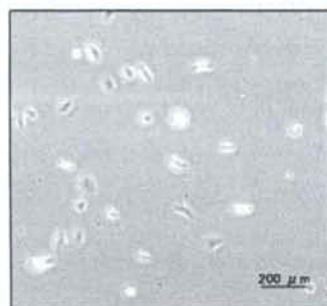
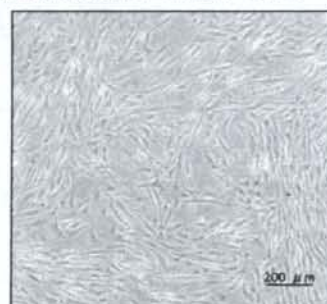


後、直ちに多くの細胞が死滅し、僅かに生存した細胞の遺伝子導入率はほぼ0%であり、細胞は増殖することはなかった。



一方、3%血清培地で培養した細胞は、導入後、多くの細胞が生存したが細胞の形態は、円形から線維芽細胞様に伸張してしまった。生存した細胞における遺伝子導入率は一過性のものであったが1%程度であり、定常発現する細胞は観察されなかった。



C-2. 構築した発現ベクターの解析 SV40のVector作製

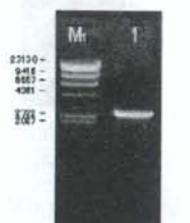
挿入するSV40の準備としてPCRによる目的領域を増幅した。Forward PrimerとReverse Primerは以下のように設計した。

SV40-Forward Primer :
CGGAATTCATGGATAAAGTTTTAAACAG
SV40-Reverse Primer :
CGGGATCCGGATCCAGACATGATAAGATAC

次に、以下の条件でPCR Mixtureを調整し、PCRを実施した。

Template (10 ng/ μ l)	1.0 μ l
Forward Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
5×PrimersSTAR buffer	10 μ l
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l

PCRサイクルは、98℃：10秒、55℃：10秒、72℃：2分で実施した。次に3 μ lのPCR Productsを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



M: λ -Hind III DNA Marker
1: Clone 1553 \times dil (1 μ l)

以上の結果から、約2.6KbpのSV40 PCR Productsを増幅させることができた。

次にVector (Stable Vectorの場合は、pIRES-DsRed Vector、Control Vectorの場合は、pTRE-Tight Vector)とPCR ProductsのLigationさせるため、切断酵素 (EcoR I と BamH I) を用いて切断処理を行った。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	0.5 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37℃で4時間行った。

《Vectorの切断酵素処理》

Vector	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37 $^{\circ}$ Cで16時間行った。

次に3 μ lの切断酵素処理後のVectorを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



以上の結果から、約2.6Kbpの切断酵素処理したVectorが確認できた。

次にPCR Productsと切断酵素処理したVectorを以下の条件でLigationさせた。

使用キット：DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	100 ng
Vector DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16 $^{\circ}$ Cで2時間、Ligationさせた。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l
E.coli Competent Cell(JM109)

On ice for 30 min.

Incubate cells for 45 sec. at 42 $^{\circ}$ C

On ice for 1 min.

Add SOC medium up to 1 ml
incubate by shaking (160-225 rpm)
for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C

1 ml is recommended for plating on
dish (Amp)

Incubate overnight at 37 $^{\circ}$ C

hTERTのVector作製

SV40と同様にhTERTのPCRを行い、hTERTのPCR Productsを作製し、VectorとのLigationを行うため、制限酵素 (EcoR I) 処理を以下のように実施した。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37 $^{\circ}$ Cで3時間処理した。切断酵素処理前(レーン1)と切断酵素処理後(レーン2)のhTERT Plasmidを各3 μ lずつ使用して、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



《Vectorの切断酵素処理》

Vector	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10 \times H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37 $^{\circ}$ Cで16時間処理した。切断酵素処理前(レーン1)と切断酵素処理後(レーン2)のVector DNAを各3 μ lずつ使用して、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



以上の結果から、約2.6Kbpの切断酵素処理したVectorが確認できた。

次にPCR Productsと切断酵素処理したVectorを以下の条件でLigationさせた。

使用キット: DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

Insert DNA	70 ng
Vector DNA	50 ng
Solution I	5 μ l
H ₂ O	Up to 10 μ l

16 $^{\circ}$ Cで2時間、Ligationさせた。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

Gently mix 10 μ l reaction mixture / 100 μ l E.coli Competent Cell(JM109)

↓

On ice for 30 min.

