

國立交通大學

生物科技學院  
生化工程研究所

碩士論文

藉由修飾腺相關病毒 VP1-3 建立胜肽導引式基因傳遞系統

Establishment of peptide-directed gene delivery system by modifying

VP1-3 of AAV

研究生：田竣元

指導教授：廖光文 博士

中華民國九十五年十二月

藉由修飾腺相關病毒 VP1-3 建立胜肽導引式基因傳遞系統

Establishment of peptide-directed gene delivery system by modifying  
VP1-3 of AAV

研究生：田竣元

Student：Jiun-Yuan Tian

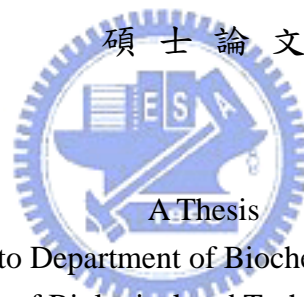
指導教授：廖光文

Adviser：Dr. Kuang-Wen Liao, Ph.D.

國立交通大學

生物科技學院

生化工程研究所



Submitted to Department of Biochemical Engineering  
College of Biological and Technology Science  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master  
in

Biochemical Engineering

December 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年十二月





# 藉由修飾腺相關病毒 VP1-3 建立胜肽導引式基因傳遞系統

學生：田竣元

指導教授：廖光文 博士

國立交通大學 生化工程所 碩士班

## 中文摘要

重組腺相關病毒(Recombinant Adeno-associated virus, rAAV)具有許多基因治療上的優點，因此成為近來最常被研究的基因治療載體之一。此一基因治療載體由兩個部份所構成：1)由六十個病毒蛋結構蛋白 (VP1-3) 組裝的蛋白質外殼 2)包裹攜帶治療用基因的單股 DNA。重組腺相關病毒感染宿主細胞，主要是利用其病毒結構蛋白上的 Heparin binding site 與宿主細胞表面受器 HSPG 黏附，經由內吞作用 (endocytosis) 被帶到細胞內部並由運輸系統將其送至細胞核，完成整個感染的流程。在整個感染過程中，病毒結構蛋白上的 Heparin binding site 擔任與細胞交互作用的窗口，扮演影響感染細胞種類的關鍵角色。

我們的實驗目的就是修飾重組腺相關病毒的病毒結構蛋白上的 Heparin binding site，使得重組腺相關病毒可以專一性的傳遞治療用基因到適當的細胞組織中。因為病毒結構蛋白上的 Heparin binding site 可與細胞表面接受器 HSPG 黏附，導致重組腺相關病毒廣泛的感染人類細胞，因此我們在不改變病毒外殼結構的情況下，將 Heparin binding site 做突變，使其失去與細胞表

面接受器 HSPG 黏附的能力，解決病毒廣泛感染人類細胞的問題。在導引重組腺相關病毒到特定種類的細胞中，我們在病毒已突變的 Heparin binding site 嵌入由 phage display 所篩選出的細胞專一性胜肽，引導病毒專一性的將治療用基因送到目標細胞中。此一系統的建立，提供一個利用嵌入細胞專一性胜肽而改變重組腺病毒相關病毒感染趨性的平台，提升基因治療的效率。



# **Establishment of peptide-directed gene delivery system by modifying VP1-3 of AAV**

Student : Jiun-Yuan Tian

Adviser : Dr. Kuang-Wen Liao

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

## **Abstract**

Recombinant Adeno-associated virus (rAAV) is one of the most commonly used vectors in markets. It is composed of two components, 1) a capsid with 60 viral protein subunits (VP1-3), and 2) encapsulated single-stranded DNA that carries therapeutic genes. rAAV infects its host by its binding of heparin-binding site on VPs to the HSPG on the host surface. The virus is then rapidly internalized and carried to the nucleus by the intracellular trafficking system, completing its infection cycle. Therefore, during infection, heparin-binding site serves as a key role in the cross talk between rAAV and its host.

Our purpose is to modify the heparin-binding sites on the VPs of rAAV so that it can specifically bind to the target cells that we desire. Because the heparin-binding sites on rAAV can bind to the HSPG on human cells, we mutated heparin-binding sites to damage its binding capability to human HSPG without a conformational change in the VP1-3. Then, a specific peptide selected by the phage display system was inserted into the heparin-binding sites, leading the viruses to a specific target for gene therapy. By the inserting a peptide specific to a certain tissue and mutating the heparin-binding sites, we have successfully created a platform to raise the efficiency of gene therapy.

## 誌謝

『只剩我和你了。』經過漫漫長夜，收拾完桌上使用的儀器後，我這樣說著。兩年多來，始終陪著我的實驗室，記錄著我的快樂、悲傷、努力與荒誕，讓我在最低潮的時候，知道我不是一個人；在我完成實驗的時候，分享我的喜悅。謝謝你，我的朋友。

廖博，我的指導教授，是我最想感謝的人，不僅是在研究方面的指導。許多個夜晚，已經背好包包要回家的老師，看到我還在實驗室，就坐下來陪我聊實驗、討論人生，啟蒙我為人處事的道理。為了能夠讓我們這幾個能夠順利畢業，每天和我們討論畢業的事宜。辛苦你了，老師。真的非常感謝你們，個性很傻大姐的靜宜學姐、很 man 的國欽學長和精明的亦涵學姐，你們是實驗室的支柱，不僅僅是因為你們建構了這個實驗室，也因為你們，我有著一段很快樂的回憶。上知和弘育，是和我一起革命的好弟兄，那段推翻實驗做不出來的日子，是我最傷身但也是最快樂的時光。詩涵，實驗室裡面的英文高手，感謝妳在英文上的指導，還有在實驗室中創造歡樂的氣氛。Chenyu、Dg、James、和 RT，謝謝你們在實驗室的維護與管理上的盡心盡力，大家的實驗才能夠順利進行。莊厚厚，謝謝你在我實驗中的幫忙，使得我不用操心純化的問題。肉鬆，感謝你對於我論文提出的意見，可以使我的論文更加的完整。賴小韻，謝謝妳的照顧，因為妳認真的為細胞室打理，使得細胞庫更加完善。還有感謝實驗室裡面的學弟妹，小



護士、正晟、阿 Pei、寶尼、瑋珍...等在生活上的幫助，讓我有力量完成我的論文。還有感謝神秘人的神秘電話，提醒我的早睡早起。

最重要的是我的家人，我的父母與我最親愛的老弟，因為你們的支持我才能夠沒有後顧之憂的畢業，謝謝你們，我親愛的家人。

竣元於 2006



# 目錄

	頁次
中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	iii
誌謝 .....	iv
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	x
附錄 .....	xii
符號說明 .....	xiii
第一章 緒論 .....	1
1.1 基因治療 .....	1
1.2 基因傳遞系統 .....	3
1.2.1 非病毒性基因治療載體 .....	4
1.2.2 病毒性基因治療載體 .....	7
1.3 腺相關病毒 .....	12
1.3.1 腺相關病毒結構 .....	13
1.3.2 腺相關病毒感染細胞機制 .....	15
1.3.3 腺相關病毒複製機制 .....	18
1.3.4 腺相關病毒在基因治療上的特性 .....	19
1.3.5 腺相關病毒應用於基因治療 .....	20
1.4 重組腺相關病毒 .....	24
1.4.1 從腺相關病毒到重組腺相關病毒 .....	24
1.4.2 重組腺相關病毒在基因治療上的限制與改進 .....	26
1.4.3 重組腺相關病毒生產模式 .....	29
1.5 嗜菌體表現技術 .....	31

# 目錄

	頁次
第二章 實驗策略 .....	36
第三章 實驗流程 .....	38
3.1 質體的構築 .....	38
3.2 重組腺相關病毒的生產 .....	38
3.3 實驗結果的驗證 .....	40
第四章 材料與方法 .....	41
4.1 菌種的培養與轉型 .....	41
4.1.1 菌種的取得 .....	41
4.1.2 培養液與培養基的配置 .....	41
4.1.3 勝任細胞的製備 .....	43
4.1.4 勝任細胞的質體轉型 .....	45
4.2 DNA 純化 .....	46
4.2.1 小量質體純化 .....	46
4.2.2 大量質體純化 .....	48
4.2.3 酵素反應後去 DNA 純化 .....	50
4.3 酵素催化反應 .....	52
4.3.1 限制酶切割反應 .....	52
4.3.2 PCR .....	53
4.3.3 Site-specific Mutagenesis by Overlap Extension .....	56
4.3.4 菌液 PCR .....	58
4.3.5 接合酶接合反應 .....	59
4.4 胜肽導引式基因治療載體質體的建構 .....	59
4.4.1 突變 Capsid 基因之取得 .....	60

# 目錄

	頁次
4.4.2 突變基因的選殖 .....	61
4.5 細胞專一性胜肽基因序列的取得 .....	62
4.6 細胞培養 .....	64
4.6.1 細胞培養液 .....	64
4.6.2 細胞株 .....	65
4.6.3 解凍細胞 .....	65
4.6.4 細胞繼代培養 .....	65
4.6.5 冷凍細胞 .....	66
4.7 AAV Helper-Free System .....	68
4.7.1 293T 細胞的準備 .....	68
4.7.2 293T 細胞的轉染 .....	68
4.7.3 病毒的收集 .....	69
4.8 轉染效率與基因傳遞系統的檢測 .....	70
第五章 結果 .....	71
5.1 pAAV-mRC 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 具有突變的質體 DNA .....	71
5.2 pAAV-m2RC 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 可插入胜肽片段的質體 DNA .....	73
5.3 pAAV-m2RC-RGD 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 插入 RGD 胜肽片段的質體 DNA .....	75
5.4 於 AAV 表面表現由 phage display system 取得胜肽片段的質體 DNA 的構築	76
5.5 AAV 的生產 .....	77
5.6 AAV 對不同種細胞株的感染效率 .....	78

# 目錄

	頁次
5.7 Heparin binding site 的突變對於 AAV 感染能力的影響 .....	78
5.8 表現 RGD motif 之 AAV 對不同種細胞株的感染效率 .....	79
5.9 表現其它胜肽片段之 AAV 對不同種細胞株的感染效率 .....	79
第六章 討論 .....	81
參考文獻 .....	84



# 圖目錄

	頁次
圖一 基因治療示意圖 .....	89
圖二 PEI 的化學結構式 .....	89
圖三 liposome 幫助 DNA 運送進入細胞 .....	90
圖四 AAV 的生活史 .....	90
圖五 AAV2 的三維立體結構圖 .....	91
圖六 不包含基因組之 AAV2 的立體結構模擬圖 .....	91
圖七 AAV2 病毒結構蛋白原子結構圖 .....	92
圖八 AAV2 的基因圖譜 .....	92
圖九 病毒結構蛋白比對圖 .....	93
圖十 AAV 感染細胞流程圖 .....	94
圖十一 AAV2 病毒結構蛋白原子結構圖 .....	95
圖十二 AAV 感染細胞機制圖 .....	96
圖十三 歷年 AAV 相關文獻累積圖 .....	97
圖十四 使用 trans-splicing 方法使 AAV 可以攜帶更大容量之基因 .....	97
圖十五 RG2 PL2 胜肽篩選圖 .....	98
圖十六 site-directed mutagenesis—突變引子設計圖 .....	99
圖十七 site-directed mutagenesis—PCR 反應流程圖 .....	99
圖十八 質體 pAAV-mRC 突變基因的取得 .....	100
圖十九 包含 pAAV-RC 骨架之菌株初篩圖 .....	101
圖二十 質體 pAAV-mRC 之限制酶切割反應篩選圖 .....	102
圖二十一 質體 pAAV-m2RC 突變基因的取得 .....	103
圖二十二 包含 pAAV-RC 骨架之菌株初篩圖 .....	104
圖二十三 質體 pAAV-m2RC 之限制酶切割反應篩選圖 .....	105
圖二十四 包含 pAAV-m2RC-RGD 之菌株初篩圖 .....	106

# 圖目錄

	頁次
圖二十五 包含 pAAV-m2RC-TP. A549 之菌株初篩圖 .....	107
圖二十六 包含 pAAV-m2RC-C2C12 12.51 之菌株初篩圖 .....	108
圖二十七 包含 pAAV-m2RC-GE11 之菌株初篩圖 .....	109
圖二十八 包含 pAAV-m2RC-RG2 P2L 之菌株初篩圖 .....	110
圖二十九 使用磷酸鈣法在 293T 細胞進行三質體共同轉染之存活率與轉染效率之測 試 .....	111
圖三十 AAV 對 293T 細胞及 HT1080 細胞感染圖 .....	112
圖三十一 AAV 對於不同細胞株之感染效率圖 .....	113
圖三十二 Heparin binding site 突變 AAV 對於 293T 細胞及 HT1080 細胞感染效率 圖 .....	114
圖三十三 具有 RGD motif 之突變 AAV 對於其感染趨性的影響 .....	115
圖三十四 不同種類 AAV 對於 293T 細胞感染效率圖 .....	116

# 附錄

	頁次
附錄一 質體 pAAV-m2RC 序列與定序資料 .....	117
附錄二 質體 pAAV-m2RC-RGD 序列與定序資料 .....	129
附錄三 質體 pAAV-m2RC-TP. A549 序列與定序資料 .....	139
附錄四 質體 pAAV-m2RC-C2C12 12.51 序列與定序資料 .....	149
附錄五 質體 pAAV-m2RC-GE11 序列與定序資料 .....	159
附錄六 質體 pAAV-mRC 序列與定序資料 .....	169
附錄七 載入胜肽導引式基因傳遞系統的胜肽片段性質 .....	181
附錄八 引子序列 .....	182
附錄九 AAV antibody .....	184





## 符號說明

AAV	Adeno-associated virus
Ab	Antibody
Ad	Adenovirus
Amp	Ampicillin
bp	Base pair
DMEM	Dulbecoo's modified eagle medium
HBS	HEPES buffer saline
hrGFP	Humanized recombinant green fluorescent protein
HSPG	Heparin sulfate proteoglycan
ITR	Inverted terminal repeat
Kana	Kanamycin
kb	Kilo-base pair
kDa	Kilo-daltons
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidium iodide
rAAV	Recombinant adeno-associated virus
RES	Restriction enzyme site
rpm	Revolutions per minute
ssDNA	Single strain DNA
VP	Viral protein

# 第一章 緒論

自 1990 年基因治療進入第一期臨床實驗開始(1, 2)，許多的研究就迅速的投入到基因治療的領域之中。在這個領域中研究主要分為四個方向：1) 基因缺陷治療、2) 腫瘤治療、3) 神經變性疾病治療、4) 病原體感染治療。無論是在哪種方向的研究，一個可信賴的基因傳遞系統 (gene delivery system) 扮演著重要的角色，指揮治療用基因在適當的細胞、正確的時間點表現。因此基因傳遞系統的核心價值，就是能夠將基因專一性的傳遞到合適的細胞組織並表現。

## 1.1 基因治療

基因治療就是將基因物質送到生物體的細胞中，經由此一基因物質的表現，治療生物體的疾病(3)。

部份遺傳性疾病是因為生物體的單一基因本身發生錯誤，如果可以使用正確的基因取代錯誤的基因，就可以治癒此類的疾病。許多導致遺傳疾病的基因已經陸續的被發現(3)，代表這些的遺傳疾病是有可能被治癒的。1990 年開始，基因治療進入第一期的臨床實驗階段，基因治療對於許多單一基因缺陷的遺傳疾病都證明有相當的效果；在 1993 年，Terence R. Flotte 使用攜帶 fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 基因的第二血清型重組腺相關病毒 (recombinant adeno-associated virus serotype 2, rAAV2)，感染細胞株 CFBE IB3-1—源自囊狀纖維化症 (cystic fibrosis, CF) 的病人呼


吸道上皮細胞，使得細胞株 CFBE IB3-11 表現 CFTR 基因，並使得 cAMP 所調控的氯離子通道的功能恢復正常，證明了基因治療的可行性(4)。嚴重性免疫複合缺陷症 X-1 (Severe combined immunodeficiency-X1, SCID-X1) 是由於淋巴細胞中的 T 細胞及 NK 細胞早期的分化過程出現障礙所造成，原因是傳遞生長、存活、及分化訊息給早期淋巴祖先細胞 (early lymphoid progenitors) 的細胞激素受體 (cytokine receptor) —IL-2, -4, -7, -9, 及 -15 receptor 上的  $\gamma$ c cytokine receptor subunit (CD132) 基因發生突變(5-7)。2000 年 Marina Cavazzana-Calvo 在期刊 science 上發表使用反轉錄病毒 (retrovirus) 攜帶  $\gamma$ c cytokine receptor subunit (CD132) 基因傳遞至 SCID-X1 病人的 CD34<sup>+</sup>骨髓細胞，回復病人 T、B，及 NK 細胞之正常數目，而得到正常的免疫功能，治療了嚴重性免疫複合缺陷症 X-1，成為基因治療上成功的第一例(8)。

除了遺傳性疾病，基因治療也應用在腫瘤治療上。不同於以外科手術、化療以及放射線照射等方法選擇性殺死腫瘤細胞，基因療法治療腫瘤主要是使用抑制前致癌基因 (proto-oncogenes) 表現、取代有缺陷的抑癌基因 (tumor suppressor genes)、傳遞腫瘤溶解性病毒 (oncolytic viruses)、傳遞細胞激素 (cytokine) 基因、抗血管新生成因子 (anti-angiogenic factor)、以及提供細胞凋亡基因 (apoptosis genes) 等方法來治療腫瘤。Jacob D (2004) 使用腺病毒 (Adenovirus, Ad) 載體及 Ma H (2005) 使用 rAAV 當作載體攜帶 TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 來治療原位

性胰臟腫瘤 (orthotopic pancreatic tumour)及肝臟轉移性腫瘤 (liver metastatic tumour)，證明在動物模式下可以有效的抑制腫瘤，都是基因治療在治療腫瘤方面很好的例子(9, 10)。

## 1.2 基因傳遞系統

基因治療主要由三個部份所構成：1) 治療用基因、2) 基因調控系統、3) 基因傳遞系統，(圖一)。治療用基因提供有功能的基因取代原有缺陷的基因，來產生正常的基因產物，解決因基因缺陷所導致的疾病。基因調控系統調節治療用基因在細胞中的表現時間與表現量。基因傳遞系統是將基因有效傳遞到目標細胞。



不同的基因治療所要達成的目的不同，因此所使用的基因傳遞系統也不盡相同。一般而言，一個好的基因傳遞系統應該具備無毒性、有效率傳遞基因、價格便宜、方便取得等特質。然而應用在臨床基因治療上，基因傳遞系統具備的特質必須有更高的要求：1) 不會引起疾病或生物體免疫反應、2) 短暫或長期穩定表現基因、3) 可攜帶基因的大小限制、4) 基因是否嵌入宿主基因體及嵌入是否有專一性、5) 廣泛或者專一性傳遞到目標細胞、6) 感染分裂或者不分裂的細胞、7) 載體的生產、純化與定量(11)。

目前的基因傳遞系統根據來源可再分為兩大類：非病毒性基因治療載體以及病毒性基因治療載體。

## 1.2.1 非病毒性基因治療載體

非病毒性基因傳遞的概念就是使用已知結構式之人工合成物質模擬病毒感染細胞的過程。不同於病毒的是，非病毒性基因治療載體是由已知結構式之人工合成物質所組成，所以研究者可以很清楚瞭解其化學式以及其上有具備的官能基，並對其作適當的修飾。除此之外，非病毒性基因治療載體也通常具備著許多應用於基因治療上的優點，方便取得、便宜的價格、無毒性與無致病力、且不引起免疫反應等。常用的非病毒性基因治療載體包括以下幾類：帶正電性聚合物 (Cationic polymers)、微脂粒 (liposome)、直接將 DNA 注射在肌肉 (DNA injection)、或者基因槍或電穿孔法 (gene gun or electroporation) 等。



### 1. 帶正電性聚合物

一般所用的帶正電性的聚合物都具有帶正電的胺基，可以對帶負電的 DNA 分子產生中和、遮蔽效應，並且能與 DNA 形成較小的複合體，幫助 DNA 穿越細胞膜。部份的研究也對這些帶正電性的聚合物上加上特殊的官能基或者是配體 (ligand)，使得這些帶正電性聚合物可以攜帶 DNA 進入特定種類的細胞中。較常用的帶正電性聚合物包括 polyethylenimines (PEI)，(圖二)、chitosan、DEAE-dextran 等；其中 PEI 除了有效保護 DNA 免於一些細胞內酵素的破壞，也可以幫助細胞吸收 DNA，但是在體內使用時，會因為血清中帶負電性蛋白質影響其正電

荷，而造成較低的轉染能力。

## 2. 微脂粒


DNA 上因具有帶負電荷的磷酸根，極難直接穿過帶負電性且非極性的外層細胞膜而進入細胞內。研究者發展一種以磷脂類為主體，具不同帶電性或極性者，以不同比例組合形成微脂粒 (圖三)，再將 DNA 與這些微脂粒混合，使得 DNA 被包裹於其中，如此一來，DNA—微脂粒複合物就可直接通過細胞膜而送入細胞內。這個方法可普遍用於各種不同細胞，且可直接在活體中使用。利用微脂粒的基因轉殖效率的高低依其磷脂的比例、種類成份而不同。另外經由此法進去細胞內的 DNA，只能短暫性的表現其基因，而且微脂粒的效率普遍均不是特別高，這是使用微脂粒當作基因治療載體並不普及的原因之一。

## 3. DNA 肌肉注射

儘管在 1980 年代之前就有多項證據顯示將質體 DNA 注射到哺乳類細胞裡可以使細胞產生其基因產物，但直到 1990 年 Felgner 首次證明這個方法是可行的，這件事情才為人們所接受(12)。研究發現，直接將 DNA 注射到動物四頭肌 (quadriceps)，發現 DNA 可在肌胚細胞 (myoblast) 內存留一段時間並且持續基因表現，雖然如此，質體 DNA 並沒有嵌入到宿主染色體上。當纖維母細胞融合形成多核的肌纖維管

(myotubule) 時，DNA 仍保存且表現。這種 DNA 進入細胞的詳細機制目前仍不是非常清楚，但相信與注射局部區域內有些組織受到傷害或注射時所增加的壓力有一些關聯性。也有一些其他組織內的細胞可利用直接 DNA 注射的方法而將基因傳送進去的，例如甲狀腺、部份腫瘤細胞、肝細胞、皮膚細胞，及心肌細胞；然而其餘的大部份組織或細胞則普遍對此方法是無效的。這種直接注射 DNA 於肌肉細胞的方法，已證實的確會針對所帶進去之基因所表現的蛋白質產生免疫反應，包括體液性免疫 (humoral immunity) 及細胞性免疫 (cellular immunity)，而這樣的方法被稱為 DNA 疫苗 (DNA vaccine)。

#### 4. 基因槍或電穿孔法



Yang, N.S.設計一套基因槍(13)，它能將帶有 DNA 分子的金粉粒子以高壓加速的方法，穿過細胞膜而送達至細胞內，使 DNA 上所攜帶的基因進行表現。使用這種機械式的方式，比較沒有特殊細胞條件的限制。因此這種方法可應用在多種不同的細胞、組織，甚且器官。而且使用基因槍所需要的 DNA 量亦遠比微脂粒的方法來得少很多。利用這種方法，已有多篇文獻成功地將 DNA 送達至肝、皮膚、或肌肉等器官內，並觀察到 DNA 在活體內的表現。利用電擊將 DNA 送入細胞內也是一種方便將基因送到細胞內的方法，運用高電壓造成細胞膜上的脂肪結構造成暫時性重新排列，因此在細胞膜上形成孔洞，可以允許 DNA 由此

孔洞進入細胞質內。只要細胞膜電壓被提升至幾百個毫伏特以上，這種現象在所有的細胞都會發生，故它可適用於各種不同組織或細胞。這種物理性的方法將 DNA 送入細胞內是較為簡單且沒有副作用，所使用 DNA 量，也遠比微脂粒法來得少。可惜其傳送之 DNA 量仍然非常有限，且表現也多為短暫性的。

## 1.2.2 病毒性基因治療載體

在活體的基因治療中，可以選擇病毒性的載體如腺病毒載體 (adenoviral vector)、牛痘病毒載體 (vaccinia viral vector) 來達到短暫基因表現的目的，也可以使用反轉錄病毒載體 (retroviral vector)、腺相關病毒載體 (adeno-associated viral vector) 來達到長期基因表現的目的。以下就是對各個病毒性基因治療載體的分別介紹：

### 1. 傳統反轉錄病毒載體 (retroviral vector)

目前基因治療所使用的反轉錄病毒主要是來自老鼠的反轉錄病毒 (MLV)，它也是最早用來進行人體試驗的病毒載體。這是個 RNA 帶有被膜 (envelope) 的病毒。其生活史中，會經由反轉錄作用而形成雙股 DNA，再嵌入宿主染色體上，達到基因轉殖及持續表現之特色。要建構此載體，通常是將病毒基因上所有病毒基因序列加以剔除而以治療用基因取代之。但一些重要序列，如包裹用訊息 (packaging signal,  $\phi$ )，嵌入染色體所需之序列(long terminal repeat, LTR)，及複製相關之序列



(polypurine tract, PPT)，則保留在載體上。部份研究者甚至會將一些增加基因表現或增加病毒力價有關序列，例如 WPRE 或 gag 5'端的部份序列，亦放在載體上，以增加載體之表現效率。載體上之 5'端及 3'端 LTR 可進一步加以改良，以增加其表現能力及安全性。將 5'端 LTR 上之 U3 啟動子改為 CMV 之加強子/啟動子，則此 CMV/LTR 嵌合啟動子 (hybrid promoter) 可有更高的表現能力。而在 3' 端 LTR 上的 U3 處將啟動子序列加以破壞，則造成所謂 SIN 載體 (self-inactivating vector)。其主要原理是利用反轉錄病毒載體之反轉錄步驟，則 3' LTR 上之 U3 屆時將成為 5' LTR 上之啟動子。如此破壞的結果，造成其自我去活化 (self-inactivation)。這個用意主要是在減少在標的細胞內表現時，反轉錄病毒載體之內在啟動子與 LTR 之間形成互相干擾表現的現象。但此類載體的設計，亦會大大降低其載體病毒力價。至於形成重組病毒所需之其他病毒蛋白基因，如 *gag*、*pol* 及 *env*，通常是由另一個質體 (即所謂包裝質體) 來提供。為了要避免此質體與表現載體之間產生任何重組而形成野生型病毒，這個包裝質體上之包裹訊息 ( $\phi$ )、PPT、3'端 LTR 都會全部予以剔除，且 5'端 LTR 也會換成 CMV 之類的啟動子。更進一步的改良，則是將 *gag*、*pol*、*env* 等基因分裝在不同質體內，再以穩定表現方式送入特定細胞內，建立所謂的包裝細胞株 (packaging cell line)，如此就更減少因重組而產生野生型病毒的問題。目前使用之 *env* 多半是選自雙嗜性 (Amphotropic) 反轉錄病毒 (既能在宿主細胞，又能

在異種細胞上引起產毒性感染)，故所製造出來之重組反轉錄病毒具有可感染多種不同細胞的特性。雖已有如此多重的改善，然而反轉錄病毒只能感染分裂中的細胞，且其病毒力價偏低 ( $10^5$ - $10^6$  cfu/ml)，在體內又非常脆弱，易被補體所摧毀，造成反轉錄病毒載體使用上仍有很大瓶頸。針對這個問題，目前已有一些改良式的反轉錄病毒載體出現，即利用水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 之 G 蛋白來取代反轉錄病毒之被膜蛋白，用以包裹病毒顆粒，形成所謂的假形反轉錄病毒 (pseudotyped retrovirus)。這類假形病毒顆粒具有相當高的穩定性，並經得起離心，濃縮，故可使病毒力價提升至  $10^8$ - $10^9$  cfu/ml，大大地提高了感染的效率。



## 2. 人類反轉錄病毒載體 (lentiviral vector 或 HIV vector)

人類反轉錄病毒與傳統反轉錄病毒最大不一樣在於它可以感染不分裂的細胞，且其基因體上大多具備了許多輔助因子基因，對其生活史上可能具有某些功能。相似於傳統之反轉錄病毒載體的設計，HIV 載體亦須帶有重要之序列以利載體之複製及包裹。例如  $\Psi$  訊息序列；PPT 序列可增進病毒 DNA 送入核內的功能；而載體的 3'端若有 WPRE 序列則可大大增加基因的表現。至於組裝病毒所需之結構蛋白，則是由另一個質體來提供。第一代的 HIV 載體系統所用之包裝質體只剔除了 *env* 的序列，而由另一個質體 DNA 提供 VSV-G 之 Env 蛋白，約百分之八

十的病毒序列仍保留在包裝質體上，故危險性較高。第二代的 HIV 載體系統，則將一些輔助因子基因 (如 vpr、vpu、vif 及 nef) 從包裝質體上再剔除，只剩下由 HIV 之 LTR 啟動子所表現之 gag、pol、tat 及 rev。第三代載體甚且將包裝質體改為 CMV 啟動子，故也不再需要 tat，而將其由此質體上剔除，甚且將 rev 分設在另外質體上。最後呈現之 HIV 載體是最具安全性的組合。利用 293T 高效率轉染技術及 VSV-G 可經得起濃縮的特性，一般都可拿到  $1 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  IU/ml 的病毒顆粒。不過每次都得做共同轉染實驗，是生產 HIV 載體比較麻煩的地方，原因是 HIV 載體系統比較難製備成包裝細胞株，因為 VSV-G、Gag 及 Tat 等蛋白對細胞之毒性較高，除非做成可調控性 (inducible) 的表現，否則很難建立起穩定表現的細胞株。

### 3. 腺病毒 (Adenovirus)

腺病毒是一個中等大小之 DNA 病毒 (35 kb)。感染人體之後，體內多半會引發免疫反應 (T 及 B 細胞) 來清除病毒的感染。目前血清學檢查發現約有 40% ~ 60% 的小孩已有對抗血清型 1 型、2 型及 5 型病毒的抗體存在。而 Ad5 又是目前最常用於基因治療載體設計的一種，故也是腺病毒載體在臨床上應用碰到最大的困難。強烈的免疫反應，除了使轉殖基因只是短暫表現外，可能也會對病人產生極大的副作用，甚且休克。腺病毒的複製史中，有基因表現有分為早期 (E1A, E1B, E2,

E3, 及 E4)、中期 (IX 及 IVa 2)、及晚期 (結構蛋白, ML) 三個階段；其中 E1A 對其他早期病毒基因的表現是絕對必須的。第一代腺病毒載體是將 E1 及 E3 剔除。E1 剔除是使重組腺病毒將來在標的細胞內不具有複製能力；E3 剔除是為了增加容納轉殖基因的空間。使用載體的方法，乃是利用同源基因重組 (homologous recombination)，將基因表現之卡帶 (cassette) 質體與不含 E1 部份之病毒基因體同時轉染進 293 細胞，經過重組後，再由 293 細胞所提供的 E1 基因來複製重組病毒。重組病毒可用來感染標的細胞或個體組織。腺病毒的病毒力價一般非常高 ( $10^{10}$  cfu/ml)，病毒顆粒穩定，所以常可用來直接進行活體內轉殖。腺病毒可以感染分裂或者不分裂的細胞，這些都是它優於反轉錄病毒之處。但相對的，腺病毒不嵌入細胞染色體中，又不會在細胞內複製，故在一段時間後，經細胞分裂，病毒 DNA 可能就消失掉，表現亦告中止。同時，如前述腺病毒載體在體內造成非常嚴重的免疫反應，這也是造成帶有腺病毒載體的標的細胞在體內很快就會被消滅的原因之一。第二代腺病毒，為了更降低這些低量的病毒複製的機率及免疫反應的發生，進一步再將 E2a 基因 (DNA-binding protein) 及 E4 由載體上去除，而改由製備細胞株來提供。第三代病毒載體甚至將更長的病毒基因體完全去除而用幫住病毒 (helper virus) 來幫忙，以企圖完全斷絕病毒載體在標的細胞內的複製能力，如此一來即可降低宿主的免疫反應，以及增長載體基因的表現時間。

### 1.3 腺相關病毒

AAV 是屬於小病毒科 (*Parvoviridae*)，依賴病毒屬 (*Dependovirus*)，是一種無法單靠自己的基因進行 DNA 複製的病毒，需要有幫助病毒 (*helper virus*)，如 adenovirus 或者 herpes simplex virus，來提供基因幫助 AAV 完成整個 DNA 複製、病毒生產的生活史。當沒有幫助病毒的存在下，AAV 在感染細胞後進入潛伏期 (*latent infection*)，AAV 的 genomic DNA 專一性插入人類的基因組中的特定位置上或者以游離基因 (*episome*) 的狀態存在於細胞中，(圖四)。

第二血清型腺相關病毒在 1965 年有污染的 Adenovirus stock 中發現，因此被稱為 Adeno-associated virus，是第一個被發現的 AAV (14, 15)。直到現在共有 100 餘種 AAV 變種病毒，分別來自 Adenovirus stock、人類或非人類靈長類的組織(14-22)。雖然 AAV 病毒變種的種類繁多，但是病毒血清型卻只有少數幾種。根據定義，新血清型病毒是指新分離出的病毒與已知血清型病毒的專一性中和血清 (*neutralizing sera*) 無法進行有效率的交叉反應 (*cross-reaction*)。因此在 AAV serotype 1-11 中，真正定義血清型的病毒只有 AAV serotype 1-5 及 AAV serotype 7-9(23)。

AAV 的天然宿主是人類，大約有百分之八十的人類族群的血清對 AAV2 是呈陽性反應(24, 25)。其中的 AAV2 具有廣泛感染哺乳類分裂及不分裂細胞，以及長期穩定表現治療基因的特性。在使用的安全性上，AAV2 並不會引起已知人類疾病(26)，而且病毒載體本身幾乎不會引起宿主身體的免疫反

應。另一方面，野生型的 AAV2 在感染人類細胞之後，其基因組會嵌入細胞核中第 19 號染色體的特定位置 *AAVS1* 基因座 (locus) 中(27)，(圖四)，或者形成游離基因 (episome)，不會導致基因突變而產生疾病，因此具有當作優秀基因治療載體的潛力。

### 1.3.1 腺相關病毒的結構

AAV2 的病毒顆粒是一個直徑約 25nm，並以 T=1 正二十面體對稱的球形結構，(圖五)。在 Stephanie Kronenberg (2001) 的研究中，使用 electron cryo-microscopy 的技術，取得十張共 1800 個不包含基因組 AAV2 的病毒外殼影像的顯微照相 (micrograph)，並根據正二十面體結構對稱，運用影像重組技術得到解析度達 1.05nm 的 AAV2 的三維立體結構圖(28)，(圖六)。根據過去對 AAV2 病毒外殼的蛋白質序列突變實驗(29, 30)及與 Canine parvovirus (CPV)的結構與蛋白質序列作比較(31)，Stephanie Kronenberg 推論 AAV2 的病毒外殼三倍對稱的軸 (three-fold symmetry) 上的突出區域 (spike region)具有 AAV2 感染細胞的功能(28)。Qing Xie 在 2002 年則成功的得到 AAV2 的結晶，進行解析度達 3-Å 的 X-ray 結晶繞射圖，取得 AAV2 及其結構蛋白的原子結構圖，(圖七)，同樣的也根據 Wu (2000) 對 AAV2 病毒外殼的蛋白質序列突變實驗，指出影響與 heparin 結合的 RGNR motif 是位於結構蛋白靠近三倍對稱的軸附近的環上 (loop)(32)。

AAV2 基因組 DNA 由蛋白病毒外殼所包覆，約佔整個病毒質量的 30%，

是一條長約 4650 nucleotides 的單股 DNA，兩端由稱為反轉末梢重複序列 (inverted terminal repeats, ITRs) 的序列所包圍，中間則是兩個大片段的開放讀碼區 (open reading frames, ORFs)，(圖八)。其中 ITRs 提供病毒 genome 複製及包裹所必需的順式作用元件 (cis-acting elements) 的訊息。5'端的 ORFs 是 *rep* gene，生產出的四種 rep 蛋白負責調控 AAV genome 上的啟動子與幫助 AAV genome 專一性的插入宿主基因組的特殊位置及部分 DNA 酵素活性；3'端的 ORFs 是 *cap* gene，使用選擇性剪接 (alternative splicing) 及使用不同的起始點進行選擇性轉譯 (alternative translation) 生產出病毒的結構蛋白 (圖八)，是構成病毒外殼的主要成分。

AAV2 的病毒外殼由 60 個大小為 87kD 的 VP1、72kD 的 VP2、及 62kD 的 VP3 病毒結構蛋白以 1:1:8~20(23, 28, 32-34)的比例所組成，形成 T=1 正二十面體對稱的球型結構。構成病毒外殼的 VP1、VP2、VP3 在 C 端擁有共同的胺基酸序列，不同的是在 N 端，VP1 比 VP2 多 137 個胺基酸序列，VP2 又比 VP3 多 65 個胺基酸序列，(圖九)。在 VP1 的 N 端具有影響 AAV 感染能力的 parvoviral phospholipase A2 (pvPLA) 區域的蛋白質序列(35, 36)，以及三個提供 nuclear localization signals (NLS) 的鹼性胺基酸序列 (basic amino acid sequence elements, basic clusters, BCs) KKR 及 RKR(37, 38)。過去的研究中發現，只要有 VP3 即可構成不具感染力病毒外殼，在提供 VP1 後可以使病毒回復感染能力，然而只提供 VP2 卻無法使病毒產生感染能力(39)，原因是 VP2 的 N 端雖然具有兩個 BCs，但卻不包含影響病毒

感染能力的 pvPLA。病毒結構蛋白共有部份—VP3 是構成 AAV 的主要結構蛋白，根據 Qing Xie (2002) 使用 X-ray 結晶繞射得到的原子結構，(圖七)，可以得知 VP3 的核心部份，也就是作為病毒外殼內面部份，具有一個由兩個 antiparallel  $\beta$ -sheet 所形成的  $\beta$  jelly-roll-barrel 的結構，幾乎所有的 nonenveloped virus 都有此特徵(40)。不同於 VP3 核心的  $\beta$  jelly-roll-barrel，位於 VP3 外圍結構，也就是病毒表面的部份，則是由許多的 loops 所組成，佔整個病毒外殼結構的三分之二(32)。比對不同血清型的 AAV 以及 parovirus，這些 loop 區域在胺基酸序列有很大的不同(32)。根據過去突變實驗及抗體對 AAV 的免疫實驗，發現這些在 VP3 結構上的 loop 扮演與細胞受體結合，以及被抗體辨識的角色，例如和細胞表面的 heparan sulfate proteoglycan (HSPG) 結合的區域就位於三倍對稱的軸附近的 loop 上。在五倍對稱的軸上，則由 symmetry-related  $\beta$ -ribbons 構成病毒表面的孔洞。原本位於病毒內部的 VP1、VP2 的 N 端部分在感染細胞後，或者經過某些處理如限制性熱處理之後，可以藉由這些位於正二十面體的五倍對稱的軸上的孔洞暴露到病毒的表面而進行其功能(41, 42)。

### 1.3.2 腺相關病毒感染細胞機制

在 AAV 感染細胞的過程中，需要克服許多障礙，包括 1) 病毒如何與細胞表面結合、2) 如何利用 endocytosis 穿越細胞膜、3) 所形成的 endosome 如何在細胞內運輸、4) 病毒如何離開 endosome、5) 以及病毒如何移動到



細胞核中，(圖十)。

在細胞的表面存在著許多的細胞表面 receptor，不同種類的細胞，其細胞表面受體的種類、數量和分布都不一樣。一般而言，不具外套膜 (nonenveloped) 的病毒會藉由與細胞表面的氨基葡聚糖受體 (glycosaminoglycan receptors, GAG receptor) 結合，再與細胞表面的共同受體 (coreceptors) 結合並調控進入細胞後的運輸路徑。其中不同血清型的 AAV 利用不同細胞表面受體黏附到細胞表面，因此審慎挑選適合血清型的 AAV 可以有效率的提升感染目標細胞的能力。

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) 廣泛的存在於許多種類的細胞中的細胞表面受體，而 AAV2 主要用來黏附到細胞表面的受體正是 HSPG(43)，這也解釋了為什麼 AAV2 可以感染許多種類的組織細胞。過去病毒外殼蛋白序列突變的研究中也發現，位於病毒結構蛋白第 487 號、第 509 號、第 585 號及第 588 號精胺酸的突變會破壞 AAV2 與 HSPG 結合的能力，並且失去感染細胞的能力(30, 32, 44)，而這個決定與 HSPG 結合的位置就位於病毒三倍對稱的軸附近的突起區域上。有趣的是這些位於突起區域上的胺基酸的位置距離為 20Å，與 heparan sulfate 上的雙糖結合的相鄰距離是一致的，而使病毒失去感染能力的中和抗體 (neutralizing monoclonal) C37-B 所辨識的抗原決定位 (epitope) 的位置正為於突起區域附近(45)。因此位於這個區域的第 585 號及第 588 號精胺酸所圍成的 RGNR motif 就被稱為 Heparan binding site (圖十一)，提供 AAV2 藉由 HSPG 與目標細胞表面黏

附的能力。

在 AAV2 順利的利用 heparan binding site 與細胞表面結合後，接著就與細胞上的 coreceptor 包括 human fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)(46)、hepatocyte growth factor receptor(47)、以及 integrins  $\alpha V\beta 5/\alpha 5\beta 1$ (48)進行作用，其中 FGFR1 似乎扮演著幫助 AAV2 與 HSPG 結合的角色。

而與 adenovirus 感染途徑相似的，integrins  $\alpha V\beta 5$  幫助 AAV2 經由 clathrin-coated pits 進行內吞作用 (endocytosis)：一個大小約 100kDa 的細胞質裡的 GTPase—dynamin 參與包含 AAV2 的 endosome 的形成(49-51)，dynamin 會在由 clathrin 所包圍的凹坑 (clathrin-coated pits) 附近進行聚合反應形成環狀，將整個 clathrin-coated pits 轉變成由 clathrin 所包圍的水泡 (clathrin-coated vesicles)，然後縮緊水泡 (vesicles) 使得水泡自細胞膜分離，形成 endosome(52, 53)。當 AAV2 與 HSPG 及 integrins  $\alpha V\beta 5$  結合後，也會刺激一種細胞內小的 GTP 結合蛋白—Rac1，Rac1 的活化會活化之後的 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 的訊息傳遞路徑，使得輸送 AAV2 的 endosome 可以沿著細胞內的骨架：微絲 (microfilaments)及微小管 (microtubules) 有效率的被運到細胞核附近(54)，(圖十二)。

然而與其幫助病毒 adenovirus 不同的是，AAV2 的病毒顆粒並不是自 endosome 直接的釋放到細胞質中，而是先形成 late endosome 後，才自 late endosome 釋放到細胞質中(55)。由於形成 late endosome 後其內部環境的 pH

值下降，其酸性環境驅使包含的 AAV2 的病毒外殼結構構形改變，使得原本隱藏在病毒內部的區域暴露出來，而穿破了 endosome 上的膜。有趣的是包含 parvoviral phospholipase A2 motif (pvPLA2, 序列為 HDXXY) (35, 36) 及具有細胞核定位訊號 (nuclear localization signals, NLS) 的 BCs(37) 的病毒結構蛋白 VP1 的 N 端蛋白序列，也因為病毒外殼構形改變而暴露出來，推測 VP1 的 N 端序列可能參與病毒自 endosome 逃脫及指引 AAV2 基因組到達細胞核的角色。

當自 late endosome 離開後，AAV2 會聚集在細胞核的附近，然而 AAV2 如何進入細胞核以及除去病毒外殼的機制還是一個很大的謎團。過去的研究發現，就算把核孔複合物 (nuclear pore complexes, NPC) 堵住，AAV2 仍然能夠進入細胞核。因此 AAV2 似乎不必藉由 NPC 進入細胞核，而有其他機制可以使得 AAV 進入細胞核中(56)。

### 1.3.3 腺相關病毒複製機制

在成功感染細胞之後，AAV 運用以自己的模板當引子的機制 (self-priming strand displacement mechanism) 開始進行其 DNA 的複製，而大型 Rep 蛋白 (Rep78 及 Rep68) 在其 DNA 的複製上扮演著重要的角色(57)。早期的病毒生產、病毒外殼組合以及病毒 DNA 複製是在細胞核中的不同部位進行，不包含基因的病毒外殼是在核仁進行組合，而 DNA 的複製及將 DNA 包裹進入病毒外殼則是在核質中進行(58, 59)。

在病毒組裝的第一個步驟是被大型 Rep 蛋白所結合的 AAV 基因組與空的病毒外殼形成一個複合體，這個步驟是由大型 Rep 蛋白與結合空的病毒外殼的小型 Rep 蛋白 (Rep52 及 Rep40) 的作用所完成(60)。然後位於病毒外殼上的小型 Rep 蛋白則提供 helicase 的活性，使得單股的 AAV 基因組移動到病毒外殼裡面，完成病毒的組裝(61)。

### 1.3.4 腺相關病毒在基因治療上的特性

AAV2當作基因治療載體時，具有以下特性：

1. rAAV載體可以廣泛的感染分裂或者不分裂狀態的人類組織細胞，包括中樞神經細胞、眼球細胞、肌肉細胞、肝臟細胞、肺臟細胞、以及造血細胞等都已經在活體實驗中被證明是可以被感染(62-68)。
2. rAAV載體在感染細胞後，可以長期的存在於細胞中並且穩定的表現治療用基因。於齧齒動物的肌肉細胞、大腦細胞、肝臟細胞、眼睛細胞中，已證明rAAV在感染這些細胞後，可以在這些細胞中存在約兩年的時間，並且持續表現治療用基因(69-71)。
3. 以rAAV當作基因治療的載體，並不會引起發炎反應。另外，由細胞毒殺性T淋巴球(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) 所產生的免疫反應與體液免疫反應也比其他的病毒型載體產生的免疫反應更低，幾乎只對治療用基因產生免疫反應。可能原因是除了治療用的基因本身之外， rAAV並不會攜帶本身病毒的基因，且rAAV對於抗原呈現細胞的感染能力很

差，所以引起的免疫反應較低(72)。

4. 從1968年以來，AAV被證明不會引起已知的人類疾病，因此將AAV系統應用於基因治療上是具有較高安全性(26, 73-75)。

5. 使用野生型AAV當作基因治療的載體時，可以避免因為治療用基因隨機嵌入宿主的染色體而使得宿主基因產生突變。因為野生型的AAV具有site-specific integration，這個特性使得AAV會固定嵌入在第19號染色體中的*AAVSI*，避免了如反轉錄病毒的隨機嵌入而造成的人類白血病(76)。

### 1.3.5 腺相關病毒應用於基因治療

從1965年腺相關病毒發現以來，每一年都有新的發現和應用，相關文獻也穩定的並且持續的增加，(圖十三)，1965年到1980年間，相關論文共有78篇，而在80年到90年之間增加了137篇關於AAV的文獻，在2001年到2005年相關文獻每年則以接近300篇的速度在增加，此現象一方面證明了AAV在基因治療上可以廣泛的應用，另一方面也證明了AAV發展的潛力。

應用方面，在活體的成年動物大腦做基因傳遞並且治療，是一件很難達成的實驗：

1. Klein RL (1998) 發表了使用 AAV 在當作基因治療的載體，把治療用基因 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 送到啮齒類的腦部，在表現 BDNF 的部份，獲得很好的成效(77)。

2. R. J. Mandel (1997) 使用了 rAAV 將人類酪胺酸水合酶基因 (Human Tyrosine Hydroxylase gene, hTH) 傳遞到阿朴嗎啡誘導 (apomorphine-induced) 帕金森氏症模式的老鼠 (此種老鼠會有原地自轉的行為) 的神經細胞，雖然無法改善其原地自轉的行為，但是 hTH 基因確實可以在神經細胞內穩定表現(67)。

