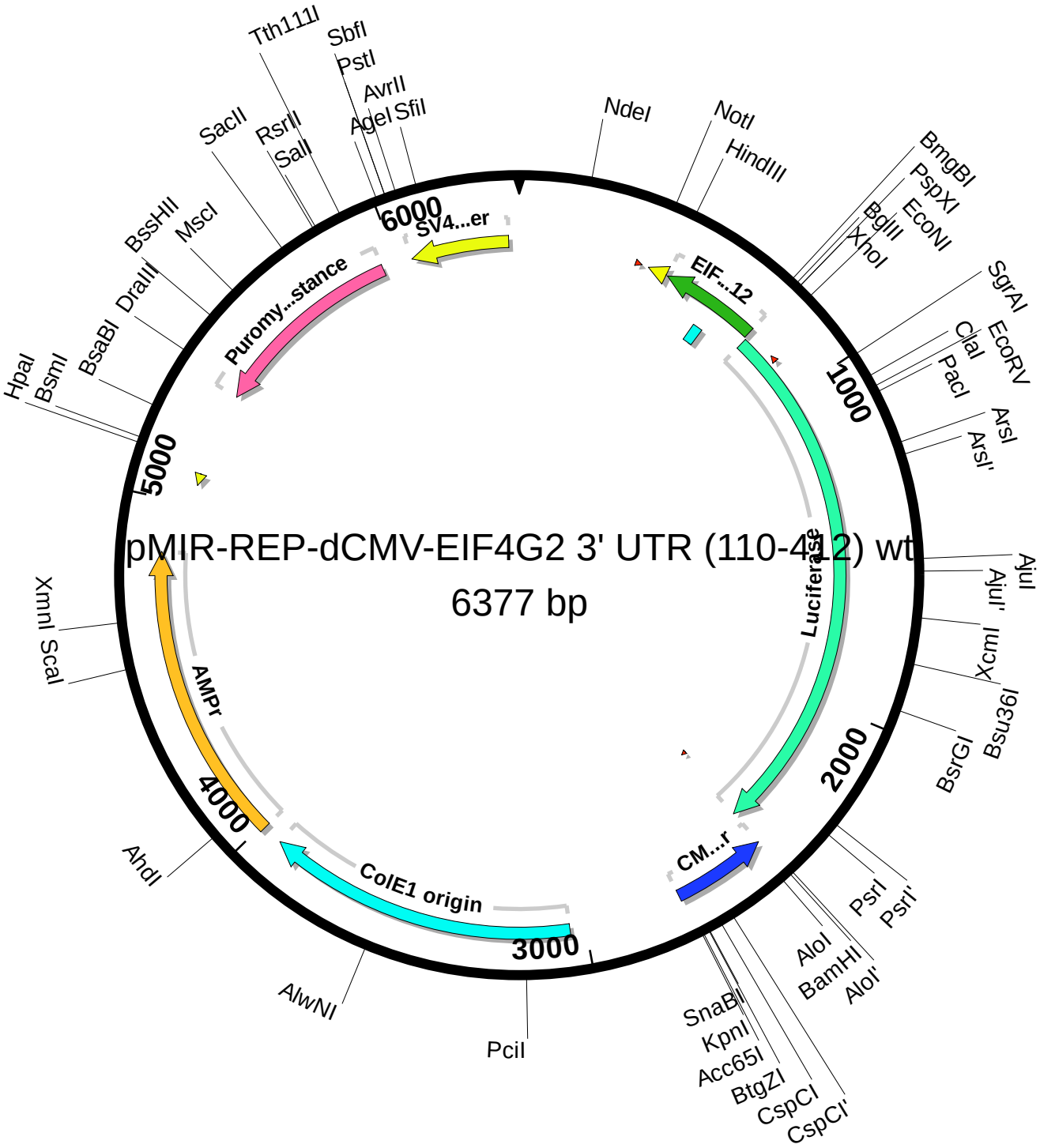
pMIR-REP-dCMV-EIF4G2 3' UTR (110-412) wt
6377 bp
Tth111I
SbfI
PstI
AvrII
AgeI
SfiI
SacII
RsrII
SalI
NdeI
NotI
HindIII
BmgBI
PspXI
BglII
EcoNI
XhoI
SgrAI
ClaI
EcoRV
PacI
ArsI
ArsI'
AjuI
AjuI'
XcmI
Bsu36I
BsrGI
PsrI
PsrI'
AloI
BamHI
AloI'
SnaBI
KpnI
Acc65I
BtgZI
CspCI
CspCI'
PciI
AlwNI
AhdI
ScaI
XmnI
HpaI
BsmI
BsaBI
DraIII
BssHII
MscI
6000
5000
4000
3000
2000
1000
SV4...er
Puromy...stance
EIF...12
Luciferase
CM...r
ColE1 origin
AMPr