↓

Incubate cells for 45 sec. at 42 $^{\circ}$ C

↓

On ice for 1 min.

↓

Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C

↓

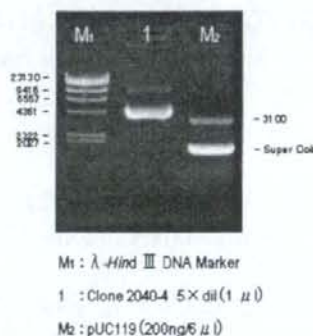
1 ml is recommended for plating on dish (Amp)

↓

Incubate overnight at 37 $^{\circ}$ C

C-2-1. S-SV40に導入されたSV40の Plasmid DNA (Clone 2040)の確認

S-SV40が挿入されたpIRES2-DsRed-Express Vectorを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体よりPlasmid Mega Kit (QIAGEN)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。



得られたPlasmid DNAを吸光度計(Nanodrop Spectrophotometer: ND-1000)にて測定したところ、A260/A280のratioは1.94、濃度は1.37 μ g / μ lであり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

次に精製したSV40 Plasmid DNAを細胞へ導入した際の検出のため、リアルタイムPCR法でのPrimerとProbeの作製を行うこととした。しか

し、購入・使用したJCRB Gene BankのSV40の完全長のDNAシーケンスデータは公表されていないため、pIRES2-DsRed VectorのMCSの上流領域からのSequence Primerを設計し、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) で解析を行いながら、MCS内を順方向、または逆方向でシーケンスを行った。作製したシーケンスPrimerは、以下のとおりである。

pIRES-DsRed Express Primer :

AATGGGCGGTAGGCGTGT

Primer-1 :

CAATGGCCTGAGTGTGCAA

Primer-2 :

AAGGTAGAAGACCCCAAG

Primer-3 :

GTTGTTATTGCTTGGGATGT

Primer-4 :

GTAAATTTGCCCTTGGACAG

Primer-5 :

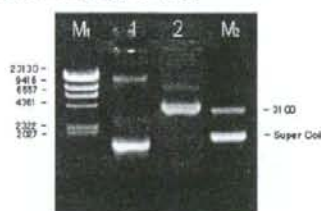
GATTGGCTAAGAAACAGTGA

これらのPrimerを用いて、SV40の全長シーケンスデータを得ることができた(添付資料-1、2、3)。

C-2-2. C-SV40に導入されたSV40のPlasmid DNA (Clone 1553)の確認

C-SV40が挿入されたpTRE-Tight Vectorを大腸菌に形質転換した。アンピシリンを含むLB寒天平板で培養し、発育してきたコロニーを釣菌し、アンピシリンを含む2 mlのLB液体培地で8時間、37°C、200 rpmの条件で振盪培養した。次にMain cultureとして、500 μ lの振盪培養した菌液をアンピシリンを含む1 LのLB液体培地で16時間、37°C、150 rpmの条件で振盪培養した。培養した菌液をEndo-Free Plasmid Maxi Kit

(QIAGEN, Code NO. 12362)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker

1 : pTRE-Tight 10 \times dil (1 μ l)

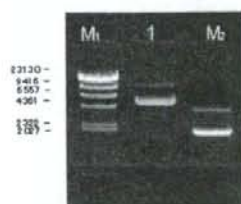
2 : Clone 1553-12 10 \times dil (1 μ l)

M2 : pUC119 (200ng/6 μ l)

得られたPlasmid DNAを吸光度計(Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000)にて測定したところ、A260/A280のratioは1.96、濃度は0.51 μ g/ μ lであり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

C-2-3. S-hTERTに導入されたhTERTのPlasmid DNA (Clone 1956)の確認

S-hTERTが挿入されたpIRES2-DsRed-Express Vectorを大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体よりPlasmid Mega Kit (QIAGEN)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker

1 : Clone 1956-2, 5 \times dil (1 μ l)

M2 : pUC119 (200ng/6 μ l)

得られたPlasmid DNAを吸光度計 (Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000) にて測定したところ、A260/A280のratioは1.96、濃度は0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

次にSV40 Plasmid DNAと同様に精製したhTERT Plasmid DNAを細胞へ導入した際の検出のため、リアルタイムPCR法でのPrimerとProbeの作製を行うこととした。しかし、今回、購入・使用したhTERTの完全長のDNAシーケンスデータは公開されていないため、pIRES2-DsRed VectorのMCSの上流領域からのSequence Primerを設計し、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer)で解析を行いながら、MCS内を順方向、または逆方向でシーケンスを行った。作製したシーケンスPrimerは、以下のとおりである。

pIRES-DsRed Express Primer :