3. Xiao X (1997) 使用 rAAV 治療阿茲海默症，方法是利用 rAAV 攜帶 GABA 受體的互補 (antisense) DNA，抑制 GABA 受體的表現，改善阿茲海默症的症狀(78)。



在治療遺傳性視覺疾病方面，John G. Flannery 與 Jomary C (1997) 各發表了一篇使用 rAAV 治療遺傳性視覺疾病的論文，他們使用 rAAV 傳送 (光受體) photoreceptor 的基因，並回復眼細胞中光受體的功能，證明體基因治療 (somatic gene therapy) 的可行性(64, 79)。

許多的疾病都是由於缺乏特定因子所造成，利用骨骼肌細胞或者肝臟細胞當做因子基因表現的平台，可以解決許多由於缺乏特定因子的遺傳疾病：

1. B 型血友病的成因是因為缺乏第九號凝血因子。Lili Wang (1999)、Mark A. Kay (2000) 分別使用 rAAV 載體攜帶治療基因第九號凝血因子送到老鼠跟人類的骨骼肌細胞，以表現第九號凝血因子的骨骼肌細胞做

為平台，治療 B 型的血友病(80, 81)。

2. 先天性肥胖的成因很多，其中一種是與胰島素缺乏無關而是由於 leptin 的缺乏所造成的肥胖。ob/ob 鼠是由於 leptin 缺乏的肥胖鼠模式，Murphy (1997) 發表的論文指出，使用 rAAV 攜帶治療用基因進行肌肉注射後，不正常的代謝與行為包括血糖過高、對於胰島素有抗性、血液中葡萄糖的感受性變低，以及嗜睡狀態都有所改善(82)。

3. 體基因治療 (Somatic gene therapy)指的是將治療蛋白經由循環系統送到身體的各個部份，在 1996 年之前鮮少有相關文獻出現，PAUL D. KESSLER (1996) 使用 rAAV 當作基因治療載體，攜帶促紅血球生成素基因 (erythropoietin gene, EPO gene)注射進入肌肉細胞，以肌肉細胞當做平台，表現 EPO 並經由血液進入循環系統。所以 rAAV 可以提供一個治療遺傳性的全身性疾病的治療途徑(83)。

裘馨氏肌肉萎縮症 (Duchenne muscular dystrophy)是一種遺傳疾病，是因為 X 染色體短臂 Xp21 處的 dystrophin 基因 (DMD gene)有缺陷所造成的。Dystrophin 基因非常龐大，長達 2500kb。Harper SQ (2002)將 dystrophin 的功能作詳細的分析，並且分割成許多小小的功能片段。把 DMD 有功能的片段分別放入 rAAV 載體中，注射到 duchenne muscular dystroph 模式的老鼠

中，證明能夠有效的反轉疾病的歷程，也說明即使 rAAV 所攜帶的基因片段大小有所限制，仍能夠應用於大基因片段的基因傳遞(84)。

遺傳性疾病囊狀纖維化症 (Cystic fibrosis, CF)是由於呼吸道上皮細胞上的氯離子通道出現異常，Terence R. Flotte 在 1993 年使用 rAAV 攜帶 fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)基因，並用 rAAV 本身的 ITR promoter 與 p5 promoter 啟動 CFTR 這個基因來治療 CF，使得呼吸道上皮細胞回復 cAMP 所調控的氯離子通道功能(65)。在治療 CF 的部份，很多都已經進行到臨床試驗階段(85)。

應用於腫瘤治療方面，主要是把催化細胞毒性的藥物前驅物的酵素基因置於腫瘤細胞裡，再將具有細胞毒性的藥物前驅物送到腫瘤附近，藉由酵素分解藥物前驅物產生毒性，毒殺腫瘤細胞；或者利用調控致癌基因或者腫瘤抑制基因，抑制血管新生成或者增強宿主免疫機制，抑制腫瘤生長。

另外 Hermonat PL (1994) 的研究中也發現 AAV 本身似乎可以藉由減低前致癌基因的表現而有抑制腫瘤的性質，原因可能是由於 AAV 中的 Rep78 蛋白抑制前致癌基因的啟動子 human c-fos、c-myc proto-oncogene promoters，並且停止細胞增生(86)。Saudan P (2000) 研究中也指出 Rep78 可以使 pRb 變成去磷酸化狀態，導致細胞在 S-phase 時期被終止(87)。



## 1.4 重組腺相關病毒

重組腺相關病毒(Recombinant Adeno-associated virus, rAAV) 因為具有許多基因治療上的優點，因此成為近來最常被研究並應用的基因治療載體之一。Atchison RW (1965) 在實驗室儲存的腺病毒中發現血清型第二型腺相關病毒 (Adeno-associated virus serotype 2, AAV2)，接著其它在基因序列有不同程度相似度的不同血清型的 AAV 及其變種病毒陸續被發現。雖然如此，仍以第一個被發現的 AAV2 被研究的最徹底，並最常被用來當做基因治療載體。

### 1.4.1 從腺相關病毒到重組腺相關病毒

在使用 AAV 當做基因治療載體的前期有許多的限制，首先要克服的就是在 AAV 生產的過程中需要用完整的 AAV 與 Adenovirus 同時感染細胞，Richard J. Samulski (1982) 在期刊 PNAS 中發表，將 AAV 的基因置入 pBR322 質體中，就是所謂的 rAAV 的原型(88)。Laughlin CA (1983) 將 AAV 基因構築在細菌的質體的研究也發表在期刊 Gene 中(89)。由於這些研究，使得 AAV 的生產簡化，只要將質體轉染進已感染 Adenovirus 的細胞，而不必經由完整的 AAV 感染細胞來生產 AAV。在另一方面，這些研究更大的貢獻是由於這些質體的建立，提供了未來在研究 AAV 基因的功能一個方便的大門。

然而還是有許多問題尚未解決，其中一個就是無法完全將 Adenovirus

從 AAV 生產過程中除去，導致 AAV 應用在基因治療上，會因為 Adenovirus 而存在出現副作用，包括引起強烈的細胞免疫反應。AAV 的生產過程中需要 Adenovirus 的部份基因產物的幫助，才能使得 AAV 脫離潛伏期 (latent cycle) 進入細胞溶解期 (lytic cycle)，而啟動病毒基因的複製與病毒的包裹，因此在生產 AAV 的過程中不可避免的需要使用 Adenovirus 感染細胞，而使生產出來的 AAV 被 Adenovirus 污染。許多的研究都在改善 Adenovirus 污染的問題：1) 利用 Adenovirus 與 AAV 不同的物理性質，例如對於熱穩定性的不同，加熱 AAV 產物 56°C 30 分鐘使 Adenovirus 失去活性，或者利用兩種病毒的比重不同，使用氯化鈉產生的比重梯度，分離兩種病毒，這些方法都可以改善 Adenovirus 污染的問題。

在之後的研究中發現 Adenovirus 幫助 AAV 的生產，是依賴 Adenovirus 基因中的 E1A、E1B、E2A、E4ORF6 及 *V4* RNAs 表現所提供的功能所達成的。1998 年，Grimm D、Matsushita T、Xiao X 分別在 *Human gene therapy*、*Gene therapy* 及 *Journal of viology* 三個期刊發表其各自無 Adenovirus 污染的 AAV 生產的研究(90-92)，主要使用的方法就是把 Adenovirus 的 E2A、E4ORF6 及 *V4* RNAs 構築在其中一個質體，並與另一個表現 rAAV *cap* 與 *rep* 的質體共同轉染進表現 E1A、E1B 的細胞株，這樣就可以在不透過感染 Adenovirus 的情況下生產 rAAV，並且確定在生產過程中不會有野生型 Adenovirus 的產生。

生物科技公司 Stratagene 根據 Matsushita T 在 *Gene therapy* 發表的

Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus 文獻建立了一個無 Adenovirus 污染的 rAAV 生產的系統 (AAV Helper-Free system)，經由這個系統可以透過簡易的轉染流程生產出 rAAV。我的實驗設計就是建立在此一系統之下，修改 rAAV 的蛋白質外殼，改變其感染宿主細胞的對象與能力。

## 1.4.2 重組腺相關病毒在基因治療上的限制與改進

雖然重組腺相關病毒在作為基因治療上有很多的優點，但是仍然有許多值得改進的地方。在作為基因治療的載體上，重組腺相關病毒可以廣泛感染人類的細胞是一個優點也是一個缺點，優點是感染的細胞種類眾多，在細胞實驗上使用限制就比較小；但是缺點是實驗最後的目的都是希望應用在人體上，廣泛感染人類細胞會造成治療用的基因在錯誤的組織或者器官表現，導致病人產生不可預期的疾病。因此改善腺相關病毒的專一性是許多科學家研究的課題：

1. Jeffrey S. Bartlett (1999) 使用 bispecific F(ab')<sub>2</sub> antibody 的技術，此一技術包含兩種抗體，分別可以結合 AAV 與 megakaryocyte 細胞，連結這兩種抗體，拉近 AAV 與 megakaryocyte 細胞，使得 AAV 更專一性的感染 megakaryocyte 細胞(93)。
2. Shaun R. Opie (2003) 利用點突變的方法測試結構性蛋白上的哪些胺基酸影響 Heparan binding site 與 HSPG 交互作用，結果當第 585 號與第

588 號的精胺酸 (arginine) 被突變成丙胺酸 (alanine) 時，AAV 失去了大部分的感染能力，根據實驗結果，第 585 號與第 588 號的精胺酸 (arginine) 在 heparan binding site 與 HSPG 的結合上扮演重要角色(94)。

3. Muller OJ (2003) 在病毒的結構性蛋白上的 heparan binding site 做突變，並插入一段隨機的 peptide 片段，使得 AAV2 改變其感染趨性，成功的讓 AAV2 可以感染人類冠狀動脈內皮細胞並失去感染其他細胞的能力(95)。

4. Warrington KH Jr (2004) 則提出結構性蛋白 VP2 的 N 端序列是非必需的，可以將之去除並加入一段最大 30kDa 的蛋白質序列，提供三級結構與細胞表面的受體結合(39)。

可攜帶基因片段太小也是 AAV2 應用在實驗上的缺點之一，因為野生型的 AAV2 其基因組大小約是 4650 nucleotides，因此在去除 rep 基因和 cap 基因之後，中間可以放入一個啟動子與 2~3kb 的基因，然而一般人類的基因通常大於 2~3kb，導致以 AAV 為基礎的病毒載體無法攜帶過大的基因組，無法形成具感染力的病毒顆粒。故為了改善此缺失，許多研究提供不同方法，以增進可攜帶基因的長度。

1. Yan Z (2000) 在期刊 Nature medicine 中提出：可以將大型基因分成兩個部分並放到兩個 rAAV 質體中，再利用剪接訊號 (splice signal) 使得大型基因片段轉錄出的 mRNA 結合在一起，表現出完整有功能的蛋白質(96)，(圖十四)。

2. Adenovirus 擁有攜帶大片段基因以及有效率且不受限於細胞週期 (cell-cycle) 將基因傳遞到細胞核的能力，而 AAV 可以具有長期基因表現及具有不攜帶病毒基因的特質，Manuel A. F. V. Gonçalves 結合 Adenovirus 與 AAV 的優點，建立了 AAV/Ad 雜合病毒載體。這個病毒載體結合了 AAV 的複製機制與 Adenovirus 病毒包裹的過程，利用腺病毒的包裹序列與腺相關病毒的基因組結合，並克服腺病毒污染的情況，產生了高容量的雜合病毒(97)。

3. Harper SQ 則使用另外的策略，先將 dystrophin 的功能作詳細的分析，並且分割成許多小小的功能片段，把這些具有部分功能的基因利用 AAV 載體送到宿主細胞中，一起執行完整的功能(84)。

4. Grieger JC (2005) 在其論文中指出缺乏結構性蛋白的 VP2 並不會影響 AAV 感染細胞時的效率，相反的，在沒有 VP2 存在的情況下，可以提升 AAV 對於 DNA 的容量，最多可以達到 6.0kb(98)。

以 AAV 當做治療用基因載體，在活體實驗上遇到的另一個問題是無法立即表現治療用基因，通常在注射後有四到六個禮拜的延遲時間，才會開始表現治療用基因，AAV 第二股的合成是造成延遲的主要原因。McCarty DM (2001) 設計了一個自我互補的 rAAV 的基因治療載體，這個基因載體包含雙股 DNA 的基因組，不僅可以避免因為合成 AAV 的第二股所造成的

延遲，另外在細胞實驗中亦提高了感染細胞的效率達 140 倍(99)。

### 1.4.3 重組腺相關病毒生產模式

重組腺相關病毒主要生產的模式有三種，包含產生穩定的細胞株、建立一個包含完整腺相關病毒基因體的雜合重組腺病毒、以及無腺病毒污染的重組腺相關病毒生產系統 (AAV Helper-Free system)：

1. 產生穩定的細胞株 (packaging cell)，以感染輔助病毒 (Helper virus) 如腺病毒開啟重組腺相關病毒的生產。主要是把兩種腺相關病毒的基因組質體轉染進細胞如HEK293細胞或者HeLa細胞，此一質體包含了野生型AAV除了ITR外所具有的所有基因，另外一個質體則帶有ITR、治療用基因、以及抵抗新黴素基因 (neomycin resistance gene)，在轉染進細胞之後，使用新黴素篩選出有轉染成功的細胞。當需要AAV2時，必須使用幫助病毒感染此一穩定的細胞株，開啟AAV2的生產(100)。
2. 建立一個包含完整rAAV基因組的雜合重組腺病毒，這個雜合腺病毒的功能就是把rAAV的基因組送到包裹細胞裡面。當需要生產rAAV時，只要同時感染雜合腺病毒與野生型的腺病毒，就可以生產出大量的rAAV，利用這個方法可以省卻許多在轉染部分所花費的時間(101)。
3. 三質體系統 AAV Helper-Free System (stratagene)(91)。在 AAV

Helper-Free System (stratagene) 裡，*rep*和*cap*基因從ITRs中間被剔除並且放到pAAV-RC中，這個步驟可以幫助ITRs中間可以包含更大的插入基因，並減少野生型病毒產生的可能。AAV Helper-Free System包含三種質體：

A. pAAV-MCS

包含一個CMV promoter以及一組多重選殖位，兩端由ITRs所包圍，CMV promoter可以使後面的基因在真核細胞中表現，而多重選殖位可以置入我們想要使用的治療用基因。

B. pAAV-RC

包含一個*rep*區域以及一個*cap*區域，產生Rep蛋白幫助pAAV-MCS複製，提供構成capsid的結構性蛋白、幫助病毒包裹(packaging)。

C. pHelper

保留Helper病毒幫助AAV產生的基因，並去除其他基因，使其無法在產生Helper病毒顆粒。

當需要rAAV2時，必須將三種質體同時轉染到HEK293細胞中，才可以生產rAAV2。

## 1.5 嗜菌體表現技術

Smith GP (1985) 在期刊 Science 上首先提出了噬菌體表現技術(102)，原理是在絲狀噬菌體 (filamentous bacteriophage) 的三號基因 (filamentous phage gene III, pIII) 上插入外來 DNA 片段而產生出中間具有外來序列的融合蛋白。此一融合蛋白可以組裝到噬菌體顆粒中，產生具有感染能力又能夠表現外來胜肽片段的病毒。之後的研究發現，除了在原本的次要外殼蛋白 pIII 可以嵌入且呈現外來胜肽片段外，其主要外殼蛋白 pVIII 與次要外殼蛋白 pVI 也可以當做嵌入呈現外來胜肽片段的對象。根據對最後挑選出來的胜肽片段親合力 (affinity) 或者結合力 (avidity) 的需求不同，我們可以選擇不同外殼蛋白當作呈現外來胜肽片段：主要其中主要外殼蛋白由於分子數目較多，因此將外來胜肽片段呈現在主要外殼蛋白 pVIII 可以篩選出較高結合力的胜肽片段，相反的，將外來蛋白胜肽片段呈現在次要外殼蛋白上，則可挑選出較高親和力的胜肽片段。

除了表現外來胜肽片段的噬菌體之外，噬菌體表現技術另外一個主要的組成是隨機胜肽庫的建立。隨機胜肽庫性質由以下兩點來決定 1) 胜肽片段的長短、2) 構型逼迫式胜肽庫 (conformationally constrained libraries) 或者構型非逼迫式胜肽庫 (conformationally unconstrained libraries)(103)。

目前所使用的胜肽片段的大小最多可以由 38 個胺基酸所構成，然而一個胺基酸可以產生 20 種變異，一個由 8 個隨機胺基酸所組成的胜肽片段將具有  $2.54 \times 10^{10}$  種變異，根據統計上的計算，要構成如此龐大的基因多樣性，



必需在細菌的轉型效率上達到  $1.1 \times 10^{12}$  才有可能達成，而這已經是實驗上可以達成構築胜肽庫的極限，意味著隨機胜肽庫包含再多的胺基酸並無法再增加隨機胜肽庫的胜肽多樣性。同時具有更多胺基酸的隨機胜肽片段將需要產生更穩固的構型來維持與目標的親和力，另外在胜肽片段結構分析及非胜肽結構的建立 (development of non-peptide structures) 也將隨著機胜肽庫所包含胺基酸的增加而更加複雜。

另外是否為構型逼迫式胜肽庫 (conformationally constrained libraries) 也影響挑選出的胜肽片段的性質。比較沒有彈性 (Flexibility) 的胜肽片段可以降低減少的熵 (entropical costs) 與目標結合，簡單的來說就是沒有彈性的胜肽片段能與目標有較好的親和力。構型逼迫式胜肽庫是在胜肽兩端分別加上一個半胱胺酸 (cysteine) 而形成雙硫鍵，使得胜肽可以形成第三級結構。因此構型逼迫式胜肽庫具有較非構型逼迫式胜肽庫更穩固的構型，也使得從構型逼迫式胜肽庫挑選出來的胜肽片段與目標有更好的親和力。

本研究的實驗目的就是利用已經發表經由噬菌體表現技術所找到的細胞專一性胜肽片段呈現在重組腺相關病毒的蛋白外殼的表面，導引攜帶治療基因的 rAAV 到特定細胞，完成基因傳遞的任務。以下是根據已發表的文獻，所搜尋到的細胞專一性胜肽片段。

1. L14 peptide : QAGTFALRGDNPQG，擁有 RGD motif 可以感染對 AAV2 感染有抵抗能力的 B16F10 細胞株。在 1999 年 AAV2 的 X-ray 晶體繞射結構還尚未解出，根據犬小病毒 (canine parvovirus, CPV) 與

AAV 都是屬於小病毒 (parvovirus) 中的一種，且其病毒結構相似，Anne Girod 使用 SOPM algorithm 軟體分析已知 X-ray 晶體繞射結構的 CPV 蛋白質外殼，並且使用 CLUSTAL W program 軟體比對 CPV 和 AAV 的病毒外殼蛋白序列，找尋出六個可能的位置，位於病毒外殼外緣並且與細胞做結合，分別是第 261、381、447、534、573 及 587 胺基酸的位置，然後在其後嵌入 L14 peptide，此一胜肽片段是 1999 年 Aumailley 在蛋白質 laminin A chain 中所找到，與細胞結合有關的 motif(104)，分別對野生型與突變的 AAV 組裝病毒基因的能力、L14 peptide 是否可以暴露在病毒外表、突變的 AAV 是否可以與 B16F10 細胞表面的特殊整合素受器 (integrin receptor) 結合、與 B16F10 細胞表面的特殊整合素受器結合是否是因為 L14 peptide 所引導等因子做測試，最後測試突變病毒所帶的基因是否在能夠 B16F10 細胞中表現。根據實驗成果，將 L14 peptide 嵌在第 587 號胺基酸後面可以通過以上種種測試，因此證明在第 587 號胺基酸後面嵌入 L14 peptide 可以改變 AAV 感染宿主細胞的趨性，因此挑選此一胜肽片段當作胜肽導引式基因傳遞系統的控制組之一(105)。

2. TP A549.1 : MTVCNASQRQAHAQATAVSL，此一胜肽片段由 20 個胺基酸所構成，是屬於較大的胜肽片段，原本隨機胜肽庫構築於 bacteriophage coat protein pIII，系統是參考自 S.E. Cwirla (1990) 在 PNAS 上發表的系統。TP A549.1 可以專一性的將噬菌體引導至人類肺癌細胞 A549(106)。

3. C2C12 12.51 : TARGEHKEEELI，此一胜肽片段由 12 個胺基酸所構成，可以專一性的引導噬菌體與 C2C12 細胞株結合並使腺病毒感染 C2C12 細胞株。Debaduti Ghosh 在其研究中認為：生產細胞專一性的基因載體，可以藉由在病毒蛋白外殼表面放置細胞專一性的胜肽，引導基因載體到感興趣的細胞種類中。但是把特殊的胜肽片段直接置入病毒蛋白外殼可能會造成病毒外殼失去功能、造成胜肽片段因構形改變而失去功能、無法組裝完整的病毒、或者破壞整個病毒結構，使得整個細胞專一性基因載體失去功能。因此作者設計了以下的實驗：1) 將 Adenovirus 裝載外來胜肽片段的骨架放到絲狀噬菌體上，2) 再將隨機胜肽庫放置在絲狀噬菌體上的 Adenovirus 骨架上。3) 經由噬菌體對 C2C12 細胞株呈現 Adenovirus 骨架上的隨機胜肽片段，找到 C2C12 專一性的胜肽片段，4) 最後再將此一片段放到 Adenovirus 原本的骨架上，產生可以專一性感染 C2C12 的 Adenovirus。根據此篇文獻，挑選 C2C12 12.51 這個胜肽序列，當做測試可以放置並引導 Adenovirus 感染 C2C12 細胞株的胜肽片段，是否可以引導 AAV 感染 C2C12 細胞株(107)。

4. GE11 : YHWYGYTPQNV I，此一胜肽片段由 12 個胺基酸所構成，可以專一性的 Epidermal growth factor receptor (ErbB1, EGFR) 結合。多種人類多細胞都能表現 EGFR，其在細胞生長、分化與遷移上扮演重要的角色。研究發現由 EGFR 向細胞內傳遞的訊息將會造成增加細胞增生，減少細胞程序凋亡，並且使腫瘤提升細胞移動能力與血管新生成。

Zonghai Li 等人使用 NEB 公司的產品 Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit，篩選出可以跟 EGFR 蛋白結合的胜肽序列，GE11(108)。

5. RG2 P2L：DYDMTKNT，此一胜肽片段由 8 個胺基酸所構成，可以專一性引導噬菌體與 RG2 細胞株結合。研究中使用三種方法來挑選對惡性神經膠細胞 (malignant glial cells) 有結合能力的胜肽片段，(圖十五)。第一種是直接使用 RG2 細胞做篩選，挑選出對 RG2 有高親和力的胜肽片段，以及可以被 RG2 吞噬的胜肽片段，這樣的胜肽片段沒有經過事先的挑選，因此可能具有或者不具有與其他種類細胞結合的特性。在第二種篩選方法是使用對纖維組織母細胞 (fibroblasts)、肌肉組織母細胞 (myoblasts) 及肝細胞 (hepatocytes) 進行負篩選，挑選無法跟以上細胞結合的胜肽片段，再挑選對 RG2 有高親和力的胜肽片段，以及可以被 RG2 吞噬的胜肽片段，經由這些步驟之後，可以得到對腦有專一性的胜肽片段。第三種方法是透過減少每種噬菌體片段的個數，並加入阻礙噬菌體 (blocking phage) 減少非專一性的結合，再使用第二種方法挑選無法對星細胞 (astrocytes)、肌肉組織母細胞及肝細胞有親和力的胜肽片段，最後從這些胜肽片段挑選出對 RG2 細胞有專一性的胜肽片段。根據實驗結果，第二種方法找到的 RG2 P2L，我挑選利用第二種方法找出的胜肽片段置入胜肽引導式細胞專一性基因傳遞系統(109)。

## 第二章 實驗策略

我的實驗目的就是建立一個胜肽導引式的基因傳遞系統，此一系統運用由噬菌體表現技術所發現的細胞專一性胜肽，引導治療用基因到特定的細胞組織中表現，達到基因治療的效果。

重組腺相關病毒 (Recombinant Adeno-associated virus, rAAV) 是挑選作為研究的基因治療載體。此一基因治療載體由兩個部份所構成：1) 六十個病毒蛋白次單元 (VPs) 組裝的蛋白質外殼包覆著 2) 攜帶著治療用基因的單股 DNA。rAAV 利用其 VPs 上的 Heparin binding site 與宿主細胞結合，進而感染宿主細胞。Shaun R. Opie 在其 rAAV 的 VPs 點突變實驗中發現，位於 Heparin binding site 上的第 585 號精胺基酸及第 588 號精胺基酸對於經由 HSPG 感染細胞的途徑是重要的，如果把這兩個帶正電的精胺酸替換成不帶電的丙胺酸，將使得 rAAV 失去經由 HSPG 感染宿主細胞的能力。另外也有研究發現，在 Heparin binding site 後面可以容許嵌入一小段的胜肽分子，而不影響病毒的結構。

根據以上兩點，我設計一個可以在 DNA 層級做修飾而改變其生產出來的 rAAV 專一性的基因傳遞系統。此一系統的核心概念分成兩個階段：

第一，為了減低因為 rAAV 廣泛感染人類細胞的能力，使得基因治療產生不可預期的後果，我們對 Heparin binding site 做突變，使得 rAAV 無法利用細胞上的 HSPG 黏附在細胞表面，此時生

產出來的 rAAV 將失去感染細胞的能力。

第二，為了提供 rAAV 專一性傳遞治療基因的能力，讓治療用基因可以在特定的細胞或組織表現，我們的做法是在已經突變的 Heparin binding site 的中間嵌入一段利用噬菌體表現技術所篩選出細胞專一性的胜肽片段，利用此一胜肽片段提供 rAAV 與特定細胞黏附的能力，進而使 rAAV 可以感染並傳遞治療用基因到目標細胞。



## 第三章 實驗流程

本實驗的目的是建立一個胜肽導引式的基因治療載體系統，我們可以通過在這個系統上搭載不同的細胞專一性胜肽，使得我們的基因治療載體具有感染特定種類細胞的能力。

在我的實驗設計上，實驗流程粗分為三個階段，分別是質體的構築、rAAV 的生產、以及對於實驗結果的驗證三個部份，實驗流程簡述如下：

### 3.1 質體的構築

減低因為 Heparin binding site 導至的 rAAV 廣泛感染人類細胞的能力，運用 site-specific mutagenesis by overlap extension 的技術在攜帶病毒蛋白外殼基因的 pAAV-RC 上產生突變，使其失去經由 HSPG 感染細胞的能力，並在其上創造出兩個唯一的限制酶切割位，方便之後細胞專一性胜肽基因的置入。

為了生產出專一性感染特定細胞的 rAAV，利用搜尋噬菌體表現技術的相關文獻中所篩選出的細胞專一性胜肽序列，將這些胜肽序列轉換成基因序列，並且經由唯一的限制酶切割位將找到的胜肽基因置入 pAAV-RC 中，使得此一質體可以提供可以感染特定細胞的病毒蛋白外殼。

### 3.2 重組腺相關病毒的生產

重組腺相關病毒的生產是按照 AAV Helper-Free system 中的標準流程，

分成兩項依序進行，1) 首先將準備好 293T 細胞，在轉染前 48 小時 Seeding 於直徑 100mm 的細胞培養盤，然後利用磷酸鈣法將 pAAV-hrGFP、pAAV-RC、pHelper 三種質體轉染進入 293T 細胞，並在 6 個小時之後更換新鮮的細胞培養液，完成轉染的程序。2) 然後在更換新鮮的細胞培養液後的第 66~72 小時收集細胞以及培養液，進行四個循環的-80°C/37°C 來打破細胞。離心 10000g 除去細胞殘骸，分裝上清液並凍入-80°C 保存。

### 3.3 實驗結果的驗證

為了檢驗我們所建立的胜肽導引式基因治療載體系統是否可行，因此設計以下實驗，包括：1) 對於野生型病毒感染能力測試，過去的研究中發現，野生型的 AAV 可以廣泛感染人類細胞，但是對於不同種類的細胞，其感染能力並不相同，因此我使用 AAV 來對我將做研究的細胞株作病毒感染能力的測試，瞭解在不同的細胞株下，病毒對其感染的效率為何，並當做之後對不同種細胞做感染時，所應加入 AAV 的數量依據；2) 研究突變對於病毒感染能力的影響，文獻中指出，在 AAV 病毒蛋白外殼上的 Heparin binding site 作突變，可以破壞 AAV 經由細胞表面受器 HSPG 感染細胞的途徑，因此，設計此一實驗驗證經由對病毒的突變是否能夠使其失去感染細胞的能力，而使得這個突變的病毒可以當做未來的系統控制組；3) 對我們所設計的胜肽導引式 rAAV 做功能性測試，這個部份是就我們所置入的細胞專一性胜肽是否可以引導 rAAV 感染並且將基因傳遞到目標細胞的測試，驗證我們



所設計的系統是否能夠因我們所挑選的細胞專一性胜肽片段，而使其得到專一性感染細胞的能力。



## 第四章 材料與方法

### 4.1 菌種的培養與轉型

#### 4.1.1 菌種的取得

實驗所用的菌種來源包括大腸桿菌 *ECOS 101* (益生生技, 台灣, 中華民國) 與大腸桿菌 *TOP10* (Invitrogen, Groningen, Netherlands)。其基因型分別如下：

**ECOS 101** : F<sup>-</sup> ( $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15) $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *hsdR17*(*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>)  
*recA1 endA1 relA1 deoR*  $\lambda$ <sup>-</sup> (類似 DH5)

**TOP10** : F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1*  
*deoR araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

#### 4.1.2 培養液與培養基的配置

以上兩種菌種都是使用 LB 培養基與 LB 培養液培養，實驗所用 LB 培養液與 LB 培養基製備方法如下：

Sodium chloride (NaCl)	10g
Tryptone	10g
Yeast extracts	5g
Agar	20g (LB 培養基需額外添加)

1. 秤重取出上列藥品，加入二次水約略到 900mL。
2. 搖晃讓所有粉末溶解。

3. 使用量筒精確量取體積，再用二次水將溶液總體積補到 1000mL。
4. 混合均勻並分裝到 500mL 或 1000mL 血清瓶中，分裝不可超過血清瓶體積的 80%。
5. 蓋上並旋轉瓶蓋到一半緊的狀態，再以錫箔紙覆蓋瓶蓋到瓶頸的部份。
- 6.1. LB 培養液：貼上滅菌條，送到壓力鍋滅菌。滅菌完成後，鎖緊瓶蓋。等到近於室溫時，放至 4°C 冰箱中保存。
- 6.2. LB 培養基：貼上滅菌條，送到壓力鍋滅菌。滅菌完成後，拿出並搖晃混合均勻，置於 65°C 水浴槽中，使 LB 培養基溫度約等同於 65°C。將 LB 培養基移至無菌操作台上，傾倒 10mL 的 LB 培養基到 LB 培養基盤子上，等待冷卻後標上標籤，並放至 4°C 冰箱中保存。
- 7.1. 需要使用含抗生素之 LB 培養液，篩選含有特定種類質體的大腸菌時，查詢適合的抗生素與其使用量 (附表)，在使用前添加並混合均勻並分裝。
- 7.2. 需要使用含抗生素之 LB 培養基，篩選含有特定種類質體的大腸菌時，查詢適合的抗生素與其使用量 (附表)，在 LB 培養基分裝到培養基盤子前 (LB 培養基溫度應於 65°C 以下以免抗生素失效)，加入適當量的抗生素，混合均勻，將 LB 培養基移至無菌操作台上，傾倒 10mL 的 LB 培養基到 LB 培養基盤子上，等待冷卻後標上標籤，並放至 4°C 冰箱中保存。

### 4.1.3 勝任細胞的製備

實驗所用的勝任細胞是以大腸桿菌 *ECOS 101* (益生生技, 台灣, 中華民國)與大腸桿菌 TOP10 (Invitrogen, Groningen, Netherlands)為原始菌種的熱震盪勝任細胞, 製備所需藥品與方法如下:

LB 培養液 (不含抗生素)

LB 培養基 (不含抗生素)

0.1M Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) filtered with 0.2 $\mu\text{m}$  filter

0.1M Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) contain 10% Glycerol filtered with 0.2 $\mu\text{m}$  filter

Amp LB 培養基 (含 Ampicillin 50ug/mL)

1. 取出原始菌種菌液於 LB 培養基上做三方向塗盤, 培養 12 小時。
2. 挑出單一菌落並加入含有 3mL LB 培養液的養菌管中, 置於 37 °C 培養箱, 以轉速 225rpm 培養 12 小時。
3. 取出 1mL 菌液, 加入含有 100mL LB 的錐形瓶中, 繼續培養 1 至 2 小時, 一小時過後應每十五分鐘量一次 OD600。
4. 預冷離心機使其溫度維持在 4°C, 準備冰水共存 (0°C)之冰桶, 將兩只 50mL 無菌離心管及新鮮配製的 0.1M  $\text{CaCl}_2$  100mL、包含 10% Glycerol 的 0.1M  $\text{CaCl}_2$  10mL 放置於冰桶中, 使之維持在 0°C。
5. 取 1mL 培養 1 至 2 小時的菌液, 並測量其 OD600 數值, 當其數值為 0.35~0.45 時進行下面步驟 (不可大於此值)。

6. 分裝菌液至預冷的 50mL 無菌離心管中，置於冰水共存 (0°C) 之冰桶中 10 分鐘。
7. 將菌液以 4100 rpm 的速度離心 10 分鐘 (4°C)。
8. 倒掉上清液，並倒置離心管 30 秒，馬上放置離心管於冰桶中。
9. 加入 0.1M CaCl<sub>2</sub> 30 ml (0°C) 於離心管中，使用 1mL 微量吸注器溫和的沖散大腸菌沉澱。
10. 將菌液以 4100 rpm 的速度離心 10 分鐘 (4°C)。
11. 倒掉上清液，並倒置離心管 30 秒，馬上放置離心管於冰桶中。
12. 加入包含 10% Glycerol 的 0.1M CaCl<sub>2</sub> (0°C) 2mL 到離心管中，使用 1mL 微量吸注器溫和的沖散大腸菌沉澱。
13. 以每一管 100μL 勝任細胞分裝到 1.5mL 的 eppendorf 中 (0°C)，迅速分裝完後，立刻置入 -80°C 冰箱中。
14. 經過 12 小時後，自 -80°C 冰箱中取出兩管勝任細胞進行轉型實驗，其中一管加入質體 pUC19 進行勝任細胞轉型，測試勝任細胞的效率；另一管則不加入任何質體，確認勝任細胞製備過程中是否有污染。取轉型後勝任細胞 100μL 菌液，於 Amp LB 培養基上進行塗盤，確認勝任細胞效率與污染情況。
15. 實驗所用勝任細胞為無污染且效率達  $5 \times 10^6 / \mu\text{g}$  pUC19 之勝任細胞。

#### 4.1.4 勝任細胞的質體轉型

實驗所用勝任細胞轉型的方法是熱震盪式轉型，實驗所需藥品與流程如下：

LB 培養液 (不含抗生素)

含抗生素之 LB 培養基

1. 自  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱取出勝任細胞，放置冰上溶解 5 分鐘。
2. 加入  $5\mu\text{L}$  的接合酶接合反應的產物，或者  $1\mu\text{L}$   $1\text{ng}/\mu\text{L}$  的質體到勝任細胞中，稍微輕彈使之混合均勻。
3. 立刻放置勝任細胞冰上 30 分鐘。
4. 移動勝任細胞至  $42^{\circ}\text{C}$  的水浴槽中 2 分鐘，進行熱震盪 heat-shock 轉型反應。
5. 迅速將勝任細胞置回冰上 2 分鐘。
6. 加入 LB 培養液  $250\mu\text{L}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ )，移至  $37^{\circ}\text{C}$  的培養箱中，以轉速 225rpm 搖晃培養 30~50 分鐘。同時放置含抗生素之 LB 培養基於  $37^{\circ}\text{C}$  的培養箱中回溫。
7. 取  $100\mu\text{L}$  的菌液均勻塗布在含抗生素之 LB 培養基上，再置回  $37^{\circ}\text{C}$  的培養箱中培養 12 小時。

## 4.2 DNA 純化

### 4.2.1 小量質體純化

實驗所使用之小量質體純化是運用 Gene-Spin™ -V2 Miniprep Purification Kit (波仕特, 台灣, 中華民國) 的實驗模組來進行小量質體的純化, 實驗所需藥品與流程如下:

Solution 1 (pH8.0) (含 RNase A)

Solution 2

Solution 3 (pH5.1)

Washing solution

Elution buffer or 二次水 (已滅菌)

1. 將培養 16~18 小時的 3mL 菌液分次移至 1.5mL eppendorf 中, 離心 13000rpm 1 分鐘, 倒掉上清液, 再短暫離心將殘留在管壁上的液體離心至 eppendorf 底部, 用微量吸注器將底部液體吸乾, 注意不可吸到下方大腸菌沉澱。
2. 加入 200 $\mu$ L Solution 1 並使用微量吸注器將大腸菌沉澱沖散, 直到大腸菌完全的懸浮起來, 且沒有塊狀物殘留。
3. 加入 200 $\mu$ L Solution 2 並溫和的翻轉搖晃 eppendorf, 小心的混合均勻, 得到呈黏稠狀的混合物。
4. 加入 200 $\mu$ L Solution 3 並溫和的翻轉搖晃 eppendorf, 小心的混合均

勻，直到白色凝結物 (蛋白質與細胞殘渣)產生。

5. 放置 enppendorf 於離心機中並小心平衡，離心 13000rpm 5 分鐘。此時白色凝結物將會沉澱於 enppendorf 的一邊或者底端。

6. 將 spin column 放入 collection tube 中，小心的吸起白色凝結物以外的上清液，注入結合好的 spin column 中，離心 13000rpm 1 分鐘。

7. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，注入 700 $\mu$ L Washing solution 到 spin column，離心 13000rpm 30 秒。

8. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，注入 700 $\mu$ L Washing solution 到 spin column，離心 13000rpm 30 秒。

9. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，離心 13000rpm 五分鐘，以去除留在 spin column 的殘留液體。

10. 將 spin column 裝在一個乾淨的 eppendorf 上，打開蓋子，置於 37 $^{\circ}$ C 乾浴槽上 5 分鐘，蒸發殘餘的酒精。

11. 加入 50 $\mu$ L 二次水到 spin column 中，質體大小若大於 7kb，則加入預熱過的 60 $^{\circ}$ C 二次水，靜置一分鐘。

12. 將裝置於 eppendorf 上的 spin column 放到離心機中並平衡，離心 13000rpm 1 分鐘，將丟棄 eppendorf 上的 spin column。



13. 取 eppendorf 中的溶液，使用 photometer 測量其 260/280 光吸收值，記錄並保存於-20°C 冰箱中。

## 4.2.2 大量質體純化

實驗所使用之大量質體純化是運用 High-copy Plasmid Purification PC100 (波仕特, 台灣, 中華民國) 的實驗模組來進行大量質體的純化，實驗所需藥品與流程如下：

Solution 1 (pH8.0) (含 RNase A)

Solution 2

Solution 3 (pH5.1)

N2 buffer

N3 buffer

N5 buffer

Elution buffer

Isopropanol

70% Alcohol

二次水 (已滅菌)



1. 將培養 16~18 小時的 100mL 菌液移至 250mL 高速離心瓶中，離心 15 分鐘，8,000rpm，4°C，倒掉上清液，將高速離心瓶倒置於乾淨紙巾上 2 分鐘。
2. 加入 4ml S1 buffer，以振盪或微量吸注器將大腸菌沉澱打散。

3. 加入 4ml 的 S2 buffer，緩慢的上下倒轉混合 6-8 次，靜置在室溫 20-25°C 下 2-3 分鐘，最多不超過 5 分鐘。注意不可震盪，否則可能導致 genome DNA 懸浮在溶液中。
4. 加入預先冷藏在 4°C 4mL 的 S3 buffer，緩慢的上下倒轉混合 6-8 次直到產生白色的凝結物，靜置在冰上 5 分鐘。
5. 在 4°C 下，以 12,000rpm 的速度離心 30 分鐘。
6. 用 2.5mL 的 N2 buffer 洗滌並平衡 column 內的 pH 值與離子強度，等 N2 buffer 完全滴完之後，才可以進行下個步驟。
7. 取上清液注入 column 中，等上清液完全滴完之後，才可以進行下個步驟。
8. 用 10mL 的 N3 buffer 洗滌 column 以去除蛋白質及其它雜質。
9. 再用 10mL 的 N3 buffer 洗滌 column，等 N3 buffer 完全滴完之後，才可以進行下個步驟。
10. 加入 5mL 的 N5 buffer 將 column 中的 plasmid DNA 洗提出來。
11. 將 5mL 洗提溶液，分裝至 1.5mL 的 eppendorf 中 (每一管 eppendorf 裝有 830 $\mu$ L 洗提溶液)，然後加入 700 $\mu$ L 異丙醇 (isopropanol) 並混合均勻，靜置冰上 10 分鐘 (0°C)。
12. 以 13,000rpm 離心混合物 45 分鐘 (4°C)，倒掉上清液，注意別把 eppendorf 底部的 DNA 沉澱倒掉。
13. 每一管 eppendorf 加入 1mL 70% 的酒精，凍進 -20°C 冰箱。

13. 當需要使用 plasmid DNA 時，拿一管 eppendorf，離心 13,000rpm 5 分鐘 (4°C)。
14. 倒掉上清液，短暫離心，用微量吸注器吸乾剩餘的酒精，打開蓋子靜置 5 分鐘等待酒精揮發。
15. 加入 20 $\mu$ l 的二次水溶解 DNA，使用 photometer 測量其 260/280 光吸收值，記錄並保存於-20°C 冰箱中。

### 4.2.3 酵素反應後 DNA 純化

實驗所使用之 DNA 純化是運用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit (波仕特, 台灣, 中華民國) 的實驗模組來進行大量質體的純化，實驗所需藥品與流程如下：



Binding solution

Washing solution

二次水 (已滅菌)

1. 將 PCR 產物或者其它經酵素反應後的 DNA 溶液放到乾淨的 eppendorf 中。
2. 當 PCR 產物或者其它經酵素反應後的 DNA 溶液體積小於或等於 100 $\mu$ L，加入 500 $\mu$ L 的 Binding solution，然後使用振盪混合均勻。當 PCR 產物或者其它經酵素反應後的 DNA 溶液體積大於 100 $\mu$ L 時，加入五倍體積的 Binding solution，然後使用振盪混合均勻。

3. 將 spin column 放入 collection tube 中，然後將上一步驟的混合物注入結合好的 spin column 中，離心 13000rpm 1 分鐘。
4. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，注入 700 $\mu$ L Washing solution 到 spin column，離心 13000rpm 30 秒。
5. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，注入 700 $\mu$ L Washing solution 到 spin column，離心 13000rpm 30 秒。
6. 取下 collection tube 上的 spin column，倒掉 collection tube 中的離心後的廢液，將 spin column 裝回 collection tube 中，離心 13000rpm 五分鐘，以去除留在 spin column 的殘留液體。
7. 將 spin column 裝在一個乾淨的 eppendorf 上，打開蓋子，置於 37 $^{\circ}$ C 乾浴槽上 5 分鐘，蒸發殘餘的酒精。
8. 加入 50 $\mu$ L 二次水到 spin column 中，DNA 大小若大於 7kb，則加入預熱過的 60 $^{\circ}$ C 二次水，靜置一分鐘。
9. 將裝置於 eppendorf 上的 spin column 放到離心機中並平衡，離心 13000rpm 1 分鐘，將丟棄 eppendorf 上的 spin column。
10. 取 eppendorf 中的溶液，使用 photometer 測量其 260/280 光吸收值，記錄並保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

## 4.3 酵素催化反應

### 4.3.1 限制酶切割反應

實驗中所使用的限制酶購自 Fermentaus、NEB、Promega。根據不同實驗目的進行不同量的限制酶切割反應。

當進行檢驗質體是否正確、基因是否正確的插入質體時，則進行小量的限制酶切割反應：

取一 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，2.0 $\mu$ L 之 10 $\times$ 限制酶切割反應緩衝液，BSA 0.2 $\mu$ L (50 mg/mL)，1 $\mu$ g 之 DNA，用滅菌的二次水將體積補足至 19.5 $\mu$ L，最後加入 0.5 $\mu$ L 之限制酶 (10U/ $\mu$ L)，反應總體積為 20 $\mu$ l。使用振盪混合，短暫離心後置於適當反應溫度 (通常是 37 $^{\circ}$ C) 之水浴槽中作用 2 小時，而後迅速置於冰上。該反應產物以 2% 洋菜膠體電泳進行分析。

當進行質體構築等需大量經限制酶切割反應完全之 DNA 時，則進行大量的限制酶切割反應：

取一 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，10.0 $\mu$ L 之 10 $\times$ 限制酶切割反應緩衝液，BSA 1.0 $\mu$ L (50 mg/mL)，5~10 $\mu$ g 之 DNA，用滅菌的二次水將體積補足至 90~95 $\mu$ L，最後加入 5~10 $\mu$ L 之限制酶 (10U/ $\mu$ L)，反應總體積為 100 $\mu$ l。使用振盪混合，短暫離心後置於適當反應溫度 (通常是 37 $^{\circ}$ C) 之水浴槽中作用 16 小時，而後迅速置於冰上，接著進行酵素反應後 DNA 純化。純化完後進行之後的實驗，或者存

放於 4°C 冰箱準備進行之後的實驗。

### 4.3.2 PCR

PCR 分為兩個部份，一個是引子設計的部份，一個是 PCR 設計的部份。

在引子設計的部份要注意下列幾點：

1. 引子序列中注意是否需要 ATG 序列或者 Stop codon。
2. 引子中要包含大約 50% 的 GC，如果 AT 大於 50% 的話，需較低的溫度才能使引子與模版結合。而引子與模版結合的溫度我們稱之為  $T_m$  值，這個值並不是不變的，根據不同的化學環境如鹽度不同以及引子序列排列方式及各種核苷酸的組成不同而有變化，理想  $T_m$  值設計在接近 55°C。 $T_m$  可以藉由一些軟體如 Invitrogen 的 Vector NTI 裡面的功能來推估，也可以使用以下公式粗估：

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

3. 以下是使用不同 DNA 聚合酶 PCR 時，配合引子長度序列，大約推估的 PCR 時引子與模版黏合的溫度：

For Taq  $T_m - 7 =$  引子與模版黏合的溫度

For Vent  $T_m - 5 =$  引子與模版黏合的溫度

4. 引子長度設計應該在 20~25 bp 左右是比較恰當的 (不包含外加的序列如限制酶切割位)
5. 引子內序列注意不要有迴文。

6. 引子的 3'端不要 G or C 以避免在 PCR 的時候引子之間提早開始黏附，造成非專一性的 PCR 產物。
7. 進行點突變引子設計時，突變的點應該要設計在 5'端而不要設計在引子的 3'端，以避免 PCR 失敗。
8. 在引子 5'端所設計的限制酶切割位必須在最外端添加 4bp 的隨機核苷酸，以避免限制酶的內切酶特性而使得限制酶切割反應失敗或者不完全。

在 PCR 設計的部份，有幾個比較應該注意的部份，以下分點說明：

1. PCR 是由 denature-annealing-extension 三個步驟重複而產生。使用 Mastercycler Autorisierter thermocycler 提供溫度的變化：95°C 使得模板 DNA 雙股分離 (denature)，然後降溫到適當的溫度 (通常是 55°C)，使引子能夠與模版 DNA 結合 (annealing)，接著將溫度提升到熱穩定 DNA 聚合酶反應適合的溫度 (通常是 72°C) 進行 DNA 聚合反應 (extension)，然後又回到 95°C denature 進到下一個循環。