Absent Sites	0	AarI,AbsI,AfeI,AflII,AleI,ApaI,AscI,AsiSI,BaeI,BaeI',BarI,BarI',BbvCI,BclI,BlpI,Bpu10I,BsgI,BstXI,BstZ17I,EcoICRI,FalI,FalI',FseI,FspAI,MauBI,MluI,MreI,NaeI,NgoMIV,NruI,PasI,PflMI,PmeI,PmlI,PshAI,PspOMI,SacI,SanDI,SgrDI,SpeI,SrfI,SwaI
Acc65I	1	2707 (6377)
AgeI	1	6010 (6377)
AhdI	1	4064 (6377)
AjuI	1	1553 (6377)
AjuI'	1	1585 (6377)
AloI	1	2466 (6377)
AloI'	1	2434 (6377)
AlwNI	1	3587 (6377)
ArsI	1	1254 (6377)
ArsI'	1	1286 (6377)
AvrII	1	6061 (6377)
BamHI	1	2442 (6377)
BglII	1	772 (6377)
BmgBI	1	757 (6377)
BsaBI	1	5226 (6377)
BsmI	1	5139 (6377)
BsrGI	1	1943 (6377)
BssHII	1	5494 (6377)
Bsu36I	1	1821 (6377)
BtgZI	1	2692 (6377)
ClaI	1	1070 (6377)
CspCI	1	2656 (6377)
CspCI'	1	2621 (6377)
DraIII	1	5385 (6377)
EcoNI	1	819 (6377)
EcoRV	1	1099 (6377)
HindIII	1	463 (6377)
HpaI	1	5125 (6377)
KpnI	1	2711 (6377)
MscI	1	5578 (6377)
NdeI	1	185 (6377)
NotI	1	407 (6377)
PacI	1	1115 (6377)
PciI	1	3171 (6377)
PspXI	1	783 (6377)
PsrI	1	2304 (6377)
PsrI'	1	2272 (6377)
PstI	1	6033 (6377)
RsrII	1	5834 (6377)
SacII	1	5741 (6377)
SalI	1	5841 (6377)
SbfI	1	6033 (6377)
ScaI	1	4544 (6377)
SfiI	1	6115 (6377)
SgrAI	1	1005 (6377)
SnaBI	1	2690 (6377)
Tth111I	1	5910 (6377)
XcmI	1	1703 (6377)
XhoI	1	783 (6377)
XmnI	1	4663 (6377)

```
5'  TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  100
3'  AGCGCGCAAAGCCACTACTGCCACTTTTGGAGACTGTGTACGTCGAGGGCCTCTGCCAGTGTCGAACAGACATTCGCCTACGGCCCTCGTCTGTTCGGGC
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                                                                NdeI
5'  TCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  200
3'  AGTCCCGCGCAGTCGCCCACAACCGCCCACAGCCCCGACCGAATTGATACGCCGTAGTCTCGTCTAACATGACTCTCACGTGGTATACGCCACACTTTAT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  300
3'  GGCGTGTCTACGCATTCCTCTTTTATGGCGTAGTCCGCGGTAAGCGGTAAGTCCGACGCGTTGACAACCCTTCCCGCTAGCCACGCCCGGAGAAGCGATA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  400
3'  ATGCGGTCGACCGCTTTCCCCCTACACGACGTTCCGCTAATTCAACCCATTGCGGTCCCAAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACGGTT
o                                                                  pMIR-REPS seq fwd
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o           NotI                                                   HindIII
5'  GCTAGCGGCCGCATACAAAAAACCAACACACAGATCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTATTAAGCTTCAAATGGATAATCAAATATTGCAACAACTCAAG
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  500
3'  CGATCGCCGGCGTATGTTTTTTGGTTGTGTGTCTAGGTTACTTTTATTTTCTAGGAAATAATTCGAAGTTTACCTATTAGTTTATAACGTTGTTGAGTTC
o       SV40 Poly A Signal                                                 EIF4G2 3' UTR 110-412
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  TATTACTGAGCAAAGTGCATTTCTACAGTATTCAGTGTTGCTATTCAGTTTTCTAACTTAAAACAGCCTATGATAACTGGCAGCAAAGAAGGTCCTTGCA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  600
3'  ATAATGACTCGTTTCACGTAAAGATGTCATAAGTCACAACGATAAGTCAAAAGATTGAATTTTGTCGGATACTATTGACCGTCGTTTCTTCCAGGAACGT