AATGGGCGGTAGGCGTGT

Primer-1 :

AACCAGCACGTCGTCGCC

Primer-2 :

GCGTACACCGGGGACAA

Primer-3 :

CCAGACCCGCCGAAGAAG

Primer-4 :

GGATGAAGCGGAGTCTGG

Primer-5 :

GGAGACCACGTTTCAAAA

Primer-6 :

TCGCCAGCATCATCAAAC

Primer-7 :

GGCTGCGTGGTGAACCTG

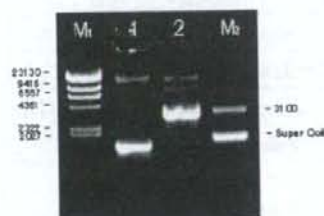
Primer-8 :

ACACGGCCTCCCTCTGCT

これらのPrimerを用いて、hTERTの全長シーケンスデータを得ることができた (添付資料-4、5、6)。

C-2-4. C-hTERTに導入されたhTERTのPlasmid DNA (Clone 1918)塩基配列確認

C-hTERTが挿入されたpTRE-Tight Vectorを大腸菌に形質転換した。アンピシリンを含むLB寒天平板で培養し、発育してきたコロニーを釣菌し、アンピシリンを含む2 mlのLB液体培地で8時間、37°C、200 rpmの条件で振盪培養した。次にMain cultureとして、500 μl の振盪培養した菌液をアンピシリンを含む1 LのLB液体培地で16時間、37°C、150 rpmの条件で振盪培養した。培養した菌液をEndo-Free Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Code NO. 12362)を用いて抽出、精製したPlasmid DNAを電気泳動して確認した。



M1 : λ -Hind III DNA Marker
1 : pTRE-Tight 10 \times dil (1 μl)
2 : Clone 1918-15 10 \times dil (1 μl)
M2 : pUC119 (200ng/6 μl)

得られたPlasmid DNAを吸光度計 (Nanodrop Spectrophotometer : ND-1000) にて測定したところ、A260/A280のratioは2.00、濃度は2.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であり、純度の高いPlasmid DNAを得ることができた。

C-3. 細胞への遺伝子導入結果

細胞への遺伝子導入方法は、リポフェクション法とエレクトロポレーション法で検討した。

C-3-1. リポフェクション法による遺伝子導入

各種試薬のリポフェクション法（8試薬×4条件）を用いて遺伝子導入効率を検討した。なお、遺伝子導入実験の際に使用した培地はOpti-MEM I Reduced-Serum Medium、検討細胞はEHXV（J-TEC）、導入遺伝子はS-SV40を用いた。

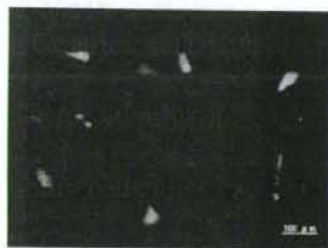
遺伝子導入24時間後に、蛍光倒立顕微鏡（Power IX-71、Olympus）を用いてDS-Redの蛍光（遺伝子が導入された細胞）が観察された細胞の割合は以下のとおりであった。

導入条件	1	2	3	4
Lipofectin Reagent	1.5	3.2	5.5	3.3
Lipofectamine 2000 Reagent	2.4	5.5	7.1	6.1
FuGENE	1.2	2.1	4.9	3.3
TurboFect in vitro Transfection	0.5	1.1	1.5	0.9
Nano Juice Transfection Kit	0.1	0.5	0.8	0.3
TransIT Transfection Reagent	0.4	1.5	2.1	1.7
GeneJet Transfection Reagent	0.9	1.1	2.8	1.5
Cellfect Transfection Kit	0.2	0.3	0.9	0.7

(%)

- ・ 導入条件 1 DNA : 試薬 = 1 : 1
- ・ 導入条件 2 DNA : 試薬 = 1 : 2
- ・ 導入条件 3 DNA : 試薬 = 1 : 3
- ・ 導入条件 4 DNA : 試薬 = 1 : 4

Lipofectamine 2000 Reagentにて導入条件 3（DNA : 試薬 = 1 : 3）で遺伝子導入を実施した時の細胞を蛍光倒立顕微鏡で観察した。