2. PCR 中引子能夠與模版 DNA 結合 (annealing) 的溫度是影響整個反應好壞的關鍵步驟。當整個 PCR 反應沒有產生任何產物時，除了確認各個反應物有沒有加錯以及酵素有沒有壞掉以外，失敗原因可能是因為調整的 annealing 太高而造成引子沒有與模版結合，使得整個實驗沒有產物出現，因此降低實驗 annealing 的溫度，也許就可以解決此一問題。

另外，annealing 溫度太低可能會造成引子與模版之間不專一性的黏合或

者引子之間不專一性的結合，而產生非專一性的 PCR 產物，此時可以藉由提高 annealing 溫度來減少非專一性的黏合。

3. 在使用熱穩定 DNA 聚合酶進行反應時應該注意其適合的反應溫度，使用不適當的反應溫度可能會使得反應速度變差、失敗、出現非專一性的 PCR 產物或者更容易產生突變。

4. 不同的熱穩定 DNA 聚合酶的反應速度不同，以 Taq DNA 聚合酶而言，其 DNA 聚合反應一分鐘可以合成約 1kb DNA，相對的 DNA 聚合酶 *pfu* 每分鐘只能合成 600bp 左右，因此在 extension 時間要根據反應產物的大小與所使用的熱穩定 DNA 聚合酶決定。

5. 根據不同的使用用途去使用熱穩定 DNA 聚合酶，例如一般實驗室使用 PCR 的熱穩定 DNA 聚合酶是 Taq，因為其價格較便宜，也足夠應用於一般實驗，但是如果需要比較高傳真低錯誤率的 PCR，TaqDNA 聚合酶平均每 500 bp 會出現一個突變可能就不能達到這樣的要求，此時具有校正的熱穩定 DNA 聚合酶 *pfu* 就可以取代 Taq，使用於對於低錯誤率需求較高的實驗。但是一般而言，*pfu* 的價格較 Taq 更高，因此在質體構築使用上，是運用 *pfu* 來減少 PCR 反應實驗突變的機率，而在一般檢測基因是否已經插入載體的 PCR 則是使用 Taq 來完成。

6. 另外，適當的反應緩衝液也是使得 PCR 能夠成功的關鍵因素之一，因為不同的離子強度、鹽度、pH 值會影響模板與引子的結合、酵素與 DNA 的結合，使用商品化實驗套組所附的 PCR 反應緩衝液，可以避免



因為 RCR 反應緩衝液配製的誤差而得到不好的 RCR 反應。

實驗所使用之 PCR 是運用 Pro Taq DNA Polymerase 實驗模組(波仕特, 台灣, 中華民國)與 *pfu* DNA Polymerase 實驗模組 (生工, 台灣, 中華民國) 來進行 DNA 片段的增幅，實驗流程如下：

取一 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，5.0 $\mu$ L 之 10 $\times$ PCR 反應緩衝液，dNTP 1.0 $\mu$ L (10mM)，5~10ng 之模版 DNA，兩股引子，用滅菌的二次水將體積補足至 49.5 $\mu$ L，最後加入 0.5 $\mu$ L 之 DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L)，反應總體積為 50 $\mu$ l。使用振盪混合，短暫離心後置於 Mastercycler Autorisierter thermocycler 進行 PCR，其反應循環順序為 94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 則根據使用的 DNA 聚合酶以及增幅片段大小決定，進行 34 個循環增幅，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘將未完成之序列完成。而後迅速放置冰上，接著進行洋菜膠體電泳確認產物大小是否正確。產物純化完成後進行接下來的實驗，或者存放於 4 $^{\circ}$ C 冰箱準備進行之後的實驗。

### 4.3.3 Site-specific Mutagenesis by Overlap Extension


實驗所使用之突變技術是運用 Site-directed mutagenesis of overlap extension，可分成兩個部份，一個是引子設計的部份，另一個是反應進行的部份。

在引子設計的部份，必須設計兩對引子，分別是將整段基因增幅出來的第一對引子 F2、R2，另一對引子則是在將要突變基因位置上互補的第二對

引子 FM、RM，其中 FM 與 RM 的互補區至少要有 15bp 完全互補，(圖十六)，在設計並合成引子之後，接下來則是反應進行的部份。

Site-directed mutagenesis of overlap extension 的反應分成三個階段進行：

1)使用 FM 與 R2、RM 與 F2 的配對分別進行兩個 PCR 反應，增幅出兩個突變的基因片段 FMR2、RMF2， 2) 再利用這兩個基因片段在突變位置上的互補區域，分別當成彼此的引子進行延長反應 (Extension)，形成完整的突變基因， 3)最後再利用 F2、R2 對這整個突變的基因進行增幅反應 (Amplification)，而取得此一突變基因的 PCR 產物，(圖十七)，方便未來質體的構築。



Site-directed mutagenesis of overlap extension 實驗分三階段進行。第一階段的 PCR 按照表依序加入 40.5 $\mu$ l 的滅菌的二次水、5 $\mu$ l 的 *pfu* PCR 緩衝液、1 $\mu$ l 的 dNTP、1 $\mu$ l (10ng/ $\mu$ l)模版 DNA、兩股引子各 1 $\mu$ l、最後加入 0.5 $\mu$ l 的熱穩定 DNA 聚合酶 *pfu*，使用振盪混合，短暫離心後置於 Mastercycler Autorisierter thermocycler 進行 PCR 反應，依加入引子配對的不同，FM 與 R2、RM 與 F2，分別進行兩個 PCR 反應，增幅出兩個部份基因片段。經由 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit 純化出 PCR 產物，各取出 400ng 的 DNA 進行第二階段的延長反應 (Extension)，在不加入兩股引子的情況下，這個階段按照表依序加入 35.5 $\mu$ l 的滅菌的二次水、5 $\mu$ l 的 *pfu* PCR 緩衝液、1 $\mu$ l 的 dNTP、4 $\mu$ l 的前段基因片段 (100ng/ $\mu$ l)、4 $\mu$ l 的後段基因片段 (100ng/ $\mu$ l)、最後加入 0.5 $\mu$ l 的熱穩定 DNA 聚合酶 *pfu*，進行四次循環的

denature-annealing-extension 的反應，生產出完整的突變基因。第三階段，直接取前一反應的產物 5 $\mu$ l 當作模板依序加入二次水、5 $\mu$ l 10 $\times$ PCR 緩衝液、1 $\mu$ l dNTP、5 $\mu$ l 模版、兩股引子 F2 與 R2 各 1 $\mu$ l、0.5 $\mu$ l 熱穩定 DNA 聚合酶 *pfu*，使用振盪混合，短暫離心後置於 Mastercycler Autorisierter thermocycler 進行 PCR，其反應循環順序為 94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘將未完成之序列完成，增幅出可用於之後構築質體的 PCR 產物。而後迅速放置冰上，接著進行洋菜膠體電泳確認產物大小是否正確。產物純化完成後進行接下來的實驗，或者存放於 4 $^{\circ}$ C 冰箱準備進行之後的實驗。



#### 4.3.4 菌液 PCR

實驗所使用的菌液 PCR 是取培養 8 個小時後的菌液當作 PCR 的模版。依序加入適當體積滅菌的二次水，5.0 $\mu$ L 之 10 $\times$ PCR 反應緩衝液，dNTP 1.0 $\mu$ L (10mM)，1.0 $\mu$ L 的菌液，兩股引子，用滅菌的二次水將體積補足至 49.5 $\mu$ L，最後加入 0.5 $\mu$ L 之 DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L)，反應總體積為 50 $\mu$ l。經過五分鐘的 95 $^{\circ}$ C 處理，進行 35 個循環的 denature-annealing-extension 的反應，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘將未完成之序列完成。產物進行洋菜膠體電泳，篩選出含有標的基因的菌株。

### 4.3.5 接合酶接合反應

實驗所使用之接合酶接合反應是運用 T4 接合酶 (Epicentre) 來進行接合酶接合反應，其實驗流程如下：

取一 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，1.0 $\mu$ L 之 10 $\times$ Ligation 緩衝液，1.0 $\mu$ L 之 ATP (25mM)，經限制酶切割反應後的質體 DNA 以及要插入之基因片段，用滅菌的二次水把體積補足為 9.0 $\mu$ L，最後加入 1.0 $\mu$ L 的 T4 接合酶，使用振盪混合，短暫離心後，置於 16 $^{\circ}$ C 水浴槽或者室溫下 24 小時，然後進行轉型實驗。

## 4.4 胜肽導引式基因治療載體質體的建構

我們的目的是建構出胜肽導引式基因治療載體質體，由此一質體所生產出來的重組腺相關病毒將失去廣泛感染細胞的能力，並且能藉由載入的細胞專一性胜肽基因序列，而使得重組腺相關病毒得到專一性感染細胞的能力。

為了破壞 rAAV 經由細胞表面受器 HSPG 感染細胞的能力，我們使用 Site-directed mutagenesis of overlap extension 將其位於 Heparin binding site 的第 585、588 號精胺酸突變為丙胺酸。根據我們所使用的 AAV Helper-Free System，Heparin binding site 位於質體 pAAV-RC 上的病毒蛋白外殼基因 (*cap gene*) 中，因此我們選擇 pAAV-RC 當做突變的 *cap gene* 選殖的載體。

#### 4.4.1 突變 Capsid 基因之取得

在我的 Site-directed mutagenesis of overlap extension 實驗中，我在病毒蛋白外殼基因上設計兩次突變，第一次的突變 MVP3 在不更動其它任何胺基酸序列的情況下，將其位於 Heparin binding site 的第 585、588 號精胺酸突變為丙胺酸：R585A、R588A，命名為 pAAV-mRC。使用的引子是 FM：MVP3F、F2：pVP3F (BsiWI)、RM：MVP3R、R2：pVP3R (XcmI) 基因序列如表，實驗步驟，(圖十七)。

第二次的突變 M2VP3 維持了第一次突變的 R585A、R588A，但是在此二個胺基酸基因中間添加了兩個限制酶切割位 NheI/NotI，然後調整限制酶切割位與刪除第 585 與 588 號胺基酸中間的基因，方便未來載入胜肽片段，此一突變命名為 pAAV-m2RC，使用的引子是 FM：M2VP3F、F2：pVP3F (BsiWI)、RM：M2VP3R、R2：pVP3R (XcmI) 基因序列如表，實驗步驟，(圖十七)。

這兩個突變的病毒蛋白外殼基因使用 pVP3F (BsiWI) 與 pVP3R (XcmI) 來增幅，得到由 BsiWI 與 XcmI 兩個限制酶切割位所包圍的 PCR 產物。接著使用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit 進行 PCR 產物的純化，測量 OD260 計算 DNA 的濃度，並使用洋菜膠電泳分析是否得到正確的 PCR 產物。

## 4.4.2 突變基因的選殖

突變基因選殖的載體 pAAV-RC 來自商品化的實驗模組 AAV Helper-Free System，取 1ng pAAV-RC 質體 DNA 進行勝任細胞大腸桿菌 *ECOS 101* 的轉型，然後使用玻璃小珠將菌液均勻塗布在含抗生素的 LB 培養基上，37°C 培養 12 小時挑菌。挑出單一菌落到 100mL 含抗生素的 LB 培養液中，於震盪保溫器 37°C 225rpm 培養 16 小時。收集培養後的菌液於高速離心管中，離心 8000rpm 15 分鐘，小心的將上清液到乾淨，使用 High-copy Plasmid Purification 實驗套組進行大量質體 DNA 的純化，並將質體 DNA 溶於水中，並測量 OD260 計算其濃度。其後以限制酶 XcmI 對其進行限制酶切割反應兩小時，然後立即以洋菜膠電泳分析其片段，觀察片段大小是否吻合。

確定純化的質體是 pAAV-RC 後，進行限制酶 XcmI 切割反應。取 10μg 的 pAAV-RC 放入 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，10.0μL 之 10X 限制酶切割反應緩衝液 Buffer 3，用滅菌的二次水將體積補足至 90~95μL，最後加入 5μL 之限制酶 XcmI (NEB)，反應總體積為 100μL。使用振盪混合，短暫離心後置於適當 37°C 之水浴加熱器中作用 16 小時，而後迅速置於冰上，接著使用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit 純化之。取 5μL 純化後的產物進行洋菜膠電泳分析，確定片段正確，將剩餘的產物進行限制酶 BsiWI 切割反應。取純化完後的產物，放入 0.2mL 微量離心管，加入適當體積滅菌的二次水，10.0μL 之 10X 限制酶切割反應緩衝液 Buffer 2，用滅菌的二次水將體積補足至 90~95μL，最後加入 5μL 之限制酶 BsiWI

(NEB)，反應總體積為 100 $\mu$ l。使用振盪混合，短暫離心後置於適當 55 $^{\circ}$ C 之水浴加熱器中作用 16 小時，而後迅速置於冰上，使用 Gene-Spin<sup>TM</sup> 1-4-3 DNA Extraction Kit 純化之，對於這一個步驟的產物，我們希望得到濃度比較高的 DNA，因此在純化的最後一步，我們只加入 30 $\mu$ L 的無菌二次水洗提 DNA。測量產物的 OD 值，並使用洋菜膠電泳檢測其限制酶切割後 DNA 片斷大小是否與其基因圖譜相符。確定後進行下一步的反應。

取純化後的載體骨架分別以 1:3、1:6、1:9 的分子數與突變 DNA 片段進行接合酶接合反應。取 700ng 的載體骨架及 240ng、480ng、720ng 的突變 DNA 片段各別置入 0.2 mL 微量離心管中，依序加入適當量的無菌二次水、1.5 $\mu$ L 接合酶接合反應緩衝溶液、1.5 $\mu$ L 的 25mM ATP、加入無菌二次水將總體積補足為 13.5 $\mu$ L，最後加入 1.5 $\mu$ L 的接合酶。使用振盪混合，短暫離心後置於室溫中作用 24 小時。

取接合載體骨架分別以 1:3、1:6、1:9 的分子數與突變 DNA 片段進行接合酶接合反應的反應產物 5 $\mu$ L 進行勝任細胞的質體轉型，塗盤並 37 $^{\circ}$ C 培養 12 小時。於三個組別中各挑選兩個菌株進行篩選，挑選出含有突變基因的菌株。

## 4.5 細胞專一性胜肽基因序列的取得

使用軟體 Vector NTI 9.0 將過去由 phage display 所得到的細胞專一性胜肽序列轉變成基因序列。

1. 開啟 Vector NTI 9.0 軟體。
2. 點選”File”→”Create New Sequence”→”Using Sequence Editor (Protein) …”。
3. 彈出 New Protein Molecule 的視窗，在 General 的部份填上胜肽序列的名稱。
4. 然後點選”Sequence and Features”，接著點選”Edit Sequence”，輸入胜肽序列並點選”OK”。
5. 回到 New Protein Molecule 的視窗並點選”確定”。
6. 彈出 Vector NTI 的視窗，提示”Warning! Vector NTI layout information will be lost for this object. Do you want to proceed changes? “，點選”是”。
7. 點選”Analyses” →”Back Translation”。
8. 彈出 Sequence Data 的視窗，在 Range 上選擇” Whole Sequence” 並點選” OK”。
9. 彈出 \_seq-BT 的視窗，點選位於 Codon Usage Table 區域的” Chagne” 方塊，選擇” Standard” ，然後點選” Use Table”。
10. 在 Translation Table 區塊上也選擇”Standard”。
11. 點選上方的”Camera”。
12. 於彈出的 Camera 視窗 Pane 區域點選”Translationn”，Range 區域點選”All”，Copy To 區域點選”Clipboard”，然後點選”Copy”。



13. 將序列貼在一般記事本上就可以得到該段胜肽片段的基因序列。

## 4.6 細胞培養

研究中使用建立好的細胞庫系統，提供品質一致的細胞進行研究。自冷凍管中取得原始的細胞株進行細胞解凍、培養。經過四次細胞繼代培養之後，計算適當量的細胞數，並將細胞依一定的數量 ( $2 \times 10^6$  個細胞/一隻冷凍管) 進行細胞冷凍。冷凍的細胞放置  $-80^\circ\text{C}$  冰箱隔夜，然後移至液態氮中保存，此次冷凍的細胞稱為第一代細胞株。取第一代細胞株進行細胞解凍、培養。經過四次細胞繼代培養之後，計算適當量的細胞數，並將細胞依一定的數量 ( $2 \times 10^6$  個細胞/一隻冷凍管) 進行細胞冷凍。冷凍的細胞放置  $-80^\circ\text{C}$  冰箱隔夜，然後移至液態氮中保存，此次冷凍的細胞稱為第二代細胞株。重複以上步驟，取得第三代細胞株。

於之後的細胞實驗中，皆取繼代培養四次以後的第三代細胞株進行實驗。當使用盡第三代細胞株時，取第二代細胞株，使用同樣的步驟，增殖出第三代細胞株。

### 4.6.1 細胞培養液

實驗中所使用的細胞培養液是使用以 DMEM (Gibco, NY, USA) 為基礎，包含 10% FBS (Biological Industries) 及 1% PSA 抗生素的細胞培養液。冷凍培養液是以 DMEM 細胞培養液為基礎，包含 7% 的 DMSO 的冷凍培養

液。

## 4.6.2 細胞株

實驗中所使用的細胞株包括人類纖維腫瘤細胞 HT1080 細胞株、人類腎臟組織上皮細胞 293T 細胞株、小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 細胞株、小鼠肌肉纖維母細胞 C2C12 細胞株、及人類子宮頸癌細胞 HeLa 細胞株等，皆在 DMEM 細胞培養液中培養，放置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中。當細胞密度到達一定程度時，進行細胞繼代培養。

## 4.6.3 解凍細胞

實驗前先準備 DMEM 細胞培養液，15mL 細胞離心管一支，25cm<sup>2</sup> 細胞培養盤一個，置入無菌操作台中。自液態氮中取出細胞冷凍管，置入 37°C 水浴槽中回溫，等待冷凍管中融解三分之二時，迅速將冷凍管移至無菌操作台中，與 5mL 的 DMEM 細胞培養液一同放入 15mL 細胞離心管中。置入離心機中，平衡後低溫離心 1200rpm 10 分鐘，再放回無菌操作台上。倒去上清液，並加入 5mL 的 DMEM 細胞培養液，迅速且均勻的將細胞沖散，然後將包含細胞之培養液移至 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養盤中，放置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

## 4.6.4 細胞繼代培養

當細胞密度長到一定程度，如 293T 細胞長到 50%滿的時候，進行細胞

繼代培養。實驗前先準備 DMEM 細胞培養液、PBS、EDTA-Trypsin、15mL 細胞離心管一支、75cm<sup>2</sup> 細胞培養盤一個，置入無菌操作台中。自 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中取出包含適當密度細胞的細胞培養盤，使用自動吸注器將細胞培養盤中舊的細胞培養液吸出，由細胞培養盤側邊加入 3mL PBS，以避免細胞被沖起，輕微搖晃細胞培養盤使 PBS 能完全的潤洗細胞培養盤底部的細胞，再以自動吸注器將 PBS 吸出。視細胞種類加入 1~3mL EDTA Trypsin 到細胞培養盤中，輕微搖晃細胞培養盤使 EDTA Trypsin 可以完全與細胞作用，然後視細胞種類置入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 3~15 分鐘。自培養箱中取出已與 EDTA Trypsin 充分反應，並與細胞培養盤分離之細胞，加入 5~10mL 的 DMEM 細胞培養液將細胞沖起，利用自動吸注器將包含細胞的細胞培養液吸到 15ml 細胞離心管中，置入離心機中，平衡後低溫離心 1200rpm 10 分鐘，再放回無菌操作台上。倒去上清液，並加入適當量的 DMEM 細胞培養液，將迅速且均勻的將細胞沖散，然後將包含細胞之培養液移至 75cm<sup>2</sup> 細胞培養盤中，放置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

#### 4.6.5 冷凍細胞

實驗前先準備冷凍培養液、DMEM 細胞培養液、PBS、EDTA-Trypsin、15mL 細胞離心管一支、細胞冷凍管數支置入無菌操作台中。另外準備細胞計數所用的細胞染劑 trypan blue 及血球計數盤。自 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中取出包含適當密度細胞的細胞培養盤，使用自動吸注器將細胞培養盤中舊

的細胞培養液吸出，由細胞培養盤側邊加入 3mL PBS，以避免細胞被沖起，輕微搖晃細胞培養盤使 PBS 能完全的潤洗細胞培養盤底部的細胞，再以自動吸注器將 PBS 吸出。視細胞種類加入 1~3mL EDTA Trypsin 到細胞培養盤中，輕微搖晃細胞培養盤使 EDTA Trypsin 可以完全與細胞作用，然後視細胞種類置入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 3~15 分鐘。自培養箱中取出已與 EDTA Trypsin 充分反應，並與細胞培養盤分離之細胞，加入 5~10mL 的 DMEM 細胞培養液將細胞沖起，利用自動吸注器將包含細胞的細胞培養液吸到 15ml 細胞離心管中，記取細胞培養液的總體積。取出 50μL 含細胞的細胞培養液，使用 PBS 作兩次兩倍稀釋，取 75μL trypan blue 加入 4 倍稀釋的細胞液並混合均勻，取 20μL 混合液自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色，計算存活細胞並換算總細胞量。同時，將包含細胞液的 15ml 細胞離心管，置入離心機中，平衡後低溫離心 1200rpm 10 分鐘，再放回無菌操作台上。倒去上清液，並加入適當體積低溫的冷凍培養液使，每 mL 冷凍培養液含有  $2 \times 10^6$  個細胞，將迅速且均勻的將細胞沖散。迅速將包含細胞的冷凍培養液加入預先寫好日期、細胞種類、實驗操作者的冷凍管中，每管包含  $2 \times 10^6$  個細胞。然後將冷凍管放置冷凍細胞盒移至 -80°C 冰箱中，放置隔夜，然後在放入液態氮桶中保存。

## 4.7 AAV Helper-Free System

生產 AAV 的實驗是使用 AAV Helper-Free System，這個系統提供了三種質體：pAAV-MCS、pAAV-RC、pHelper，以及生產病毒所用之細胞株 293T 細胞。pAAV-MCS 是攜帶治療基因的載體，研究中使用綠色螢光蛋白基因 hrGFP gene 當作報導基因，轉殖到質體 pAAV-MCS 中，構築 pAAV-hrGFP 質體。質體 pHelper 則提供相當於幫助病毒的功能，包含 E2A、E4ORF6 及 VA RNA 等 Adenovirus 基因。pAAV-RC 包含 AAV 上的 *Cap* 基因與 *Rep* 基因，負責生產病毒外殼結構蛋白與 AAV 複製所需的蛋白。293T 細胞株則是包含 Adenovirus E1A、E1B 基因的細胞，提供 Adenovirus 幫助 AAV 生產的部份功能。AAV Helper-Free System 提供一個安全且方便的平台，運用三種質體共同轉染進入 293T 細胞中，在不產生 Adenovirus 的情況下生產 AAV。

### 4.7.1 293T 細胞的準備

實驗所用 293T 細胞來自於花蓮慈濟醫院張惠芬女士，經過 Neomycin 篩選過後，確認是具有 large T antigen 的細胞。

### 4.7.2 293T 細胞的轉染

細胞轉染前 48 小時，於直徑 15 公分的細胞培養圓盤上接種  $8 \times 10^6$  的 293T 細胞，置入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。於轉染前 6 小時前置換新鮮的 DMEM 細胞培養液，此時需注意 293T 細胞非常容易由與細胞培養盤分

離而整片懸浮起來，因此在更換培養液時需要溫和的處理。轉染前準備轉染所需質體並調整其 DNA 濃度至  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以及轉染所需的緩衝液  $0.3\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  與  $2\times\text{HBS}$  ( $280\text{ mM NaCl}$ 、 $1.5\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $50\text{ mM HEPES}$ 、Adjust the pH to 7.10 with  $\text{NaOH}$ )。

接著進行 293T 細胞的轉染，先將  $2\text{mL}$  的  $0.3\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  與  $2\times\text{HBS}$  分別加入兩個乾淨的試管中，取三質體各  $20\mu\text{L}$  加入包含  $0.3\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  的試管中並混和均勻。使用自動吸注器將質體與  $0.3\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  的混和物吸起並緩緩加入包含  $2\times\text{HBS}$  的試管中，在加入的過程中不斷搖晃試管使之混合均勻。使用自動吸注器將混和物注入接種細胞的直徑  $15$  公分細胞培養盤中，輕微搖晃使混和物均勻散佈在整個細胞培養盤中。將細胞培養盤置入  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養。轉染三小時後，取出細胞培養盤並輕微搖晃，然後再置入  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中培養。轉染六小時後，自  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中取出細胞培養盤，使用新鮮的細胞培養液更換舊的細胞培養液，然後放置回  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱中繼續培養  $66\sim 72$  小時，然後進行病毒的收集。

### 4.7.3 病毒的收集

在 293T 細胞進行三質體共同轉染後的  $66\sim 72$  小時進行病毒的收集，此時細胞型態約略為球形，並且有與細胞培養盤分離的情況發生。實驗前準備  $50\text{mL}$  細胞離心管兩支，標好日期與病毒種類，置入無菌操作台中。自  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培養箱取出培養  $66\sim 72$  小時的細胞培養盤，使用自動吸注器將

細胞培養盤上的細胞沖下，然後吸起住入 50mL 細胞離心管，置入離心機中，平衡後低溫離心 2000rpm 20 分鐘，然後置回無菌操作台上。將上清液小心倒至另外一個 50mL 細胞離心管中，標好標記，將兩管細胞離心管移至 -80°C 冰箱中保存。

## 4.8 轉染效率與基因傳遞系統的檢測

在實驗的設計上使用綠色螢光蛋白基因 hrGFP 當作報導基因，轉染成功或者是感染成功的細胞都會表現 hrGFP，因此可以藉由螢光顯微鏡來觀察。流式細胞儀則提供轉染及感染效率的資訊，包括細胞的顆粒性、大小、存活以及 hrGFP 表現的量。



## 第五章 結果

### 5.1 pAAV-mRC 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 具有突變的質體 DNA

採用 AAV Helper-Free System 中的 pAAV-RC 當作骨架，以丙氨酸 (Alanine, A) 各別取代 AAV capsid protein 上的 585 號、588 號精氨酸 (Arginine, R) 為目的，使用三對突變所需要使用的引子，進行三階段式 PCR (Site-directed mutagenesis)。

使用引子 VP3F 與 MVP3R (含 FspI 限制酶切割位) 配對、VP3R 與 MVP3F (含 FspI 限制酶切割位) 配對，以 pAAV-RC 為模版，分別進行第一階段 PCR，取得兩組在突變位置有 18 個鹼基對有重疊基因片段 (分別為 1197bp 與 495bp) 的 PCR 產物並純化之，(圖十八)。以第一階段取得的兩組基因片段互為模版與引子，進行第二階段 PCR (4 次熱循環) 得到全長的突變基因片段。以第二階段的 PCR 產物為模版，使用引子 pVP3F 及 pVP3R 進行第三次 PCR 反應，取得包含突變基因的 DNA 片段 (長 817bp)，(圖十八)。

以 pAAV-RC 為骨架，經限制酶切割反應切下原本基因的 DNA 片段，運用接合酶接合反應，以限制酶切割反應後的突變基因 DNA 片段取代 pAAV-RC 上原本的基因 (molecular number vector : insert = 1:3, 1:6, 1:9)，完成 pAAV-mRC 的構築。構築完成之質體轉形至 *E.coli* 勝任細胞內，使用菌



液 PCR 反應、小量質體限制酶切割反應，以及定序三步驟確定基因之正確性。

為了挑選出具有質體骨架 pAAV-RC 的菌株，使用 pAAV-RC 骨架專一性引子 pVP3F 及 pVP3R 進行菌液 PCR，並以轉形 pAAV-RC 菌株當作菌液 PCR 的 control 組，然後以 1.5% 膠體電泳進行分析，確認含有質體骨架 pAAV-RC 的菌株，(圖十九)。包含質體骨架 pAAV-RC 與 pAAV-mRC 的菌株在進行菌液 PCR 後，可以得到長 817bp 的 DNA 片段。

為了挑選出具有突變質體 pAAV-mRC 的菌株，在具有質體骨架 pAAV-RC 菌株完成小量質體純化及定量後，進行 FspI 限制酶切割反應，並以質體 pAAV-RC 當作限制酶切割反應 control 組，然後以 1.5% 膠體電泳進行分析，確認含有五個 FspI 限制酶切割位的質體 pAAV-mRC，(圖二十)。pAAV-mRC 在經過 FspI 限制酶切割反應後，可以得到 2107bp、1592bp、1547bp、1172bp、909bp 等五個 DNA 片段，其中 1592bp 與 1547bp 兩個片段因為大小相近，故無法完全分離，但仍能由螢光亮度看出在 1500bp 左右的 band 比較厚且亮。Control 組 pAAV-RC 在經過 FspI 限制酶切割反應後，可以得到 3016bp、1592bp、1547bp、1172bp 等四個 DNA 片段。

取二個挑選出的 pAAV-mRC 質體 DNA 10 $\mu$ g/20 $\mu$ L，及引子 VP3F、VP3R、pVP3R 送交定序 (波士特，台灣，中華民國)，確認 pAAV-mRC 的正確性，(附表)。

## 5.2 pAAV-m2RC 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 可插入胜肽片段的質體 DNA

採用構築完成的 pAAV-mRC 當作骨架，以在 Capsid protein Heparin binding site 基因上創造兩個獨特限制酶切割位 (Unique restriction enzyme site)：NheI 限制酶切割位、NotI 限制酶切割位為目的，使用三對突變所需要使用的引子，進行三階段式 PCR 反應 (Site-directed mutagenesis)。

使用引子 VP3F 與 M2VP3R (含 NheI 與 NotI 限制酶切割位)配對、VP3R 與 M2VP3F (含 NheI 與 NotI 限制酶切割位)配對，以 pAAV-mRC 為模版，分別進行第一階段 PCR 反應，取得兩組在突變位置有 17 個鹼基對重疊之基因片段 (分別為 1204bp 對與 492bp) 的 PCR 產物並純化之，(圖二十一)。以第一階段取得的兩組基因片段互為模版與引子，進行第二次 PCR 反應 (4 次熱循環) 得到全長的突變基因片段。以第二階段的 PCR 產物為模版，使用引子 pVP3F 及 pVP3R 進行第三次 PCR 反應，取得包含突變基因的 DNA 片段 (長 823bp)，(圖二十一)。

以 pAAV-mRC 為骨架，經限制酶切割反應切下原本基因的 DNA 片段，運用接合酶接合反應，以限制酶切割反應後的突變基因 DNA 片段取代 pAAV-mRC 上原本的基因 (molecular number vector : insert = 1:3, 1:6, 1:9)，完成 pAAV-m2RC 的構築。構築完成之質體轉形至 *E.coli* 勝任細胞內，使用菌液 PCR 反應、小量質體限制酶切割反應，以及定序三步驟確定基因之正確性。序列正確之質體再大幅增殖並以 Nucleobond AX 大量質體純化套組

進行大量質體之純化。

為了挑選出具有質體骨架 pAAV-mRC 的菌株，使用 pAAV-mRC 骨架專一性引子 pVP3F 及 pVP3R 進行菌液 PCR，並以轉形 pAAV-mRC 菌株當作菌液 PCR 的 control 組，然後以 1.5% 膠體電泳進行分析，確認含有質體骨架 pAAV-mRC 的菌株，(如圖二十二)。包含質體骨架 pAAV-mRC 的菌株在進行菌液 PCR 後，可以得到長 817bp 的 DNA 片段，而包含 pAAV-m2RC 質體的菌株在進行菌液 PCR 後，可以得到長 823bp 的 DNA 片段。

為了挑選出具有突變質體 pAAV-m2RC 的菌株，在具有質體骨架 pAAV-mRC 菌株完成小量質體純化及定量後，進行 NotI 限制酶切割反應，並以質體 pAAV-mRC 當作限制酶切割反應 control 組，然後以 1.5% 膠體電泳進行分析，確認含有一個 NotI 限制酶切割位的質體 pAAV-m2RC，(圖二十三)。pAAV-m2RC 在經過 FspI 限制酶切割反應後，可以得到 7333bp 的 DNA 片段。Control 組 pAAV-mRC 因為不具有 NotI 限制酶切割位，故仍以環狀質體形態存在。

取一個挑選出的 pAAV-mRC 質體 DNA 10 $\mu$ g/20 $\mu$ L，及引子 VP3F、VP3R 及 pVP3R 送交定序 (波士特，台灣，中華民國)，確認 pAAV-mRC 的正確性，(附表)。

### 5.3 pAAV-m2RC-RGD 的構築—表現 Capsid protein Heparin binding site 插入 RGD 胜肽片段的質體 DNA

採用構築完成的 pAAV-m2RC 當作骨架，以在 Capsid protein 上表現包含 RGD motif 的胜肽片段為目的，設計 RGD motif 基因的兩股互補引子 (I1F 37mer, I1R 37mer)，以梯度降溫的方法，使兩股互補引子互相黏合成雙股 DNA 片段，此段雙股 DNA 片段兩端具有 NotI 及 NheI 限制酶切割位黏性端。以 pAAV-m2RC 為骨架，進行限制酶切割反應，於兩端產生具有 NotI 及 NheI 限制酶切割位黏性端，與包含 RGD motif 基因的 DNA 片段進行接合酶接合反應 (Molecular number vector : insert = 1:10)，完成 pAAV-m2RC-RGD 的構築。構築完成之質體轉形至 E.coli 勝任細胞內，使用菌液 PCR 反應以及定序確定基因之正確性。序列正確之質體再大幅增殖並以 Nucleobond AX 大量質體純化套組進行大量質體之純化。

為了篩選出具有質體 DNA pAAV-m2RC-RGD 的菌株，使用 pAAV-m2RC 專一性引子 pVP3F 及 RGD motif 專一性引子 I1R，對挑選出來的菌株進行菌液 PCR，並以轉型 pAAV-m2RC 的菌株為 control 組，(圖二十四)。具有質體 DNA pAAV-m2RC-RGD 的菌株在經過菌液 PCR 後可以得到 780bp 的 DNA 片段，而不包含胜肽基因片段的質體 DNA pAAV-m2RC 的 control 組菌株則無法增幅出 DNA 片段。

取一個挑選出的 pAAV-m2RC-RGD 質體 DNA (10 $\mu$ g/20 $\mu$ L)，及引子 pVP3R (10 $\mu$ /20 $\mu$ L) 送交定序 (波士特，台灣，中華民國)，確認 pAAV-mRC

的正確性，(附表)。

## 5.4 於 AAV 表面表現由 phage display system 取得胜肽片段的質體 DNA 的構築


採用構築完成的 pAAV-m2RC 當作骨架，以在 Capsid protein 上表現由 phage display system 取得胜肽片段為目的，設計胜肽片段基因的兩股互補引子，TP. A549 F、TP. A549 R (各 67mer)，C2C12 12.51 F、C2C12 12.51 R (各 43mer)，GE11 F、GE11 R (各 43mer)，RG2 P2L F、RG2 P2L R (各 31mer)，以梯度降溫的方法，使兩股互補引子互相黏合成雙股 DNA 片段，這些雙股 DNA 片段兩端具有 NotI 及 NheI 限制酶切割位黏性端。以 pAAV-m2RC 為骨架，進行限制酶切割反應，於兩端產生具有 NotI 及 NheI 限制酶切割位黏性端，與包含胜肽片段基因的 DNA 片段進行接合酶接合反應 (Molecular number vector : insert = 1:10)，完成質體 DNA pAAV-m2RC-TP. A549、DNA pAAV-m2RC-C2C12 12.51、DNA pAAV-m2RC-GE11、DNA pAAV-m2RC-RG2 P2L 的構築。構築完成之質體轉形至 E.coli 勝任細胞內，使用菌液 PCR 反應以及定序三步驟確定基因之正確性。序列正確之質體再大幅增殖並以 Nucleobond AX 大量質體純化套組進行大量質體之純化。

為了篩選出具有胜肽基因片段的質體 DNA 菌株，使用 pAAV-m2RC 專一性引子 pVP3F 及胜肽基因片段專一性引子 TP. A549 R、C2C12 12.51 R、GE11 R、RG2 P2L R，個別對挑選出來的菌株進行菌液 PCR，並以轉型

pAAV-m2RC 的菌株為 control 組，(圖二十五~圖二十八)。具有胜肽基因片段的質體 DNA 的菌株在經過菌液 PCR 後，分別可以得到 810bp (DNA pAAV-m2RC-TP. A549)、786bp (DNA pAAV-m2RC-C2C12 12.51)、786bp (DNA pAAV-m2RC-GE11)、774bp (DNA pAAV-m2RC-RG2 P2L) 的 DNA 片段，而不包含胜肽基因片段的質體 DNA pAAV-m2RC 的 control 組菌株則無法增幅出 DNA 片段。

取挑選出的質體 DNA 10 $\mu$ g/20 $\mu$ L，及引子 pVP3R 送交定序 (波士特，台灣，中華民國)，確認 pAAV-mRC 的正確性，(附表)。

## 5.5 AAV 的生產



AAV 的生產是運用磷酸鈣法，將三質體 pHelper、pAAV-hrGFP、及 pAAV-RC 共同轉染 (cotransfection) 到的 293T 細胞中，37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培養 6 小時後更換新鮮的培養液，再放回 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培養 66~72 小時，之後收集包含 AAV 的細胞及上清液。

質體轉染效率與細胞存活率是影響 AAV 生產的主要因素，實驗中使用磷酸鈣法進行轉染實驗，以 hrGFP 當做實驗的報導基因，檢驗轉染效率。使用螢光顯微鏡及流式細胞儀觀察並計算對 293T 細胞成功轉染效率及存活率。根據實驗結果使用磷酸鈣法進行轉染實驗，對 293T 細胞的轉染效率及存活率都可達 70% 以上，(圖二十九)。

接著為了確定病毒有成功生產出來，使用包含 AAV 的上清液對 293T

細胞及 HT1080 細胞進行感染實驗，以 hrGFP 當做實驗的報導基因，並以螢光顯微鏡觀察感染情形，(圖三十)。實驗中可以觀察到帶有螢光的細胞，代表確實有 AAV 的存在。

## 5.6 AAV 對不同種細胞株的感染效率

為了瞭解野生型 AAV 對於不同種的細胞株感染效率為何，因此取用包含 AAV 的上清液對於不同種的細胞株進行感染實驗，細胞株包括人類纖維腫瘤細胞 HT1080 細胞株、人類腎臟組織上皮細胞 293T 細胞株、小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 細胞株、小鼠肌肉纖維母細胞 C2C12 細胞株、及人類子宮頸癌細胞 HeLa 細胞株，以野生型 AAV 所攜帶之 hrGFP 基因當作報導基因，使用流式細胞儀偵測螢光細胞比例，計算感染效率，(圖三十一)。

## 5.7 Heparin binding site 的突變對於 AAV 感染能力的影響

為了瞭解對於 AAV 表面的 Heparin binding site 作突變是否能夠影響 AAV 感染細胞的能力，使用質體 pAAV-m2RC 取代 pAAV-RC，對 293T 細胞株進行三質體共同轉染，生產病毒並收集上清液，對 HT1080 細胞及 293T 細胞進行感染實驗，實驗中同時以質體 pAAV-RC 進行三質體共同轉染所生產出的病毒上清液為控制組，以病毒所攜帶之 hrGFP 基因當作報導基因，使用流式細胞儀偵測螢光細胞比例，計算感染效率，(圖三十二)。根據實驗結果可以得知，突變組的感染效率遠低於野生型 AAV。

## 5.8 表現 RGD motif 之 AAV 對不同種細胞株的感染效率

為了瞭解表現 RGD motif 之 AAV 是否具有引導病毒專一性感染小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 細胞株的能力，使用質體 pAAV-m2RC-RGD 取代 pAAV-RC，對 293T 細胞株進行三質體共同轉染，生產病毒並收集上清液，對 HT1080 細胞、293T 細胞及 B16F10 細胞進行感染實驗，實驗中各別以質體 pAAV-RC 及 pAAV-m2RC 進行三質體共同轉染所生產出的病毒上清液為控制組，以病毒所攜帶之 hrGFP 基因當作報導基因，使用流式細胞儀偵測螢光細胞比例，計算感染效率，(圖三十三)。根據實驗結果可以得知，表現 RGD motif 的 AAV 感染 B16F10 細胞時，比感染 293T 細胞及 HT1080 細胞有更好的效率。比較野生型 AAV 與表現 RGD motif 的 AAV，野生型的 AAV 對於 B16F10 的感染能力較差，而對於 293T 細胞極好的感染能力。相反的，表現 RGD motif 的 AAV 則可較專一性的感染 B16F10 細胞。

## 5.9 表現其它胜肽片段之 AAV 對不同種細胞株的感染效率

為了瞭解所設計的胜肽導引式基因治療系統是否可以藉由 RGD motif 以外的其他胜肽，改變其感染的能力，因此使用質體 pAAV-m2RC-TP-A549、pAAV-m2RC-C2C12 12.51、pAAV-m2RC-GE11、pAAV-m2RC-RG2 P2L 取代 pAAV-RC，對 293T 細胞株進行三質體共同轉染，生產病毒並收集上



清液，對 293T 細胞進行感染實驗，實驗中各別以質體 pAAV-RC 及 pAAV-m2RC 進行三質體共同轉染所生產出的病毒上清液為控制組，以病毒所攜帶之 hrGFP 基因當作報導基因，使用流式細胞儀偵測螢光細胞比例，計算感染效率，(圖三十四)。



## 第六章 討論

本研究是運用 Site-directed mutagenesis 的方式，在 AAV2 的病毒結構蛋白次單元 (VPs) 上產生突變，使其失去對於細胞表面的主要受體 HSPG 結合的能力。

過去的研究提出，AAV2 感染細胞時有七個主要的步驟，包括 1) 病毒與細胞的結合、2) 穿越細胞膜、3) 形成的 endosome 在細胞運輸、4) 脫離 endosome、5) 移動到細胞核、6) 除去病毒外殼、7) 雙股 DNA 的形成，而影響不同血清型 AAV 感染細胞效率的關鍵則是在細胞表面是否提供適合的受體與 AAV 做結合。存在於多種組織細胞上的 HSPG 是 AAV2 與細胞黏附的主要受體，提供 AAV2 廣泛感染哺乳類細胞的特性。然而以作為基因治療載體的角度來看，無法專一性的將基因遞送到適合的細胞將會導致許多副作用。

過去對於 VPs 突變的研究中發現，位於病毒結構蛋白第 487 號、第 509 號、第 585 號及第 588 號鹼性胺基酸是影響 AAV2 與 Heparin 結合以及經由 HSPG 感染細胞的主要胺基酸。比對蛋白質序列，VPs 中的 VP3 的原子結構、以及 AAV2 的立體結構可以看出，這些影響 AAV2 與 Heparin 結合的鹼性胺基酸，是位於 VP3 外圍結構的 Loop 以及 AAV2 病毒外殼表面的突起，具有直接與 Heparin 作用的可能。研究者使用辨識這些鹼性胺基酸附近序列的抗體，對 AAV2 做抗體中和實驗，更直接證明位於病毒結構蛋白第 487

號、第 509 號、第 585 號及第 588 號鹼性胺基酸是與 Heparin 直接作用的胺基酸，提供 AAV2 與細胞表面的 HSPG 結合的能力。

為了去除 AAV2 不專一性的感染能力，因此以病毒結構蛋白第 585 號及第 588 號胺基酸當作突變對象，運用 Site-directed mutagenesis 將病毒結構蛋白基因上的精胺酸的基因序列突變為丙胺酸的基因序列。

在感染人類纖維腫瘤細胞 HT1080 細胞株、人類腎臟組織上皮細胞 293T 細胞株的實驗中發現，以質體 pAAV-m2RC 提供病毒外殼基因，所得到的 AAV 上清液無法有效率的感染 HT1080 細胞株及 293T 細胞株，而野生型的 AAV 對於此兩種細胞株則有良好的感染能力。推論由質體 pAAV-m2RC 提供病毒外殼基因所生產的 AAV 失去其感染天然宿主的能力，可能是由於 heparin binding site 的突變而失去與其天然宿主細胞表面的 HSPG 結合的能力，但仍有可能是因為病毒結構蛋白基因的突變，而使得 AAV 無法有效率的形成，或者產生不包含基因組的空病毒。在 AAV 無法有效率的形成的部份，可以藉由 AAV 顆粒專一性抗體 A20 進行 dot blotting 及 ELISA 檢測 AAV 顆粒是否存在，並以 AAV 結構蛋白專一性抗體 B1 進行 immuno-blotting 的實驗，確認病毒結構蛋白的存在。在檢驗產生的病毒是否包含基因組方面，過去的研究使用 CsCl 等梯度離心，可以分離包含基因組的病毒與不含基因組的病毒，也可使用 260/280 光吸收值的不同，計算出不含基因組的空病毒的百分比。

由質體 pAAV-m2RC-RGD 提供病毒結構蛋白的 AAV 在實驗中，傾向於

專一性感染 B16F10 細胞，對於其它種類細胞如 HT1080 細胞及 293T 細胞，感染能力遠低於野生型 AAV (30%~40%)。然而在 B16F10 的感染實驗中，含有 RGD motif 的 AAV 較野生型 AAV 有更佳的感染能力。這樣的實驗結果，證明在 AAV 上的 RGD motif 具有改變 AAV 感染細胞的能力，而過去的研究中，於病毒結構蛋白的第 587 號胺基酸後插入包含 RGD motif 基因的 L14 胜肽，也確實能夠使 AAV 感染 B16F10 細胞。這樣的實驗結果一方面驗證過去的研究，一方面也可以確認所設計的質體 DNA 提供的病毒結構蛋白，不會破壞病毒結構而造成病毒組合與病毒基因包裹上的困難。雖然如此，由於 B16F10 細胞的感染效率大都在 10% 以下，因實驗誤差而導致的感染效率上的差距是要被審慎評估的。



## 參考文獻

1. Anderson, W. F., Blaese, R. M. & Culver, K. (1990) *Hum Gene Ther* **1**, 331-62.
2. Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L. & et al. (1990) *N Engl J Med* **323**, 570-8.
3. Miller, A. D. (1990) *Blood* **76**, 271-8.
4. Flotte, T. R., Solow, R., Owens, R. A., Afione, S., Zeitlin, P. L. & Carter, B. J. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 349-56.
5. Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X. & Leonard, W. J. (1993) *Science* **262**, 1877-80.
6. Leonard, W. J. (1996) *Annu Rev Med* **47**, 229-39.
7. Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M. & Takeshita, T. (1996) *Annu Rev Immunol* **14**, 179-205.
8. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nussbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. & Fischer, A. (2000) *Science* **288**, 669-72.
9. Jacob, D., Davis, J., Zhu, H., Zhang, L., Teraishi, F., Wu, S., Marini, F. C., 3rd & Fang, B. (2004) *Clin Cancer Res* **10**, 3535-41.
10. Ma, H., Liu, Y., Liu, S., Kung, H. F., Sun, X., Zheng, D. & Xu, R. (2005) *Int J Cancer* **116**, 314-21.
11. Goverdhan, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J. M., Barcia, C., Curtin, J. F., Soffer, E. B., Mondkar, S., King, G. D., Hu, J., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Greengold, D. S., Lowenstein, P. R. & Castro, M. G. (2005) *Mol Ther* **12**, 189-211.
12. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P. L. (1990) *Science* **247**, 1465-8.
13. Yang, N. S. & Sun, W. H. (1995) *Nat Med* **1**, 481-3.
14. Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. M. (1965) *Science* **149**, 754-6.
15. Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. & Rowe, W. P. (1966) *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1467-74.
16. Parks, W. P., Green, M., Pina, M. & Melnick, J. L. (1967) *J Virol* **1**, 980-7.
17. Bantel-Schaal, U. & zur Hausen, H. (1984) *Virology* **134**, 52-63.
18. Rutledge, E. A., Halbert, C. L. & Russell, D. W. (1998) *J Virol* **72**, 309-19.
19. Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J. & Wilson, J. M. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-9.
20. Gao, G., Vandenberghe, L. H., Alvira, M. R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X. & Wilson, J. M. (2004) *J Virol* **78**, 6381-8.
21. Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T. &