o                                   EIF4G2 3' UTR 110-412
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  ATAGACTGCCTCTGCTTGAGAACTTATGATGTAATTATTGCATGCTGCTAATATACTATCTAAACATTAAAGATACTCCTAAAATATTTGATGGTAGACT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  700
3'  TATCTGACGGAGACGAACTCTTGAATACTACATTAATAACGTACGACGATTATATGATAGATTTGTAATTTCTATGAGGATTTTATAAACTACCATCTGA
o                   miR-146a
o                                   EIF4G2 3' UTR 110-412
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                                                          PspXI
o                                                          BmgBI          BglII           XhoI
5'  ATGATTAAGACATTACACTACAAAAAAACCTTATGCAGAAGGAAATCCTAACTGACGTGCTTCTGCTTTAAGATCTCATCACTCGAGCAATTTGGACTTT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  800
3'  TACTAATTCTGTAATGTGATGTTTTTTTGGAATACGTCTTCCTTTAGGATTGACTGCACGAAGACGAAATTCTAGAGTAGTGAGCTCGTTAAACCTGAAA
o                                   EIF4G2 3' UTR 110-412                                  Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                   EcoNI
5'  CCGCCCTTCTTGGCCTTTATGAGGATCTCTCTGATTTTTCTTGCGTCGAGTTTTCCGGTAAGACCTTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAACTCCTCCGC
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  900
3'  GGCGGGAAGAACCGGAAATACTCCTAGAGAGACTAAAAAGAACGCAGCTCAAAAGGCCATTCTGGAAAGCCATGAAGCAGGTGTTTGTGTTGAGGAGGCG
o                                                                  pMIR-REP seq rev
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
```

```
5'  GCAACTTTTTCGCGGTTGTTACTTGACTGGCGACGTAATCCACGATCTCTTTTTCCGTCATCGTCTTTCCGTGCTCCAAAACAACAACGGCGGCGGGAAG
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1000
3'  CGTTGAAAAAGCGCCAACAATGAACTGACCGCTGCATTAGGTGCTAGAGAAAAAGGCAGTAGCAGAAAGGCACGAGGTTTTGTTGTTGCCGCCGCCCTTC
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o        SgrAI                                                                  ClaI                    EcoRV
5'  TTCACCGGCGTCATCGTCGGGAAGACCTGCCACGCCCGCGTCGAAGATGTTGGGGTGTTGTAACAATATCGATTCCAATTCAGCGGGGGCCACCTGATAT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1100
3'  AAGTGGCCGCAGTAGCAGCCCTTCTGGACGGTGCGGGCGCAGCTTCTACAACCCCACAACATTGTTATAGCTAAGGTTAAGTCGCCCCCGGTGGACTATA
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                  PacI
5'  CCTTTGTATTTAATTAAAGACTTCAAGCGGTCAACTATGAAGAAGTGTTCGTCTTCGTCCCAGTAAGCTATGTCTCCAGAATGTAGCCATCCATCCTTGT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1200
3'  GGAAACATAAATTAATTTCTGAAGTTCGCCAGTTGATACTTCTTCACAAGCAGAAGCAGGGTCATTCGATACAGAGGTCTTACATCGGTAGGTAGGAACA
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                       ArsI                        ArsI'
5'  CAATCAAGGCGTTGGTCGCTTCCGGATTGTTTACATAACCGGACATAATCATAGGTCCTCTGACACATAATTCGCCTCTCTGATTAACGCCCAGCGTTTT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1300
3'  GTTAGTTCCGCAACCAGCGAAGGCCTAACAAATGTATTGGCCTGTATTAGTATCCAGGAGACTGTGTATTAAGCGGAGAGACTAATTGCGGGTCGCAAAA