次に、遺伝子導入後に7日間培養した細胞を継代した後、再度、蛍光倒立顕微鏡を用いて、DS-Redの蛍光が観察された細胞は以下のとおりであった。

導入条件	1	2	3	4
Lipofectin Reagent	0.0	0.3	0.7	0.3
Lipofectamine 2000 Reagent	0.2	0.5	1.0	0.3
FuGENE	0.2	0.5	0.8	0.5
TurboFect in vitro Transfection	0.0	0.1	0.3	0.2
Nano Juice Transfection Kit	0.0	0.0	0.0	0.0
TransIT Transfection Reagent	0.0	0.0	0.2	0.0
GeneJet Transfection Reagent	0.0	0.0	0.2	0.0
Cellfect Transfection Kit	0.0	0.0	0.1	0.0

(%)

Lipofectamine 2000 Reagentにて導入条件 3（DNA : 試薬 = 1 : 3）で遺伝子導入を実施した時の細胞を蛍光倒立顕微鏡で観察した。



継代後にDS-Redの蛍光が観察された細胞は、遺伝子導入24時間後に観察された細胞よりも減少していた。遺伝子導入24時間後に観察された細胞は、一過性に発現が観察された細胞であり、継代後も観察された細胞は、遺伝子が定常発現している可能性がある。しかし、現段階では、蛍光が観察された細胞の増殖性は非常に悪かった。

C-3-2. エレクトロポレーション法による遺伝子導入

エレクトロポレーション法では、Gene Pulser Xcell (BIO-RAD) を使用した。 10^6 cell/ml の細胞に対して 2 mm のキュベットを使用し、以下の 8 条件で遺伝子導入を検討した。

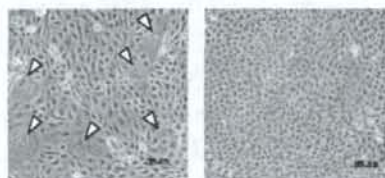
条件	波形	電圧 V	P. L.	Pulse 数
1	Exp	200	—	1
2	Exp	100	—	1
3	Exp	75	—	1
4	Squ	150	20	1
5	Squ	100	20	1
6	Squ	100	10	1
7	Squ	100	10	2
8	Squ	75	10	2

波形 Exp : Exponential Wave
 波形 Squ : Square Wave
 P. L. : Pulse length (msec)

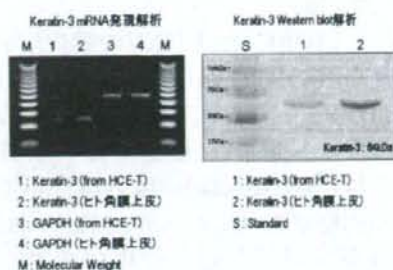
エレクトロポレーション法を用いた実験結果は、ほとんどの細胞に遺伝子導入されなかった。

C-4. HCE-T の Cloning と細胞特性

Integrin $\beta 1$ を細胞表面マーカーとして、Integrin $\beta 1$ 陽性細胞を分離したことにより、細胞形態を比較的揃えることができた。

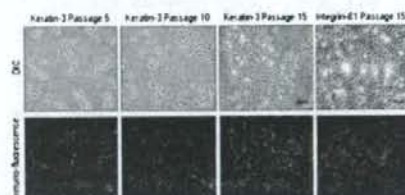


Cloning した HCE-T 細胞における角膜上皮細胞の特異的マーカーの 1 つである Keratin-3 の発現について、PCR と Western blot による解析を行った。



以上の結果から、Integrin $\beta 1$ で Cloning した HCE-T 細胞から Keratin-3 の mRNA と Keratin-3 のタンパク質が検出された。

さらに細胞継代による Keratin-3 と Integrin $\beta 1$ の発現について抗体を用いて細胞染色した。



以上の結果から、Integrin $\beta 1$ で Cloning した HCE-T 細胞は、継代しても Keratin-3 と Integrin $\beta 1$ の発現は発現し続けていた。

なお、既に三次元培養についての検討も開始しており、HCE-T 細胞が重層化することを倒立顕微鏡にて確認した。



D. まとめ

D-1-1. HCEC-2とEHXVの継代培養

無血清培地 (EpiLife-KG2: EpiLife™+HCGS) を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件では、HCEC-2細胞は3継代目で殆どの細胞が増殖しなくなった。EHXVは3継代目で細胞の膨化が顕著となり、4継代で細胞が殆ど増殖しなくなった。以上の結果から、いずれの細胞においても、無血清培地を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件では細胞を角膜上皮細胞の形態を維持した状態で継代培養することは困難であった。