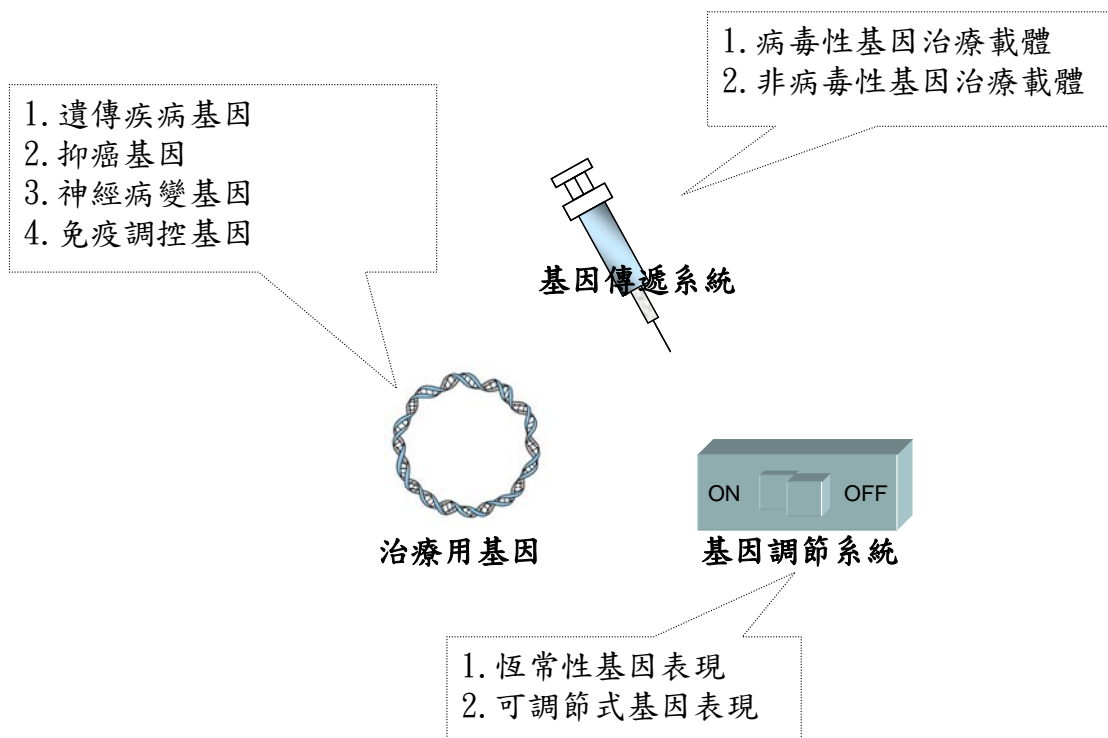
- Kanda, T. (2006) *Jpn J Infect Dis* **59**, 285-93.
22. Schmidt, M., Grot, E., Cervenka, P., Wainer, S., Buck, C. & Chiorini, J. A. (2006) *J Virol* **80**, 5082-5.
  23. Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R. J. (2006) *Mol Ther* **14**, 316-27.
  24. Erles, K., Sebokova, P. & Schlehofer, J. R. (1999) *J Med Virol* **59**, 406-11.
  25. Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G. & Patel, S. D. (2000) *J Virol* **74**, 1761-6.
  26. Berns, K. I. & Linden, R. M. (1995) *Bioessays* **17**, 237-45.
  27. Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. & Berns, K. I. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2211-5.
  28. Kronenberg, S., Kleinschmidt, J. A. & Bottcher, B. (2001) *EMBO Rep* **2**, 997-1002.
  29. Rabinowitz, J. E., Xiao, W. & Samulski, R. J. (1999) *Virology* **265**, 274-85.
  30. Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. & Muzyczka, N. (2000) *J Virol* **74**, 8635-47.
  31. Chapman, M. S. & Rossmann, M. G. (1993) *Virology* **194**, 491-508.
  32. Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. & Chapman, M. S. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10405-10.
  33. Buller, R. M. & Rose, J. A. (1978) *J Virol* **25**, 331-8.
  34. Rabinowitz, J. E. & Samulski, R. J. (2000) *Virology* **278**, 301-8.
  35. Girod, A., Wobus, C. E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. A. & Hallek, M. (2002) *J Gen Virol* **83**, 973-8.
  36. Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Garipey, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. & Tijssen, P. (2001) *Dev Cell* **1**, 291-302.
  37. Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S. I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H. & Handa, H. (1999) *J Virol* **73**, 7912-5.
  38. Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J. A. (2006) *J Virol* **80**, 11040-54.
  39. Warrington, K. H., Jr., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S. & Muzyczka, N. (2004) *J Virol* **78**, 6595-609.
  40. Harrison, S. C. (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**, 195-9.
  41. Kronenberg, S., Bottcher, B., von der Lieth, C. W., Bleker, S. & Kleinschmidt, J. A. (2005) *J Virol* **79**, 5296-303.
  42. Bleker, S., Sonntag, F. & Kleinschmidt, J. A. (2005) *J Virol* **79**, 2528-40.
  43. Summerford, C. & Samulski, R. J. (1998) *J Virol* **72**, 1438-45.
  44. Grifman, M., Trepel, M., Speece, P., Gilbert, L. B., Arap, W., Pasqualini, R. & Weitzman, M. D. (2001) *Mol Ther* **3**, 964-75.
  45. Wobus, C. E., Hugle-Dorr, B., Girod, A., Petersen, G., Hallek, M. & Kleinschmidt, J. A. (2000) *J Virol* **74**, 9281-93.
  46. Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V. & Srivastava, A. (1999) *Nat Med*

- 5, 71-7.
47. Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K. & Daida, H. (2005) *J Virol* **79**, 609-14.
  48. Summerford, C., Bartlett, J. S. & Samulski, R. J. (1999) *Nat Med* **5**, 78-82.
  49. Bartlett, J. S., Wilcher, R. & Samulski, R. J. (2000) *J Virol* **74**, 2777-85.
  50. Duan, D., Li, Q., Kao, A. W., Yue, Y., Pessin, J. E. & Engelhardt, J. F. (1999) *J Virol* **73**, 10371-6.
  51. Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A. & Nemerow, G. (1998) *J Virol* **72**, 3455-8.
  52. Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. (1995) *Nature* **374**, 190-2.
  53. Sever, S., Damke, H. & Schmid, S. L. (2000) *J Cell Biol* **150**, 1137-48.
  54. Sanlioglu, S., Benson, P. K., Yang, J., Atkinson, E. M., Reynolds, T. & Engelhardt, J. F. (2000) *J Virol* **74**, 9184-96.
  55. Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D. & Danos, O. (2001) *J Virol* **75**, 1824-33.
  56. Hansen, J., Qing, K. & Srivastava, A. (2001) *Mol Ther* **4**, 289-96.
  57. Muzyczka N, a. B. K. (2001) *Fields Virology*.
  58. Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. (1997) *J Virol* **71**, 1341-52.
  59. Wistuba, A., Weger, S., Kern, A. & Kleinschmidt, J. A. (1995) *J Virol* **69**, 5311-9.
  60. Dubielzig, R., King, J. A., Weger, S., Kern, A. & Kleinschmidt, J. A. (1999) *J Virol* **73**, 8989-98.
  61. King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. (2001) *Embo J* **20**, 3282-91.
  62. Fisher, K. J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S. E. & Wilson, J. M. (1997) *Nat Med* **3**, 306-12.
  63. Fisher-Adams, G., Wong, K. K., Jr., Podsakoff, G., Forman, S. J. & Chatterjee, S. (1996) *Blood* **88**, 492-504.
  64. Flannery, J. G., Zolotukhin, S., Vaquero, M. I., LaVail, M. M., Muzyczka, N. & Hauswirth, W. W. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6916-21.
  65. Flotte, T. R., Afione, S. A., Conrad, C., McGrath, S. A., Solow, R., Oka, H., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B. & Carter, B. J. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10613-7.
  66. Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L. & Durning, M. J. (1994) *Nat Genet* **8**, 148-54.
  67. Mandel, R. J., Spratt, S. K., Snyder, R. O. & Leff, S. E. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14083-8.
  68. Snyder, R. O., Miao, C. H., Patijn, G. A., Spratt, S. K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A. M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L. K., Thompson, A. R. & Kay, M. A. (1997) *Nat Genet* **16**, 270-6.
  69. McCown, T. J., Xiao, X., Li, J., Breese, G. R. & Samulski, R. J. (1996) *Brain Res* **713**, 99-107.
  70. Snyder, R. O., Miao, C., Meuse, L., Tubb, J., Donahue, B. A., Lin, H. F., Stafford, D.

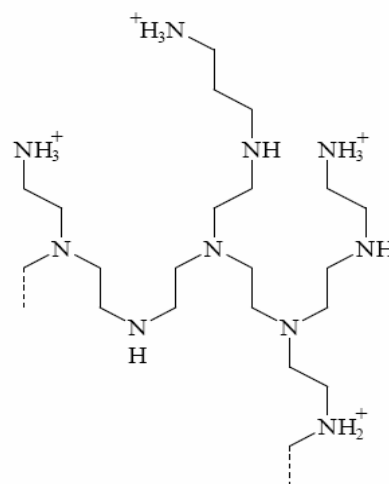
- W., Patel, S., Thompson, A. R., Nichols, T., Read, M. S., Bellinger, D. A., Brinkhous, K. M. & Kay, M. A. (1999) *Nat Med* **5**, 64-70.
71. Xiao, X., Li, J. & Samulski, R. J. (1996) *J Virol* **70**, 8098-108.
72. Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K. J. & Wilson, J. M. (1998) *J Virol* **72**, 4212-23.
73. NR., B. (1988) *Parvoviruses and human disease*.
74. Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Kapikian, A. Z., Austin, J. B. & Rowe, W. P. (1968) *Am J Epidemiol* **88**, 368-78.
75. Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Sereno, M. S., Brandt, C. D., Kim, H. W., Parrott, R. H. & Chanock, R. M. (1971) *Am J Epidemiol* **94**, 359-66.
76. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003) *Science* **302**, 415-9.
77. Klein, R. L., Meyer, E. M., Peel, A. L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N. & King, M. A. (1998) *Exp Neurol* **150**, 183-94.
78. Xiao, X., McCown, T. J., Li, J., Breese, G. R., Morrow, A. L. & Samulski, R. J. (1997) *Brain Res* **756**, 76-83.
79. Jomary, C., Vincent, K. A., Grist, J., Neal, M. J. & Jones, S. E. (1997) *Gene Ther* **4**, 683-90.
80. Wang, L., Takabe, K., Bidlingmaier, S. M., Ill, C. R. & Verma, I. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3906-10.
81. Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W. & High, K. A. (2000) *Nat Genet* **24**, 257-61.
82. Murphy, J. E., Zhou, S., Giese, K., Williams, L. T., Escobedo, J. A. & Dwarki, V. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13921-6.
83. Kessler, P. D., Podsakoff, G. M., Chen, X., McQuiston, S. A., Colosi, P. C., Matelis, L. A., Kurtzman, G. J. & Byrne, B. J. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14082-7.
84. Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., Harper, H. A., Robinson, A. S., Engelhardt, J. F., Brooks, S. V. & Chamberlain, J. S. (2002) *Nat Med* **8**, 253-61.
85. Griesenbach, U., Ferrari, S., Geddes, D. M. & Alton, E. W. (2002) *Gene Ther* **9**, 1344-50.
86. Hermonat, P. L. (1994) *Cancer Lett* **81**, 129-36.
87. Saudan, P., Vlach, J. & Beard, P. (2000) *Embo J* **19**, 4351-61.
88. Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M. & Muzyczka, N. (1982) *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2077-81.



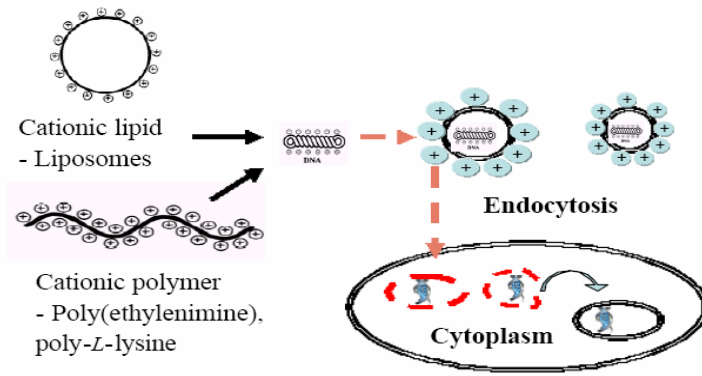
89. Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H. & Carter, B. J. (1983) *Gene* **23**, 65-73.
90. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J. A. (1998) *Hum Gene Ther* **9**, 2745-60.
91. Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y. & Colosi, P. (1998) *Gene Ther* **5**, 938-45.
92. Xiao, X., Li, J. & Samulski, R. J. (1998) *J Virol* **72**, 2224-32.
93. Bartlett, J. S., Kleinschmidt, J., Boucher, R. C. & Samulski, R. J. (1999) *Nat Biotechnol* **17**, 181-6.
94. Opie, S. R., Warrington, K. H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. & Muzyczka, N. (2003) *J Virol* **77**, 6995-7006.
95. Muller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A. & Trepel, M. (2003) *Nat Biotechnol* **21**, 1040-6.
96. Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D. & Engelhardt, J. F. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6716-21.
97. Goncalves, M. A., van der Velde, I., Janssen, J. M., Maassen, B. T., Heemskerk, E. H., Opstelten, D. J., Knaan-Shanzer, S., Valerio, D. & de Vries, A. A. (2002) *J Virol* **76**, 10734-44.
98. Grieger, J. C. & Samulski, R. J. (2005) *J Virol* **79**, 9933-44.
99. McCarty, D. M., Monahan, P. E. & Samulski, R. J. (2001) *Gene Ther* **8**, 1248-54.
100. Tamayose, K., Hirai, Y. & Shimada, T. (1996) *Hum Gene Ther* **7**, 507-13.
101. Liu, X. L., Clark, K. R. & Johnson, P. R. (1999) *Gene Ther* **6**, 293-9.
102. Smith, G. P. (1985) *Science* **228**, 1315-7.
103. Uchiyama, F., Tanaka, Y., Minari, Y. & Tokui, N. (2005) *J Biosci Bioeng* **99**, 448-56.
104. Aumailley, M. & Rousselle, P. (1999) *Matrix Biol* **18**, 19-28.
105. Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. & Hallek, M. (1999) *Nat Med* **5**, 1052-6.
106. Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. & Dower, W. J. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6378-82.
107. Ghosh, D. & Barry, M. A. (2005) *J Virol* **79**, 13667-72.
108. Li, Z., Zhao, R., Wu, X., Sun, Y., Yao, M., Li, J., Xu, Y. & Gu, J. (2005) *Faseb J* **19**, 1978-85.
109. Samoylova, T. I., Petrenko, V. A., Morrison, N. E., Globa, L. P., Baker, H. J. & Cox, N. R. (2003) *Mol Cancer Ther* **2**, 1129-37.



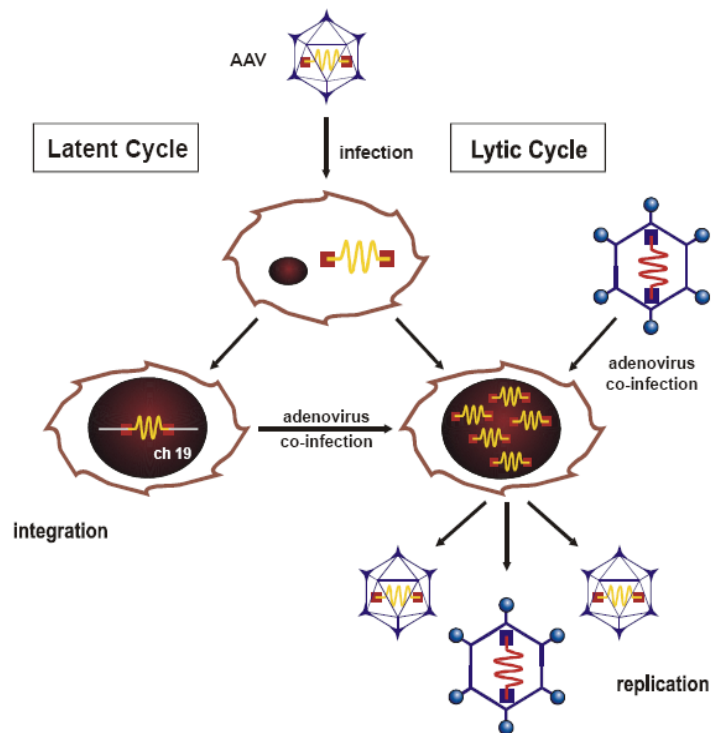
圖一，基因治療示意圖。基因治療由治療基因、基因調節系統、基因傳遞系統三個部份所組成，根據不同的治療對象挑選適當的治療用基因，使用不同的基因調節系統及基因傳遞系統，達成基因治療的目的。



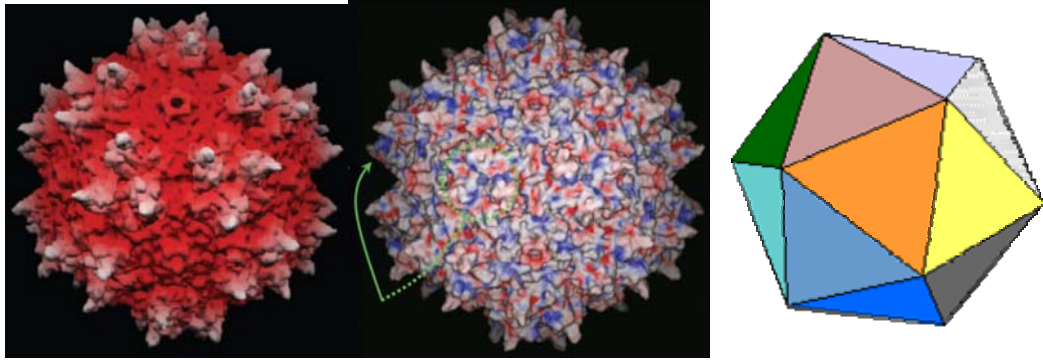
圖二，PEI 的化學結構式 (節錄自 Godbey, W.T., Wu, K.K., A.G., PEI and its role in gene delivery, 1999, 60, 150)。



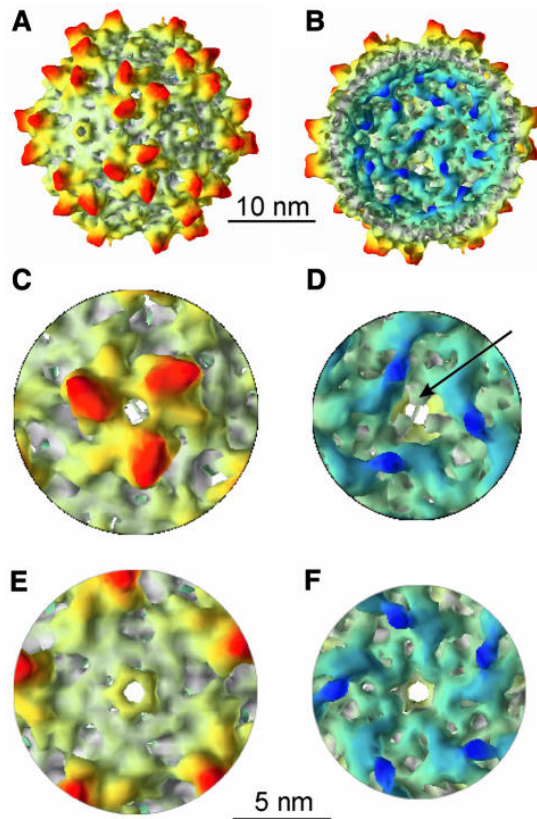
圖三，liposome 幫助 DNA 運送進入細胞。把 liposome 與 DNA 混合，使得 DNA 被包裹於其中，如此一來，DNA—liposome 複合物就可直接通過帶負電性的細胞膜而送入細胞內。



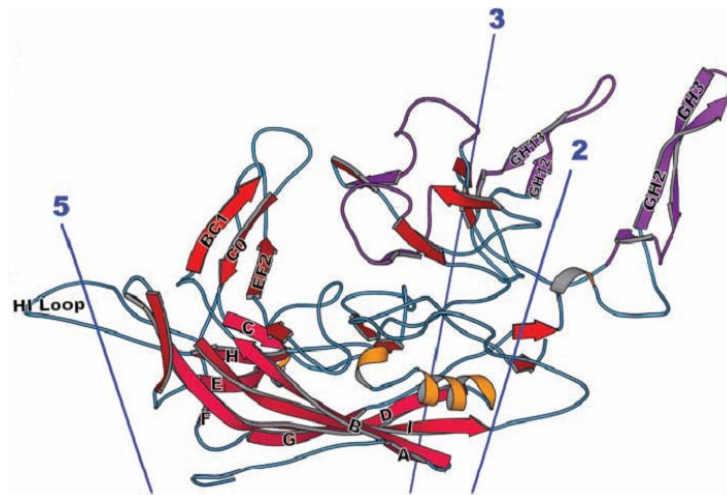
圖四，AAV 的生活史。當沒有幫助病毒的存在下，AAV 在感染細胞後進入潛伏期 (latent infection)，AAV 的 genomic DNA 專一性插入人類的基因組中的特定位置上或者以游離基因 (episome) 的狀態存在於細胞中。



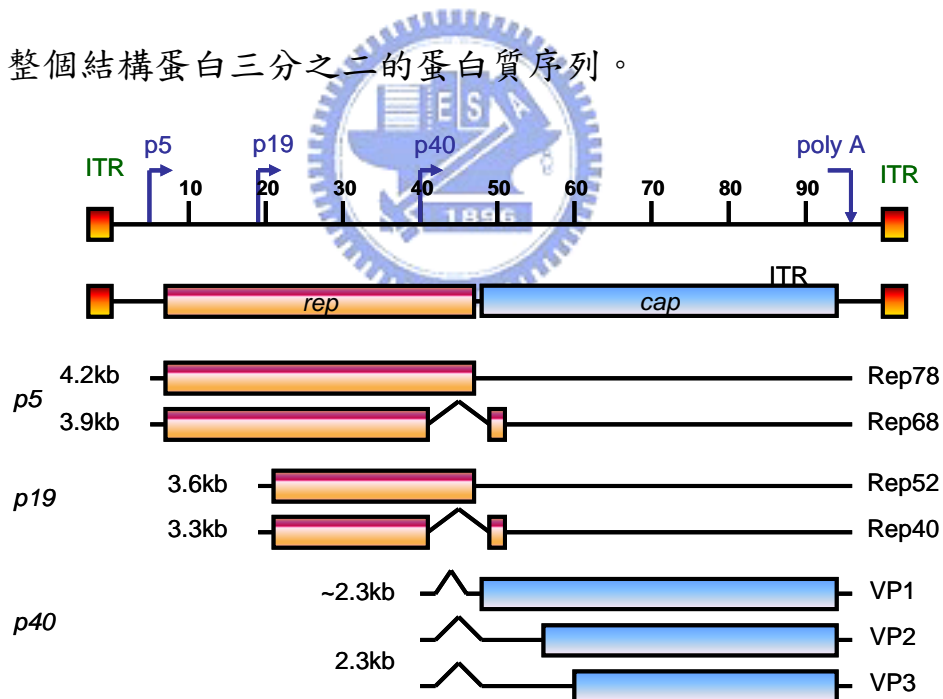
圖五，AAV2 的三維立體結構圖 (節錄自 Xie et al. 2002)。如圖所示，AAV2 的形態是接近圓球狀，並且以 T=1 的正二十面體對稱。



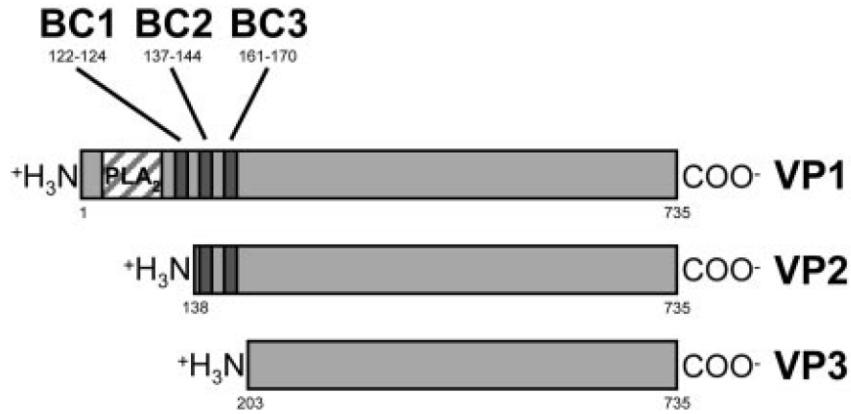
圖六，不包含基因組之AAV2的立體結構模擬圖 (節錄自 Stephanie Kronenberg et al. 2001)，A、C、E圖分別代表病毒表面的形態、三倍對稱軸、五倍對稱軸上結構的分佈。B、D、F圖則代表病毒內部的形態、三倍對稱軸、五倍對稱軸內結構的分佈。



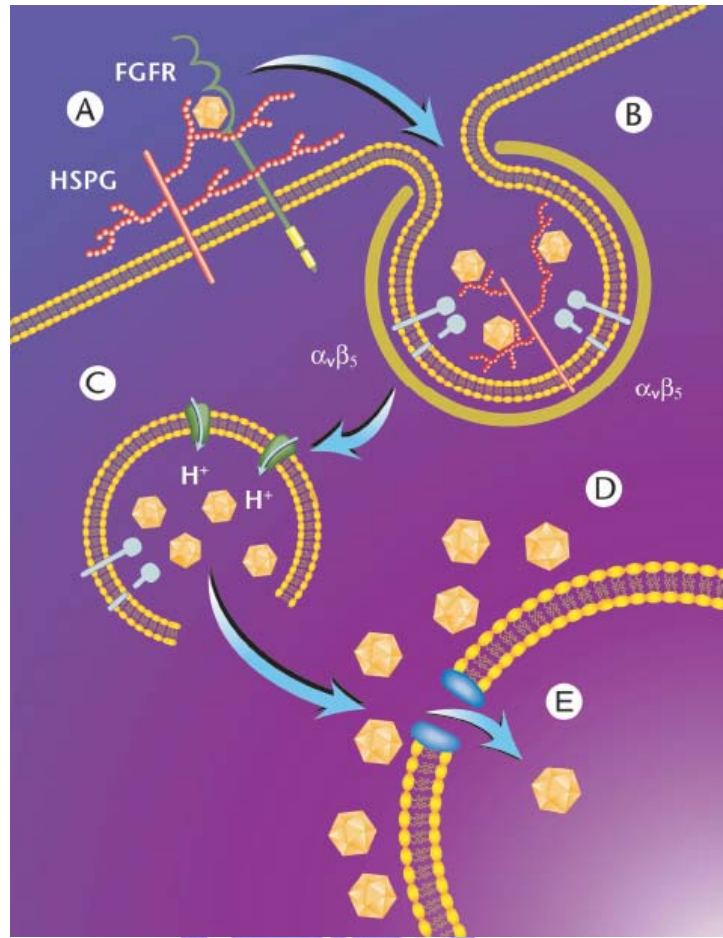
圖七，AAV2 病毒結構蛋白原子結構圖（節錄自 Xie et al. 2002）。病毒外殼內面部份，由兩個 antiparallel  $\beta$ -sheet 所形成的  $\beta$  jelly-roll-barrel 的結構。病毒的外殼表面部份，則由許多 loops 所形成，佔整個結構蛋白三分之二的蛋白質序列。



圖八，AAV2 的基因圖譜。AAV2 的基因組 DNA 兩端由兩個 inverted terminal repeats (ITRs) 所包圍，中間包含著兩個大片的 open reading frames (ORFs)，分別是 *rep* gene 及 *cap* gene。



圖九，病毒結構蛋白比對圖。(節錄自 Florian Sonntag et al. 2006)。構成病毒外殼的 VP1、VP2、VP3 在 C 端擁有共同的胺基酸序列，不同的是在 N 端，VP1 比 VP2 多 137 個胺基酸序列，VP2 又比 VP3 多 65 個胺基酸序列。VP1 的 N 端包含 parvoviral phospholipase A2 (pvPLA) 區域的蛋白質序列，以及三個提供 nuclear localization signals (NLS) 的鹼性胺基酸序列 (basic amino acid sequence elements, basic clusters, BCs)。

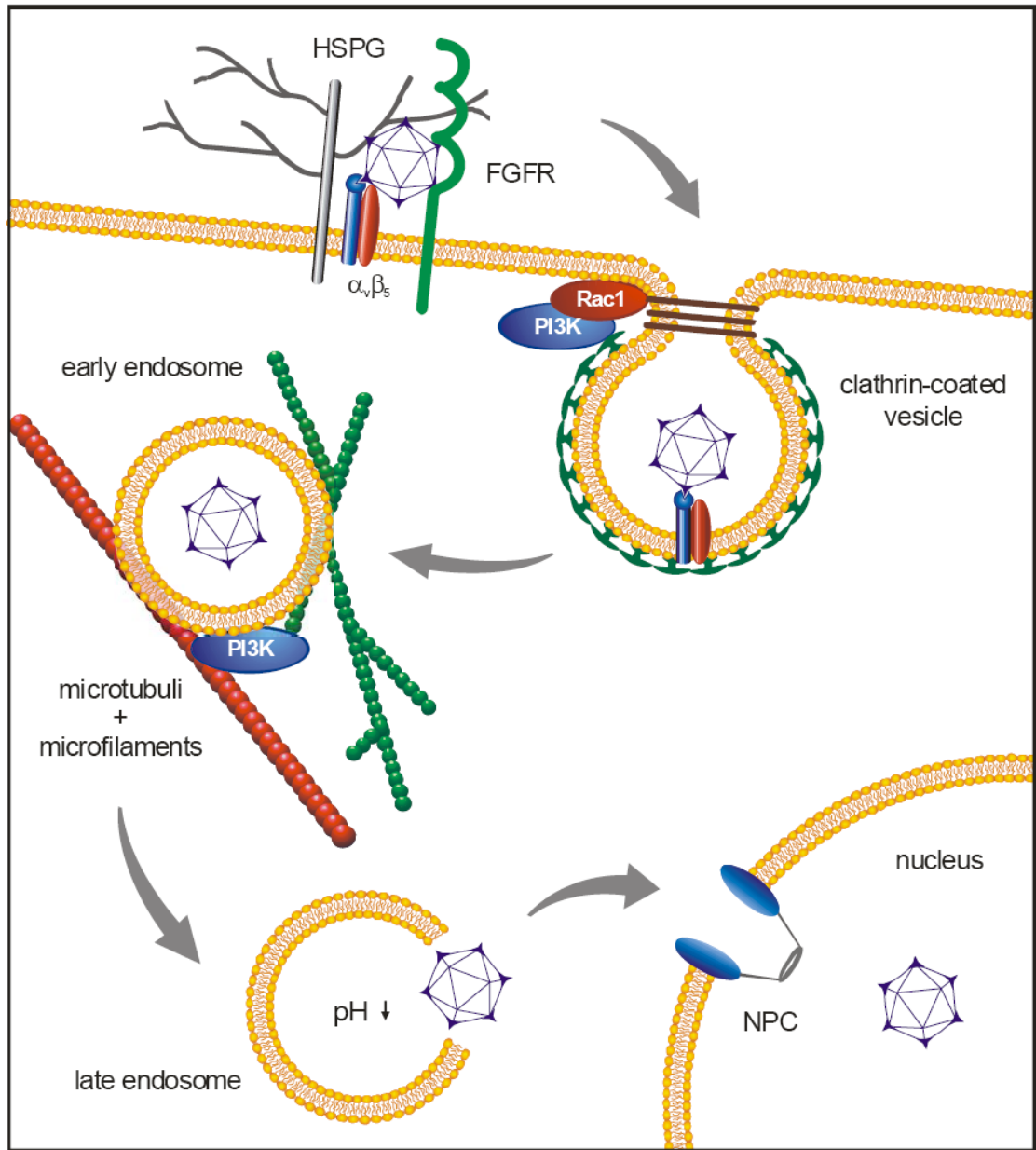


圖十，AAV 感染細胞流程圖（節錄自 Jeffrey S. Bartlett et al. 2000）。在與細胞表面的 HSPG 結合之後，AAV 馬上藉由 integrin  $\alpha_v\beta_5$  參與的 clathrin-coated pits 被送到細胞內並形成 endosome。利用細胞內的細胞骨架將 endosome 輸送到細胞核附近區域，接著因為 endosome 內環境 pH 值下降，導致 AAV 的構形改變，而能夠脫離 endosome。聚集在細胞核附近的 AAV 可以藉由通過 nucleus pore complex 以外的方式進入細胞核並完成病毒的感染。

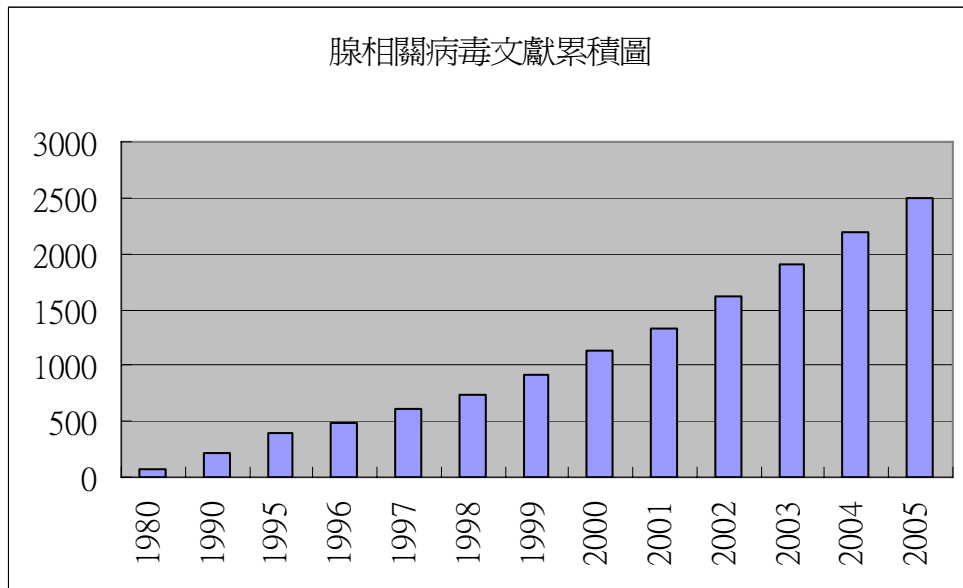


圖十一，AAV2 病毒結構蛋白原子結構圖 (自 PDB 取得 AAV2 VP3 蛋白資料 1LP3，使用 NCBI 網站所提供的軟體 Cn3D 運算出結果)。於病毒結構蛋白的 Heparin binding site 所在的序列 RGNR 圈選並標記，可以在結構圖上看到一段變成黃色的 loop，比對圖七，可以知道此段 loop 是位於病毒的三倍對稱軸上，是構成 AAV 表面三倍對稱軸附近的突起部份。

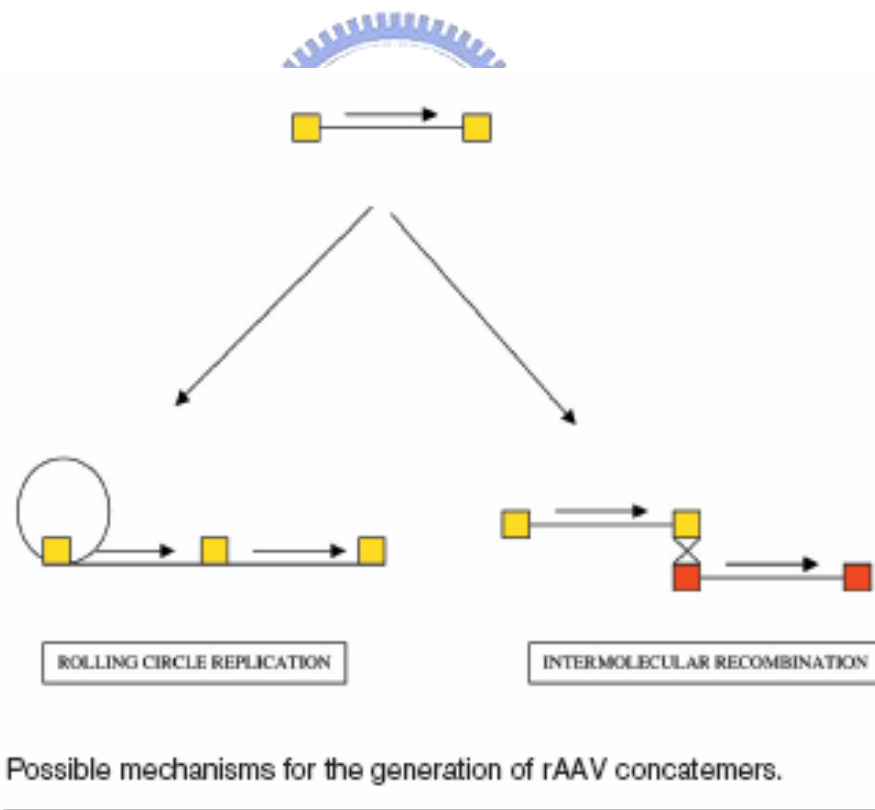




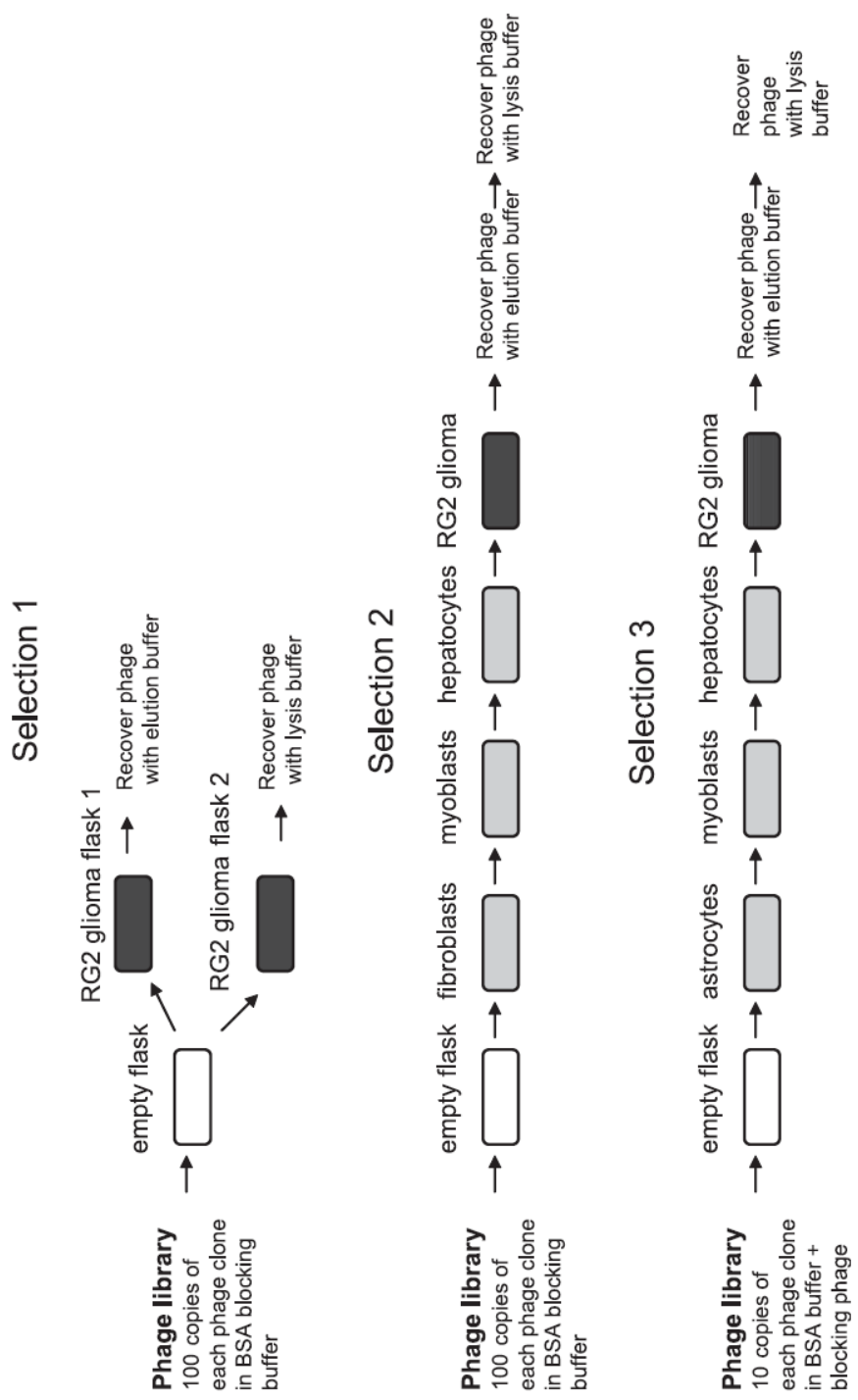
圖十二，AAV 感染細胞機制圖。



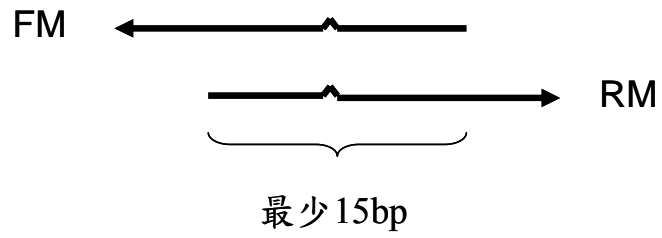
圖十三，歷年 AAV 相關文獻累積圖。



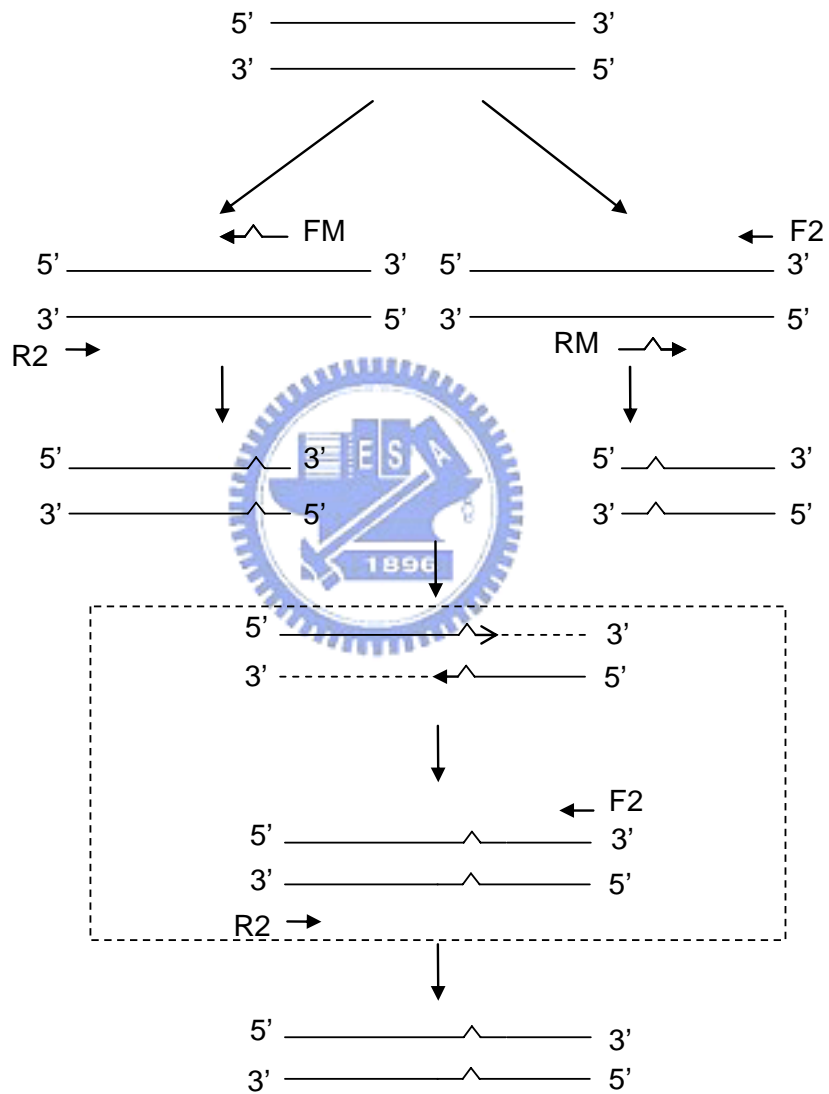
圖十四，使用 trans-splicing 方法使 AAV 可以攜帶更大容量之基因(節錄自 Yan Z et al. 2000)。



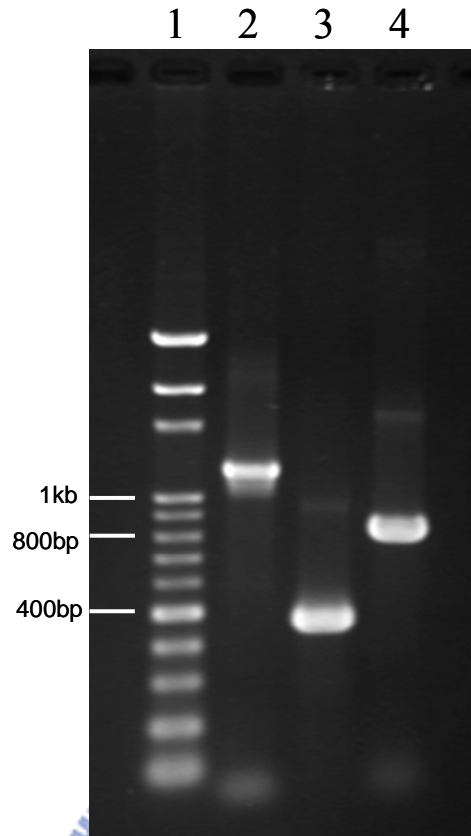
圖十五，RG2 PL2 胜肽篩選圖 (節錄自 Samoylova, T. I. et al. 2003)。