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  CCCGGTATCCAGATCCACAACCTTCGCTTCAAAAAATGGAACAACTTTACCGACCGCGCCCGGTTTATCATCCCCCTCGGGTGTAATCAGAATAGCTGAT
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1400
3'  GGGCCATAGGTCTAGGTGTTGGAAGCGAAGTTTTTTACCTTGTTGAAATGGCTGGCGCGGGCCAAATAGTAGGGGGAGCCCACATTAGTCTTATCGACTA
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  GTAGTCTCAGTGAGCCCATATCCTTGTCGTATCCCTGGAAGATGGAAGCGTTTTGCAACCGCTTCCCCGACTTCTTTCGAAAGAGGTGCGCCCCCAGAAG
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1500
3'  CATCAGAGTCACTCGGGTATAGGAACAGCATAGGGACCTTCTACCTTCGCAAAACGTTGGCGAAGGGGCTGAAGAAAGCTTTCTCCACGCGGGGGTCTTC
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                       AjuI                        AjuI'
5'  CAATTTCGTGTAAATTAGATAAATCGTATTTGTCAATCAGAGTGCTTTTGGCGAAGAATGAAAATAGGGTTGGTACTAGCAACGCACTTTGAATTTTGTA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1600
3'  GTTAAAGCACATTTAATCTATTTAGCATAAACAGTTAGTCTCACGAAAACCGCTTCTTACTTTTATCCCAACCATGATCGTTGCGTGAAACTTAAAACAT
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'  ATCCTGAAGGGATCGTAAAAACAGCTCTTCTTCAAATCTATACATTAAGACGACTCGAAATCCACATATCAAATATCCGAGTGTAGTAAACATTCCAAAA
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1700
3'  TAGGACTTCCCTAGCATTTTTGTCGAGAAGAAGTTTAGATATGTAATTCTGCTGAGCTTTAGGTGTATAGTTTATAGGCTCACATCATTTGTAAGGTTTT
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o     XcmI
5'  CCGTGATGGAATGGGACAACACTTAAAATCGCAGTATCCGGAACGATTTGATTGCCAAAAATAGGATCTCTGGCATGCGAGAATCTGACGCAGGCAGTTC
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  1800
3'  GGCACTACCTTACCCTGTTGTGAATTTTAGCGTCATAGGCCTTGCTAAACTAACGGTTTTTATCCTAGAGACCGTACGCTCTTAGACTGCGTCCGTCAAG
o                                                   Luciferase
o   ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
```

```
                                Bsu36I
5'  TATGCGGAAGGGCCACACCCTTAGGTAACCCAGTAGATCCAGAGGAATTCATTATCAGTGCAATTGTTTTGTCACGATCAAAGGACTCTGGTACAAAATC
                                                                                                          1900
3'  ATACGCCTTCCCGGTGTGGGAATCCATTGGGTCATCTAGGTCTCCTTAAGTAATAGTCACGTTAACAAAACAGTGCTAGTTTCCTGAGACCATGTTTTAG
                                                                Luciferase

                                                BsrGI
5'  GTATTCATTAAAACCGGGAGGTAGATGAGATGTGACGAACGTGTACATCGACTGAAATCCCTGGTAATCCGTTTTAGAATCCATGATAATAATTTTCTGG
                                                                                                          2000
3'  CATAAGTAATTTTGGCCCTCCATCTACTCTACACTGCTTGCACATGTAGCTGACTTTAGGGACCATTAGGCAAAATCTTAGGTACTATTATTAAAAGACC
                                                                Luciferase

5'  ATTATTGGTAATTTTTTTTGCACGTTCAAAATTTTTTGCAACCCCTTTTTGGAAACAAACACTACGGTAGGCTGCGAAATGTTCATACTGTTGAGCAATT
                                                                                                          2100