D-1-2. HCE-2への遺伝子導入

HCEC2の遺伝子導入細胞をLipofection法で作成することは困難であった。HCEC2は購入時に既に3継代しており、角膜上皮幹/前駆細胞は含まれていない可能性が高いことから、円形の角膜上皮細胞の形態を維持することは困難であった。

C-2-1~4. 不死化遺伝子の構築

今年度の不死化遺伝子Vector構築では、SV40とhTERTの2種類のPlasmidを定常発現させるVectorと発現コントロールできるVectorの2種類に挿入し、4種類の不死化遺伝子Vectorを構築することができた。

また、SV40は、全長シーケンスのデータが無かったため、全長シーケンスも行い、リアルタイムPCRを実施する際に最も効率のよいPrimer-Probeを選定することができた。

D-3-1. リポフェクション法による遺伝子導入

8種類の試薬を各々4条件でDNA

と混合し、計32種類の条件でリポフェクション法を実施した。現段階において、Lipofectamine 2000 Reagentを用いて、試薬とDNAの割合を1:3で混合した場合が最も導入効率が良いことが分かった。しかし、完全な定常発現にまでは至っていない。この原因として、Vectorに挿入したSV40とhTERTのサイズが大きいこと、使用したDS-RedのVectorの蛍光強度が予想以上に低かったことなどにより、結果として、導入効率の判定が悪くなった。

D-3-2. リポフェクション法による遺伝子導入

最も多くの研究で使用されているエレクトロポレーター (Gene Pulser Xcell) を用いて検討を行ったが、結果としては、リポフェクション法よりも導入効率が悪いというのが、現段階での結果である。使用機器を変えて今後検討を行っていく。

D-4. HCE-TのCloningと細胞特性

不死化された角膜上皮細胞のHCE-Tは、Cloningされていない状態で分譲されている。そこで、角膜上皮細胞の特性の1つであるIntegrin β 1でソーティングし、Cloningを行った。その結果として、細胞形態を比較的揃えることができた。

次にCloningした細胞を継代培養し続けたところ、15継代後でも角膜上皮細胞マーカーのIntegrin β 1とKeratin-3のm-RNAとタンパク質の発現が観察された。なお、三次元培養についての検討も開始しており、HCE-T細胞が重層化することを倒立顕微鏡で確認した。

E. 考察と結論

正常ヒト角膜上皮細胞株を用いて、不死化遺伝子の導入を検討したが、現段階での研究成果では、不死化細胞株を確立することはできなかった。しかし、不死化遺伝子のPlasmidの作製は終了していることから、今年度に検討することができなかった試薬や方法を用いて、平成21年度の研究を展開する。

既報の論文において、角膜上皮細胞に遺伝子を導入する研究では、全てウイルスベクターを使用している。つまり、ウイルスベクターを用いなければ、角膜上皮細胞に遺伝子を導入することが難しいということを示しているのかもしれない。確かに、今年度に検討した方法は、一般的な研究で使用している方法の90%以上を検証しているが、遺伝子導入は成功しなかった。その一方で、本研究は“新規眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発”であることから、もし新しい角膜上皮細胞株が作製された場合、細胞を使用する環境が必ず管理された場所で実施されるということは保証されないことも考えられるため、ウイルスベクターを使用しない方がよいと考えている。

使用したVectorにおいては、定常発現Vectorと発現コントロールVectorでは、導入するVectorが1種類か2種類かの違いがある。遺伝子導入が他の細胞と比べて難しい角膜上皮細胞では、2種類のVectorを導入させる必要がある発現コントロールVectorによる細胞株の構築は、かなり難しいかもしれない。しかし、既にSV40の定常発現細胞であるHCE-Tでも、適切なCloningを行うことで、角膜上皮細胞の細胞特性を保持したまま継代し、さらに培養条件を変えることで分化す

る能力も保持しているのであれば、定常発現Vectorによる不死化角膜上皮細胞でも、眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で使用する細胞株としての条件は満たしていると考えている。なお、今年度は、細胞株樹立後の研究において、FITCやAlexa488などの緑の蛍光抗体を用いた研究が実施しやすいように、赤蛍光のDS-RedのVectorを用いたが、実際の実験結果としては、非常に蛍光が暗いため、平成21年度の研究では、GFPベクターに乗せ替える予定である。