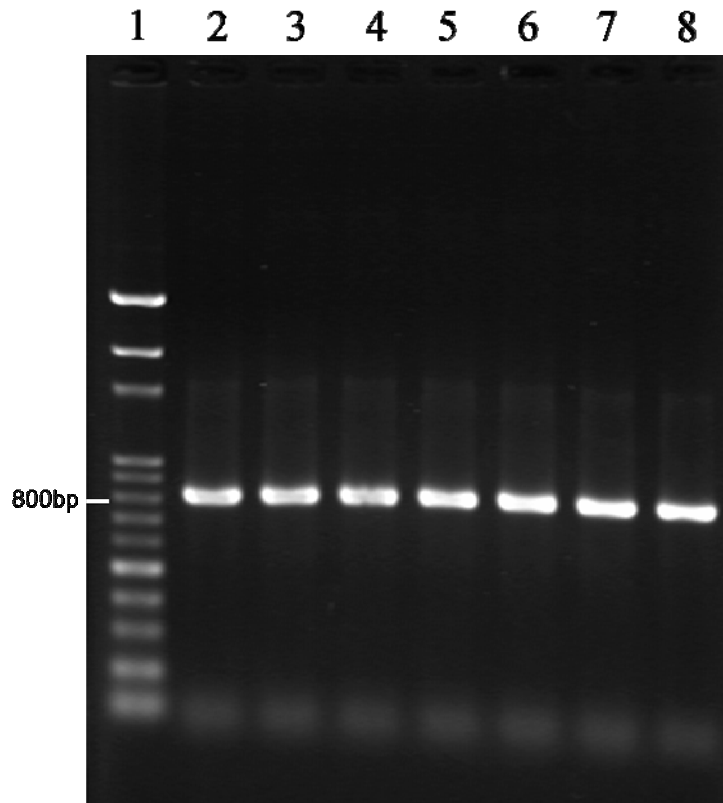
圖十六，site-directed mutagenesis—突變引子設計圖。



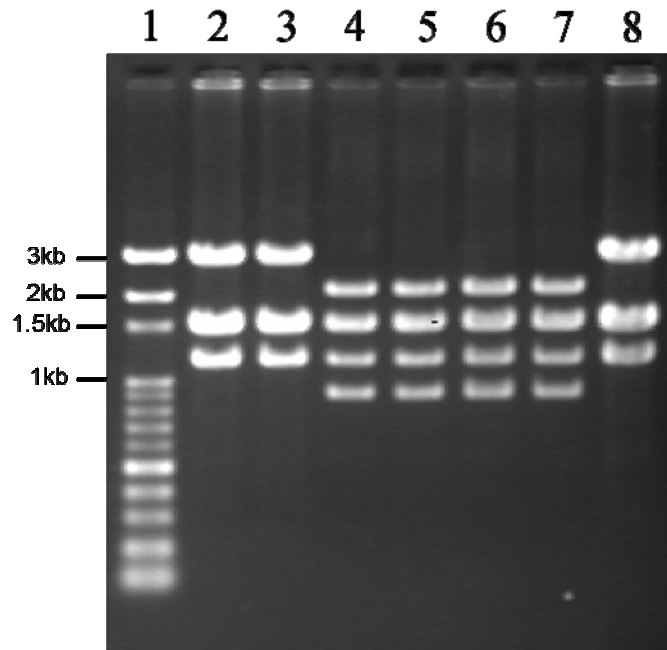
圖十七，site-directed mutagenesis—PCR 反應流程圖。



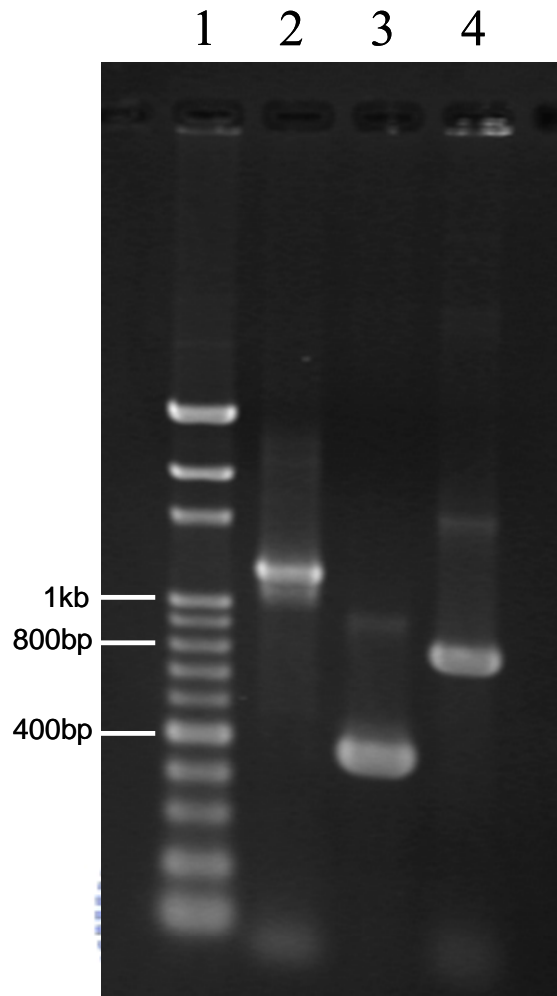
圖十八，質體 pAAV-mRC 突變基因的取得。使用 site-directed mutagenesis 進行三階段 PCR，第一列代表 100bp 的 marker，第二列代表前段突變基因的 PCR 產物 (1197bp)，第三列代表後段突變基因的 PCR 產物 (495bp)，第四列則代表包含突變基因的 DNA 片段的 PCR 產物 (817bp)。



圖十九，包含 pAAV-RC 骨架之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 pVP3R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-RC 骨架之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第七列代表挑選的六個菌株的菌液 PCR 產物，第八列代表包含質體 pAAV-RC 菌株的菌液 PCR 片段。包含 pAAV-RC 或 pAAV-mRC 質體的菌株進行菌液 PCR 後都會得到長 817bp 的 DNA 片段。由圖可以得知挑選的六個菌株都包含 pAAV-RC 的骨架。

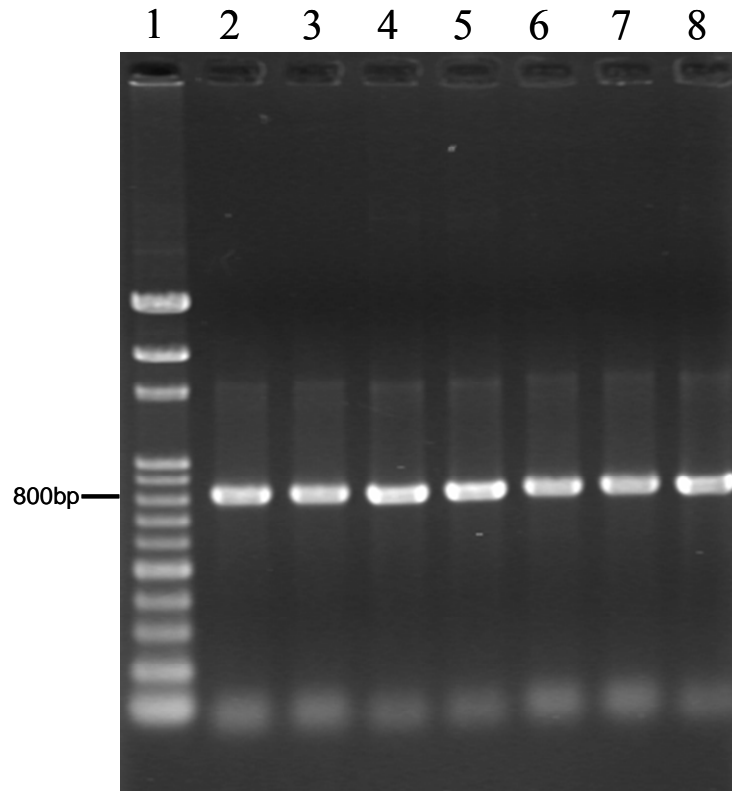


圖二十，質體 pAAV-mRC 之限制酶切割反應篩選圖。使用 FspI 限制酶進行限制酶切割反應，挑選出包含五個 FspI 限制酶切割位的 pAAV-mRC。第一列代表 100bp marker，第二到七列代表經過篩選的六個菌株所包含的質體，第八列則是以 pAAV-RC 當做控制組。質體 pAAV-RC 包含四個 FspI 限制酶切割位，經過 FspI 限制酶切割反應之後，可以得到 3016bp、1592bp、1547bp、1172bp 等四個 DNA 片段；具有突變的質體 pAAV-mRC 則包含五個 FspI 限制酶切割位，經過 FspI 限制酶切割反應之後，可以得到 2107bp、1592bp、1547bp、1172bp、909bp 等五個 DNA 片段。在 pAAV-RC 與 pAAV-mRC 進行完 FspI 限制酶切割反應之後，都會有兩個相近 DNA 片段在大小 1.5kb 處出現，因此無法完整的看到四條及五條 DNA 片段出現。由實驗可以看到第四到七列的 DNA 片段與 pAAV-mRC 進行完 FspI 限制酶切割反應之後的片段大小相似。

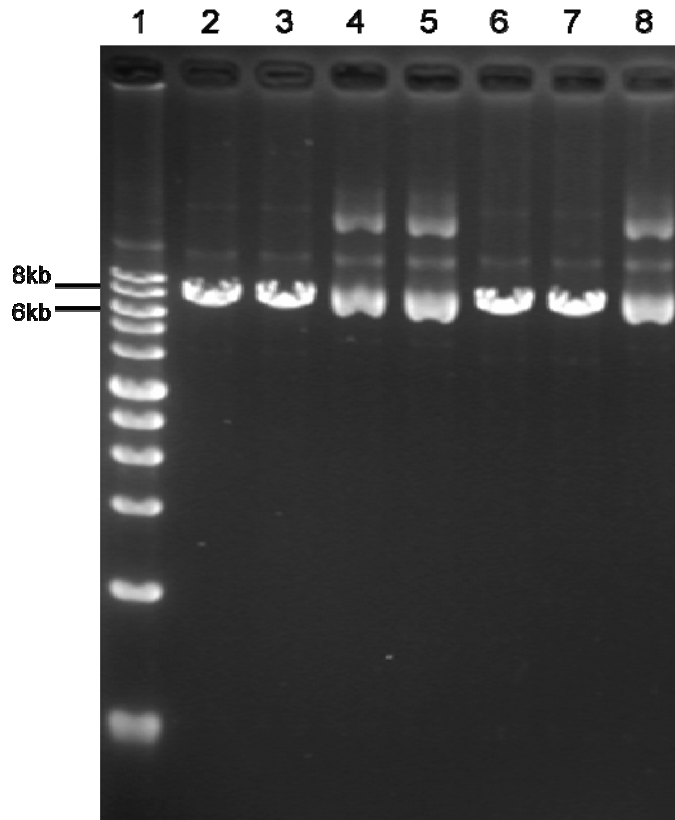


圖二十一，質體 pAAV-m2RC 突變基因的取得。使用 site-directed mutagenesis 進行三階段 PCR，第一列代表 100bp 的 marker，第二列代表前段突變基因的 PCR 產物 (1204bp)，第三列代表後段突變基因的 PCR 產物 (492bp)，第四列則代表包含突變基因的 DNA 片段的 PCR 產物 (823bp)。

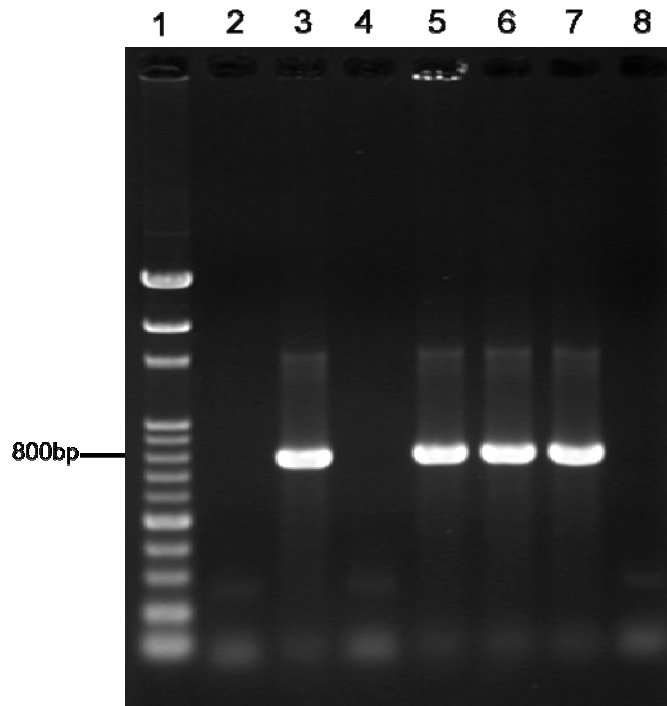




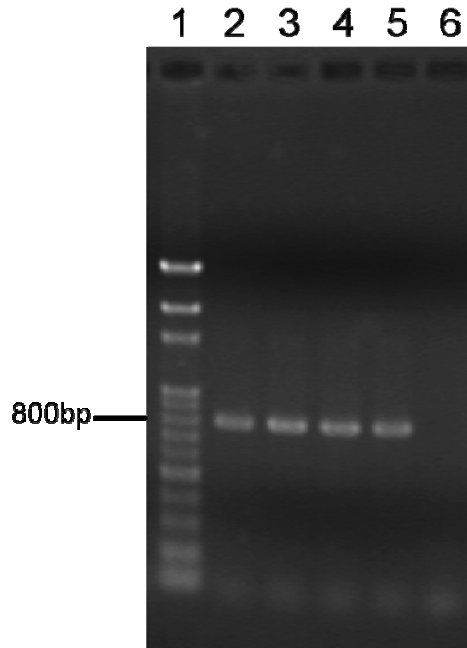
圖二十二，包含 pAAV-RC 骨架之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 pVP3R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-RC 骨架之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第七列代表挑選的六個菌株的菌液 PCR 產物，第八列代表包含質體 pAAV-mRC 菌株的菌液 PCR 產物。包含 pAAV-mRC 質體的菌株進行菌液 PCR 後會得到長 817bp 的 DNA 片段；包含 pAAVm2RC 質體的菌株進行菌液 PCR 後會得到長 823bp 的 DNA 片段。由圖可以得知挑選的六個菌株進行菌液 PCR 後都得到約 800bp 的 DNA 片段，皆有可能包含 pAAV-m2RC。



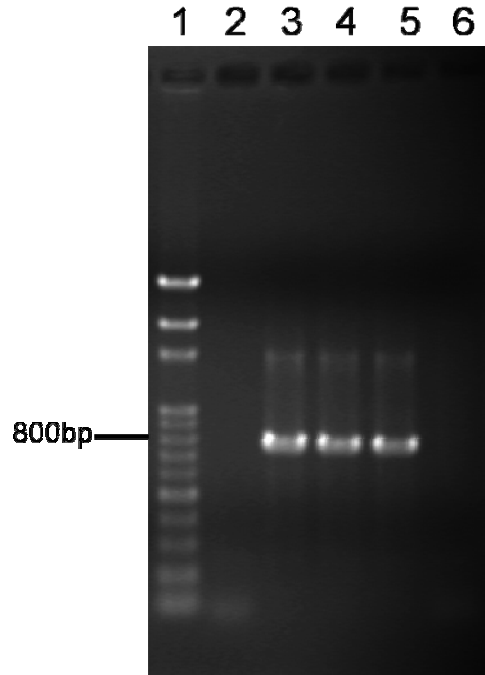
圖二十三，質體 pAAV-m2RC 之限制酶切割反應篩選圖。使用 NotI 限制酶進行限制酶切割反應，挑選出包含一個 NotI 限制酶切割位的 pAAV-m2RC。第一列代表 100bp marker，第二到七列代表經過篩選的六個菌株所包含的質體，第八列則是以 pAAV-mRC 當做控制組。質體 pAAV-mRC 不包含 NotI 限制酶切割位，經過 NotI 限制酶切割反應之後，仍然是環狀 DNA 分子；具有突變的質體 pAAV-m2RC 則包含一個 NotI 限制酶切割位，經過 NotI 限制酶切割反應之後，可以得到 7333bp 的 DNA 片段。由實驗可以看到第二、三、六、七列的 DNA 片段大小約為 7kb 左右，所以可能是質體 pAAV-m2RC。



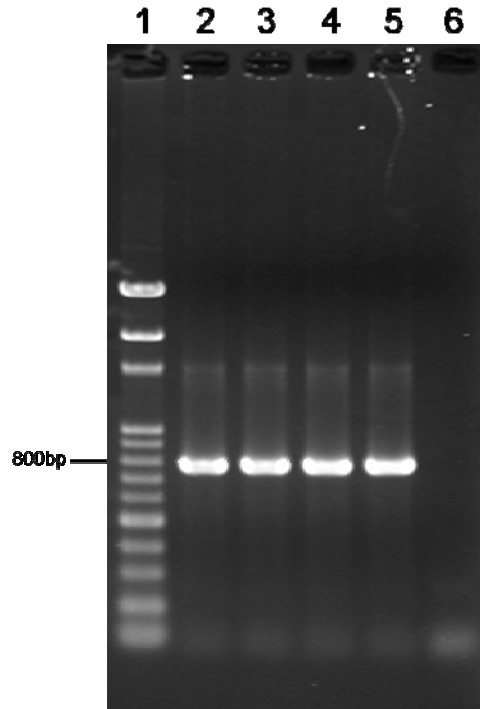
圖二十四，包含 pAAV-m2RC-RGD 之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 I1R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-m2RC 骨架與包含 RGD 基因片段之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第七列代表挑選的六個菌株的菌液 PCR 產物，第八列代表包含質體 pAAV-m2RC 菌株的菌液 PCR 產物。包含 pAAV-m2RC 質體的菌株進行菌液 PCR 後，因不包含 RGD 基因片段，因此無法得到 PCR 產物；包含 pAAVm2RC-RGD 質體的菌株進行菌液 PCR 後可以得到長 780bp 的 DNA 片段。由圖可以得知第三、五、六、七列菌株進行菌液 PCR 後都得到約 800bp 的 DNA 片段，皆有可能包含 pAAV-m2RC-RGD。



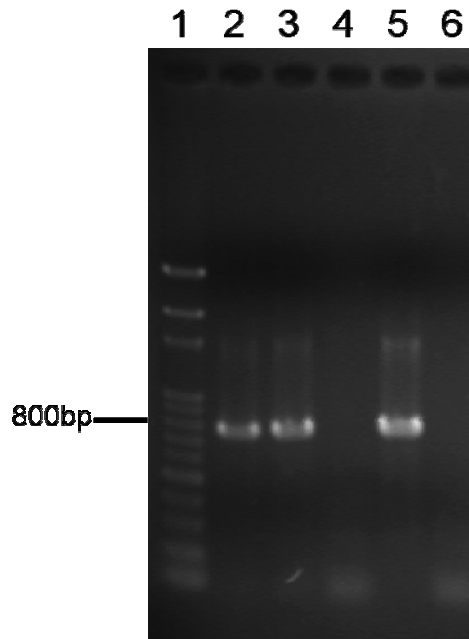
圖二十五，包含 pAAV-m2RC-TP. A549 之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 TP. A549 R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-m2RC 骨架與包含 TP. A549 基因片段之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第五列代表挑選的四個菌株的菌液 PCR 產物，第六列代表包含質體 pAAV-m2RC 菌株的菌液 PCR 產物。包含 pAAV-m2RC 質體的菌株進行菌液 PCR 後，因不包含 TP. A549 基因片段，因此無法得到 PCR 產物；包含 pAAVm2RC-TP. A549 質體的菌株進行菌液 PCR 後可以得到長 810bp 的 DNA 片段。由圖可以得知第二到五列菌株進行菌液 PCR 後都得到約 800bp 的 DNA 片段，皆有可能包含 pAAV-m2RC-TP. A549。



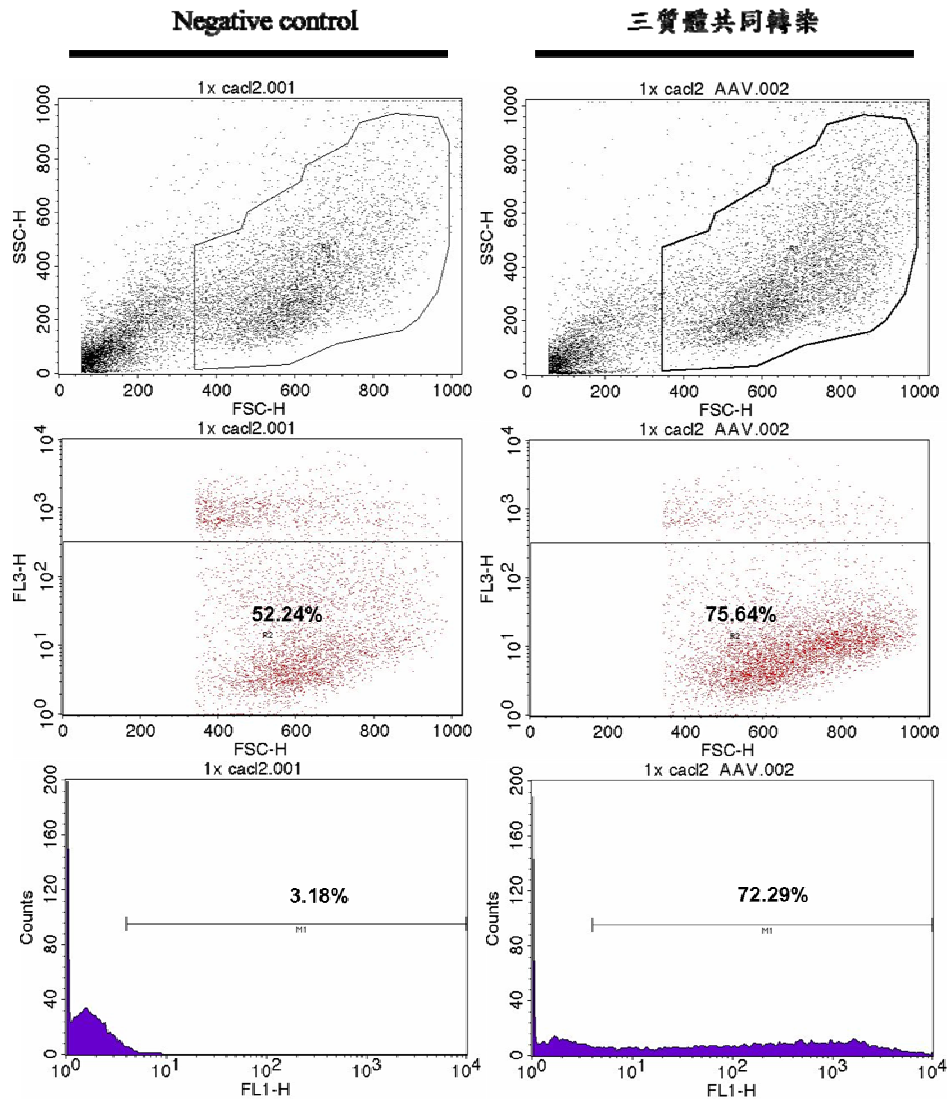
圖二十六，包含pAAV-m2RC-C2C12 12.51之菌株初篩圖。使用引子pVP3F及C2C12 12.51 R對挑選菌株進行菌液PCR，篩選出包含質體pAAV-m2RC骨架與包含C2C12 12.51基因片段之菌株。第一列代表100bp marker，第二到第五列代表挑選的四個菌株的菌液PCR產物，第六列代表包含質體pAAV-m2RC菌株的菌液PCR產物。包含pAAV-m2RC質體的菌株進行菌液PCR後，因不包含C2C12 12.51基因片段，因此無法得到PCR產物；包含pAAVm2RC-C2C12 12.51質體的菌株進行菌液PCR後可以得到長786bp的DNA片段。由圖可以得知第三到五列菌株進行菌液PCR後都得到約800bp的DNA片段，皆有可能包含pAAV-m2RC-C2C12 12.51。



圖二十七，包含 pAAV-m2RC-GE11 之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 GE11 R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-m2RC 骨架與包含 GE11 基因片段之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第五列代表挑選的四個菌株的菌液 PCR 產物，第六列代表包含質體 pAAV-m2RC 菌株的菌液 PCR 產物。包含 pAAV-m2RC 質體的菌株進行菌液 PCR 後，因不包含 GE11 基因片段，因此無法得到 PCR 產物；包含 pAAVm2RC-GE11 質體的菌株進行菌液 PCR 後可以得到長 786bp 的 DNA 片段。由圖可以得知第二到五列菌株進行菌液 PCR 後都得到約 800bp 的 DNA 片段，皆有可能包含 pAAV-m2RC-GE11。

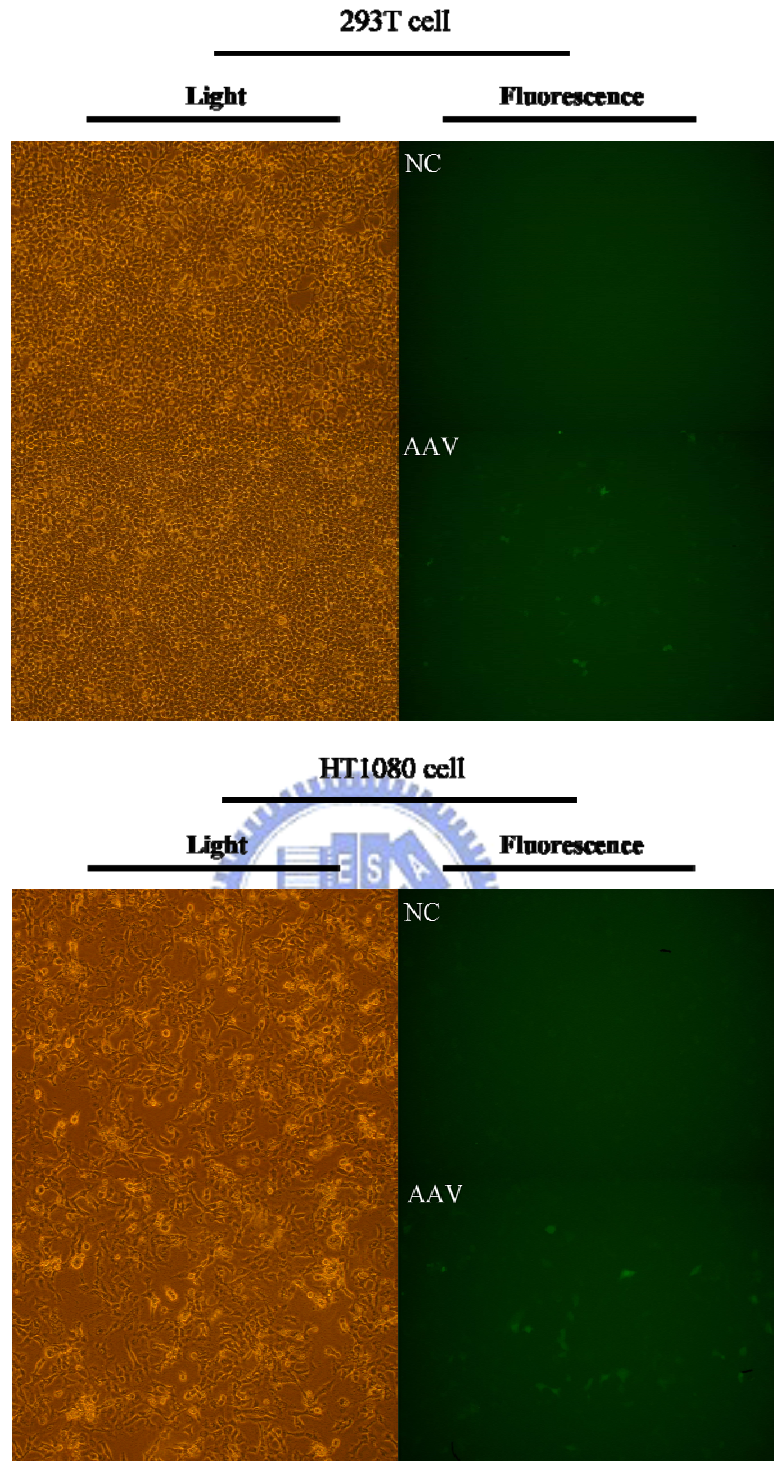


圖二十八，包含 pAAV-m2RC-RG2 P2L 之菌株初篩圖。使用引子 pVP3F 及 RG2 P2L R 對挑選菌株進行菌液 PCR，篩選出包含質體 pAAV-m2RC 骨架與包含 RG2 P2L 基因片段之菌株。第一列代表 100bp marker，第二到第五列代表挑選的四個菌株的菌液 PCR 產物，第六列代表包含質體 pAAV-m2RC 菌株的菌液 PCR 產物。包含 pAAV-m2RC 質體的菌株進行菌液 PCR 後，因不包含 RG2 P2L 基因片段，因此無法得到 PCR 產物；包含 pAAVm2RC-RG2 P2L 質體的菌株進行菌液 PCR 後可以得到長 774bp 的 DNA 片段。由圖可以得知第二、三、五列菌株進行菌液 PCR 後都得到約 800bp 的 DNA 片段，皆有可能包含 pAAV-m2RC-RG2 P2L。

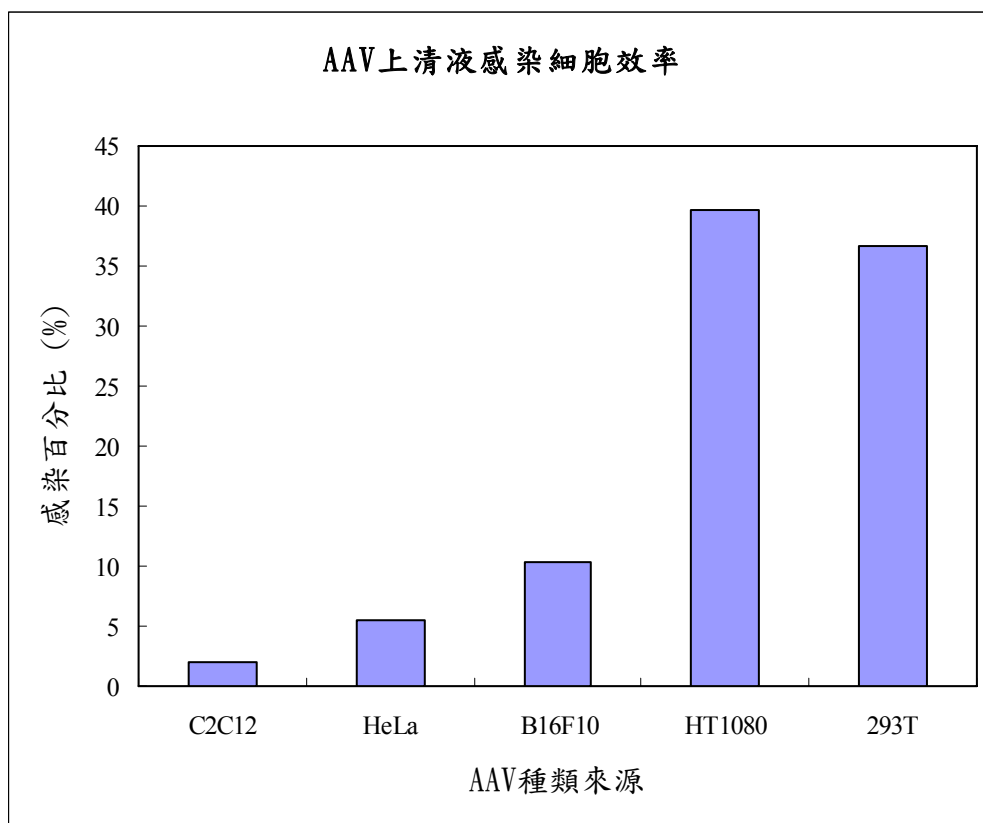


圖二十九，使用磷酸鈣法在 293T 細胞進行三質體共同轉染之存活率與轉染效率之測試。實驗使用 pAAV-hrGFP 所攜帶的 hrGFP 基因當作報導基因，DNA 染劑 PI 檢驗細胞是否存活，於轉染後 36 小時使用流式細胞儀偵測並計算細胞存活率及轉染效率。Negative control 組代表不使用任何質體進行轉染，三質體共同轉染組代表使用 pAAV-RC、pAAV-hrGFP、及 pHelper 三種質體進行三質體共同轉染。根據 Negative control 組圈選細胞群落，並選則 PI (FL3-H) 染色較少之細胞群落 (活細胞)，觀察 hrGFP (FL1-H) 的表現量以偵測轉染效率。

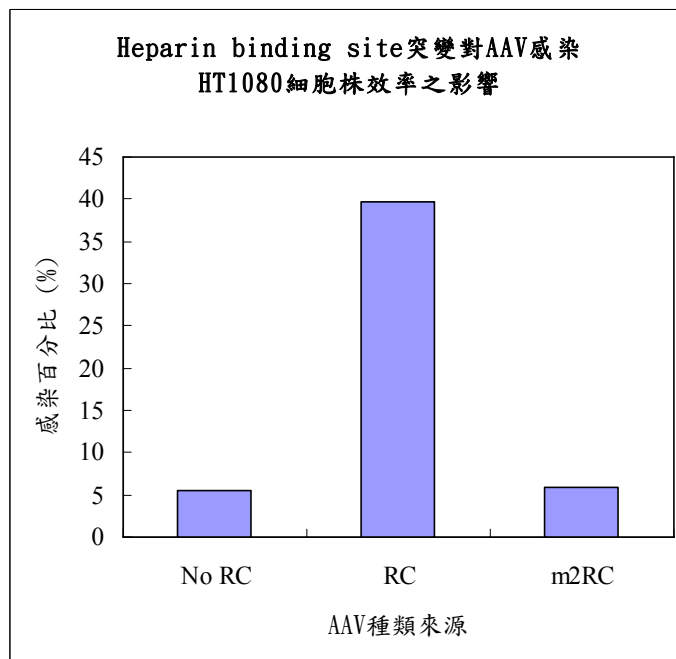
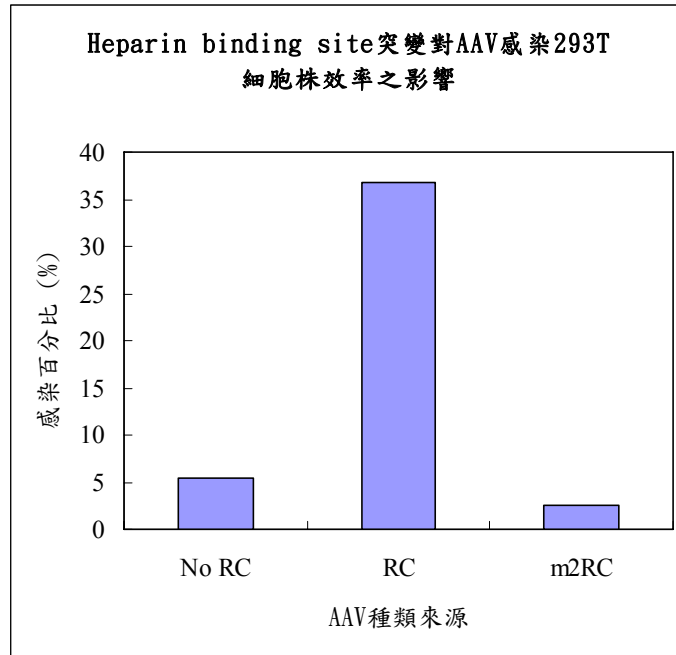




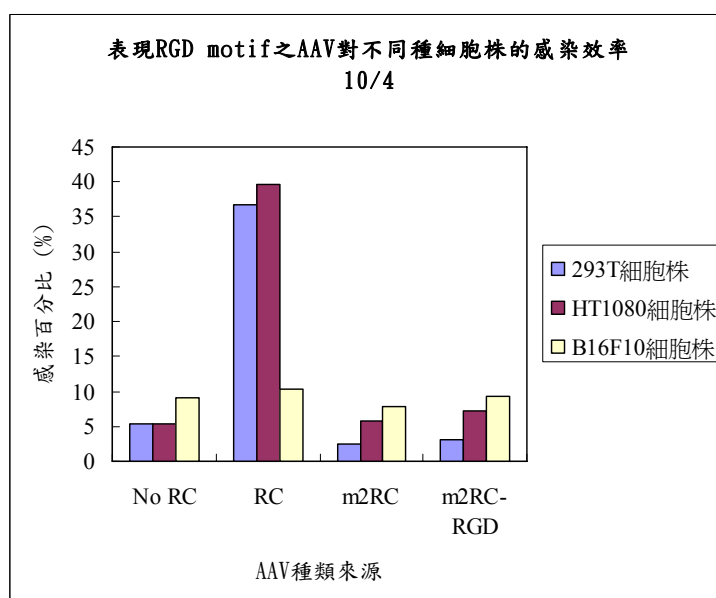
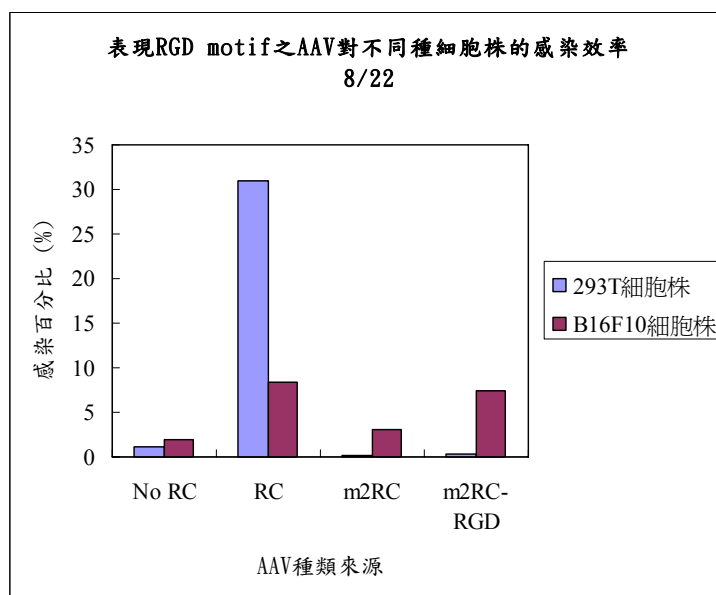
圖三十，AAV 對 293T 細胞及 HT1080 細胞感染圖。AAV 使用 hrGFP 基因作為報導基因。在使用包含 AAV 的上清液進行細胞感染後 48 小時，使用螢光顯微鏡觀察表現 hrGFP 之細胞，確認病毒是否存在。



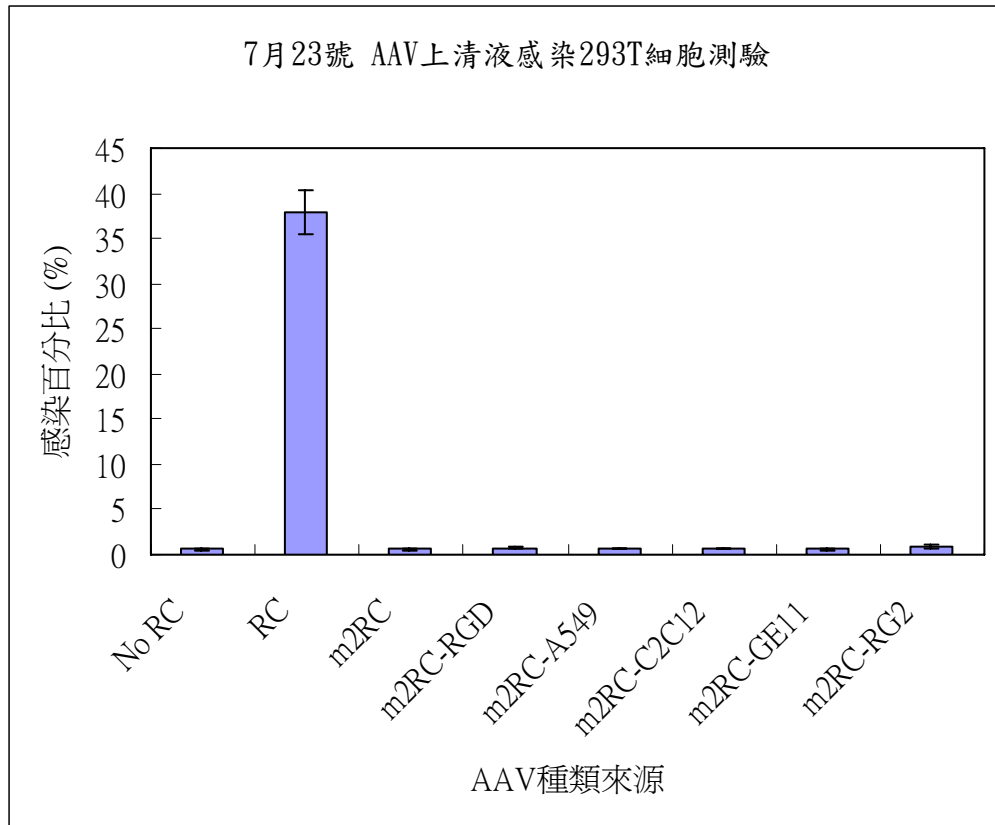
圖三十一，AAV 對於不同細胞株之感染效率圖。以 AAV 所攜帶的 hrGFP 基因作為報導基因，在使用包含 AAV 的上清液進行感染 48 小時後，以流式細胞儀偵測螢光細胞數量並計算其百分比。如圖所示，AAV 對於 HT1080 及 293T 細胞的感染效率較其他三種細胞好，感染效率可以到達 30%-45%。



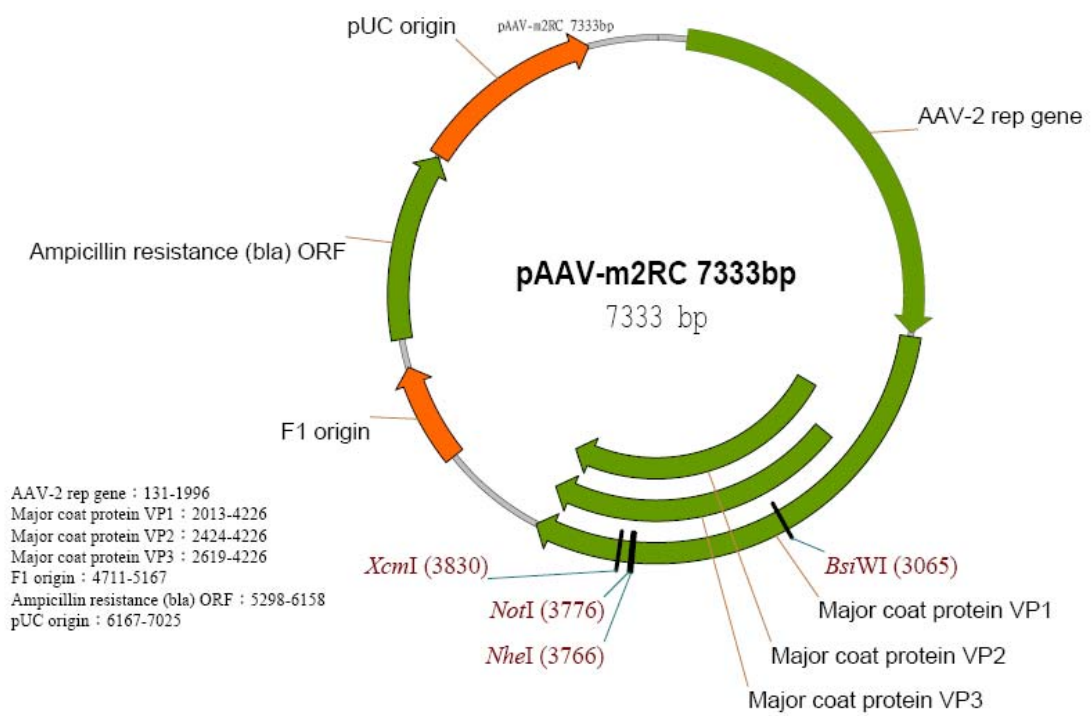
圖三十二，Heparin binding site 突變 AAV 對於 293T 細胞及 HT1080 細胞感染效率圖。實驗挑選 AAV 感染效率較佳的 293T 細胞及 HT1080 細胞進行突變對於 AAV 感染效率影響的測試，使用突變 AAV 攜帶的 hrGFP 當作報導基因，使用流式細胞儀偵測其感染效率。由圖可知，與正常的 AAV 相比，具有來自 m2RC 突變蛋白質外殼的 AAV 感染效率都大幅下降。



圖三十三，具有 RGD motif 之突變 AAV 對於其感染趨性的影響。使用 pAAV-m2RC-RGD 取代 pAAV-RC 提供病毒外殼結構蛋白與正常 AAV 感染趨性的比較。使用 AAV 攜帶的 hrGFP 當作報導基因，在感染後 48 小時，使用流式細胞儀偵測其感染效率。如圖所示，正常的 AAV 對 293T 及 HT1080 有較好的感染效率，而包含 RGD 的突變 AAV 則在 B16F10 細胞中有較好的感染效率。



圖三十四，不同種類 AAV 對於 293T 細胞感染效率圖。使用 AAV 攜帶的 hrGFP 當作報導基因，在感染後 48 小時，使用流式細胞儀偵測其感染效率。如圖所示，只有正常的 AAV 具有良好的感染效率，其它突變病毒感染效率非常低的。



附錄一，質體 pAAV-m2RC 序列與定序資料



1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGGA
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCTT	CTAGTCTTCA	AGGATAAGGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTTCCTG
	ACACTAATTC	CAGGGGTCCG	TGGAACTGCT	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAGTGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTCGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCTCAA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACCGGCT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTTCTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGAAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCCTGC
451	TTTCTGAGT	CAGATTCGCG	AAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTGACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGTTTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTACTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGTTCCA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTCGGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGACACG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAAAC	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATA	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCGACTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCCGTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CGTCTTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TG GTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCCACGCA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TTACTCTTGA	TTCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCCAGCA	GGAGTCCGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTACG
1351	CTCGGCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCGTGAT GAGGGCACTA	CGTCACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGC
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCTTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTT TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GGTTGAGGTG CCAACTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGTGGA TTTCCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTGC
1651	GGTGC GCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTCGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTCCCTG ACAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACTCACG AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTCTGTC AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCACTGCCTG CGTGACGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATAACGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTACCAC	GAAGCTCAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCAC GGACCCGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTGCTC	GGTCTTGTG CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTCATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CCGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTCCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTCGA	CGACAGCGGA GCTGTGCTCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTCCGG



2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGTT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTTCGCCCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCCATT	TTCCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGTFT	TTCCAGCCA AAAGGTCGGT
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTCT	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTC GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTCTT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTTCGAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAAT GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTACATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTTGCC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCCCT ATGAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACTTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTCGTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TACTTGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCACC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTCCG	TTCAGTTTTC AAGTCAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGCTCACTGT	TTCCGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCCTG ACCGAAGGAC

