)를 완성하였다(도 2).

실시예 3: 형질전환 애기장대 제조

상기 실시예 2에서 제조한 XVA-*PtrMYB119* 유전자 재조합 벡터를 식물체로 형질전환시키기 위하여 *Agrobacterium* GV3101 strain을 이용하여 야생형 애기장대(mouseear cress)에 형질전환시키고 이 후 수확된 씨앗에 제조제 Basta를 처리하여 형질전환된 개체만을 선별하였다. 이어서, 그 후, 상기 선별된 형질전환 개체들을 남성호르몬인 Dihydrotestosterone(DHT)가 함유된 배지에서 성장시켜 적색변이가 일어나는 개체들을 일차선별하고 이들로 부터 다음세대를 얻어 지속적인 적색변이 형질전환 line을 선별하였으며 상기 선별된 라인으로 DHT를 1/2MS, 1, 10, 100 ppb 및 1, 10, 100 ppm 농도별로 처리하여 색소 축적여부를 관찰하였다.

그 결과, 형질전환된 식물체에서 적색변이가 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

실시예 4: 유전자 발현 확인

적색변이가 일어나는 형질전환 식물체들의 유전자 발현정도를 관찰하기 위하여 상기 제조한 XVA 형질전환 식물체들을 1/2MS, 1, 10, 100 ppt, 1, 10, 100 ppb, 1, 10, 100 ppm 농도의 DHT를 함유하고 있는 배지에서 발아 후 성장시켰다. 14일째 상기 식물체들로부터 RNA를 뽑아 cDNA를 만든 후 Real-time PCR을 통해 *PtrMYB119* 유전자의 발현 및 안토시아닌 색소합성을 담당하는 PAL pathway의 *AtCHS*, *AtANS* 유전자의 발현을 확인하였다.

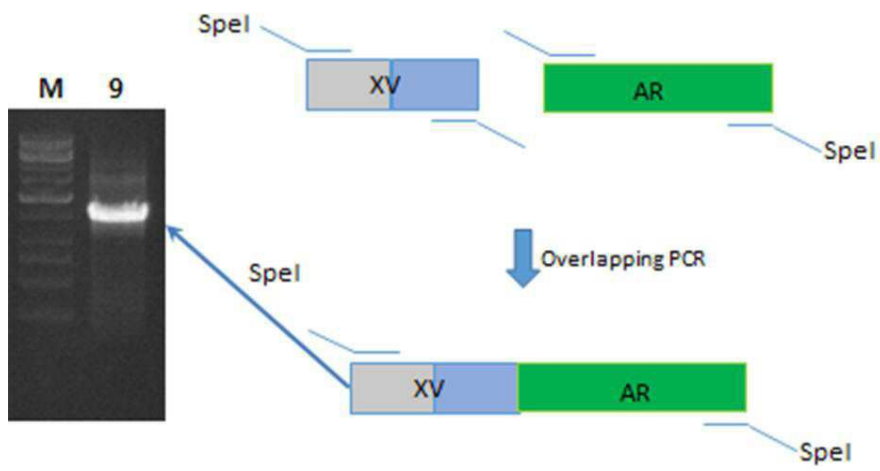
그 결과 1 ppm 농도의 DHT에서 발현이 증가되기 시작하여 10 ppm, 100 ppm에서 높게 발현되는 것으로 나타났고(도 4) 두 *AtCHS*, *AtANS* 유전자 모두 1 ppm부터 발현이 증가하였으며(도 5 및 6) 안토시아닌 함량은 10 ppm에서 증가하기 시작하여 100 ppm에서 가장 높은 함량을 나타내었다(도 7).

결론적으로, 종래 여성호르몬(17-β-Estradiol) 수용체(receptor)를 기반으로 하는 형질전환 지표식물은 제조되었으나 남성호르몬(Androgen)을 검출하는 형질전환 지표식물은 현재까지 보고된 바가 없다. 본 발명의 환경호르몬 검출용 형질전환 식물체는 항생제 마커가 없는 친환경적인 방법으로 식물체를 제작하고 남성호르몬 수용체(XVA)를 이용해 남성 환경호르몬 존재를 인식하여 안토시아닌 색소를 축적함에 따라 축적 정도를 육안으로 실시간으로 관찰할 수 있는 기술적 특징으로 인해 상기 식물체를 이용하여 광범위한 지역에 대해 실시간 모니터링이 가능하며 경제적이고도 신속하게, 지속적으로 친환경적 분석에 따른 위기대응 및 관리에 활용 가능하다.