平成21年度は、本研究の最終年度であるため、更なる検討を行い、眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で利用できる新規角膜上皮細胞株の作製と検討を行う。さらに三次元培養による角膜上皮モデルの構築と代替法標準物質（無刺激、MAS25、MAS50）による検討を行い、眼刺激性試験のGolden Standard法であるDraize法との比較・検討を行う。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
今のところ、新規特許出願については未定である。
本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせ

ない特許は以下のとおりである。

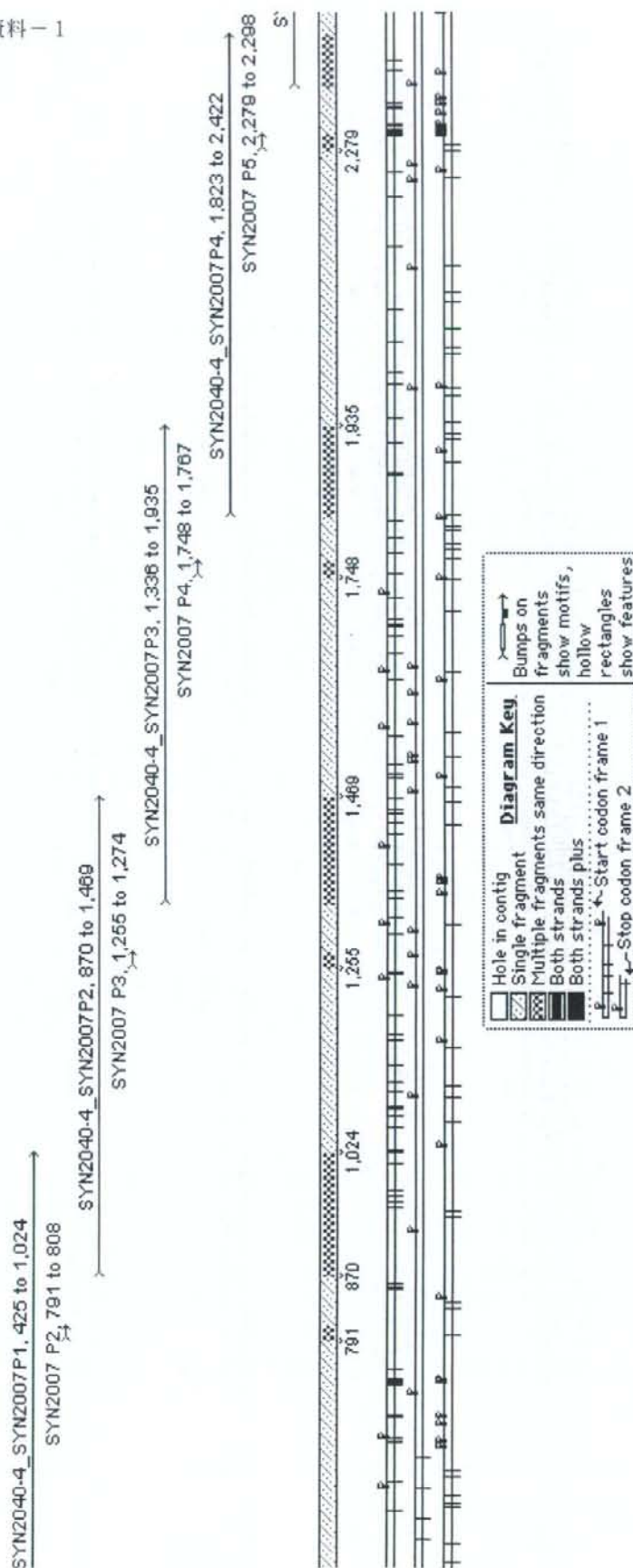
- ・ 標本作製に関する特許:『難浸透性組織迅速固定液(特許番号:3723204)』山本直樹ほか, 2005.
- ・ 新規幹細胞マーカーについての特許出願状況:『網膜幹細胞の分離方法および網膜幹細胞(出願番号:特願2006-279917)』山本直樹ほか, 2006.