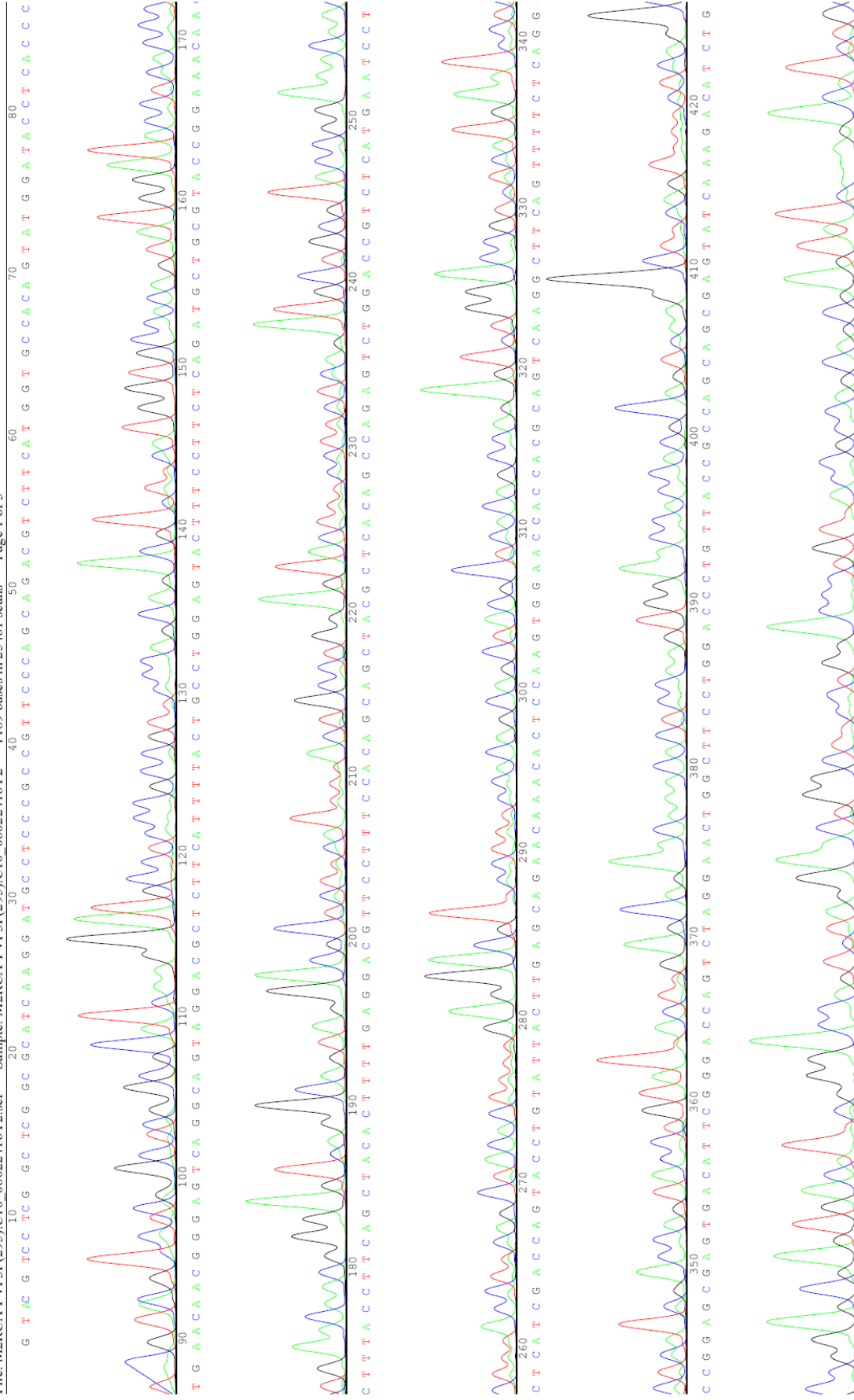
3451	GACCCTGTTA	CCGCCAGCAG	CGAGTATCAA	AGACATCTGC	GGATAACAAC
	CTGGGACAAT	GGCGGTCTGC	GCTCATAGTT	TCTGTAGACG	CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT	ACTCGTGGAC	TGGAGCTACC	AAGTACCACC	TCAATGGCAG
	TTGTCACTTA	TGAGCACCTG	ACCTCGATGG	TTCATGGTGG	AGTTACCCTC
3551	AGACTCTCTG	GTGAATCCGG	GCCCCGGCCAT	GGCAAGCCAC	AAGGACGATG
	TCTGAGAGAC	CACTTAGGCC	CGGGCCGGTA	CCGTTCCGGT	TTCCTGCTAC
3601	AAGAAAAGTT	TTTTCTCAG	AGCGGGGTTT	TCATCTTTGG	GAAGCAAGGC
	TTCTTTTCAA	AAAAGGAGTC	TCGCCCAAG	AGTAGAAAAC	CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA	CAAATGTGGA	CATTGAAAAG	GTCATGATTA	CAGACGAAGA
	AGTCTCTTTT	GTTTACACCT	GTAACTTTTT	CAGTACTAAT	GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG	ACAACCAATC	CCGTGGCTAC	GGAGCAGTAT	GGTTCGTGAT
	CCTTTAGTCC	TGTTGGTTAG	GGCACCGATG	CCTCGTCATA	CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT	CCAGGCTAGC	GGAGCGGCCG	CGCAAGCAGC	TACCGCAGAT
	GATGGTTGGA	GGTCCGATCG	CCTCGCCGGC	GCGTTCGTCG	ATGGCGTCTA
3801	GTCAACACAC	AAGGCGTTCT	TCCAGGCATG	GTCTGGCAGG	ACAGAGATGT
	CAGTTGTGTG	TTCCGCAAGA	AGGTCCGTAC	CAGACCGTCC	TGTCTCTACA
3851	GTACCTTCAG	GGGCCATCT	GGGCAAAGAT	TCCACACACG	GACGGACATT
	CATGGAAGTC	CCCGGTAGA	CCCGTTTCTA	AGGTGTGTGC	CTGCCTGTAA
3901	TTCACCCCTC	TCCCCTCATG	GGTGGATTCT	GACTTAAACA	CCCTCCTCCA
	AAGTGGGGAG	AGGGGAGTAC	CCACCTAAGC	CTGAATTTGT	GGGAGGAGGT
3951	CAGATTCTCA	TCAAGAACAC	CCCGGTACCT	GCGAATCCTT	CGACCACCTT
	GTCTAAGAGT	AGTTCCTGTG	GGGCCATGGA	CGCTTAGGAA	GCTGGTGGAA
4001	CAGTGGCGCA	AAGTTTGCTT	CCTTCATCAC	ACAGTACTCC	ACGGGACAGG
	GTCACGCCGT	TTCAAACGAA	GGAAAGTAGT	TGTCATGAGG	TGCCCTGTCC
4051	TCAGCGTGGA	GATCGAGTGG	GAGCTGCAGA	AGGAAAACAG	CAAACGCTGG
	AGTCGCACCT	CTAGCTCACC	CTCGACGTCT	TCCTTTTGTG	GTTTGCGACC
4101	AATCCCAGAA	TTCAGTACAC	TTCCAACCTAC	AACAAGTCTG	TTAATGTGGA
	TTAGGGCTTT	AAGTCATGTG	AAGGTTGATG	TTGTTTCTAG	AATTACACCT
4151	CTTTACTGTG	GACACTAATG	GCGTGTATTG	AGAGCCTCGC	CCCATTGGCA
	GAAATGACAC	CTGTGATTAC	CGCACATAAG	TCTCGGAGCG	GGGTAACCGT
4201	CCAGATACCT	GACTCGTAAT	CTGTAATTGC	TTGTTAATCA	ATAAACCGTT
	GGTCTATGGA	CTGAGCATTG	GACATTAACG	AACAATTAGT	TATTTGGCAA
4251	TAATTGCTTT	CAGTTGAACT	TTGGTCTCTG	CGTATTTCTT	TCTTATCTAG
	ATTAAGCAAA	GTCAACTTGA	AACCAGAGAC	GCATAAAGAA	AGAATAGATC
4301	TTTCCATGGC	TACGTAGATA	AGTAGCATGG	CGGGTAAATC	ATTAACCTACA
	AAAGGTACCG	ATGCATCTAT	TCATCGTACC	GCCCAATTAG	TAATTGATGT
4351	GCCCCGGCGT	TTAAACAGCG	GGCGGAGGGG	TGGAGTCGTG	ACGTGAATTA
	CGGGCCCGCA	AATTTGTCTG	CCGCCTCCCC	ACCTCAGCAC	TGCACTTAAT
4401	CGTCATAGGG	TTAGGGAGGT	CCTGTATTAG	AGGTCACGTG	AGTGTTTTGC
	GCAGTATCCC	AATCCCTCCA	GGACATAATC	TCCAGTGCAC	TCACAAAACG
4451	GACATTTTGC	GACACCATGT	GGTCTCGCTG	GGGGGGGGGG	CCCGAGTGAG
	CTGTAAAACG	CTGTGGTACA	CCAGAGCGAC	CCCCCCCCCC	GGGCTCACTC
4501	CACGCAGGGT	CTCCATTTTG	AAGCGGGAGG	TTTGAACGAG	CGCTGGCGCG
	GTGCGTCCCA	GAGGTAAAAC	TTCCGCCCTC	AAACTTGCTC	GCGACCGCGC
4551	CTCACTGGCC	GTCGTTTTAC	AACGTCGTGA	CTGGGAAAAC	CCTGGCGTTA
	GAGTGACCGG	CAGCAAAATG	TTGCAGCACT	GACCCTTTTG	GGACCGCAAT

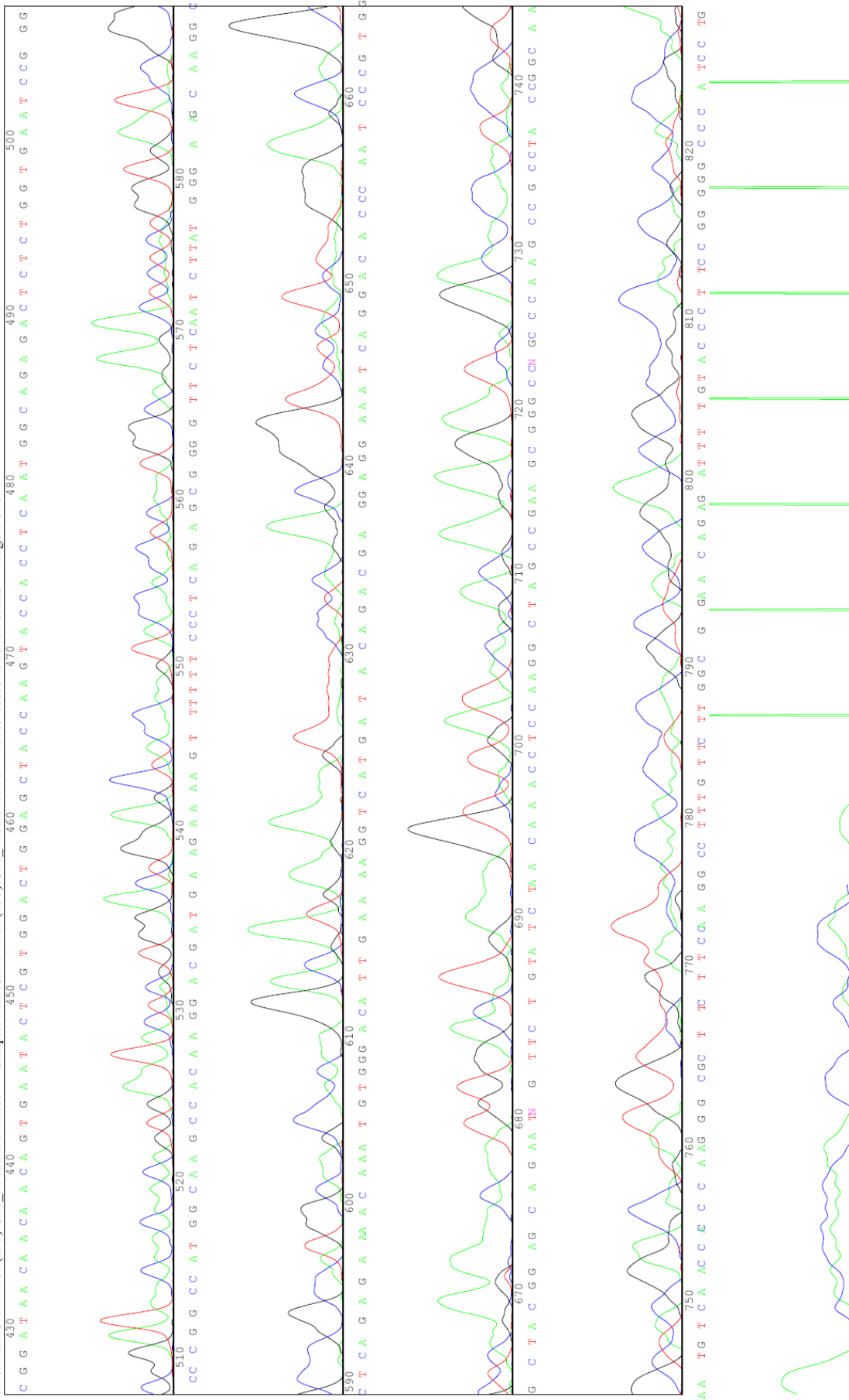
4601	CCCAACTTAA	TCGCCTTGCA	GCACATCCCC	CTTTCGCCAG	CTGGCGTAAT
	GGGTTGAATT	AGCGGAACGT	CGTGTAGGGG	GAAAGCGGTC	GACCGCATTAA
4651	AGCGAAGAGG	CCCGCACC GA	TCGCCCTTCC	CAACAGTTGC	GCAGCCTGAA
	TCGCTTCTCC	GGGCGTGGCT	AGCGGGAAGG	GTTGTCAACG	CGTCGGACTT
4701	TGGCGAATGG	AAATTGTAAG	CGTTAATATT	TTGTTAAAAT	TCGCGTTAAA
	ACCGCTTACC	TTTAACATT C	GCAATTATAA	AACAATTTTA	AGCGCAATTT
4751	TTTTTGTTAA	ATCAGCTCAT	TTTTTTAACC	AATAGGCCGA	AATCGGCAAA
	AAAAACAATT	TAGTCGAGTA	AAAAAATTGG	TTATCCGGCT	TTAGCCGTTT
4801	ATCCCTTATA	AATCAAAAAG	ATAGACCGAG	ATAGGGTTGA	GTGTTGTTC
	TAGGGAATAT	TTAGTTTTCT	TATCTGGCTC	TATCCCAACT	CACAACAAGG
4851	AGTTTGGAAC	AAGAGTCCAC	TATTAAGAAC	GTGGACTCCA	ACGTCAAAGG
	TCAAACCTTG	TTCTCAGGTG	ATAATTCTTG	CACCTGAGGT	TGCAGTTTCC
4901	GCGAAAAACC	GTCTATCAGG	GCGATGGCCC	ACTACGTGAA	CCATCACCCT
	CGCTTTTTGG	CAGATAGTCC	CGCTACCGGG	TGATGCACTT	GGTAGTGGGA
4951	AATCAAGTTT	TTTGGGGTCG	AGGTGCCGTA	AAGCACTAAA	TCGGAACCCT
	TTAGTTCAAA	AAACCCCAGC	TCCACGGCAT	TTCGTGATTT	AGCCTTGGGA
5001	AAAGGGAGCC	CCCATTAG	AGCTTGACGG	GGAAAGCCGG	CGAACGTGGC
	TTCCCTCGG	GGGCTAAATC	TCGAACTGCC	CCTTTCGGCC	GCTTGCACCG
5051	GAGAAAGGAA	GGGAAGAAAG	CGAAAGGAGC	GGGCGCTAGG	GCCTGGCAA
	CTCTTTCCTT	CCCTTCTTTC	GCTTTCCTCG	CCC GCGATCC	CGCGACC GTT
5101	GTGTAGCGGT	CACGCTGCGC	GTAACCACCA	CACCCGCCGC	GCTTAATGCG
	CACATCGCCA	GTGCGACGCG	CATTGGTGGT	GTGGGCGGCG	CGAATTACGC
5151	CCGCTACAGG	GCGCGTCAGG	TGGCACTTTT	CGGGGAAATG	TGCGCGGAAC
	GGCGATGTCC	CGCGCAGTCC	ACCGTGAAAA	GCCCCTTTAC	ACGCGCCTTG
5201	CCCTATTTGT	TTATTTTTCT	AAATACATT C	AAATATGTAT	CCGCTCATGA
	GGGATAAACA	AATAAAAAGA	TTTATGTAAG	TTTATACATA	GGCGAGTACT
5251	GACAATAACC	CTGATAAATG	CTTCAATAAT	ATTGAAAAAG	GAAGAGTATG
	CTGTTATTGG	GACTATTTAC	GAAGTTATTA	TAAC TTTTT C	CTTCTCATA C
5301	AGTATTCAAC	ATTTCCGTGT	CGCCCTTATT	CCCTTTTTTG	CGGCATTTTG
	TCATAAGTTG	TAAAGGCACA	GCGGGAATAA	GGGAAAAAAC	GCCGTAAAAC
5351	CCTTCTGT	TTTGCTCACC	CAGAAACGCT	GGTGAAAGTA	AAAGATGCTG
	GGAAGGACAA	AAACGAGTGG	GTCTTTGCGA	CCACTTTCAT	TTTCTACGAC
5401	AAGATCAGTT	GGGTGCACGA	GTGGGTTACA	TCGAACTGGA	TCTCAACAGC
	TTCTAGTCAA	CCCACGTGCT	CACCCAATGT	AGCTTGACCT	AGAGTTGTCTG
5451	GGTAAGATCC	TTGAGAGTTT	TCGCCCCGAA	GAACGTTTT C	CAATGATGAG
	CCATTCTAGG	AACTCTCAAA	AGCGGGGCTT	CTTGCAAAAAG	GTTACTACTC
5501	CAC TTTTAAA	GTTCTGCTAT	GTGGCGCGGT	ATTATCCCGT	ATTGACGCCG
	GTGAAAATTT	CAAGACGATA	CACCGCGCCA	TAATAGGGCA	TAAC TGC GGC
5551	GGCAAGAGCA	ACTCGGTCGC	CGCATACT	ATTCTCAGAA	TGACTTGGTT
	CCGTTCTCGT	TGAGCCAGCG	GCGTATGTGA	TAAGAGTCTT	ACTGAACCAA
5601	GAGTACTCAC	CAGTCACAGA	AAAGCATCTT	ACGGATGGCA	TGACAGTAAG
	CTCATGAGTG	GTCAGTGTCT	TTTCGTAGAA	TGCCTACCGT	ACTGTCATTC
5651	AGAATTATGC	AGTGCTGCCA	TAACCATGAG	TGATAA CACT	GCGGCCAACT
	TCTTAATACG	TCACGACGGT	ATTGGTACTC	ACTATTGTGA	CGCCGGTTGA
5701	TACTTCTGAC	AACGATCGGA	GGACCGAAGG	AGCTAACCGC	TTTTTTGCAC
	ATGAAGACTG	TTGCTAGCCT	CCTGGCTTCC	TCGATTGGCG	AAAAAACGTG

5751	AACATGGGGG TTGTACCCCC	ATCATGTAAC TAGTACATTG	TCGCCTTGAT AGCGGAACTA	CGTTGGGAAC GCAACCCTTG	CGGAGCTGAA GCCTCGACTT
5801	TGAAGCCATA ACTTCGGTAT	CCAAACGACG GGTTTGCTGC	AGCGTGACAC TCGCACTGTG	CACGATGCCT GTGCTACGGA	GTAGCAATGG CATCGTTACC
5851	CAACAACGTT GTTGTTGCAA	GCGCAAATA CGCGTTTGAT	TAACTGGCG AATTGACCGC	AACTACTTAC TTGATGAATG	TCTAGCTTCC AGATCGAAGG
5901	CGGCAACAAT GCCGTTGTTA	TAATAGACTG ATTATCTGAC	GATGGAGGCG CTACCTCCGC	GATAAAGTTG CTATTTCAAC	CAGGACCACT GTCCTGGTGA
5951	TCTGCGCTCG AGACGCGAGC	GCCCTCCGG CGGGAAGGCC	CTGGCTGGTT GACCGACCAA	TATTGCTGAT ATAACGACTA	AAATCTGGAG TTTAGACCTC
6001	CCGGTGAGCG GGCCACTCGC	TGGGTCTCGC ACCCAGAGCG	GGTATCATTG CCATAGTAAC	CAGCACTGGG GTCGTGACCC	GCCAGATGGT CGGTCTACCA
6051	AAGCCCTCCC TTCGGGAGGG	GTATCGTAGT CATAGCATCA	TATCTACACG ATAGATGTGC	ACGGGGAGTC TGCCCCCAG	AGGCAACTAT TCCGTTGATA
6101	GGATGAACGA CCTACTTGCT	AATAGACAGA TTATCTGTCT	TCGCTGAGAT AGCGACTCTA	AGGTGCCTCA TCCACGGAGT	CTGATTAAGC GACTAATTCC
6151	ATTGGTAACT TAACCATTGA	GTCAGACCAA CAGTCTGGTT	GTTTACTCAT CAAATGAGTA	ATATACTTTA TATATGAAAT	GATTGATTTA CTAACTAAAT
6201	AAACTTCATT TTTGAAGTAA	TTAATTTAA AAATTAAATT	AAGGATCTAG TTCCTAGATC	GTGAAGATCC CACTTCTAGG	TTTTTGATAA AAAACTATT
6251	TCTCATGACC AGAGTACTGG	AAAATCCCTT TTTTAGGGAA	AACGTGAGTT TTGCACTCAA	TTCGTTCCAC AAGCAAGGTG	TGAGCGTCAG ACTCGCAGTC
6301	ACCCCGTAGA TGGGGCATCT	AAAGATCAAA TTTCTAGTTT	GGATCTTCTT CCTAGAAGAA	GAGATCCTTT CTCTAGGAAA	TTTTCTGCGC AAAAGACGCG
6351	GTAATCTGCT CATTAGACGA	GCTTGCAAAC CGAACGTTTG	AAAAAAACCA TTTTTTTGGT	CCGCTACCAG GGCGATGGTC	CGGTGGTTTG GCCACCAAAC
6401	TTTGCCGGAT AAACGGCCTA	CAAGAGCTAC GTTCTCGATG	CAACTCTTTT GTTGAGAAAA	TCCGAAGGTA AGGCTTCCAT	ACTGGCTTCA TGACCGAAGT
6451	GCAGAGCGCA CGTCTCGCGT	GATACCAAAT CTATGGTTTA	ACTGTTCTTC TGACAAGAAG	TAGTGTAGCC ATCACATCGG	GTAGTTAGGC CATCAATCCG
6501	CACCACTTCA GTGGTGAAGT	AGAACTCTGT TCTTGAGACA	AGCACCGCCT TCGTGGCGGA	ACATACCTCG TGTATGGAGC	CTCTGCTAAT GAGACGATTA
6551	CCTGTTACCA GGACAATGGT	GTGGCTGCTG CACCGACGAC	CCAGTGGCGA GGTCACCGCT	TAAGTCGTGT ATTCAGCACA	CTTACCGGGT GAATGGCCCA
6601	TGGACTCAAG ACCTGAGTTC	ACGATAGTTA TGCTATCAAT	CCGGATAAGG GGCCTATTCC	CGCAGCGGTC GCGTCGCCAG	GGGCTGAACG CCCGACTTGC
6651	GGGGGTTCGT CCCCAAGCA	GCACACAGCC CGTGTGTCCG	CAGCTTGGAG GTCGAACCTC	CGAACGACCT GCTTGCTGGA	ACACCGAACT TGTGGCTTGA
6701	GAGATACCTA CTCTATGGAT	CAGCGTGAGC GTCGCACTCG	TATGAGAAAG ATACTCTTTC	CGCCACGCTT GCGGTGCGAA	CCCGAAGGGA GGGCTTCCCT
6751	GAAAGGCGGA CTTTCCGCCT	CAGGTATCCG GTCCATAGGC	GTAAGCGGCA CATTCGCCGT	GGGTCGGAAC CCCAGCCTTG	AGGAGAGCGC TCCTCTCGCG
6801	ACGAGGGAGC TGCTCCCTCG	TTCCAGGGGG AAGGTCCCCC	AAACGCCTGG TTTGCGGACC	TATCTTTATA ATAGAAATAT	GTCCTGTCCG CAGGACAGCC
6851	GTTTCGCCAC CAAAGCGGTG	CTCTGACTTG GAGACTGAAC	AGCGTCGATT TCGCAGCTAA	TTTGTGATGC AAACACTACG	TCGTCAGGGG AGCAGTCCCC

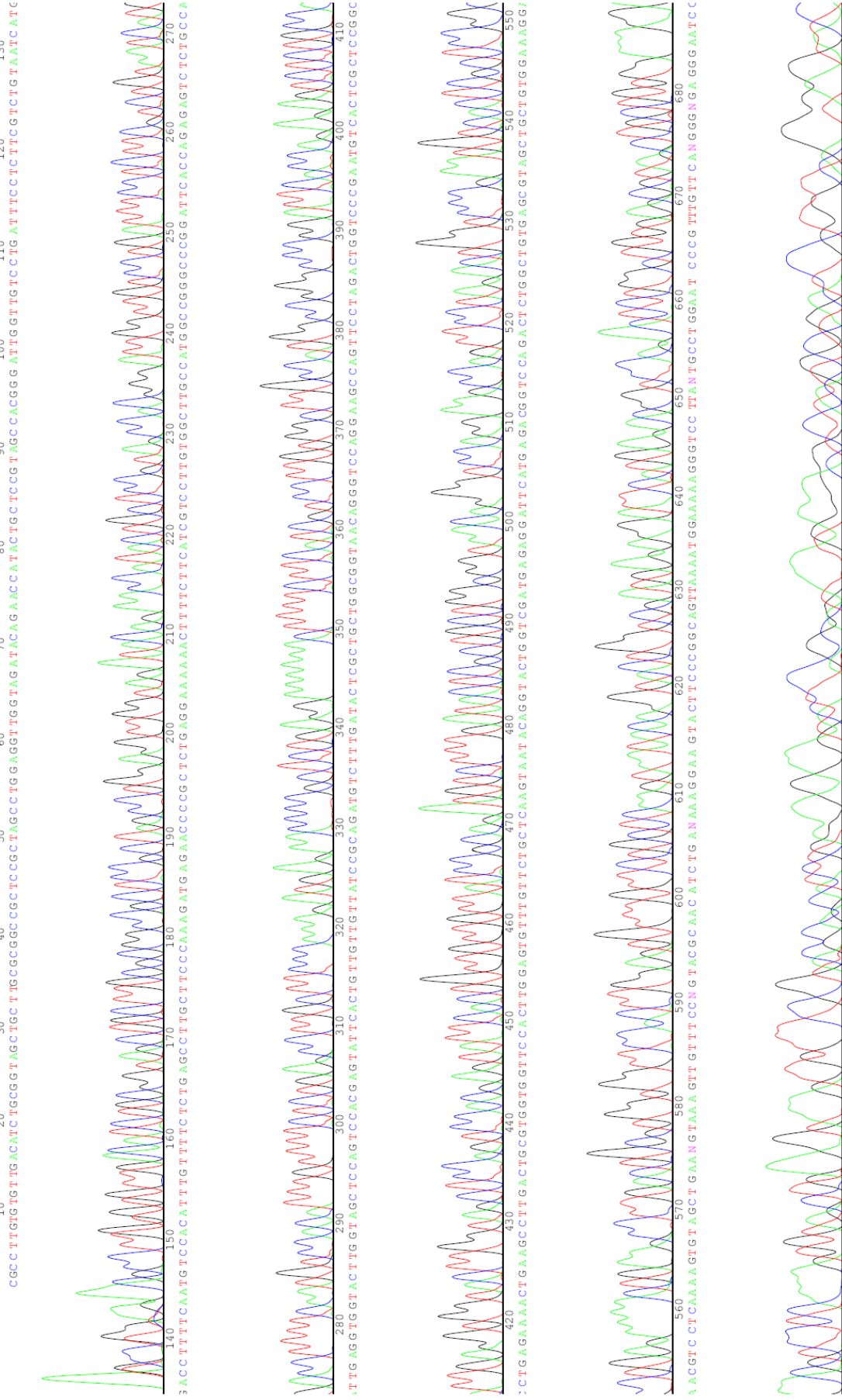
6901	GGCGGAGCCT	ATGGAAAAAC	GCCAGCAACG	CGGCCTTTTT	ACGGTTCCTG
	CCGCCTCGGA	TACCTTTTTG	CGGTCGTTGC	GCCGGAAAAA	TGCCAAGGAC
6951	GCCTTTTGCT	GGCCTTTTGC	TCACATGTTT	TTTCCTGCGT	TATCCCCTGA
	CGGAAAACGA	CCGGAAAACG	AGTGTACAAG	AAAGGACGCA	ATAGGGGACT
7001	TTCTGTGGAT	AACCGTATTA	CCGCCTTTGA	GTGAGCTGAT	ACCGCTCGCC
	AAGACACCTA	TTGGCATAAT	GGCGGAAACT	CACTCGACTA	TGGCGAGCGG
7051	GCAGCCGAAC	GACCGAGCGC	AGCGAGTCAG	TGAGCGAGGA	AGCGGAAGAG
	CGTCGGCTTG	CTGGCTCGCG	TCGCTCAGTC	ACTCGCTCCT	TCGCCTTCTC
7101	CGCCCAATAC	GCAAACCGCC	TCTCCCCGCG	CGTTGGCCGA	TTCATTAATG
	GCGGGTTATG	CGTTTGGCGG	AGAGGGGCGC	GCAACCGGCT	AAGTAATTAC
7151	CAGCTGGCAC	GACAGGTTTC	CCGACTGGAA	AGCGGGCAGT	GAGCGCAACG
	GTCGACCGTG	CTGTCCAAAG	GGCTGACCTT	TCGCCCGTCA	CTCGCGTTGC
7201	CAATTAATGT	GAGTTAGCTC	ACTCATTAGG	CACCCCAGGC	TTTACACTTT
	GTTAATTACA	CTCAATCGAG	TGAGTAATCC	GTGGGGTCCG	AAATGTGAAA
7251	ATGCTTCCGG	CTCGTATGTT	GTGTGGAATT	GTGAGCGGAT	AACAATTTCA
	TACGAAGGCC	GAGCATACAA	CACACCTTAA	CACTCGCCTA	TTGTTAAAGT
7301	CACAGGAAAC	AGCTATGACC	ATGATTACGC	CAA	
	GTGTCCTTTG	TCGATACTGG	TACTAATGCG	GTT	







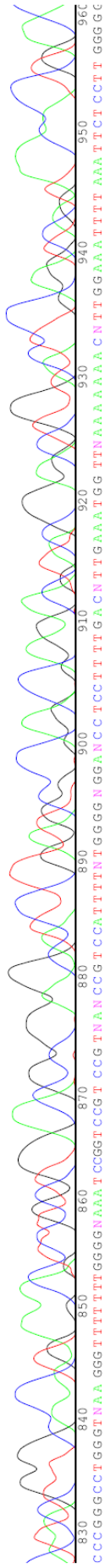
File: 10.M2RCA-PVP3R(295) Run Ended: Feb 23, 2006, 0:27:55 Signal G:872 A:488 T:546 C:819 Comment:  
 Sample: M2RCA-PVP3R(295) Lane: 10 Base spacing 10.12 1001 bases in 12703 scans Page 1 of 2

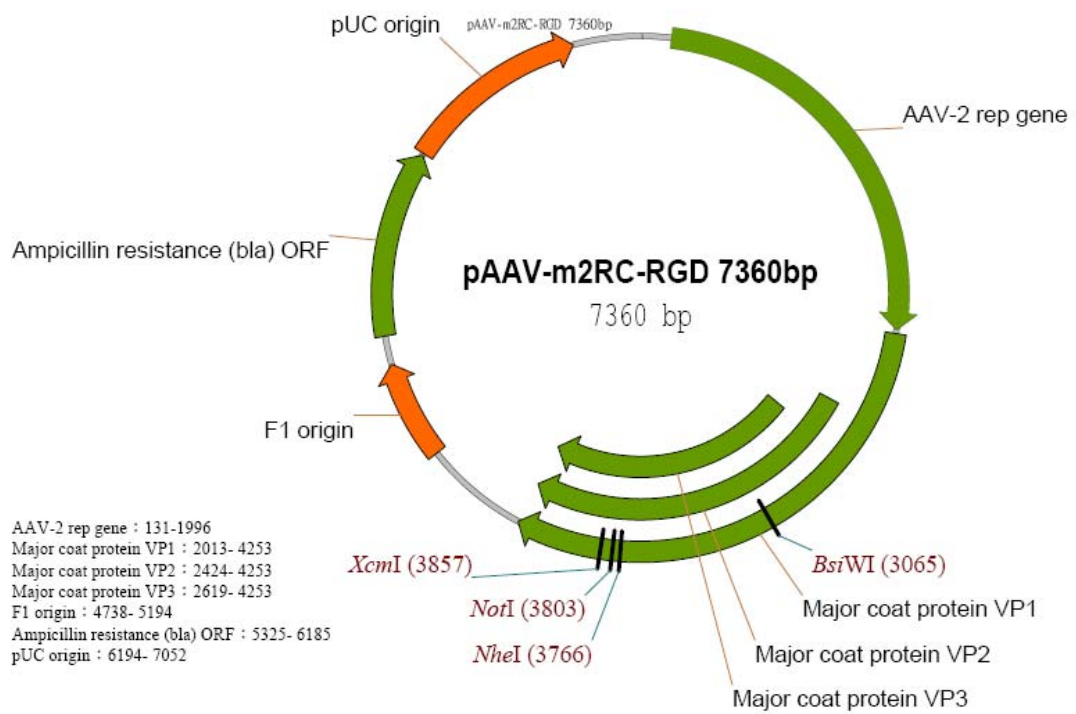




File: 10.M2RCA-PVP3R(295) Run Ended: Feb 23, 2006, 0:27:55 Signal G:872 A:488 T:546 C:819 Comment:  
 Sample: M2RCA-PVP3R(295) Lane: 10 Base spacing 10.12 1001 bases in 12703 scans Page 2 of 2

690 : A T A C T G G N G G C A C C C A T T G N A A A A A C C T C C T T G C T G G G G N A A C G G C N G G G A N G G G C A T C C C T T G A A T G C C C C C C C N A A A G C C C C A A G G A A C G T T A C N G G G A A C C T G G G T A C T T C C C A A G T C C C A A G T A A A A C A N C C C T T G A A N I  
 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820





附錄二，質體 pAAV-m2RC-RGD 序列與定序資料



1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGGA
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCTT	CTAGTCTTCA	AGGATAAGGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTCTCTG
	ACACTAATTC	CAGGGGTCGC	TGGAAGTCTG	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAGTGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTCGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCTCAA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACC GGCT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTTCTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGGAAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCCTGC
451	TTTCTGAGT	CAGATTGCGG	AAAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGTTTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTACTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGTTCCA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GGCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTCGGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGCACAG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAAAT	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATA	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCCGACTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCCGTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CGTCTTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TGGTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCACGCA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TTACTCTTGA	TTCCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCAGCA	GGAGTCGGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTTACG
1351	CTCGGCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCCTGAT GAGGGCACTA	CGTCACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGGC
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCTTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTT TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GTTTGGAGTG CCAACCTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGGTGGA TTTCCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTCAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTTGC
1651	GGTGCGCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTCGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTCCCTG ACAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACCTCAG AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTCTGTC AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCACTGCCTG CGTGACGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATACCGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTCAACCAC	GAAGCTCAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCCAC GGACCGGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTCTGTC	GGGTCTTGTG CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CCGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTTCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTCTGA	CGACAGCGGA GCTGTGCTCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTGGCG

2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTCCGCCCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCCATT	TTCCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGT	TTCCAGCCA AAAGTCGGT
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTCG	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTG GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTTCT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTCCGAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAAT GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTCATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTTGCC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCCCT ATGAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACTTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTCGTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TTACTTGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCAC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTCCG	TTCAGTTTTC AAGTCAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGCTCACTGT	TTCGGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCCTG ACCGAAGGAC

3451	GACCCTGTTA CTGGGACAAT	CCGCCAGCAG GGCGGTCTGC	CGAGTATCAA GCTCATAGTT	AGACATCTGC TCTGTAGACG	GGATAACAAC CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT TTGTCACTTA	ACTCGTGGAC TGAGCACCTG	TGGAGCTACC ACCTCGATGG	AAGTACCACC TTCATGGTGG	TCAATGGCAG AGTTACCCTC
3551	AGACTCTCTG TCTGAGAGAC	GTGAATCCGG CACTTAGGCC	GCCCGGCCAT CGGGCCGGTA	GGCAAGCCAC CCGTTCCGGT	AAGGACGATG TTCCTGCTAC
3601	AAGAAAAGTT TTCTTTTCAA	TTTTCCTCAG AAAAGGAGTC	AGCGGGGTTT TCGCCCAAG	TCATCTTTGG AGTAGAAACC	GAAGCAAGGC CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA AGTCTCTTTT	CAAATGTGGA GTTTACACCT	CATTGAAAAG GTAACCTTTT	GTCATGATTA CAGTACTAAT	CAGACGAAGA GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG CCTTTAGTCC	ACAACCAATC TGTGGTGTAG	CCGTGGCTAC GGCACCGATG	GGAGCAGTAT CCTCGTCATA	GGTTCTGTAT CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT GATGGTTGGA	CCAGGCTAGC GGTCCGATCG	ACTTTTGCCC TGAAAACGGG	TCCGCGGTGA AGGCGCCACT	TAATCCACAA ATTAGGTGTT
3801	GCGGCCGCGC CGCCGGCGCG	AAGCAGCTAC TTCGTGATG	CGCAGATGTC GCGTCTACAG	AACACACAAG TTGTGTGTTT	GCGTCTTCC CGCAAGAAGG
3851	AGGCATGGTC TCCGTACCAG	TGGCAGGACA ACCGTCCTGT	GAGATGTGTA CTCTACACAT	CCTTCAGGGG GGAAGTCCCC	CCCATCTGGG GGGTAGACCC
3901	CAAAGATTCC GTTTCTAAGG	ACACACGGAC TGTGTGCCTG	GGACATTTTC CCTGTAAAAG	ACCCCTCTCC TGGGGAGAGG	CCTCATGGGT GGAGTACCCA
3951	GGATTCCGAC CCTAAGCCTG	TTAAACACCC AATTTGTGGG	TCCTCCACAG AGGAGGTGTC	ATTCTCATCA TAAGAGTAGT	AGAACACCCC TCTTGTGGGG
4001	GGTACCTGCG CCATGGACGC	AATCCTTCGA TTAGGAAGCT	CCACCTTCAG GGTGAAGTC	TGCGGCAAAG ACGCCGTTTC	TTGCTTCTCT AAACGAAGGA
4051	TCATCACACA AGTAGTGTGT	GTACTIONCAG CATGAGGTGC	GGACAGGTCA CCTGTCCAGT	GCGTGGAGAT CGCACCTCTA	CGAGTGGGAG GCTCACCCCTC
4101	CTGCAGAAGG GACGTCTTCC	AAAACAGCAA TTTTGTGCTT	ACGCTGGAAT TGCGACCTTA	CCCGAAATTC GGGCTTTAAG	AGTACACTTC TCATGTGAAG
4151	CAACTACAAC GTTGATGTTG	AAGTCTGTTA TTCAGACAAT	ATGTGGACTT TACACCTGAA	TACTGTGGAC ATGACACCTG	ACTAATGGCG TGATTACCGC
4201	TGTATTCAGA ACATAAGTCT	GCCTCGCCCC CGGAGCGGGG	ATTGGCACCA TAACCGTGGT	GATACCTGAC CTATGGACTG	TCGTAATCTG AGCATTAGAC
4251	TAATTGCTTG ATTAACGAAC	TTAATCAATA AATTAGTTAT	AACCGTTTAA TTGGCAAATT	TTCGTTTCAG AAGCAAAGTC	TTGAACTTTG AACTTGAAAC
4301	GTCTCTGCGT CAGAGACGCA	ATTTCTTTCT TAAAGAAAGA	TATCTAGTTT ATAGATCAAA	CCATGGCTAC GGTACCGATG	GTAGATAAGT CATCTATTCA
4351	AGCATGGCGG TCGTACCGCC	GTTAATCATT CAATTAGTAA	AACTACAGCC TTGATGTCGG	CGGGCGTTTA GCCCGCAAAT	AACAGCGGGC TTGTGCCCCG
4401	GGAGGGGTGG CCTCCCCACC	AGTCGTGACG TCAGCACTGC	TGAATTACGT ACTTAATGCA	CATAGGGTTA GTATCCCAAT	GGGAGGTCTT CCCTCCAGGA
4451	GTATTAGAGG CATAATCTCC	TCACGTGAGT AGTGCCTCA	GTTTTGCGAC CAAAACGCTG	ATTTTGGCGAC TAAAACGCTG	ACCATGTGGT TGGTACACCA
4501	CTCGCTGGGG GAGCGACCCC	GGGGGGGCC CCCCCGGG	GAGTGAGCAC CTCACTCGTG	GCAGGGTCTC CGTCCCAGAG	CATTTTGAAG GTAAAACCTC
4551	CGGGAGGTTT GCCCTCCAAA	GAACGAGCGC CTTGCTCGCG	TGGCGCGCTC ACCGCGCGAG	ACTGGCCGTC TGACCGGCAG	GTTTTACAAC CAAAATGTTG

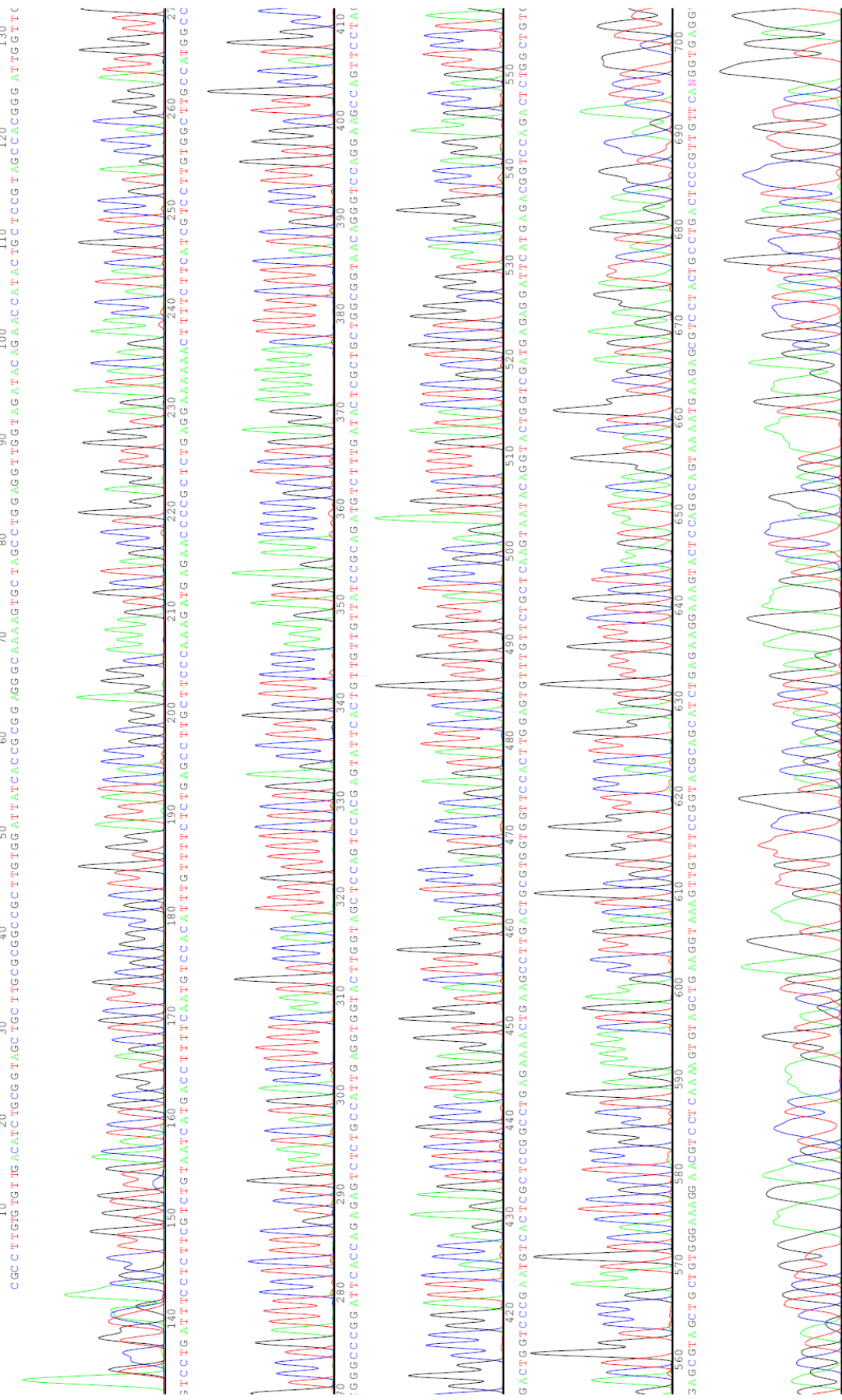
4601	GTCGTGACTG CAGCACTGAC	GGAAAACCCT CCTTTTGGGA	GGCGTTACCC CCGCAATGGG	AACTTAATCG TTGAATTAGC	CCTTGCAGCA GGAACGTCGT
4651	CATCCCCCTT GTAGGGGGAA	TCGCCAGCTG AGCGGTCCGAC	GCGTAATAGC CGCATTATCG	GAAGAGGCC CTTCTCCGGG	GCACCGATCG CGTGGCTAGC
4701	CCCTTCCCAA GGGAAGGGTT	CAGTTGCGCA GTCAACGCGT	GCCTGAATGG CGGACTTACC	CGAATGGAAA GCTTACCTTT	TTGTAAGCGT AACATTCCGA
4751	TAATATTTTG ATTATAAAAC	TTAAAATTCG AATTTTAAGC	CGTTAAATTT GCAATTTAAA	TTGTTAAATC AACAATTTAG	AGCTCATTTT TCGAGTAAAA
4801	TTTAACCAAT AAATTGGTTA	AGGCCGAAAT TCCGGCTTTA	CGGCAAAATC GCCGTTTTAG	CCTTATAAAT GGAATATTTA	CAAAGAATA GTTTTCTTAT
4851	GACCGAGATA CTGGCTCTAT	GGGTTGAGTG CCCAACTCAC	TTGTTCCAGT AACAAGGTCA	TTGGAACAAG AACCTTGTTT	AGTCCACTAT TCAGGTGATA
4901	TAAGAACGTG ATTCTTGAC	GACTCCAACG CTGAGGTTGC	TCAAAGGGCG AGTTTCCCGC	AAAAACCGTC TTTTTGGCAG	TATCAGGGCG ATAGTCCCGC
4951	ATGGCCCACT TACCGGGTGA	ACGTGAACCA TGCACCTGGT	TCACCCTAAT AGTGGGATTA	CAAGTTTTTT GTTCAAAAAA	GGGGTCGAGG CCCCAGCTCC
5001	TGCCGTAAAG ACGGCATTTT	CACTAAATCG GTGATTTAGC	GAACCCTAAA CTTGGGATTT	GGGAGCCCCC CCCTCGGGGG	GATTTAGAGC CTAAATCTCG
5051	TTGACGGGGA AACTGCCCTT	AAGCCGGCGA TTCGGCCGCT	ACGTGGCGAG TGCACCGCTC	AAAGGAAGGG TTTTCTTCCC	AAGAAAGCGA TTCTTTTCGT
5101	AAGGAGCGGG TTCTCGCCC	CGCTAGGGCG GCGATCCCGC	CTGGCAAGTG GACCGTTCAC	TAGCGGTCAC ATCGCCAGTG	GCTGCGCGTA CGACGCGCAT
5151	ACCACCACAC TGGTGGTGTG	CGCCCGCGCT GGCGGCGCGA	TAATGCGCCG ATTACGCGGC	CTACAGGGCG GATGTCCCGC	CGTCAGGTGG GCAGTCCACC
5201	CACTTTTTCG GTGAAAAGCC	GGAAATGTGC CCTTTACACG	GCGGAACCCC CGCCTTGGGG	TATTTGTTTA ATAAACAAAT	TTTTTCTAAA AAAAAGATTT
5251	TACATTCAAA ATGTAAGTTT	TATGTATCCG ATACATAGGC	CTCATGAGAC GAGTACTCTG	AATAACCCTG TTATTGGGAC	ATAAATGCTT TATTTACGAA
5301	CAATAATATT GTTATTATAA	GAAAAAGGAA CTTTTTCTTT	GAGTATGAGT CTCATACTCA	ATTCAACATT TAAGTTGTAA	TCCGTGTCCG AGGCACAGCG
5351	CCTTATTCCC GGAATAAGGG	TTTTTTGCGG AAAAAACGCC	CATTTTGCCT GTAAAACGGA	TCCTGTTTTT AGGACAAAAA	GCTCACCCAG CGAGTGGGTC
5401	AAACGCTGGT TTTGCACCA	GAAAGTAAAA CTTTCATTTT	GATGCTGAAG CTACGACTTC	ATCAGTTGGG TAGTCAACCC	TGCACGAGTG ACGTGCTCAC
5451	GGTTACATCG CCAATGTAGC	AACTGGATCT TTGACCTAGA	CAACAGCGGT GTTGTGCCA	AAGATCCTTG TTCTAGGAAC	AGAGTTTTTCG TCTCAAAAGC
5501	CCCCGAAGAA GGGGCTTCTT	CGTTTTCCAA GCAAAAGGTT	TGATGAGCAC ACTACTCGTG	TTTTAAAGTT AAAATTTCAA	CTGCTATGTG GACGATACAC
5551	GCGCGGTATT CGCGCCATAA	ATCCCGTATT TAGGGCATAA	GACGCCGGGC CTGCGGCCCG	AAGAGCAACT TTCTCGTTGA	CGGTGCGCGC GCCAGCGGCG
5601	ATACACTATT TATGTGATAA	CTCAGAATGA GAGTCTTACT	CTTGGTTGAG GAACCAACTC	TACTCACCAG ATGAGTGGTC	TCACAGAAAA AGTGTCTTTT
5651	GCATCTTACG CGTAGAATGC	GATGGCATGA CTACCGTACT	CAGTAAGAGA GTCATTCTCT	ATTATGCAGT TAATACGTCA	GCTGCCATAA CGACGGTATT
5701	CCATGAGTGA GGTACTCACT	TAACACTGCG ATTGTGACGC	GCCAACTTAC CGGTTGAATG	TTCTGACAAC AAGACTGTTG	GATCGGAGGA CTAGCCTCTT