3'  TAATAACCATTAAAAAAAACGTGCAAGTTTTAAAAAACGTTGGGGAAAAACCTTTGTTTGTGATGCCATCCGACGCTTTACAAGTATGACAACTCGTTAA
                                                                Luciferase

5'  CACGTTCATTATAAATGTCGTTCGCGGGCGCAACTGCAACTCCGATAAATAACGCGCCCAACACCGGCATAAAGAATTGAAGAGAGTTTTCACTGCATAC
                                                                                                          2200
3'  GTGCAAGTAATATTTACAGCAAGCGCCCGCGTTGACGTTGAGGCTATTTATTGCGCGGGTTGTGGCCGTATTTCTTAACTTCTCTCAAAAGTGACGTATG
                                                                Luciferase

                                                                                        PsrI'
5'  GACGATTCTGTGATTTGTATTCAGCCCATATCGTTTCATAGCTTCTGCCAACCGAACGGACATTTCGAAGTATTCCGCGTACGTGATGTTCACCTCGATA
                                                                                                          2300
3'  CTGCTAAGACACTAAACATAAGTCGGGTATAGCAAAGTATCGAAGACGGTTGGCTTGCCTGTAAAGCTTCATAAGGCGCATGCACTACAAGTGGAGCTAT
                                                                Luciferase

      PsrI
5'  TGTGCATCTGTAAAAGCAATTGTTCCAGGAACCAGGGCGTATCTCTTCATAGCCTTATGCAGTTGCTCTCCAGCGGTTCCATCCTCTAGAGGATAGAATG
                                                                                                          2400
3'  ACACGTAGACATTTTCGTTAACAAGGTCCTTGGTCCCGCATAGAGAAGTATCGGAATACGTCAACGAGAGGTCGCCAAGGTAGGAGATCTCCTATCTTAC
                                                                Luciferase

                                        AloI'     BamHI                   AloI
5'  GCGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCATGGTGGATCCACGGTTCACTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACC
                                                                                                          2500
3'  CGCGGCCCGGAAAGAAATACAAAAACCGCAGAAGGTACCACCTAGGTGCCAAGTGATTTGGTCGAGACGAATATATCTGGAGGGTGGCATGTGCGGATGG
                                Luc 3' seq fwd primer                   CMV enhancer promoter
                                Luciferase

5'  GCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGA
                                                                                                          2600
3'  CGGGTAAACGCAGTTACCCCGCCTCAACAATGCTGTAAAACCTTTCAGGGCAACTAAAACCACGGTTTTGTTTGAGGGTAACTGCAGTTACCCCACCTCT
                                                                CMV enhancer promoter

                                                                                                SnaBI
                                CspCI'                                  CspCI                   BtgZI
5'  CTTGGAAATCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACgtaggttcact
                                                                                                          2700
3'  GAACCTTTAGGGGCACTCAGTTTGGCGATAGGTGCGGGTAACTACATGACGGTTTTGGCGTAGTGGTACCATTATCGCTACTGATTATGcatccaagtga
                                                                CMV enhancer promoter
```