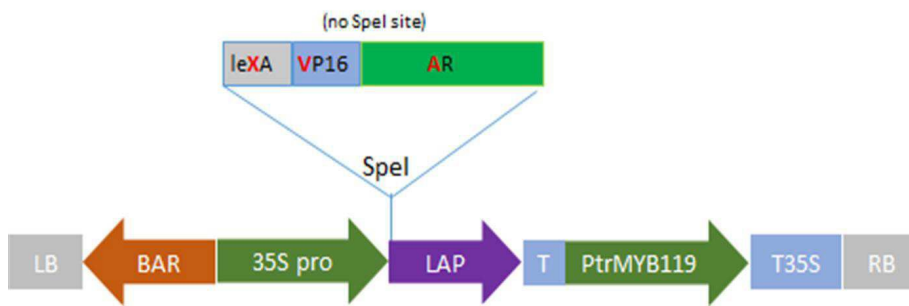
본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

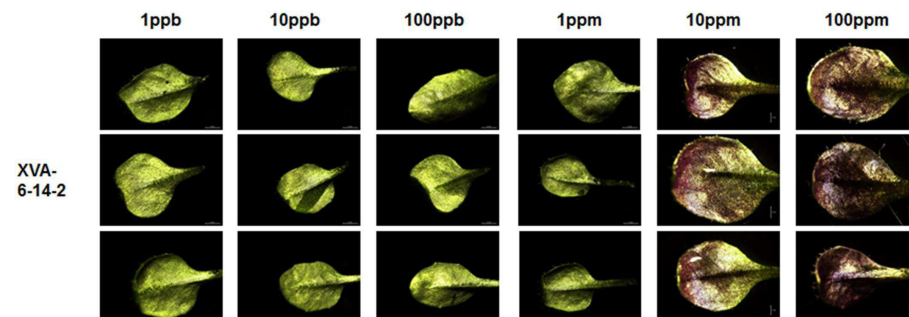
도면1



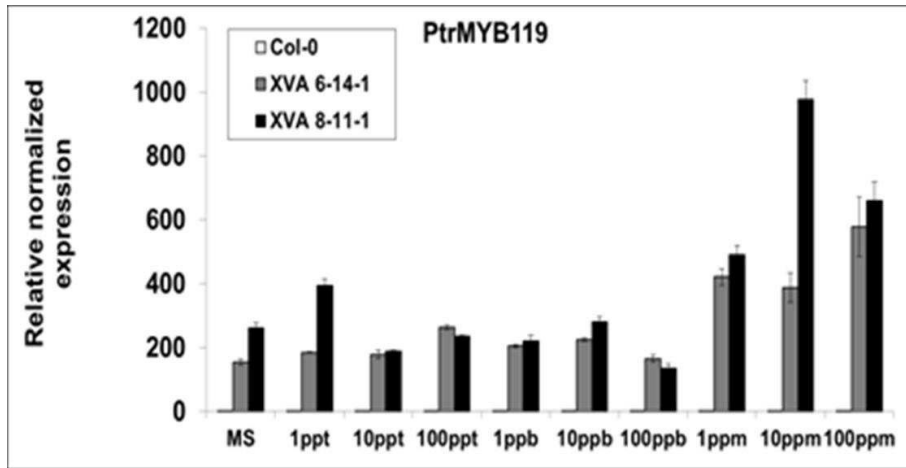
도면2



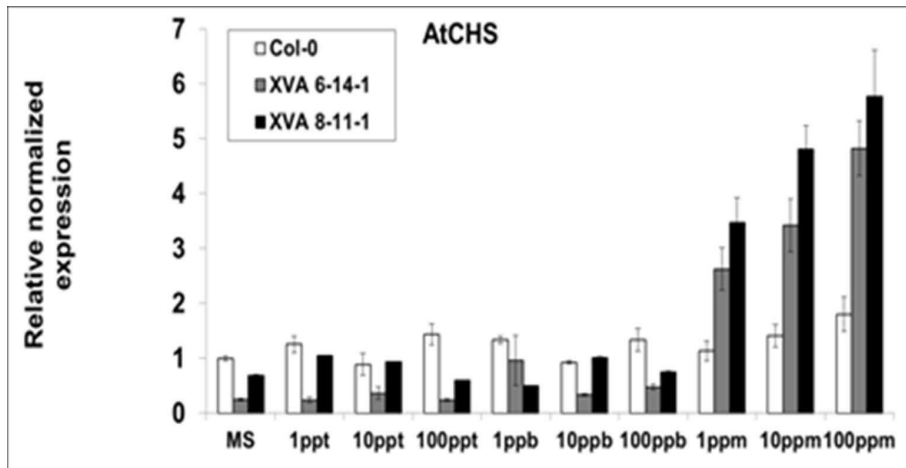
도면3



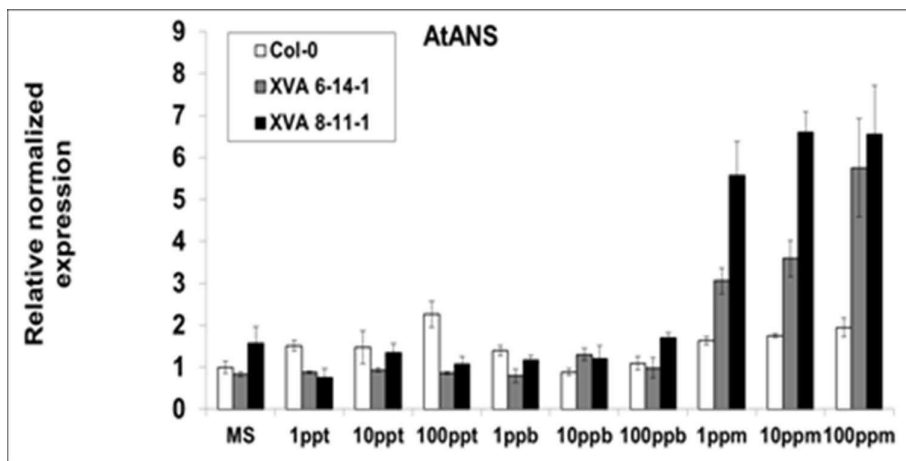
도면4



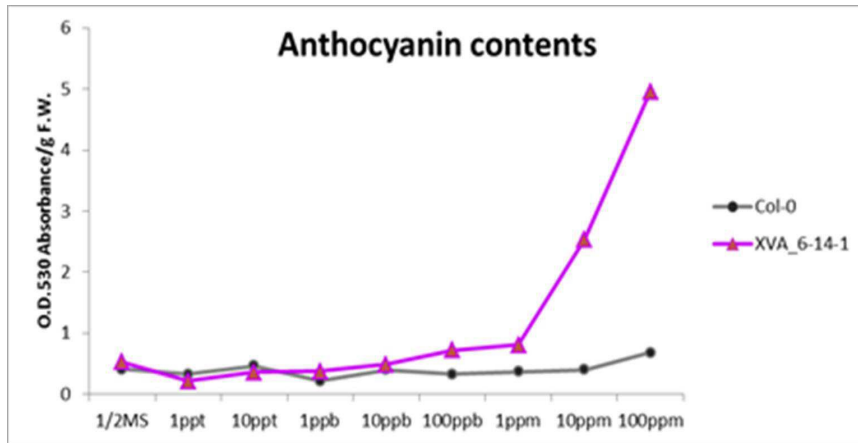
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University
- <120> Indicator plant for detecting androgenic environmental hormone
- <130> PD17-5474
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1200
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> XVA nucleotide seq.

```

<400> 1
atgaaagcgt taacggccag gcaacaagag gtgtttgac tcatccgtga tcacatcagc 60
cagacaggta tgccgccgac gcgtgcggaa atcgcgacgc gtttgggggtt cegttcccca 120
aacgcggctg aagaacatct gaaggcgcctg gcacgcaaag gcgttattga aattgtttcc 180

ggcgcacac gcgggattcg tctgttgac gaagaggaag aagggttgcc gctggtaggt 240
cgtgtggctg ccggtgaacc gtcgagcgcc cccccaccg atgtcagcct gggggacgag 300
ctccacttag acggcgagga cgtggcgatg gcgcatgccg acgcgctaga cgatttcgat 360
ctggacatgt tgggggacgg ggattccccg ggtccgggat ttacccccca cgactccgcc 420
ccctacggcg ctctggatat ggccgacttc gagtttgagc agatgtttac cgatgcctt 480
ggaattgacg agtacgggtg ggatccgtct aacaaccagc ccgactcctt tgcagccttg 540
ctctctagcc teaatgaact gggagagaga cagcttgtac acgtggtcaa gtgggccaag 600

gccttgctg gcttccgcaa cttacacgtg gacgaccaga tggctgtcat tcagtactcc 660
    
```