5751	CCGAAGGAGC GGCTTCCTCG	TAACCGCTTT ATTGGCGAAA	TTGCACAAC AAACGTGTTG	ATGGGGGATC TACCCCTAG	ATGTAACTCG TACATTGAGC
5801	CCTTGATCGT GGAAC TAGCA	TGGGAACCGG ACCCTTGGCC	AGCTGAATGA TCGACTTACT	AGCCATACCA TCGGTATGGT	AACGACGAGC TTGCTGCTCG
5851	GTGACACCAC CACTGTGGTG	GATGCCTGTA CTACGGACAT	GCAATGGCAA CGTTACC GTT	CAACGTTGCG GTTGCAACGC	CAAAC TATTA GTTTGATAAT
5901	ACTGGCGAAC TGACCGCTTG	TACTTACTCT ATGAATGAGA	AGCTTCCCGG TCGAAGGGCC	CAACAATTAA GTTGTTAATT	TAGACTGGAT ATCTGACCTA
5951	GGAGGCGGAT CCTCCGCC TA	AAAGTTGCAG TTTCAACGTC	GACCACTTCT CTGGTGAAGA	GCGCTCGGCC CGCGAGCCGG	CTTCCGGCTG GAAGGCCGAC
6001	GCTGGTTTAT CGACCAAATA	TGCTGATAAA ACGACTATTT	TCTGGAGCCG AGACCTCGGC	GTGAGCGTGG CACTCGCACC	GTCTCGCGGT CAGAGCGCCA
6051	ATCATTGCAG TAGTAACGTC	CACTGGGGCC GTGACCCCGG	AGATGGTAAG TCTACCATT C	CCCTCCCGTA GGGAGGGCAT	TCGTAGTTAT AGCATCAATA
6101	CTACACGACG GATGTGCTGC	GGGAGTCAGG CCCTCAGTCC	CAACTATGGA GTTGATACCT	TGAACGAAAT ACTTGCTTTA	AGACAGATCG TCTGTCTAGC
6151	CTGAGATAGG GACTCTATCC	TGCCTCACTG ACGGAGTGAC	ATTAAGCATT TAATTCGTAA	GGTAACTGTC CCATTGACAG	AGACCAAAGTT TCTGGTTCAA
6201	TACTCATATA ATGAGTATAT	TACTTTAGAT ATGAAATCTA	TGATTTAAAA ACTAAATTTT	CTTCATTTTT GAAGTAAAAA	AATTTAAAAG TTAAATTTTC
6251	GATCTAGGTG CTAGATCCAC	AAGATCCTTT TTCTAGGAAA	TTGATAATCT AACTATTAGA	CATGACCAAA GTACTGGTTT	ATCCCTTAAC TAGGGAATTG
6301	GTGAGTTTT C CACTCAAAA G	GTTCCACTGA CAAGGTGACT	GCGTCAGACC CGCAGTCTGG	CCGTAGAAAA GGCATCTTTT	GATCAAAAGGA CTAGTTTCTC
6351	TCTTCTTGAG AGAAGA ACTC	ATCCTTTTTT TAGGAAAAAA	TCTGCGCGTA AGACGCGCAT	ATCTGCTGCT TAGACGACGA	TGCAAACAAA ACGTTTGTTT
6401	AAAACCACCG TTTTGGTGGC	CTACCAGCGG GATGGTCGCC	TGGTTTGTTT ACCAAACAAA	GCCGGATCAA CGGCCTAGTT	GAGCTACCAA CTCGATGGTT
6451	CTCTTTTTTC GAGAAAAAGG	GAAGGTA ACT CTTCCATTGA	GGCTTCAGCA CCGAAGTCGT	GAGCGCAGAT CTCGCGTCTA	ACCAAATACT TGGTTTATGA
6501	GTTCTTCTAG CAAGAAGATC	TGTAGCCGTA ACATCGGCAT	GTTAGGCCAC CAATCCGGTG	CACTTCAAGA GTGAAGTTCT	ACTCTGTAGC TGAGACATCG
6551	ACCGCCTACA TGGCGGATGT	TACCTCGCTC ATGGAGCGAG	TGCTAATCCT ACGATTAGGA	GTTACCAGTG CAATGGTCAC	GCTGCTGCCA CGACGACGGT
6601	GTGGCGATAA CACCGCTATT	GTCGTGTCTT CAGCACAGAA	ACCGGGTTGG TGGCCCAACC	ACTCAAGACG TGAGTTCTGC	ATAGTTACCG TATCAATGGC
6651	GATAAGGCGC CTATTCCGCG	AGCGGTCGGG TCGCCAGCCC	CTGAACGGGG GACTTGCCCC	GGTTCGTGCA CCAAGCACGT	CACAGCCCAG GTGTCGGGTC
6701	CTTGGAGCGA GAACCTCGCT	ACGACCTACA TGCTGGATGT	CCGAACTGAG GGCTTGACTC	ATACCTACAG TATGGATGTC	CGTGAGCTAT GCACTCGATA
6751	GAGAAAGCGC CTCTTTCGCG	CACGCTTCCC GTGCGAAGGG	GAAGGGAGAA CTTCCCTCTT	AGGCGGACAG TCCGCCTGTC	GTATCCGGTA CATAGGCCAT
6801	AGCGGCAGGG TCGCCGTCCC	TCGGAACAGG AGCCTTG TCC	AGAGCGCACG TCTCGCGTGC	AGGGAGCTTC TCCCTCGAAG	CAGGGGGAAA GTCCCCCTTT
6851	CGCCTGGTAT GCGGACCATA	CTTTATAGTC GAAATATCAG	CTGTGCGGTT GACAGCCCAA	TCGCCACCTC AGCGGTGGAG	TGACTTGAGC ACTGAACTCG

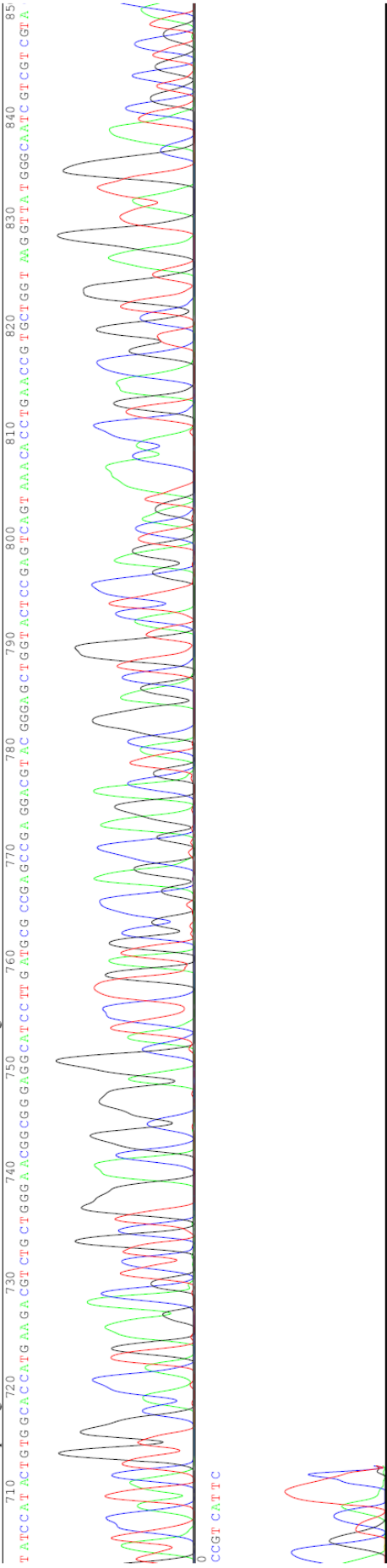


6901	GTCGATTTTT	GTGATGCTCG	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	GAAAAACGCC
	CAGCTAAAAA	CACTACGAGC	AGTCCCCCGG	CCTCGGATAC	CTTTTTGCGG
6951	AGCAACGCGG	CCTTTTTACG	GTTCTGGCC	TTTTGCTGGC	CTTTTGCTCA
	TCGTTGCGCC	GGAAAAATGC	CAAGGACCGG	AAAACGACCG	GAAAAACGAGT
7001	CATGTTCTTT	CCTGCGTTAT	CCCCTGATTC	TGTGGATAAC	CGTATTACCG
	GTACAAGAAA	GGACGCAATA	GGGGACTAAG	ACACCTATTG	GCATAATGGC
7051	CCTTTGAGTG	AGCTGATACC	GCTCGCCGCA	GCCGAACGAC	CGAGCGCAGC
	GGAAACTCAC	TCGACTATGG	CGAGCGGCGT	CGGCTTGCTG	GCTCGCGTCG
7101	GAGTCAGTGA	GCGAGGAAGC	GGAAGAGCGC	CCAATACGCA	AACCGCCTCT
	CTCAGTCACT	CGTCCTTCG	CCTTCTCGCG	GGTTATGCGT	TTGGCGGAGA
7151	CCCCGCGCGT	TGGCCGATTC	ATTAATGCAG	CTGGCACGAC	AGGTTTCCCG
	GGGGCGCGCA	ACCGGCTAAG	TAATTACGTC	GACCGTGCTG	TCCAAAGGGC
7201	ACTGGAAAAGC	GGGCAGTGAG	CGCAACGCAA	TTAATGTGAG	TTAGCTCACT
	TGACCTTTTCG	CCCCTCACTC	GCGTTGCGTT	AATTACACTC	AATCGAGTGA
7251	CATTAGGCAC	CCCAGGCTTT	ACACTTTATG	CTTCCGGCTC	GTATGTTGTG
	GTAATCCGTG	GGGTCCGAAA	TGTGAAATAC	GAAGGCCGAG	CATACAACAC
7301	TGGAATTGTG	AGCGGATAAC	AATTTACAC	AGGAAACAGC	TATGACCATG
	ACCTTAACAC	TCGCCTATTG	TTAAAGTGTG	TCCTTTGTCG	ATACTGGTAC
7351	ATTACGCCAA				
	TAATGCGGTT				



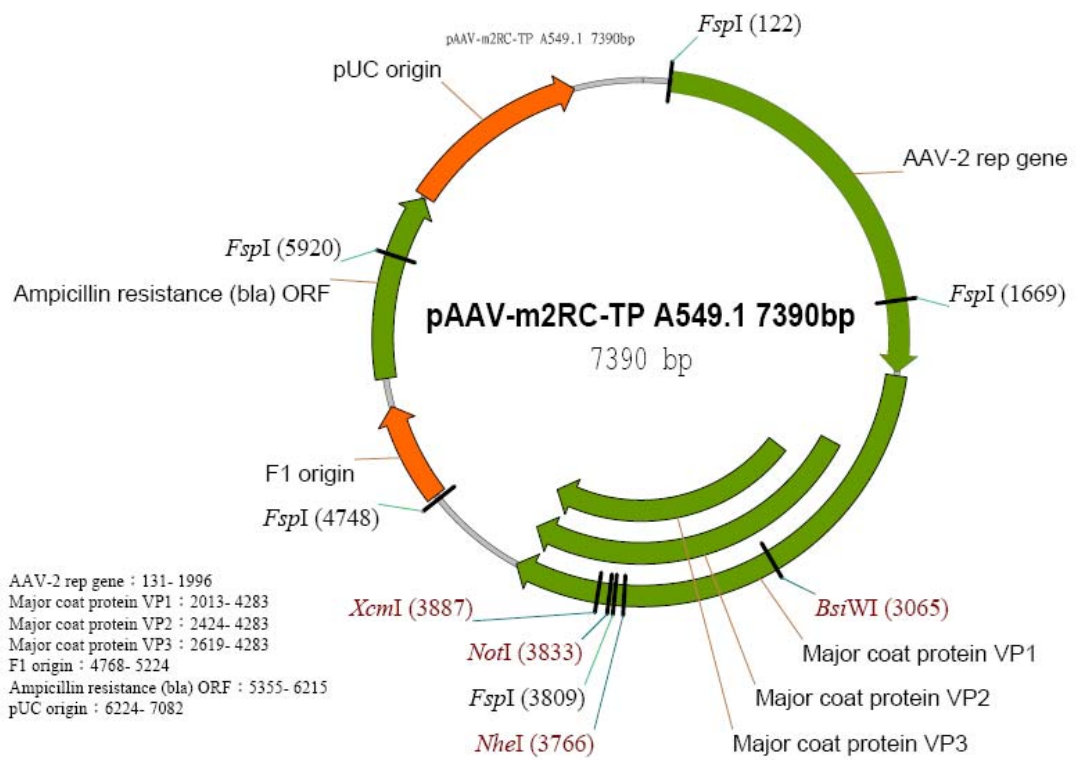


File: 18.M3RC1-PVP3R(464).scf Run Ended: Mar 14, 2006, 0:27:18 Signal A:152 C:245 G:352 T:152 Sample: M3RC1-PVP3R(464)  
 Lane: 18 Base spacing 9.72 858 bases in 10508 scans Page 2 of 2



質體 pAAV-m2RC-RGD R端定序資料 頁二





附錄三，質體 pAAV-m2RC-TP. A549 序列與定序資料



1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGGA
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCTT	CTAGTCTTCA	AGGATAAAGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTCTCTG
	ACACTAATTC	CAGGGGTGCG	TGGAAC TGCT	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAC TGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTCGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCTCAA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACC GGCT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCCCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTCTTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGGAAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCCTGC
451	TTTCCTGAGT	CAGATTCGCG	AAAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTGACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGT TTTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTACTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGT TCCA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GGCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTGCGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGACACAG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAA ACT	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATA C	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCCGACTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCC GTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CCGTCTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TGGTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCCACGCA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TTACTCTTGA	TCCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCCAGCA	GGAGTCGGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTTACG
1351	CTCGGCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCCTGAT GAGGGCACTA	CGTCACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGGC
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCTTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTTC TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GGTTGAGGTG CCAACTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGGTGGGA TTCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTGC
1651	GGTGC GCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTCGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTCCCTG ACAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACTCAGC AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTGCTCA AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCACTGCCTG CGTGACGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATACCGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTACCAC	GAAGCTCAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCCAC GGACCGGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTGCTC	GGGTCTTGTG CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CCGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTTCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTGCA	CGACAGCGGA GCTGTGCGCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTGGCG

2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTTCCGCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCATT	TTCCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGTTT	TTCCAGCCA AAAGGTCGST
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTCTG	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTG GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTTCT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTTCGAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAAT GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTCATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTGTC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCTTT ATGAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACTTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTCGTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TTACTTGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCAC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTTCCG	TTCAGTTTTC AAGTCAAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGCTCACTGT	TTCGGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCTG ACCGAAGGAC

3451	GACCCTGTTA CTGGGACAAT	CCGCCAGCAG GGCGGTGTC	CGAGTATCAA GCTCATAGTT	AGACATCTGC TCTGTAGACG	GGATAACAAC CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT TTGTCACTTA	ACTCGTGGAC TGAGCACCTG	TGGAGCTACC ACCTCGATGG	AAGTACCACC TTCATGGTGG	TCAATGGCAG AGTTACCGTC
3551	AGACTCTCTG TCTGAGAGAC	GTGAATCCGG CACTTAGGCC	GCCCGGCCAT CGGGCCGGTA	GGCAAGCCAC CCGTTCGGTG	AAGGACGATG TTCCTGCTAC
3601	AAGAAAAGTT TTCTTTTCAA	TTTTCTCAG AAAAGGAGTC	AGCGGGGTTT TCGCCCAAG	TCATCTTTGG AGTAGAAACC	GAAGCAAGGC CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA AGTCTCTTTT	CAAATGTGGA GTTTACACCT	CATTGAAAA GTAACCTTTT	GTCATGATTA CAGTACTAAT	CAGACGAAGA GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG CCTTTAGTCC	ACAACCAATC TGTTGGTTAG	CCGTGGCTAC GGCACCAGATG	GGAGCAGTAT CCTCGTCATA	GGTTCGTGAT CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT GATGGTTGGA	CCAGGCTAGC GGTCCGATCG	ATGACCGTGT TACTGGCACA	GCAACGCGAG CGTTGCGCTC	CCAGCGCCAG GGTCGCGGTC
3801	GCGCATGCGC CGCGTACGCG	AGGCGACCGC TCCGCTGGCG	GGTGAGCCTG CCACTCGGAC	GCGGCCGCGC CGCCGGCGCG	AAGCAGCTAC TTCGTCGATG
3851	CGCAGATGTC GCGTCTACAG	AACACACAAG TTGTGTGTTT	GCGTCTTCC CGCAAGAAGG	AGGCATGGTC TCCGTACCAG	TGGCAGGACA ACCGTCTGT
3901	GAGATGTGTA CTCTACACAT	CCTTCAGGGG GGAAGTCCCC	CCCATCTGGG GGGTAGACCC	CAAAGATTCC GTTTCTAAGG	ACACACGGAC TGTGTGCCTG
3951	GGACATTTTC CCTGTAAAAG	ACCCCTCTCC TGGGGAGAGG	CCTCATGGGT GGAGTACCCA	GGATTCCGAC CCTAAGCCTG	TAAACACCC AATTTGTGGG
4001	TCCTCCACAG AGGAGGTGTC	ATTCTCATCA TAAGAGTAGT	AGAACACCCC TCTTGTGGGG	GGTACCTGCG CCATGGACGC	AATCCTTCGA TTAGGAAGCT
4051	CCACCTTCAG GGTGGAAAGTC	TGCGGCAAAG ACGCCGTTTC	TTTGCTTCTT AAACGAAGGA	TCATCACACA AGTAGTGTGT	GTAATCCACG CATGAGGTGC
4101	GGACAGGTCA CCTGTCCAGT	GCGTGGAGAT CGCACCTCTA	CGAGTGGGAG GCTCACCCCTC	CTGCAGAAGG GACGTCTTCC	AAAACAGCAA TTTTGTGCTT
4151	ACGCTGGAAT TGCGACCTTA	CCCGAAATTC GGGCTTTAAG	AGTACACTTC TCATGTGAAG	CAACTACAAC GTTGATGTTG	AAGTCTGTTA TTCAGACAAT
4201	ATGTGGACTT TACACCTGAA	TACTGTGGAC ATGACACCTG	ACTAATGGCG TGATTACCGC	TGTATTCAGA ACATAAGTCT	GCCTCGCCCC CGGAGCGGGG
4251	ATTGGCACCA TAACCGTGGT	GATACCTGAC CTATGGACTG	TCGTAATCTG AGCATTAGAC	TAATTGCTTG ATTAACGAAC	TTAATCAATA AATTAGTTAT
4301	AACCGTTTTAA TTGGCAAATT	TTCGTTTCAG AAGCAAAGTC	TTGAACTTTG AACTTGAAAC	GTCTCTGCGT CAGAGACGCA	ATTTCTTTCT TAAAGAAAGA
4351	TATCTAGTTT ATAGATCAAA	CCATGGCTAC GGTACCGATG	GTAGATAAGT CATCTATTCA	AGCATGGCGG TCGTACCGCC	GTTAATCATT CAATTAGTAA
4401	AACTACAGCC TTGATGTCCG	CGGGCGTTTA GCCCGCAAAT	AACAGCGGGC TTGTGCGCCG	GGAGGGGTGG CCTCCCCACC	AGTCGTGACG TCAGCACTGC
4451	TGAATTACGT ACTTAATGCA	CATAGGGTTA GTATCCCAAT	GGGAGGTCTT CCCTCCAGGA	GTATTAGAGG CATAATCTCC	TCACGTGAGT AGTGCCTCA
4501	GTTTTGCGAC CAAAACGCTG	ATTTTGGGAC TAAAACGCTG	ACCATGTGGT TGGTACACCA	CTCGCTGGGG GAGCGACCCC	GGGGGGGCC CCCCCGGG
4551	GAGTGAGCAC CTCACTCGTG	GCAGGGTCTC CGTCCCAGAG	CATTTTGAAG GTAAAACCTT	CGGGAGGTTT GCCCTCCAAA	GAACGAGCGC CTTGCTCGCG



4601	TGGCGCGCTC ACCGCGCGAG	ACTGGCCGTC TGACCGGCAG	GTTTTACAAC CAAAATGTTG	GTCGTGACTG CAGCACTGAC	GGAAAACCCT CCTTTTGGGA
4651	GGCGTTACCC CCGCAATGGG	AACTTAATCG TTGAATTAGC	CCTTGCAGCA GGAACGTCGT	CATCCCCCTT GTAGGGGGAA	TCGCCAGCTG AGCGGTCGAC
4701	GCGTAATAGC CGCATTATCG	GAAGAGGCC CTTCTCCGGG	GCACCGATCG CGTGGCTAGC	CCCTTCCCAA GGGAAGGGT	CAGTTGCGCA GTCAACGCGT
4751	GCCTGAATGG CGGACTTACC	CGAATGGAAA GCTTACCTTT	TTGTAAGCGT AACATTGCGA	TAATATTTTG ATTATAAAAC	TTAAAATTCG AATTTTAAGC
4801	CGTTAAATTT GCAATTTAAA	TTGTTAAATC AACAAATTTAG	AGCTCATTTT TCGAGTAAAA	TTTAACCAAT AAATTGGTTA	AGGCCGAAAT TCCGGCTTTA
4851	CGGCAAAATC GCCGTTTTAG	CCTTATAAAT GGAATATTTA	CAAAAGAATA GTTTTCTTAT	GACCGAGATA CTGGCTCTAT	GGGTTGAGTG CCCAACTCAC
4901	TTGTTCCAGT AACAAGGTCA	TTGGAACAAG AACCTTGTTT	AGTCCACTAT TCAGGTGATA	TAAGAACGTG ATTCTTGAC	GACTCCAACG CTGAGGTTGC
4951	TCAAAGGGCG AGTTTCCCGC	AAAAACCGTC TTTTTGGCAG	TATCAGGGCG ATAGTCCCGC	ATGGCCCACT TACCGGGTGA	ACGTGAACCA TGCACCTGGT
5001	TCACCCTAAT AGTGGGATTA	CAAGTTTTTT GTTCAAAAAA	GGGGTCGAGG CCCCAGCTCC	TGCCGTAAAG ACGGCATTTC	CACTAAATCG GTGATTTAGC
5051	GAACCCTAAA CTTGGGATTT	GGGAGCCCC CCCTCGGGGG	GATTTAGAGC CTAAATCTCG	TTGACGGGGA AACTGCCCTT	AAGCCGGCGA TTCGGCCGCT
5101	ACGTGGCGAG TGCACCGCTC	AAAGGAAGGG TTTCTTCCC	AAGAAAGCGA TTCTTTGCT	AAGGAGCGGG TTCCTCGCCC	CGCTAGGGCG GCGATCCCGC
5151	CTGGCAAGTG GACCGTTTAC	TAGCGGTAC ATCGCCAGTG	GCTGCGCGTA CGACGCGCAT	ACCACCACAC TGGTGGTGTG	CCGCCGCGCT GGCGGCGCGA
5201	TAATGCGCCG ATTACGCGGC	CTACAGGGCG GATGTCCCGC	CGTCAGGTGG GCAGTCCACC	CACTTTTCGG GTGAAAAGCC	GGAAATGTGC CCTTTACACG
5251	GCGGAACCCC CGCCTTGGGG	TATTTGTTTA ATAAACAAAT	TTTTTCTAAA AAAAAGATTT	TACATTCAA ATGTAAGTTT	TATGTATCCG ATACATAGGC
5301	CTCATGAGAC GAGTACTCTG	AATAACCCTG TTATTGGGAC	ATAAATGCTT TATTTACGAA	CAATAATATT GTTATTATAA	GAAAAAGGAA CTTTTCTCTT
5351	GAGTATGAGT CTCATACTCA	ATTCAACATT TAAGTTGTAA	TCCGTGTCGC AGGCACAGCG	CCTTATTCCC GGAATAAGGG	TTTTTTGCGG AAAAAACGCC
5401	CATTTTGCC GTAAAACGGA	TCCTGTTTTT AGGACAAAAA	GCTCACCCAG CGAGTGGGTC	AAACGCTGGT TTTGCGACCA	GAAAGTAAAA CTTTCATTTT
5451	GATGCTGAAG CTACGACTTC	ATCAGTTGGG TAGTCAACCC	TGCACGAGTG ACGTGCTCAC	GGTTACATCG CCAATGTAGC	AACTGGATCT TTGACCTAGA
5501	CAACAGCGGT GTTGTGCGCA	AAGATCCTTG TTCTAGGAAC	AGAGTTTTTCG TCTCAAAAGC	CCCCGAAGAA GGGGCTTCTT	CGTTTTCCAA GCAAAAGGTT
5551	TGATGAGCAC ACTACTCGTG	TTTTAAAGTT AAAATTTCAA	CTGCTATGTG GACGATACAC	GCGCGGTATT CGCGCCATAA	ATCCCCTATT TAGGGCATAA
5601	GACGCCGGGC CTGCGGCCCG	AAGAGCAACT TTCTCGTTGA	CGGTGCGCGC GCCAGCGGCG	ATACACTATT TATGTGATAA	CTCAGAATGA GAGTCTTACT
5651	CTTGGTTGAG GAACCAACTC	TACTCACCAG ATGAGTGGTC	TCACAGAAAA AGTGTCTTTT	GCATCTTACG CGTAGAATGC	GATGGCATGA CTACCGTACT
5701	CAGTAAGAGA GTCATTCTCT	ATTATGCAGT TAATACGTCA	GCTGCCATAA CGACGGTATT	CCATGAGTGA GGTACTCACT	TAACACTGCG ATTGTGACGC

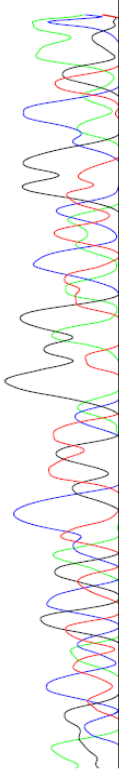
5751	GCCAACTTAC CGGTTGAATG	TTCTGACAAC AAGACTGTTG	GATCGGAGGA CTAGCCTCCT	CCGAAGGAGC GGCTTCCTCG	TAACCGCTTT ATTGGCGAAA
5801	TTTGACACAAC AAACGTGTTG	ATGGGGGATC TACCCCTAG	ATGTAACCTCG TACATTGAGC	CCTTGATCGT GGAAGTAGCA	TGGGAACCGG ACCCTTGGCC
5851	AGCTGAATGA TCGACTTACT	AGCCATACCA TCGGTATGGT	AACGACGAGC TTGCTGCTCG	GTGACACCAC CACTGTGGTG	GATGCCTGTA CTACGGACAT
5901	GCAATGGCAA CGTTACCGTT	CAACGTTGCG GTTGCAACGC	CAAACATTA GTTTGATAAT	ACTGGCGAAC TGACCGCTTG	TACTTACTCT ATGAATGAGA
5951	AGCTTCCCGG TCGAAGGGCC	CAACAATTAA GTTGTTAATT	TAGACTGGAT ATCTGACCTA	GGAGGCGGAT CCTCCGCTA	AAAGTTGCAG TTTCAACGTC
6001	GACCACTTCT CTGGTGAAGA	GCGCTCGGCC CGCGAGCCGG	CTTCCGGCTG GAAGGCCGAC	GCTGGTTTTAT CGACCAAATA	TGCTGATAAA ACGACTATTT
6051	TCTGGAGCCG AGACCTCGGC	GTGAGCGTGG CACTCGCACC	GTCTCGCGGT CAGAGCGCCA	ATCATTGCAG TAGTAACGTC	CACTGGGGCC GTGACCCCGG
6101	AGATGGTAAG TCTACCATT	CCCTCCCGTA GGGAGGGCAT	TCGTAGTTAT AGCATCAATA	CTACACGACG GATGTGCTGC	GGGAGTCAGG CCCTCAGTCC
6151	CAACTATGGA GTTGATACCT	TGAACGAAAT ACTTGCTTTA	AGACAGATCG TCTGTCTAGC	CTGAGATAGG GACTCTATCC	TGCCTCACTG ACGGAGTGAC
6201	ATTAAGCATT TAATTCGTAA	GGTAACTGTC CCATTGACAG	AGACCAAGTT TCTGGTTCAA	TACTCATATA ATGAGTATAT	TACTTTAGAT ATGAAATCTA
6251	TGATTTAAAA ACTAAATTTT	CTTCATTTTT GAAGTAAAAA	AATTTAAAAG TTAAATTTTC	GATCTAGGTG CTAGATCCAC	AAGATCCTTT TTCTAGGAAA
6301	TTGATAATCT AACTATTAGA	CATGACCAAA GTACTGGTTT	ATCCCTTAAC TAGGGAATTG	GTGAGTTTTC CACTCAAAAAG	GTTCCACTGA CAAGGTGACT
6351	GCGTCAGACC CGCAGTCTGG	CCGTAGAAAA GGCATCTTTT	GATCAAAGGA CTAGTTTCCT	TCTTCTTGAG AGAAGAATC	ATCCTTTTTT TAGGAAAAAA
6401	TCTGCGCGTA AGACGCGCAT	ATCTGCTGCT TAGACGACGA	TGCAAACAAA ACGTTTGT	AAAACCACCG TTTTGGTGGC	CTACCAGCGG GATGGTCGCC
6451	TGGTTTGT ACCAAACAAA	GCCGGATCAA CGGCCTAGTT	GAGCTACCAA CTCGATGGTT	CTCTTTTCC GAGAAAAAGG	GAAGGTAAC CTTCCATTGA
6501	GGCTTCAGCA CCGAAGTCGT	GAGCGCAGAT CTCGCGTCTA	ACCAAATACT TGGTTTATGA	GTTCTTCTAG CAAGAAGATC	TGTAGCCGTA ACATCGGCAT
6551	GTTAGGCCAC CAATCCGGTG	CACTTCAAGA GTGAAGTTCT	ACTCTGTAGC TGAGACATCG	ACCGCTACA TGGCGGATGT	TACCTCGCTC ATGGAGCGAG
6601	TGCTAATCCT ACGATTAGGA	GTTACCAGTG CAATGGTCAC	GCTGCTGCCA CGACGACGGT	GTGGCGATAA CACCGCTATT	GTCGTGTCTT CAGCACAGAA
6651	ACCGGTTGG TGGCCCAACC	ACTCAAGACG TGAGTTCTGC	ATAGTTACCG TATCAATGGC	GATAAGGCGC CTATTCCGCG	AGCGGTCGGG TCGCCAGCCC
6701	CTGAACGGGG GACTTGCCCC	GGTTCGTGCA CCAAGCACGT	CACAGCCAG GTGTCGGGTC	CTTGAGCGA GAACCTCGCT	ACGACCTACA TGCTGGATGT
6751	CCGAAGTGG GGCTTGACTC	ATACCTACAG TATGGATGTC	CGTGAGCTAT GCACCTGATA	GAGAAAAGCGC CTCTTTCGCG	CACGCTTCCC GTGCGAAGGG
6801	GAAGGGAGAA CTTCCCTCTT	AGGCGGACAG TCCGCCTGTC	GTATCCGGTA CATAGGCCAT	AGCGGCAGGG TCGCCGTCCC	TCGGAACAGG AGCCTTGTC
6851	AGAGCGCACG TCTCGCGTGC	AGGGAGCTTC TCCCTCGAAG	CAGGGGGAAA GTCCCCCTTT	CGCCTGGTAT GCGGACCATA	CTTTATAGTC GAAATATCAG

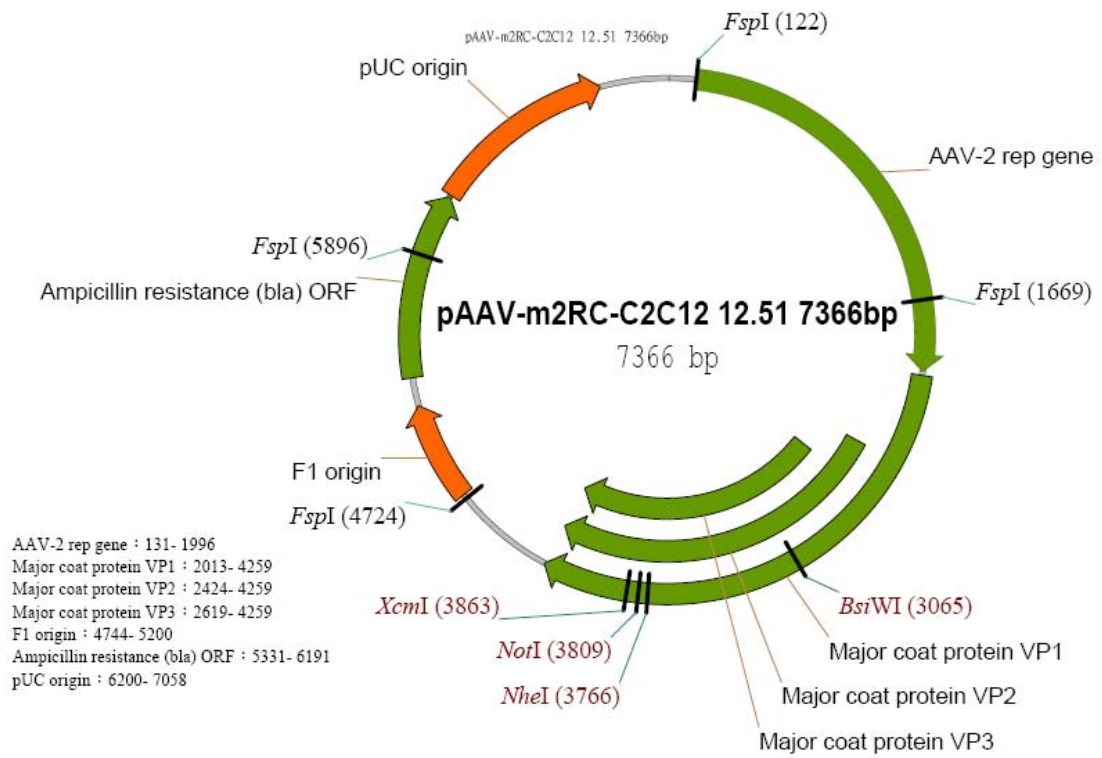
6901	CTGTCGGGTT	TCGCCACCTC	TGACTTGAGC	GTCGATTTTT	GTGATGCTCG
	GACAGCCCAA	AGCGGTGGAG	ACTGAACTCG	CAGCTAAAAA	CACTACGAGC
6951	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	GAAAAACGCC	AGCAACGCGG	CCTTTTTACG
	AGTCCCCCG	CCTCGGATAC	CTTTTTGCGG	TCGTTGCGCC	GGAAAAATGC
7001	GTTCCCTGGCC	TTTTGCTGGC	CTTTTGCTCA	CATGTTCTTT	CCTGCGTTAT
	CAAGGACCGG	AAAACGACCG	GAAAACGAGT	GTACAAGAAA	GGACGCAATA
7051	CCCCTGATTC	TGTGGATAAC	CGTATTACCG	CCTTTGAGTG	AGCTGATAAC
	GGGGACTAAG	ACACCTATTG	GCATAATGGC	GGAAACTCAC	TCGACTATGG
7101	GCTCGCCGCA	GCCGAACGAC	CGAGCGCAGC	GAGTCAGTGA	GCGAGGAAGC
	CGAGCGGCGT	CGGCTTGCTG	GCTCGCGTCG	CTCAGTCACT	CGCTCCTTCG
7151	GGAAGAGCGC	CCAATACGCA	AACCGCCTCT	CCCCGCGCGT	TGGCCGATTC
	CCTTCTCGCG	GGTTATGCGT	TTGGCGGAGA	GGGGCGCGCA	ACCGGCTAAG
7201	ATTAATGCAG	CTGGCACGAC	AGGTTTCCCG	ACTGGAAAAGC	GGGCAGTGAG
	TAATTACGTC	GACCGTGCTG	TCCAAAGGGC	TGACCTTTTCG	CCCGTCACTC
7251	CGCAACGCAA	TTAATGTGAG	TTAGCTCACT	CATTAGGCAC	CCCAGGCTTT
	GCGTTGCGTT	AATTACACTC	AATCGAGTGA	GTAATCCGTG	GGGTCCGAAA
7301	ACACTTTATG	CTTCCGGCTC	GTATGTTGTG	TGGAATTGTG	AGCGGATAAC
	TGTGAAATAC	GAAGGCCGAG	CATACAACAC	ACCTTAACAC	TCGCCTATTG
7351	AATTTACAC	AGGAAACAGC	TATGACCATG	ATTACGCCAA	
	TTAAAGTGTG	TCCTTTGTCG	ATACTGGTAC	TAATGCGGTT	





680 N A G G G N C T A A T G C C T G A C T C C C G T T G T T C A G G G N G A G G T A C C A T A C T N G G C A C C A T G A A N A N  
700  
710  
720  
730





附錄四，質體 pAAV-m2RC-C2C12 12.51 序列與定序資料



1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGG
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCTT	CTAGTCTTCA	AGGATAAGGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTTCGT
	ACACTAATTC	CAGGGGTGCG	TGGAACTGCT	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAGTGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTCGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCCTCA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACC GGCT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTTCTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGAAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCTGCT
451	TTTCTGAGT	CAGATTCGCG	AAAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTGACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGTCTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTAFTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGTTCCTA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GGCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTGCGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGCACAG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAAAC	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATAC	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCCAGTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCCGTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CCGTCTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TGGTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCCACGA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TTACTCTTGA	TTCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCCAGCA	GGAGTCGGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTACAG
1351	CTCGGCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCGTGAT GAGGGCACTA	CGTCACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGGC
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCTTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTT TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GGTTGAGGTG CCAACCTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGGTGGA TTTCCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTCAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTGC
1651	GGTGC GCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTCGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTTCCCTG ACAAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACTCACG AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTGCTCA AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCACTGCCTG CGTGACGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATACCGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTACCAC	GAAGCTCAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCCAC GGACCGGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTGCTC	GGGTCTTGTC CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTTCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTGCA	CGACAGCGGA GCTGTGCGCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTGGC



2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGTT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTTCCGCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCATT	TTCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGT	TTTCCAGCCA AAAGGTGCGT
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTCG	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTG GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTTCT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTTCAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAAT GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTCATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTTGCC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCCCT ATGAAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACTTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTCGTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TTACTTGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCACC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTTCCG	TTCAGTTTTT AAGTCAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGTCACTGT	TTCGGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCCCTG ACCGAAGGAC

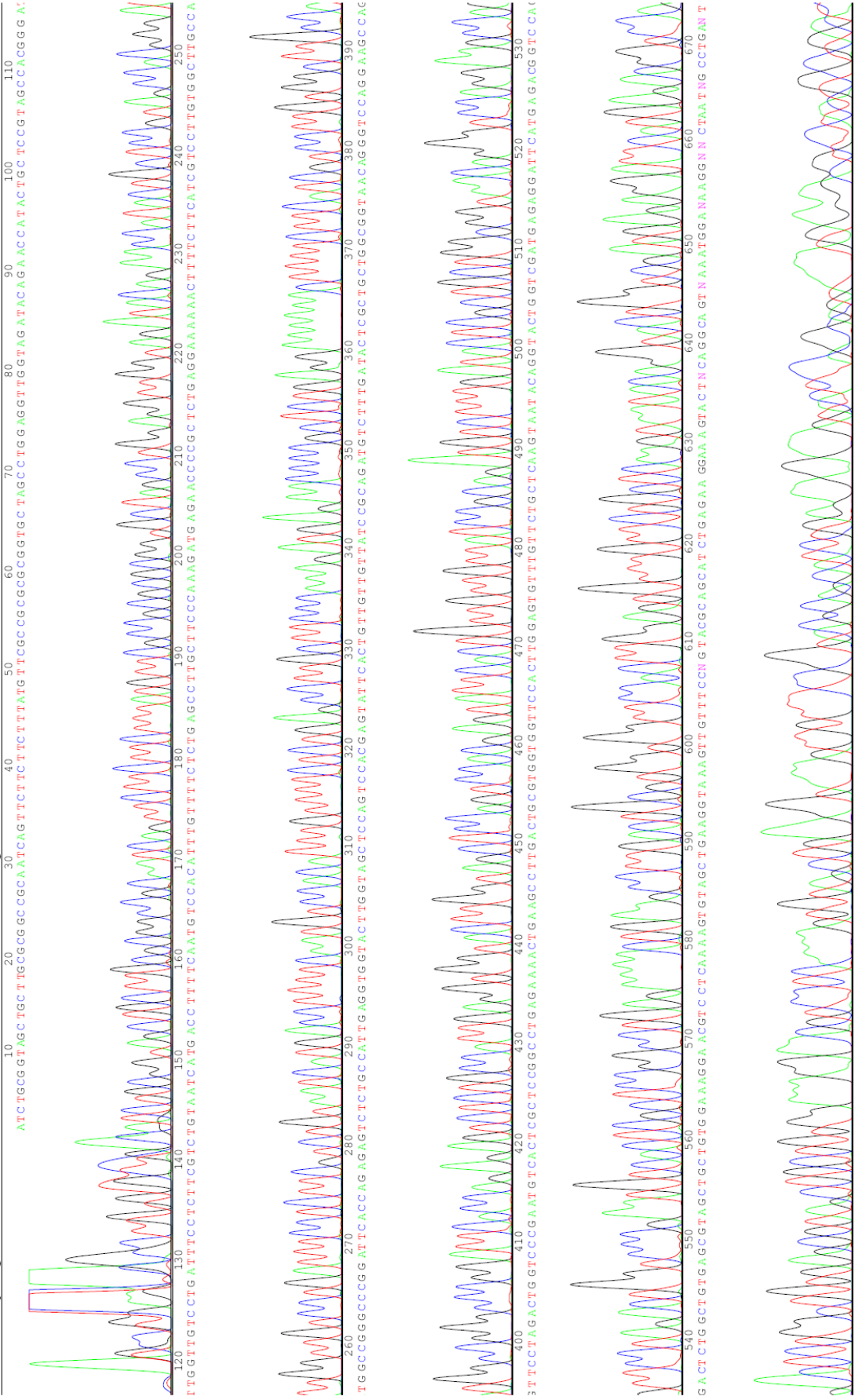
3451	GACCCTGTTA CTGGGACAAT	CCGCCAGCAG GGCGGTGTC	CGAGTATCAA GCTCATAGTT	AGACATCTGC TCTGTAGACG	GGATAACAAC CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT TTGTCACTTA	ACTCGTGGAC TGAGCACCTG	TGGAGCTACC ACCTCGATGG	AAGTACCACC TTCATGGTGG	TCAATGGCAG AGTTACCGTC
3551	AGACTCTCTG TCTGAGAGAC	GTGAATCCGG CACTTAGGCC	GCCCGGCCAT CGGGCCGGTA	GGCAAGCCAC CCGTTCCGGT	AAGGACGATG TTCCTGCTAC
3601	AAGAAAAGTT TTCTTTTCAA	TTTTCTCAG AAAAGGAGTC	AGCGGGGTTT TCGCCCAAG	TCATCTTTGG AGTAGAAACC	GAAGCAAGGC CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA AGTCTCTTTT	CAAATGTGGA GTTTACACCT	CATTGAAAAG GTAACTTTTT	GTCATGATTA CAGTACTAAT	CAGACGAAGA GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG CCTTTAGTCC	ACAACCAATC TGTTGGTTAG	CCGTGGCTAC GGCACCGATG	GGAGCAGTAT CCTCGTCATA	GGTTCGTGAT CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT GATGGTTGGA	CCAGGCTAGC GGTCCGATCG	ACCGCGCGCG TGGCGCGCGC	GCGAACATAA CGCTTGTATT	AGAAGAAGAA TCTTCTTCTT
3801	CTGATTGCGG GACTAACGCC	CCGCGCAAGC GGCGCGTTCG	AGCTACCGCA TCGATGGCGT	GATGTCAACA CTACAGTTGT	CACAAGGCGT GTGTTCCGCA
3851	TCTTCCAGGC AGAAGGTCCG	ATGGTCTGGC TACCAGACCG	AGGACAGAGA TCCTGTCTCT	TGTGTACCTT ACACATGGAA	CAGGGGCCCA GTCCCCGGGT
3901	TCTGGGCAAA AGACCCGTTT	GATTCCACAC CTAAGGTGTG	ACGGACGGAC TGCCTGCCTG	ATTTTCACCC TAAAAGTGGG	CTCTCCCCTC GAGAGGGGAG
3951	ATGGGTGGAT TACCCACCTA	TCGGACTTAA AGCCTGAATT	ACACCCTCCT TGTGGGAGGA	CCACAGATTC GGTGTCTAAG	TCATCAAGAA AGTAGTTCTT
4001	CACCCCGGTA GTGGGGCCAT	CCTGCGAATC GGACGCTTAG	CTTCGACCAC GAAGCTGGTG	CTTCAGTGCG GAAGTCACGC	GCAAAGTTTG CGTTTCAAAC
4051	CTTCCTTCAT GAAGGAAGTA	CACACAGTAC GTGTGTCATG	TCCACGGGAC AGGTGCCCTG	AGGTCAGCGT TCCAGTCGCA	GGAGATCGAG CCTCTAGCTC
4101	TGGGAGCTGC ACCCTCGACG	AGAAGGAAAA TCTTCTTTTT	CAGCAAACGC GTCGTTTTCG	TGGAATCCCG ACCTTAGGGC	AAATTCAGTA TTTAAGTCAT
4151	CACTTCCAAC GTGAAGGTTG	TACAACAAGT ATGTTGTTC	CTGTTAATGT GACAATTACA	GGACTTTACT CCTGAAATGA	GTGGACACTA CACCTGTGAT
4201	ATGGCGTGTA TACCGCACAT	TTCAGAGCCT AAGTCTCGGA	CGCCCCATTG GCGGGGTAAC	GCACCAGATA CGTGGTCTAT	CCTGACTCGT GGACTGAGCA
4251	AATCTGTAAT TTAGACATTA	TGCTTGTTAA ACGAACAATT	TCAATAAACC AGTTATTTGG	GTTTAATTTCG CAAATTAAGC	TTTCAGTTGA AAAGTCAACT
4301	ACTTTGGTCT TGAAACCAGA	CTGCGTATTT GACGCATAAA	CTTTCTTATC GAAAGAATAG	TAGTTTCCAT ATCAAAGGTA	GGCTACGTAG CCGATGCATC
4351	ATAAGTAGCA TATTCATCGT	TGGCGGGTTA ACCGCCCAAT	ATCATTAACT TAGTAATTGA	ACAGCCCGGG TGTGGGGCCC	CGTTTAAACA GCAAATTTGT
4401	GCGGGCGGAG CGCCCGCCTC	GGGTGGAGTC CCCACCTCAG	GTGACGTGAA CACTGCACTT	TTACGTCATA AATGCAGTAT	GGGTTAGGGA CCCAATCCCT
4451	GGTCCTGTAT CCAGGACATA	TAGAGGTCAC ATCTCCAGTG	GTGAGTGTTT CACTCACAAA	TGCGACATTT ACGCTGTAAA	TGCGACACCA ACGCTGTGGT
4501	TGTGGTCTCG ACACCAGAGC	CTGGGGGGGG GACCCCCCCC	GGGCCCGAGT CCCGGGCTCA	GAGCACGCAG CTCGTGCCTC	GGTCTCCATT CCAGAGGTAA
4551	TTGAAGCGGG AACTTCGCCC	AGGTTTGAAC TCCAAACTTG	GAGCGCTGGC CTCGCGACCG	GCGCTCACTG CGCGAGTGAC	GCCGTCGTTT CGGCAGCAAA