Acc65I
KpnI

5' GATCTGGTACCTTGAATTCATGCTTCTCCTCCCTTTAGTGAGGGTAATTCTCTCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCCTTCTCTTCTATAGTGT
3' CTAGACCATGGAACTTAAGTACGAAGAGGAGGGAAATCACTCCCATTAAGAGAGAGAGAGGGATATCACTCAGCATAATTAAGGAAGAGAAGATATCACA 2800

CMV enhancer promoter

5' CACCTAAATCGTTGCAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAA
3' GTGGATTTAGCAACGTTAAGCATTAGTACAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGAGTGTTAAGGTGTGTTGTATGCTCGGCCTTCGTATTT 2900

5' GTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT
3' CACATTTCGGACCCCACGGATTACTCACTCGATTGAGTGTAATTAACGCAACGCGAGTGACGGGCGAAAGGTCAGCCCTTTGGACAGCACGGTCGACGTA 3000

5' TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGC
3' ATTACTTAGCCGGTTGCGCGCCCCTCTCCGCCAAACGCATAACCCGCGAGAAGGCGAAGGAGCGAGTGACTGAGCGACGCGAGCCAGCAAGCCGACGCCG 3100

ColE1 origin

PciI

5' GAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
3' CTCGCCATAGTCGAGTGAGTTTCCGCCATTATGCCAATAGGTGTCTTAGTCCCCTATTGCGTCCTTTCTTGTACACTCGTTTTCCGGTCGTTTTCCGGTC 3200

ColE1 origin

5' GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
3' CTTGGCATTTTTCCGGCGCAACGACCGCAAAAAGGTATCCGAGGCGGGGGGACTGCTCGTAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTTGGGC 3300

ColE1 origin

5' ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCC
3' TGTCCTGATATTTCTATGGTCCGCAAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAGG 3400

ColE1 origin

5' CTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT
3' GAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTATCGAGTGCGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCGACCCGACACACGTGCTTGGGGGGCA 3500

ColE1 origin

AlwNI

5' TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
3' AGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCGTCGGTGACCATTGTCCTAA 3600

ColE1 origin

5' AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
3' TCGTCTCGCTCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTCTTGTCATAAACCATAGACGCGAGACGACT 3700