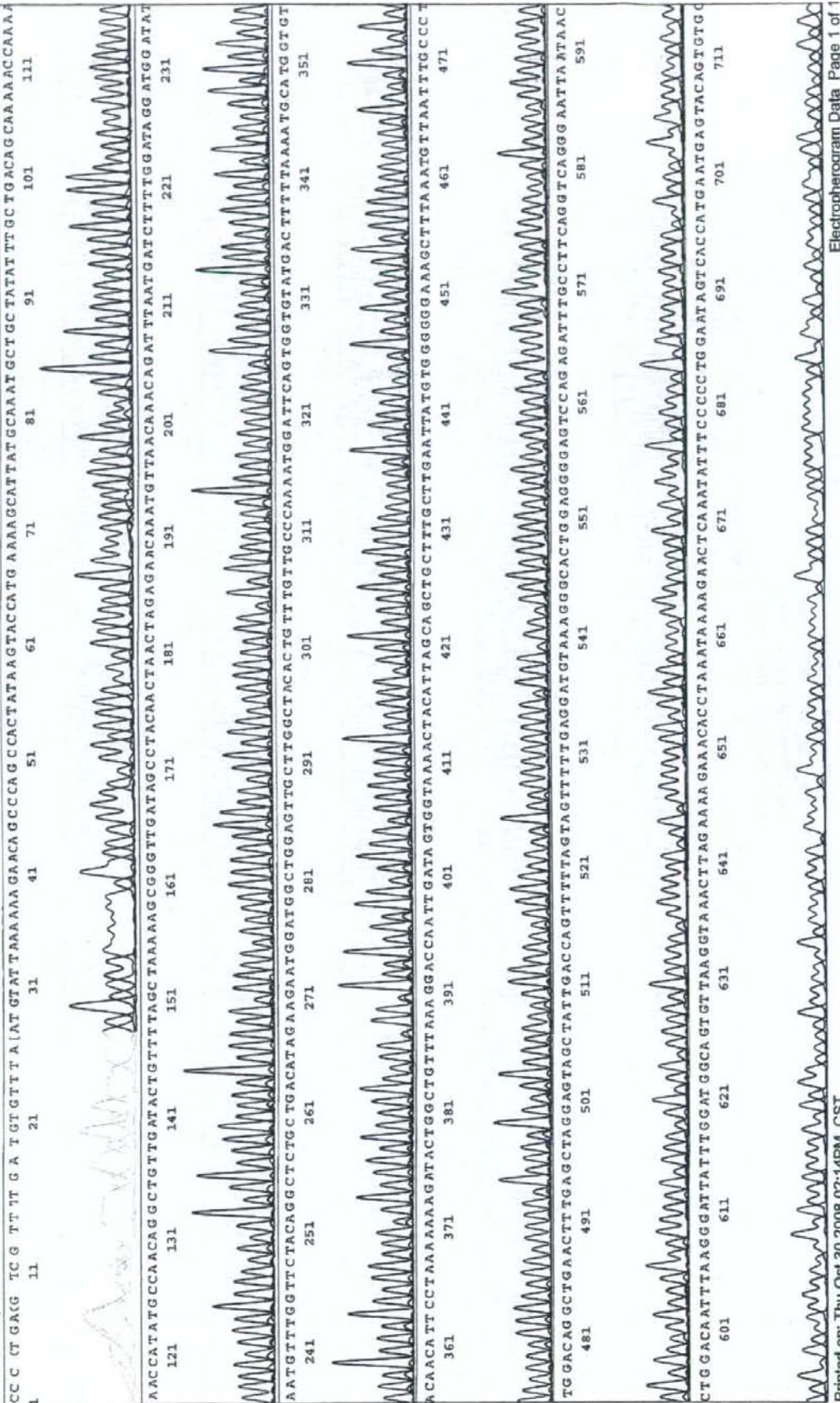
2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。