tggatggggc tcatggtggt tgccatgggc tggcgatcct tcaccaatgt caactccagg 720
atgctctact tcgcccctga tctggttttc aatgagtacc gcatgcacaa gtcccggatg 780
tacagccagt gtgtccgaat gaggcacctc tctcaagagt ttggatggct ccaaatcacc 840
ccccaggaat tctgtgcat gaaagcactg ctactcttca gcattattcc agtggatggg 900
ctgaaaaatc aaaaattctt tgatgaactt cgaatgaact acatcaagga actcgatcgt 960
atcattgcat gcaaaagaaa aaatcccaca tctgtctcaa gacgcttcta ccagctcacc 1020

aagctcctgg actccgtgca gcctattgcg agagagctgc atcagttcac ttttgacctg 1080
ctaatcaagt cacacatggt gagcgtggac tttccggaaa tgatggcaga gatcatctct 1140
gtgcaagtgc ccaagatcct ttctgggaaa gtcaagccca tctatttcca cacccagtga 1200
1200

<210> 2
<211> 834
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PtrMYB119 cDNA

<400> 2
atggtaggct cattaggagt aaggaaaggt gcatggacgg aggaggaaga tatacttcta 60

aggaagtgcg tcgagaaata tggatgaagga agatggcatg aagtccctc cagagcaggc 120
ttgaatcgat gcaggaaaag ctgcagaatg aggtggttga attatcttaa gccaaatgct 180
aagagaggac agttttcggg ggacgaagtg gacttgatta tcagactaca caagttgctt 240
ggcaataggt ggtcattgat agctggtaga ctttcaggaa gaacagcga tgatgtcaag 300
aattattgga actcaaacca gcgtaagaag gtgatttcta gcactgatga agttcgatca 360
aaaccagaag caaatcaat cacaagagac aacataataa agcctcaacc ttggaagtcc 420
agaagtttat tctggttaag aggaaaaagt actccactta ttaatgttgg taattctcaa 480

tatgggaacg atctttgtaa gtcatgttat tcaacagtat cgccacctc cgacattaat 540
gaagttgaaa gtttatggtg ggaaagctcg ttagatgaca aagaaattaa tcaaacgatc 600
aacagcagtt gtctgggttc tgtttcagca gcagcagcag cagcttacc agagtccagc 660
gaaagtcatt ttgtaaagaa caacgcacca ggagggataa aaactgggga cgtgttctat 720
gaacaaggac aaaattgttg gactgacatt tctttggatg cagaccttg gaatctaatac 780
aatacagaac tagatcaaca acaacctgaa ggacttcagt ctataatgtt gtaa 834

<210> 3
<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XVE_SpeI_F

<400> 3

tttactagta tgaagcggtt aacggccag 29

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XV_pA_R

<400> 4

tctggctggt tgtagacgg atccccaccg tactcgtc 38

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pXV_A_F

<400> 5

gtgggatcc gtctaacaac cagcccgact cctttgca 38

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A_SpeI_R

<400> 6

tttactagtt cactgggtgt ggaaatagat g 31

<210> 7

<211> 269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OlexA-46 promoter

<400> 7

ttgcatgcca gcttgggctg caggtcgagg ctaaaaaact aatgcatta tcatccctc 60

gacgtactgt acatataacc actggtttta tatacagcag tactgtacat ataaccactg 120

gttttatata cagcagtcga cgtactgtac atataaccac tggttttata tacagcagta 180

ctgtacatat aaccactggg tttatataca gcagtcgagg taagattaga tatggatatg 240

tatatggata tgtatatggg ggtaatgcc 269

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 8

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5