ColE1 origin

```
5'  AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAAAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG
                                                                                                  3800
3'  TCGGTCAATGGAAGCCTTTTTCTCAACCATCGAGAACTAGGCCGTTTTTTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAAACAAACGTTCGTCGTCTAATGCGC
                                                ColE1 origin

5'  CAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA
                                                                                                  3900
3'  GTCTTTTTTTCCTAGAGTTCTTCTAGGAAACTAGAAAAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACCTTGCTTTTGAGTGCAATTCCCTAAAACCAGTACTCTAAT
                                                ColE1 origin

5'  TCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCT
                                                                                                  4000
3'  AGTTTTTCCTAGAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTTCATATATACTCATTTGAACCAGACTGTCAATGGTTACGA
                ColE1 origin                                                                  AMPr

                                                                AhdI
5'  TAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC
                                                                                                  4100
3'  ATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGACAGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACTGAGGGGCAGCACATCTATTGATGCTATGCCCTCCCGAATGG
                                                AMPr

5'  ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGT
                                                                                                  4200
3'  TAGACCGGGGTCACGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGGTCTAAATAGTCGTTATTTGGTCGGTCGGCCTTCCCGGCTCGCGTCTTCA
                                                AMPr

5'  GGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
                                                                                                  4300
3'  CCAGGACGTTGAAATAGGCGGAGGTAGGTCAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCATTCATCAAGCGGTCAATTATCAAACGCGTTGCAACAACGGT
                                                AMPr

5'  TTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTG
                                                                                                  4400
3'  AACGATGTCCGTAGCACCACAGTGCGAGCAGCAAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGCTCAATGTACTAGGGGGTACAACAC
                                                AMPr

5'  CAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
                                                                                                  4500
3'  GTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCAACCGGCGTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCGTGACGTATTAAGAGAA
                                                AMPr

                                                ScaI
5'  ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
                                                                                                  4600
3'  TGACAGTACGGTAGGCATTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCACATACGCCGCTGGCTCAACGAGAACGGGCC
                                                AMPr

                                                                XmnI
5'  CGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCT
                                                                                                  4700
3'  GCAGTTATGCCCTATTATGGCGCGGTGTATCGTCTTGAAATTTTCACGAGTAGTAACCTTTTGCAAGAAGCCCCGCTTTTGAGAGTTCCTAGAATGGCGA
                                                AMPr
```

```
5'   GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  4800
3'   CAACTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTTGACTAGAAGTCGTAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGTTTTTGTCCTTCCGTT
o                                                                    AMPr
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'   AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCA
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  4900
3'   TTACGGCGTTTTTTCCCTTATTCCCGCTGTGCCTTTACAACTTATGAGTATGAGAAGGAAAAAGTTATAATAACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGT
o                                  AMPr
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'   TGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5000
3'   ACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTTTTTATTTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTCACGGTGGACTGCAGATTCTTTGGTAATA
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'   TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGATTGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACC
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5100
3'   ATAGTACTGTAATTGGATATTTTTATCCGCATAGTGCTCTAACGTCACTTTTTTTACGAAATAAACACTTTAAACACTACGATAACGAAATAAACATTGG
o                                                                                SV40 Poly A
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                  HpaI                BsmI
5'   ATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACC
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5200
3'   TAATATTCGACGTTATTTGTTCAATTGTTGTTGTTAACGTAAGTAAAATACAAAGTCCAAGTCCCCCTCCACACCCTCCAAAAAATTTCGTTCATTTTGG
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                  BsaBI
5'   TCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTCTAGAGTCGGTGGGCCTCGGGGGCGGGTGCGGGGTCGGCGGGGCCGCCCCGGGTGGCTTCGGTCGGAG
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5300
3'   AGATGTTTACACCATACCGACTAATACTAGGAGATCTCAGCCACCCGGAGCCCCCGCCCACGCCCCAGCCGCCCCGGCGGGGCCCACCGAAGCCAGCCTC
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                                                                DraIII
5'   CCATGGGGTCGTGCGCTCCTTTCGGTCGGGCGCTGCGGGTCGTGGGGCGGGCGTCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCATGCACCAGGTGCGCGGTCCTTCGG
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5400
3'   GGTACCCCAGCACGCGAGGAAAGCCAGCCCGCGACGCCCAGCACCCCGCCCGCAGTCCGTGGCCCGAACGCCCAGTACGTGGTCCACGCGCCAGGAAGCC
o                                                                                Puromycin resistance
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                                                                BssHII
5'   GCACCTCGACGTCGGCGGTGACGGTGAAGCCGAGCCGCTCGTAGAAGGGGAGGTTGCGGGGCGCGGAGGTCTCCAGGAAGGCGGGCACCCCGGCGCGCTC
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5500
3'   CGTGGAGCTGCAGCCGCCACTGCCACTTCGGCTCGGCGAGCATCTTCCCCTCCAACGCCCCGCGCCTCCAGAGGTCCTTCCGCCCGTGGGGCCGCGCGAG
o                                                Puromycin resistance
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
o                                                                                    MscI
5'   GGCCGCCTCCACTCCGGGGAGCACGACGGCGCTGCCCAGACCCTTGCCCTGGTGGTCGGGCGAGACGCCGACGGTGGCCAGGAACCACGCGGGCTCCTTG
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5600
3'   CCGGCGGAGGTGAGGCCCCTCGTGCTGCCGCGACGGGTCTGGGAACGGGACCACCAGCCCGCTCTGCGGCTGCCACCGGTCCTTGGTGCGCCCGAGGAAC
o                                                Puromycin resistance
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
5'   GGCCGGTGCGGCGCCAGGAGGCCTTCCATCTGTTGCTGCGCGGCCAGCCGGGAACCGCTCAACTCGGCCATGCGCGGGCCGATCTCGGCGAACACCGCCC
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|  5700
3'   CCGGCCACGCCGCGGTCCTCCGGAAGGTAGACAACGACGCGCCGGTCGGCCCTTGGCGAGTTGAGCCGGTACGCGCCCGGCTAGAGCCGCTTGTGGCGGG
o                                                Puromycin resistance
o    ++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|++++|
o
```