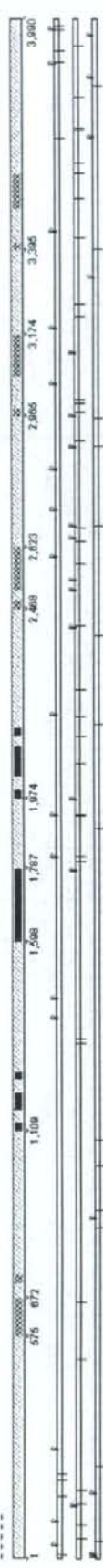
SV40 Large T Ag gene DNA シーケンス結果

GAATTCATGGATAAAGTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA
 GGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAATATTCTCTGATGAGAAAGGCATATTTAAA
 AAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAAGAAAAAATGAAGAAAA
 TGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAGTAAAATATGCTCATCAACCTGACT
 TTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGGTATTTGCTTCTTCCTTAAATCCTGGTGT
 GATGCAATATACTGCAAACAATGGCCTGAGTGTGCAAAAAAATGTCTACTAACTG
 CATATGCTTGTGTGCTTACTGAGGATGAAGCATGAAAATAGAAAATTATACAGGAA
 AGATCCACTTGTGTGGGTTGATTGCTACTGCTTCGATTGCTTTAGAATGTGGTTTG
 GACTTGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACT
 ACCTACAGAGATTTAAAGCTATAAGGTAAATATAAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTT
 AAATACTGATTCTAATTGTTTGTGATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATGAAT
 GGGAGCAGTGGTGAATGCCTTAATGAGGAAAACTGTTTTGCTCAGAAGAAAATG
 CCATCTAGTGTATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATCTACTCCTCCAAAAAAG
 AAGAGAAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTGTGAG
 TCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGTCTTTGCTATTTACACCACAAAGGA
 AAAAGCTGCACCTGCTATACAAAAAATATGGA AAAATATTCTGTAACTTTATAAG
 TAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGA
 GTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTAATTTGTA
 AAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTAACTAGAGATCCATTTTCTG
 TTATTGAGGAAAGTTTGCCTGGTGGGTTAAAGGAGCATGATTTAATCCAGAAGAA
 GCAGAGGAAACTAAACAAGTGTCCCTGGAAGCTTGTAACAGAGATGCAATGGAAAC
 AAAATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAAATTTTCAGTACAGTTT
 TGAAATGTGTTAAAATGTATTA AAAAAGAAGCCAGCCACTATAAGTACCATGA
 AAAGCATTATGCAATGCTGCTATATTGCTGACAGCAAAAACCAAAAAACCATATG
 CCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGCTAAAAAGCGGGTTGATAGCCTACAACATA
 CTAGAGAAAACAATGTTAAACAACAGATTTAATGATCTTTTTGGATAGGATGGATATA
 TGTGTTGGTTCTACAGGCTCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGGAGTTGCTGG
 CTACACTGTTTGTGCCCCAAAATGGATTTCAGTGGTGTATGACTTTTTAAAATGCATG
 GTGTACAACATTCCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATTGATAGTGGT
 AAAACTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGGGAAAGCTTTAAATGTT
 AATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACCTTGGAGCTAGGAGTAGCTATTGACCAGTTTTT
 AGTAGTTTTTGAGGATGTAAGGGCACTGGAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCA
 GGTCAAGGAATTAATAACCTGGACAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTAA
 GGTAACCTTAGAAAAGAAACACCTAAATAAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAAT
 AGTCAACCATGAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTA AAAC
 AAATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCAGTGAGTTTT
 TGTTAGAAAAGAGGATAATTCAAAAGTGGCATTGCTTTGCTTCTTATGTTAATTTGGT
 ACAGACCTGTGGCTGAGTTTGTCAAAGTATTCAGAGCAGAATTTGTGGAGTGGAAA
 GAGAGATTGGACAAAAGAGTTTAGTTTGTCAAGTGTATCAAAAAATGAAGTTAATGT
 GGCTATGGGAGTTGGAGTTTTAGATTGGCTAAGAAAACAGTGATGATGATGATGATG
 ACAGCCAGGAAAATGCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGA
 CTCAGGGCATGAAACAGGCATTGATTCA CAGTCTCAAGGCTCATTTCAGGCCCTC
AGCCCTCACAGTCTCACAGTCTGTTCA TGATCATAATCAGCCATATCACATCTGTA
GAGGTTTTACTTGTTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAA
 AATGAATGCAATTGTTGTTAACTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAA
 AGCAATAGCATCACAAATTTCAAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGT
 GGTGTTGCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCC

```

SYN1056-2_SYN1018P1_1 to 672
+SYN1056-2_SYN1018P2_576 to 1204
SYN1018 P1_715 to 732
SYN1018 P3_1108 to 1128
SYN1056-2_SYN1018P3_1164 to 1787
SYN1018 P2_1242 to 1259
SYN1056-2_SYN1018P4_1568 to 2107
SYN1018 P6_1974 to 1991
SYN1056-2_SYN1018P6_2031 to 2623
SYN1018 P4_2138 to 2155
SYN1018 P6_2468 to 2485
SYN1056-2_SYN1018P6_2515 to 3174
SYN1018 P7_2905 to 2982
SYN1056-2_SYN1018P7_3009 to 3587
SYN1018 P8_3305 to 3412
SYN1056-2_SYN1018P8_3501 to 3990

```



<ul style="list-style-type: none"> Hole in contig Single fragment Both fragments same direction Both strands plus low marks Start codon frame 1 Stop codon frame 2 	<p>Diagram Key</p> <ul style="list-style-type: none"> Bumps on fragments low marks rectangles show features
--	--