SacII

5' CCGCTTCGACGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACCGCCACCGCGGCGCCGTCGTCCGCGACCCACACCTTGCCGATGTCGAGCCCGACGCGCGTGAGGAAGAG 5800
3' GGCGAAGCTGCGAGAGGCCGCACCAGGTCTGGCGGTGGCGCCGCGGCAGCAGGCGCTGGGTGTGGAACGGCTACAGCTCGGGCTGCGCGCACTCCTTCTC

Puromycin resistance

RsrII SalI

5' TTCTTGCAGCTCGGTGACCCGCTCGATGTGGCGGTCCGGGTCGACGGTGTGGCGCGTGGCGGGGTAGTCGGCGAACGCGGCGGCGAGGGTGCGTACGGCC 5900
3' AAGAACGTCGAGCCACTGGGCGAGCTACACCGCCAGGCCCAGCTGCCACACCGCGCACCGCCCCATCAGCCGCTTGCGCCGCCGCTCCCACGCATGCCGG

Puromycin resistance

Tth111I

5' CGGGGGACGTCGTCGCGGGTGGCGAGGCGCACCGTGGGCTTGTACTCGGTCATGGAAGGTCGTCTCCTTGTGAGGGGTCAGGGGCGTGGGTCAGGGGATG 6000
3' GCCCCCTGCAGCAGCGCCCACCGCTCCGCGTGGCACCCGAACATGAGCCAGTACCTTCCAGCAGAGGAACACTCCCCAGTCCCCGCACCCAGTCCCCTAC

Puromycin resistance

AgeI SbfI PstI AvrII

5' GTGGCGGCACCGGTCGTGGCGGCCGACCTGCAGGCATGCAAGCTAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAG 6100
3' CACCGCCGTGGCCAGCACCGCCGGCTGGACGTCCGTACGTTCGATCGAAAAACGTTTTCGGATCCGGAGGTTTTTTCGGAGGAGTGATGAAGACCTTATC

SV40 Promoter

SfiI

5' CTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATG 6200
3' GAGTCTCCGGCTCCGCCGGAGCCGGAGACGTATTTATTTTTTTTAATCAGTCGGTACCCCGCCTCTTACCCGCCTTGACCCGCCTCAATCCCCGCCCTAC

SV40 Promoter

5' GGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTG 6300
3' CCGCCTCAATCCCCGCCCTGATACCAACGACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCGGACCCCTGAAAGGTGTGGACCAAC

SV40 Promoter

5' CTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCAATCTTTCGTC 6377
3' GACTGATTAACTCTACGTACGAAACGTATGAAGACGGACGACCCCTCGGACCCCTGAAAGGTGTGGTTAGAAAGCAG

SV40 Promoter