4601	TACAACGTCG ATGTTGCAGC	TGACTGGGAA ACTGACCCTT	AACCCTGGCG TTGGGACCGC	TTACCCAAC AATGGGTTGA	TAATCGCCTT ATTAGCGGAA
4651	GCAGCACATC CGTCGTGTAG	CCCCTTTCGC GGGGAAAGCG	CAGCTGGCGT GTCGACCGCA	AATAGCGAAG TTATCGCTTC	AGGCCCGCAC TCCGGGCGTG
4701	CGATCGCCCT GCTAGCGGGA	TCCCAACAGT AGGGTTGTCA	TGCGCAGCCT ACGCGTCGGA	GAATGGCGAA CTTACCGCTT	TGGAAATTGT ACCTTTAACA
4751	AAGCGTTAAT TTCGCAATTA	ATTTTGTAA TAAAACAATT	AATTCGCGTT TTAAGCGCAA	AAATTTTGT TTTAAAAACA	TAAATCAGCT ATTTAGTCGA
4801	CATTTTTTTA GTAAAAAAT	ACCAATAGGC TGGTTATCCG	CGAAATCGGC GCTTTAGCCG	AAAATCCCTT TTTTAGGGAA	ATAAATCAAA TATTTAGTTT
4851	AGAATAGACC TCTTATCTGG	GAGATAGGGT CTCTATCCCA	TGAGTGTGT ACTCACAACA	TCCAGTTTGG AGGTCAAACC	AACAAGAGTC TTGTTCTCAG
4901	CACTATTAAG GTGATAATTC	AACGTGGACT TTGCACCTGA	CCAACGTCAA GGTTGCAGTT	AGGGCGAAAA TCCCCTTTT	ACCGTCTATC TGGCAGATAG
4951	AGGGCGATGG TCCCGCTACC	CCCACTACGT GGGTGATGCA	GAACCATCAC CTTGGTAGTG	CCTAATCAAG GGATTAGTTC	TTTTTTGGGG AAAAAACCCC
5001	TCGAGGTGCC AGCTCCACGG	GTAAAGCACT CATTTTCGTGA	AAATCGGAAC TTTAGCCTTG	CCTAAAGGGA GGATTTCCCT	GCCCCCGATT CGGGGGCTAA
5051	TAGAGCTTGA ATCTCGAACT	CGGGGAAAGC GCCCTTTTCG	CGGCGAACGT GCCGCTTGCA	GGCGAGAAAG CCGCTCTTTC	GAAGGGAAGA CTTCCCTTCT
5101	AAGCGAAAGG TTCGCTTTCC	AGCGGGCGCT TCGCCCGCGA	AGGGCGCTGG TCCCGCGACC	CAAGTGTAGC GTTACATCG	GGTCACGCTG CCAGTGCAGC
5151	CGCGTAACCA GCGCATTGGT	CCACACCCGC GGTGTGGGCG	CGCGCTTAAT GCGCGAATTA	GCGCCGCTAC CGCGGCGATG	AGGGCGCGTC TCCCGCGCAG
5201	AGGTGGCACT TCCACCGTGA	TTTCGGGGAA AAAGCCCCTT	ATGTGCGCGG TACACGCGCC	AACCCCTATT TTGGGGATAA	TGTTTATTTT ACAAATAAAA
5251	TCTAAATACA AGATTTATGT	TTCAAATATG AAGTTTATAC	TATCCGCTCA ATAGGCGAGT	TGAGACAATA ACTCTGTTAT	ACCCTGATAA TGGGACTATT
5301	ATGCTTCAAT TACGAAGTTA	AATATTGAAA TTATAACTTT	AAGGAAGAGT TTCCTTCTCA	ATGAGTATTC TACTCATAAG	AACATTTCCG TTGTAAAGGC
5351	TGTCGCCCTT ACAGCGGGAA	ATTCCCTTTT TAAGGGAAAA	TTGCGGCATT AACGCCGTAA	TTGCCTTCCT AACGGAAGGA	GTTTTTGCTC CAAAAACGAG
5401	ACCCAGAAAC TGGGTCTTTG	GCTGGTGAAA CGACCACCTT	GTAAAAGATG CATTTTCTAC	CTGAAGATCA GACTTCTAGT	GTTGGGTGCA CAACCCACGT
5451	CGAGTGGGTT GCTCACCCAA	ACATCGAACT TGTAGCTTGA	GGATCTCAAC CCTAGAGTTG	AGCGGTAAGA TCGCCATTCT	TCCTTGAGAG AGGAACTCTC
5501	TTTTCGCCCC AAAAGCGGGG	GAAGAACGTT CTTCTTGCAA	TTCCAATGAT AAGTTACTA	GAGCACTTTT CTCGTGAAAA	AAAGTTCTGC TTCAAGACG
5551	TATGTGGCGC ATACACCGCG	GGTATTATCC CCATAATAGG	CGTATTGACG GCATAACTGC	CGGGCAAGA GGCCCGTTCT	GCAACTCGGT CGTTGAGCCA
5601	CGCCGCATAC GCGGCGTATG	ACTATTCTCA TGATAAGAGT	GAATGACTTG CTTACTGAAC	GTTGAGTACT CAACTCATGA	CACCAGTCAC GTGGTCACTG
5651	AGAAAAGCAT TCTTTTCGTA	CTTACGGATG GAATGCCTAC	GCATGACAGT CGTACTGTCA	AAGAGAATTA TTCTCTTAAT	TGCAGTGCTG ACGTCACGAC
5701	CCATAACCAT GGTATTGGTA	GAGTGATAAC CTCACTATTG	ACTGCGGCCA TGACGCCGGT	ACTTACTTCT TGAATGAAGA	GACAACGATC CTGTTGCTAG

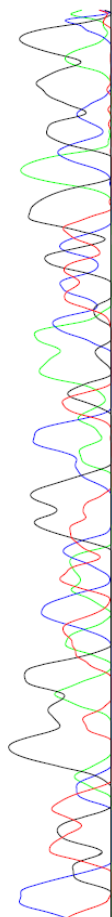
5751	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG	GGGATCATGT
	CCTCCTGGCT	TCCTCGATTG	GCGAAAAAAC	GTGTTGTACC	CCCTAGTACA
5801	AACTCGCCTT	GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG
	TTGAGCGGAA	CTAGCAACCC	TTGGCCTCGA	CTTACTTCGG	TATGGTTTTGC
5851	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA
	TGCTCGCACT	GTGGTGCTAC	GGACATCGTT	ACCGTTGTTG	CAACGCGTTT
5901	CTATTAAC TG	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCC GGCAAC	AATTAATAGA
	GATAATTGAC	CGCTTGATGA	ATGAGATCGA	AGGGCCGTTG	TTAATTATCT
5951	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG	TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC
	GACCTACCTC	CGCCTATTTT	AACGTCTCTG	TGAAGACGCG	AGCCGGGAAG
6001	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT
	GCCGACCGAC	CAAATAACGA	CTATTTAGAC	CTCGGCCACT	CGCACCCAGA
6051	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT	CCCGTATCGT
	GCGCCATAGT	AACGTCTGTA	CCCCGGTCTA	CCATTCGGGA	GGGCATAGCA
6101	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC
	TCAATAGATG	TGCTGCCCCCT	CAGTCCGTTG	ATACCTACTT	GCTTTATCTG
6151	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC
	TCTAGCGACT	CTATCCACGG	AGTGACTAAT	TCGTAACCAT	TGACAGTCTG
6201	CAAGTTTACT	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAA ACTTC	ATTTTTAATT
	GTTCAAATGA	GTATATATGA	AATCTAACTA	AATTTTGAAG	TAAAAATTA
6251	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA	TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAATCC
	ATTTTCCTAG	ATCCACTTCT	AGGAAAAACT	ATTAGAGTAC	TGGTTTTAGG
6301	CTTAACGTGA	GTTTTCGTTC	CACTGAGCGT	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC
	GAATTGCACT	CAAAAGCAAG	GTGACTCGCA	GTCTGGGGCA	TCTTTTCTAG
6351	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA
	TTTCCTAGAA	GA ACTCTAGG	AAAAAAAGAC	GCGCATTAGA	CGACGAACGT
6401	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC
	TTGTTTTTTT	GGTGGCGATG	GTGCGCCACCA	AACAAACGGC	CTAGTTCTCG
6451	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTA ACTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA
	ATGGTTGAGA	AAAAGGCTTC	CATTGACCGA	AGTCGTCTCG	CGTCTATGGT
6501	AATACTGTTC	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC
	TTATGACAAG	AAGATCACAT	CGGCATCAAT	CCGGTGGTGA	AGTTCTTGAG
6551	TGTAGCACCG	CCTACATAAC	TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG
	ACATCGTGGC	GGATGTATGG	AGCGAGACGA	TTAGGACAAT	GGTCACCGAC
6601	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGTCTTACCG	GGTTGGACTC	AAGACGATAG
	GACGGTCACC	GCTATTCAGC	ACAGAATGGC	CCAACCTGAG	TTCTGCTATC
6651	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT	CGTGCACACA
	AATGGCCTAT	TCCGCGTCGC	CAGCCCGACT	TGCCCCCAA	GCACGTGTGT
6701	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG
	CGGGTCGAAC	CTCGCTTGCT	GGATGTGGCT	TGACTCTATG	GATGTGCGAC
6751	AGCTATGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT
	TCGATACTCT	TTGCGGGTGC	GAAGGGCTTC	CCTCTTTCCG	CCTGTCCATA
6801	CCGGTAAGCG	GCAGGGTCCG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG
	GGCCATTTCG	CGTCCCAGCC	TTGTCTCTCT	GCGTGCTCCC	TCGAAGGTCC
6851	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT	ATAGTCTCTG	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC
	CCCTTTGCGG	ACCATAGAAA	TATCAGGACA	GCCCAAAGCG	GTGGAGACTG

6901	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA	TGCTCGTCAG	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA
	AACTCGCAGC	TAAAAACACT	ACGAGCAGTC	CCCCCGCCTC	GGATACCTTT
6951	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT
	TTGCGGTTCGT	TGCGCCGGAA	AAATGCCAAG	GACCGGAAAA	CGACCGGAAA
7001	TGCTCACATG	TTCTTTCCTG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA
	ACGAGTGTAC	AAGAAAGGAC	GCAATAGGGG	ACTAAGACAC	CTATTGGCAT
7051	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG
	AATGGCGGAA	ACTCACTCGA	CTATGGCGAG	CGGCGTCGGC	TTGCTGGCTC
7101	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC
	GCGTCGCTCA	GTCACTCGCT	CCTTCGCCTT	CTCGCGGGTT	ATGCGTTTGG
7151	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	CGATTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT
	CGGAGAGGGG	CGCGCAACCG	GCTAAGTAAT	TACGTCGACC	GTGCTGTCCA
7201	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG
	AAGGGCTGAC	CTTTCGCCCG	TCACTCGCGT	TGCGTTAATT	ACACTCAATC
7251	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	CGGCTCGTAT
	GAGTGAGTAA	TCCGTGGGGT	CCGAAATGTG	AAATACGAAG	GCCGAGCATA
7301	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG
	CAACACACCT	TAACACTCGC	CTATTGTTAA	AGTGTGTCTT	TTGTCGATAC
7351	ACCATGATTA	CGCCAA			
	TGGTACTAAT	GCGGTT			



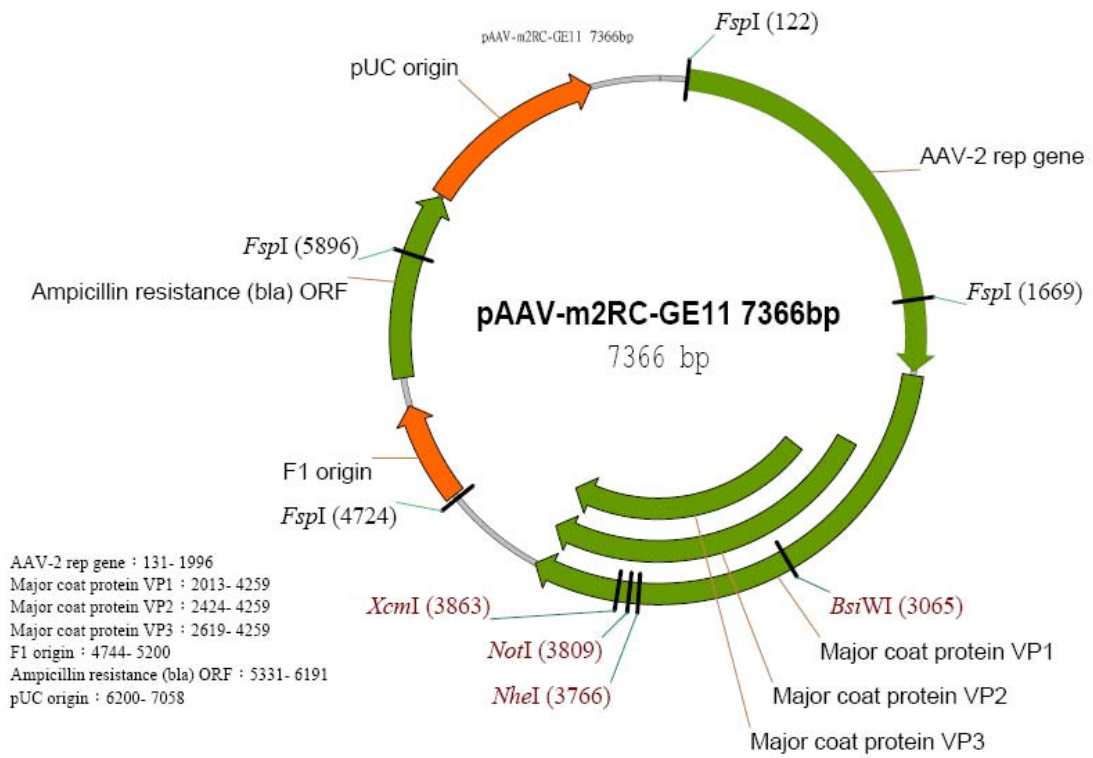


680 690 700 710 720 730 740  
C CCG T T G T T C A G G G G N G A G G T N T C C A T A C T G N G G C C C C C A T G A A A A A C N T C T G C T G G G N A C G G C H G G G A G G C



質體 pAAV-m2RC-C2C12 12.51 R端定序資料 頁二





附錄五，質體 pAAV-m2RC-GE11 序列與定序資料





1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGGA
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCCT	CTAGTCTTCA	AGGATAAAGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTCTCTG
	ACACTAATTC	CAGGGGTCCG	TGGAACTGCT	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAGTGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTCGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCTCAA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACCCGGT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTTCTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGGAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCCTGC
451	TTTCCTGAGT	CAGATTCGCG	AAAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGTCTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTACTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGTCCA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GGCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTCCGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGCACAG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAAACT	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATAC	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCCAGCTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCCGTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CCGTCTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TGGTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCCACGA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TFACTCTTGA	TTCCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCCAGCA	GGAGTCGGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTTACG
1351	CTCGGCCCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCCTGAT GAGGGCACTA	CGTCACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGGC
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCCTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTTC TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GTTGAGGTG CCAACCTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGGTGGGA TTTCCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTCAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTGC
1651	GGTGCGCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTCCCTG ACAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACTCAGC AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTGCTCA AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCACTGCCTG CGTGACGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATACCGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTACCAC	GAAGCTCAAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCCAC GGACCGGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTGCTC	GGGTCTTGTG CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CCGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTTCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTGCA	CGACAGCGGA GCTGTGCGCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTGCGG

2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTCCGCCCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCCATT	TTCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGT	TTCCAGCCA AAAGGTCGGT
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTG	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTG GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTTCT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTCCAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAAT GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTCATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTTGCC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCCCT ATGAAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACTTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTGCTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TACTTGGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCACC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTTCCG	TTCAGTTTTC AAGTCAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGCTCACTGT	TTCGGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCCTG ACCGAAGGAC

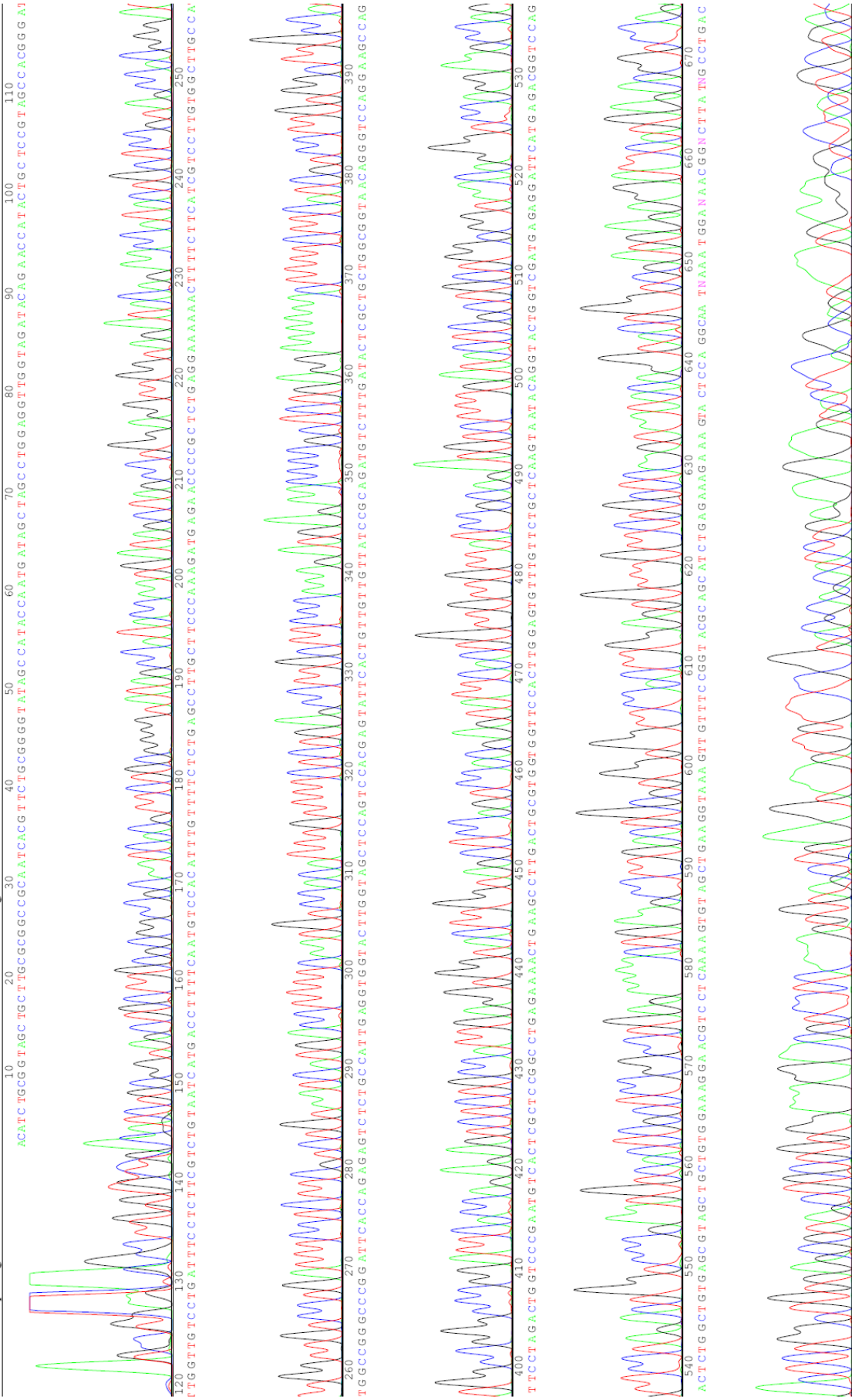
3451	GACCCCTGTTA CTGGGACAAT	CCGCCAGCAG GGCGGTCGTC	CGAGTATCAA GCTCATAGTT	AGACATCTGC TCTGTAGACG	GGATAACAAC CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT TTGTCACTTA	ACTCGTGGAC TGAGCACCTG	TGGAGCTACC ACCTCGATGG	AAGTACCACC TTCATGGTGG	TCAATGGCAG AGTTACCGTC
3551	AGACTCTCTG TCTGAGAGAC	GTGAATCCGG CACTTAGGCC	GCCCGGCCAT CGGGCCGGTA	GGCAAGCCAC CCGTTCCGGT	AAGGACGATG TTCTTGCTAC
3601	AAGAAAAGTT TTCTTTTCAA	TTTTCTCAG AAAAGGAGTC	AGCGGGGTTT TCGCCCAAG	TCATCTTTGG AGTAGAAACC	GAAGCAAGGC CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA AGTCTCTTTT	CAAATGTGGA GTTTACACCT	CATTGAAAAG GTAACTTTTT	GTCATGATTA CAGTACTAAT	CAGACGAAGA GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG CCTTTAGTCC	ACAACCAATC TGTTGGTTAG	CCGTGGCTAC GGCACCGATG	GGAGCAGTAT CCTCGTCATA	GTTTCTGTAT CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT GATGGTTGGA	CCAGGCTAGC GGTCCGATCG	TATCATTGGT ATAGTAACCA	ATGGCTATAC TACCGATATG	CCCGCAGAAC GGGCGTCTTG
3801	GTGATTGCGG CACTAACGCC	CCGCGCAAGC GGCGCGTTTC	AGCTACCGCA TCGATGGCGT	GATGTCAACA CTACAGTTGT	CACAAGGCGT GTGTTCCGCA
3851	TCTTCCAGGC AGAAGGTCCG	ATGGTCTGGC TACCAGACCG	AGGACAGAGA TCCTGTCTCT	TGTGTACCTT ACACATGGAA	CAGGGGCCCA GTCCCGGGT
3901	TCTGGGCAAA AGACCCGTTT	GATTCCACAC CTAAGGTGTG	ACGGACGGAC TGCCTGCCTG	ATTTTCACCC TAAAAGTGGG	CTCTCCCCTC GAGAGGGGAG
3951	ATGGGTGGAT TACCCACCTA	TCGGACTTAA AGCCTGAATT	ACACCCTCCT TGTGGGAGGA	CCACAGATTC GGTGTCTAAG	TCATCAAGAA AGTAGTTCTT
4001	CACCCCGGTA GTGGGGCCAT	CCTGCGAATC GGACGCTTAG	CTTCGACCAC GAAGCTGGTG	CTTCAGTGCG GAAGTCACGC	GCAAAGTTTG CGTTTCAAAC
4051	CTTCCTTCAT GAAGGAAGTA	CACACAGTAC GTGTGTCATG	TCCACGGGAC AGGTGCCCTG	AGGTACAGCGT TCCAGTCGCA	GGAGATCGAG CCTCTAGCTC
4101	TGGGAGCTGC ACCCTCGACG	AGAAGGAAAA TCTTCCTTTT	CAGCAAACGC GTCGTTTGCG	TGGAATCCCG ACCTTAGGGC	AAATTCAGTA TTTAAGTCAT
4151	CACTTCCAAC GTGAAGGTTG	TACAACAAGT ATGTTGTTCA	CTGTTAATGT GACAATTACA	GGACTTTACT CCTGAAATGA	GTGGACACTA CACCTGTGAT
4201	ATGGCGTGTA TACCGCACAT	TTCAGAGCCT AAGTCTCGGA	CGCCCCATTG GCGGGGTAAC	GCACCAGATA CGTGGTCTAT	CCTGACTCGT GGACTGAGCA
4251	AATCTGTAAT TTAGACATTA	TGCTTGTTAA ACGAACAATT	TCAATAAACC AGTTATTTGG	GTTTAATTCG CAAATTAAGC	TTTCAGTTGA AAAGTCAACT
4301	ACTTTGGTCT TGAAACCAGA	CTGCGTATTT GACGCATAAA	CTTTCTTATC GAAAGAATAG	TAGTTTCCAT ATCAAAGGTA	GGCTACGTAG CCGATGCATC
4351	ATAAGTAGCA TATTCATCGT	TGGCGGGTTA ACCGCCCAAT	ATCATTAACT TAGTAATTGA	ACAGCCCGGG TGTCGGGCCC	CGTTTAAACA GCAAATTTGT
4401	GCGGGCGGAG CGCCCGCCTC	GGGTGGAGTC CCCACCTCAG	GTGACGTGAA CACTGCACTT	TTACGTCATA AATGCAGTAT	GGGTTAGGGA CCCAATCCCT
4451	GGTCCTGTAT CCAGGACATA	TAGAGGTCAC ATCTCCAGTG	GTGAGTGTTT CACTCACAAA	TGCGACATTT ACGCTGTAAA	TGCGACACCA ACGCTGTGGT
4501	TGTGGTCTCG ACACCAGAGC	CTGGGGGGGG GACCCCCCCC	GGGCCCGAGT CCCGGGCTCA	GAGCACGCAG CTCGTGCGTC	GGTCTCCATT CCAGAGGTAA
4551	TTGAAGCGGG AACTTCGCCC	AGGTTTGAAC TCCAAACTTG	GAGCGCTGGC CTCGCGACCG	GCGCTCACTG CGCGAGTGAC	GCCGTGTTTT CGGCAGCAAA

4601	TACAACGTCG ATGTTGCAGC	TGACTGGGAA ACTGACCCTT	AACCCTGGCG TTGGGACCGC	TTACCCAAC AATGGGTGA	TAATCGCCTT ATTAGCGGAA
4651	GCAGCACATC CGTCGTGTAG	CCCCTTTCGC GGGAAAAGCG	CAGCTGGCGT GTCGACCGCA	AATAGCGAAG TTATCGCTTC	AGGCCCGCAC TCCGGGCGTG
4701	CGATCGCCCT GCTAGCGGGA	TCCCAACAGT AGGGTTGTCA	TGCGCAGCCT ACGCGTCGGA	GAATGGCGAA CTTACCGCTT	TGGAAATTGT ACCTTTAACA
4751	AAGCGTTAAT TTCGCAATTA	ATTTTGTAA TAAAACAATT	AATTCGCGTT TTAAGCGCAA	AAATTTTTGT TTTAAAAACA	TAAATCAGCT ATTTAGTCGA
4801	CATTTTTTTA GTAAAAAAT	ACCAATAGGC TGGTTATCCG	CGAAATCGGC GCTTTAGCCG	AAAATCCCTT TTTTAGGGAA	ATAAATCAAA TATTTAGTTT
4851	AGAATAGACC TCTTATCTGG	GAGATAGGGT CTCTATCCCA	TGAGTGTGT ACTCACAACA	TCCAGTTTGG AGGTCAAACC	AACAAGAGTC TTGTTCTCAG
4901	CACTATTAAG GTGATAATTC	AACGTGGACT TTGCACCTGA	CCAACGTCAA GGTTGCAGTT	AGGGCGAAAA TCCCCTTTT	ACCGTCTATC TGGCAGATAG
4951	AGGGCGATGG TCCCCTACC	CCCCTACGT GGGTGATGCA	GAACCATCAC CTTGGTAGTG	CCTAATCAAG GGATTAGTTC	TTTTTTGGGG AAAAACCCC
5001	TCGAGGTGCC AGCTCCACGG	GTAAAGCACT CATTTCTGTA	AAATCGGAAC TTTAGCCTTG	CCTAAAGGGA GGATTTCCCT	GCCCCCGATT CGGGGGCTAA
5051	TAGAGCTTGA ATCTCGAACT	CGGGGAAAGC GCCCTTTTCG	CGGCGAACGT GCCGCTTGCA	GGCGAGAAAG CCGCTCTTTC	GAAGGGAAGA CTTCCCTTCT
5101	AAGCGAAAGG TTCGCTTTCC	AGCGGGCGCT TCGCCCGCGA	AGGGCGCTGG TCCCCTGACC	CAAGTGTAGC GTTACATCG	GGTCACGCTG CCAGTGCAGC
5151	CGCGTAACCA GCGCATTGGT	CCACACCCGC GGTGTGGGCG	CGCGCTTAAT GCGCGAATTA	GCGCCGCTAC CGCGGCGATG	AGGGCGCGTC TCCCCTGCGAG
5201	AGGTGGCACT TCCACCGTGA	TTTCGGGGAA AAAGCCCCTT	ATGTGCGCGG TACACGCGCC	AACCCCTATT TTGGGGATAA	TGTTTTATTTT ACAAATAAAA
5251	TCTAAATACA AGATTTATGT	TTCAAATATG AAGTTTATAC	TATCCGCTCA ATAGGCGAGT	TGAGACAATA ACTCTGTTAT	ACCCTGATAA TGGGACTATT
5301	ATGCTTCAAT TACGAAGTTA	AATATTGAAA TTATAACTTT	AAGGAAGAGT TTCCTTCTCA	ATGAGTATTC TACTCATAAG	AACATTTCCG TTGTAAAGGC
5351	TGTCGCCCTT ACAGCGGGAA	ATTCCCTTTT TAAGGGAAAA	TTGCGGCATT AACGCCGTAA	TTGCCTTCCT AACGGAAGGA	GTTTTTGCTC CAAAAACGAG
5401	ACCCAGAAAC TGGGTCTTTG	GCTGGTGAAA CGACCACTTT	GTAAAAGATG CATTTTCTAC	CTGAAGATCA GACTTCTAGT	GTTGGGTGCA CAACCCACGT
5451	CGAGTGGGTT GCTCACCCAA	ACATCGAACT TGTAGCTTGA	GGATCTCAAC CCTAGAGTTG	AGCGGTAAGA TCGCCATTCT	TCCTTGAGAG AGGAACTCTC
5501	TTTTCGCCCC AAAAGCGGGG	GAAGAACGTT CTTCTTGCAA	TTCCAATGAT AAGGTTACTA	GAGCACTTTT CTCGTGAAAA	AAAGTTCTGC TTTCAAGACG
5551	TATGTGGCGC ATACACCGCG	GGTATTATCC CCATAATAGG	CGTATTGACG GCATAACTGC	CCGGGCAAGA GGCCCGTTCT	GCAACTCGGT CGTTGAGCCA
5601	CGCCGCATAC GCGGCGTATG	ACTATTCTCA TGATAAGAGT	GAATGACTTG CTTACTGAAC	GTTGAGTACT CAACTCATGA	CACCAGTCAC GTGGTCAGTG
5651	AGAAAAGCAT TCTTTTCGTA	CTTACGGATG GAATGCCTAC	GCATGACAGT CGTACTGTCA	AAGAGAATTA TTCTCTTAAT	TGCAGTGCTG ACGTCACGAC
5701	CCATAACCAT GGTATTGGTA	GAGTGATAAC CTCACTATTG	ACTGCGGCCA TGACGCCGGT	ACTTACTTCT TGAATGAAGA	GACAACGATC CTGTTGCTAG

5751	GGAGGACCGA CCTCCTGGCT	AGGAGCTAAC TCCTCGATTG	CGCTTTTTTTG GCGAAAAAAC	CACAACATGG GTGTTGTACC	GGGATCATGT CCCTAGTACA
5801	AACTCGCCTT TTGAGCGGAA	GATCGTTGGG CTAGCAACCC	AACCGGAGCT TTGGCCTCGA	GAATGAAGCC CTTACTTCGG	ATACCAAACG TATGGTTTGC
5851	ACGAGCGTGA TGCTCGCACT	CACCACGATG GTGGTGCTAC	CCTGTAGCAA GGACATCGTT	TGGCAACAAC ACCGTTGTTG	GTTGCGCAAA CAACGCGTTT
5901	CTATTAAGT GATAATTGAC	GCGAACTACT CGCTTGATGA	TACTCTAGCT ATGAGATCGA	TCCCAGCAAC AGGGCCGTTG	AATTAATAGA TTAATTATCT
5951	CTGGATGGAG GACCTACCTC	GCGGATAAAG CGCCTATTTT	TTGCAGGACC AACGTCCTGG	ACTTCTGCGC TGAAGACGCG	TCGGCCCTTC AGCCGGGAAG
6001	CGGCTGGCTG GCCGACCGAC	GTTTATTGCT CAAATAACGA	GATAAATCTG CTATTTAGAC	GAGCCGGTGA CTCGGCCACT	GCGTGGGTCT CGCACCCAGA
6051	CGCGGTATCA GCGCCATAGT	TTGCAGCACT AACGTCGTGA	GGGGCCAGAT CCCCGGTCTA	GGTAAGCCCT CCATTCCGGA	CCCGTATCGT GGGCATAGCA
6101	AGTTATCTAC TCAATAGATG	ACGACGGGGA TGCTGCCCTC	GTCAGGCAAC CAGTCCGTTG	TATGGATGAA ATACCTACTT	CGAAATAGAC GCTTTATCTG
6151	AGATCGCTGA TCTAGCGACT	GATAGGTGCC CTATCCACGG	TCACTGATTA AGTGACTAAT	AGCATTGGTA TCGTAACCAT	ACTGTCAGAC TGACAGTCTG
6201	CAAGTTTACT GTTCAAATGA	CATATATACT GTATATATGA	TTAGATTGAT AATCTAACTA	TTAAAACTTC AATTTTGAAG	ATTTTAAATT TAAAAATTAA
6251	TAAAAGGATC ATTTTCCTAG	TAGGTGAAGA ATCCACTTCT	TCCTTTTTTGA AGGAAAAACT	TAATCTCATG ATTAGAGTAC	ACCAAAATCC TGGTTTTAGG
6301	CTTAACGTGA GAATTGCACT	GTTTTCGTTC CAAAAGCAAG	CACTGAGCGT GTGACTCGCA	CAGACCCCGT GTCTGGGGCA	AGAAAAGATC TCTTTTCTAG
6351	AAAGGATCTT TTTCCTAGAA	CTTGAGATCC GAACTCTAGG	TTTTTTTCTG AAAAAAAGAC	CGCGTAATCT GCGCATTAGA	GCTGCTTGCA CGACGAACGT
6401	AACAAAAAAA TTGTTTTTTT	CCACCGCTAC GGTGGCGATG	CAGCGGTGGT GTCGCCACCA	TTGTTTGCCG AACAAACGGC	GATCAAGAGC CTAGTTCTCG
6451	TACCAACTCT ATGGTTGAGA	TTTTCCGAAG AAAAGGCTTC	GTAAGTGGCT CATTGACCGA	TCAGCAGAGC AGTCGTCTCG	GCAGATACCA CGTCTATGGT
6501	AATACTGTTC TTATGACAAG	TTCTAGTGTA AAGATCACAT	GCCGTAGTTA CGGCATCAAT	GGCCACCACT CCGGTGGTGA	TCAAGAACTC AGTTCTTGAG
6551	TGTAGCACCG ACATCGTGGC	CCTACATAAC GGATGTATGG	TCGCTCTGCT AGCGAGACGA	AATCCTGTTA TTAGGACAAT	CCAGTGGCTG GGTCACCGAC
6601	CTGCCAGTGG GACGGTCACC	CGATAAGTCG GCTATTCAGC	TGTCTTACCG ACAGAATGGC	GGTTGGACTC CCAACCTGAG	AAGACGATAG TTCTGCTATC
6651	TTACCGGATA AATGGCCTAT	AGGCGCAGCG TCCGCGTCCG	GTCGGGCTGA CAGCCCGACT	ACGGGGGGTT TGCCCCCAA	CGTGCACACA GCACGTGTGT
6701	GCCCAGCTTG CGGGTCGAAC	GAGCGAACGA CTCGCTTGCT	CCTACACCGA GGATGTGGCT	ACTGAGATAC TGAATCTATG	CTACAGCGTG GATGTCGCAC
6751	AGCTATGAGA TCGATACTCT	AAGCGCCACG TTCGCGGTGC	CTTCCCGAAG GAAGGGCTTC	GGAGAAAGGC CCTCTTTCCG	GGACAGGTAT CCTGTCCATA
6801	CCGGTAAGCG GGCCATTCCG	GCAGGGTCCG CGTCCCAGCC	AACAGGAGAG TTGTCCTCTC	CGCACGAGGG GCGTGCTCCC	AGCTTCCAGG TCGAAGGTCC
6851	GGGAAACGCC CCCTTTGCGG	TGGTATCTTT ACCATAGAAA	ATAGTCCTGT TATCAGGACA	CGGGTTTCGC GCCCAAAGCG	CACCTCTGAC GTGGAGACTG

6901	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA	TGCTCGTCAG	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA
	AACTCGCAGC	TAAAAACACT	ACGAGCAGTC	CCCCCGCCTC	GGATACCTTT
6951	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT
	TTGCGGTGCT	TGCGCCGGAA	AAATGCCAAG	GACCGGAAAA	CGACCGGAAA
7001	TGCTCACATG	TTCTTTCCCTG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA
	ACGAGTGTAC	AAGAAAGGAC	GCAATAGGGG	ACTAAGACAC	CTATTGGCAT
7051	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG
	AATGGCGGAA	ACTCACTCGA	CTATGGCGAG	CGGCGTCGGC	TTGCTGGCTC
7101	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC
	GCGTCGCTCA	GTCACTCGCT	CCTTCGCCTT	CTCGCGGGTT	ATGCGTTTGG
7151	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	CGATTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT
	CGGAGAGGGG	CGCGCAACCG	GCTAAGTAAT	TACGTCGACC	GTGCTGTCCA
7201	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG
	AAGGGCTGAC	CTTTCGCCCG	TCACTCGCGT	TGCGTTAATT	ACACTCAATC
7251	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	CGGCTCGTAT
	GAGTGAGTAA	TCCGTGGGGT	CCGAAATGTG	AAATACGAAG	GCCGAGCATA
7301	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG
	CAACACACCT	TAACACTCGC	CTATTGTTAA	AGTGTGTCCT	TTGTCGATAC
7351	ACCATGATTA	CGCCAA			
	TGTTACTAAT	GCGGTT			





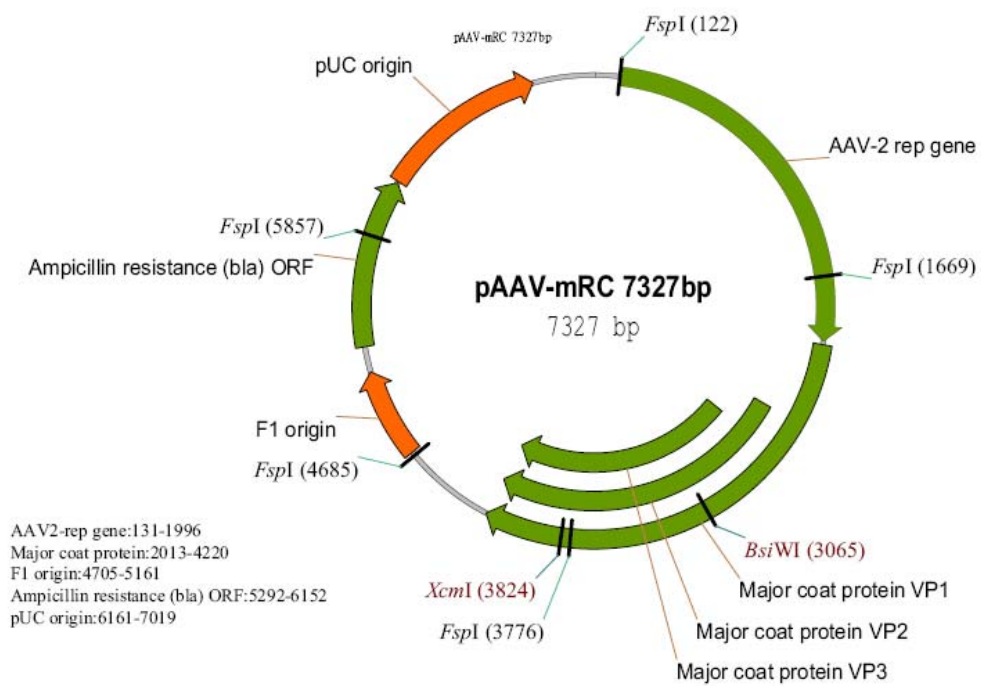


680 T C C C G T T G T T C A G G G N G A G G G A A T C C C A T A C T G N G G C C C C A T G A A A A A C T C T G C T G G G G A A C G G C G G G G A G G C A T  
700  
710  
720  
730  
740



質體 pAAV-m2RC-GE11 R端定序資料 頁二





附錄六，質體 pAAV-mRC 序列與定序資料



1	GCGCGCCGAT	ATCGTTAACG	CCCCGCGCCG	GCCGCTCTAG	AACTAGTGGA
	CGCGCGGCTA	TAGCAATTGC	GGGGCGCGGC	CGGCGAGATC	TTGATCACCT
51	TCCCCCGGAA	GATCAGAAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT	TCTCTAGAAA
	AGGGGGCCTT	CTAGTCTTCA	AGGATAAGGC	TTCAAGGATA	AGAGATCTTT
101	GSTATAGGAAC	TTCTGATCTG	CGCAGCCGCC	ATGCCGGGGT	TTTACGAGAT
	CATATCCTTG	AAGACTAGAC	GCGTCGGCGG	TACGGCCCCA	AAATGCTCTA
151	TGTGATTAAG	GTCCCCAGCG	ACCTTGACGA	GCATCTGCCC	GGCATTCTGT
	ACACTAATTC	CAGGGGTGCG	TGGAACTGCT	CGTAGACGGG	CCGTAAAGAC
201	ACAGCTTTGT	GAAGTGGGTG	GCCGAGAAGG	AATGGGAGTT	GCCGCCAGAT
	TGTGAAACA	CTTGACCCAC	CGGCTCTTCC	TTACCCTCAA	CGGCGGTCTA
251	TCTGACATGG	ATCTGAATCT	GATTGAGCAG	GCACCCCTGA	CCGTGGCCGA
	AGACTGTACC	TAGACTTAGA	CTAACTCGTC	CGTGGGGACT	GGCACC GGCT
301	GAAGCTGCAG	CGCGACTTTC	TGACGGAATG	GCGCCGTGTG	AGTAAGGCCC
	CTTCGACGTC	GCGCTGAAAG	ACTGCCTTAC	CGCGGCACAC	TCATTCCGGG
351	CGGAGGCCCT	TTTCTTTGTG	CAATTTGAGA	AGGGAGAGAG	CTACTTCCAC
	GCCTCCGGGA	AAAGAAACAC	GTAAACTCT	TCCCTCTCTC	GATGAAGGTG
401	ATGCACGTGC	TCGTGAAAC	CACCGGGGTG	AAATCCATGG	TTTTGGGACG
	TACGTGCACG	AGCACCTTTG	GTGGCCCCAC	TTTAGGTACC	AAAACCCTGC
451	TTTCCTGAGT	CAGATTGCGG	AAAACTGAT	TCAGAGAATT	TACCGCGGGA
	AAAGGACTCA	GTCTAAGCGC	TTTTTACTA	AGTCTCTTAA	ATGGCGCCCT
501	TCGAGCCGAC	TTTGCCAAAC	TGGTTCGCGG	TCACAAAGAC	CAGAAATGGC
	AGCTCGGCTG	AAACGGTTTG	ACCAAGCGCC	AGTGTCTCTG	GTCTTTACCG
551	GCCGGAGGCG	GGAACAAGGT	GGTGGATGAG	TGCTACATCC	CCAATTACTT
	CGGCCTCCGC	CCTTGTCCA	CCACCTACTC	ACGATGTAGG	GGTTAATGAA
601	GCTCCCCAAA	ACCCAGCCTG	AGCTCCAGTG	GGCGTGGACT	AATATGGAAC
	CGAGGGGTTT	TGGGTCGGAC	TCGAGGTCAC	CCGCACCTGA	TTATACCTTG
651	AGTATTTAAG	CGCCTGTTTG	AATCTCACGG	AGCGTAAACG	GTTGGTGGCG
	TCATAAATTC	GCGGACAAAC	TTAGAGTGCC	TCGCATTTGC	CAACCACCGC
701	CAGCATCTGA	CGCACGTGTC	GCAGACGCAG	GAGCAGAACA	AAGAGAATCA
	GTCGTAGACT	GCGTGACACAG	CGTCTGCGTC	CTCGTCTTGT	TTCTCTTAGT
751	GAATCCCAAT	TCTGATGCGC	CGGTGATCAG	ATCAAAAAT	TCAGCCAGGT
	CTTAGGGTTA	AGACTACGCG	GCCACTAGTC	TAGTTTTTGA	AGTCGGTCCA
801	ACATGGAGCT	GGTCGGGTGG	CTCGTGGACA	AGGGGATTAC	CTCGGAGAAG
	TGTACCTCGA	CCAGCCCACC	GAGCACCTGT	TCCCCTAATG	GAGCCTCTTC
851	CAGTGGATCC	AGGAGGACCA	GGCCTCATA	ATCTCCTTCA	ATGCGGCCTC
	GTCACCTAGG	TCCTCCTGGT	CCGGAGTATG	TAGAGGAAGT	TACGCCGGAG
901	CAACTCGCGG	TCCCAAATCA	AGGCTGCCTT	GGACAATGCG	GGAAAGATTA
	GTTGAGCGCC	AGGGTTTAGT	TCCGACGGAA	CCTGTTACGC	CCTTTCTAAT
951	TGAGCCTGAC	TAAAACCGCC	CCCGACTACC	TGGTGGGCCA	GCAGCCCGTG
	ACTCGGACTG	ATTTTGGCGG	GGGCTGATGG	ACCACCCGGT	CGTCGGGCAC
1001	GAGGACATTT	CCAGCAATCG	GATTTATAAA	ATTTTGGAAC	TAAACGGGTA
	CTCCTGTAAA	GGTCGTTAGC	CTAAATATTT	TAAAACCTTG	ATTTGCCCAT
1051	CGATCCCCAA	TATGCGGCTT	CCGTCTTTCT	GGGATGGGCC	ACGAAAAAGT
	GCTAGGGGTT	ATACGCCGAA	GGCAGAAAGA	CCCTACCCGG	TGCTTTTTCA
1101	TCGGCAAGAG	GAACACCATC	TGGCTGTTTG	GGCCTGCAAC	TACCGGGAAG
	AGCCGTTCTC	CTTGTGGTAG	ACCGACAAAC	CCGGACGTTG	ATGGCCCTTC

1151	ACCAACATCG TGGTTGTAGC	CGGAGGCCAT GCCTCCGGTA	AGCCCACACT TCGGGTGTGA	GTGCCCTTCT CACGGGAAGA	ACGGGTGCGT TGCCCACGCA
1201	AAACTGGACC TTTGACCTGG	AATGAGAACT TTACTCTTGA	TTCCCTTCAA AAGGGAAGTT	CGACTGTGTC GCTGACACAG	GACAAGATGG CTGTTCTACC
1251	TGATCTGGTG ACTAGACCAC	GGAGGAGGGG CCTCCTCCCC	AAGATGACCG TTCTACTGGC	CCAAGGTCGT GGTTCCAGCA	GGAGTCGGCC CCTCAGCCGG
1301	AAAGCCATTC TTTCGGTAAG	TCGGAGGAAG AGCCTCCTTC	CAAGGTGCGC GTTCCACGCG	GTGGACCAGA CACCTGGTCT	AATGCAAGTC TTACGTTTAC
1351	CTCGGCCCAG GAGCCGGGTC	ATAGACCCGA TATCTGGGCT	CTCCCCTGAT GAGGGCACTA	CGTACCTCC GCAGTGGAGG	AACACCAACA TTGTGGTTGT
1401	TGTGCGCCGT ACACGCGGCA	GATTGACGGG CTAACTGCCC	AACTCAACGA TTGAGTTGCT	CCTTCGAACA GGAAGCTTGT	CCAGCAGCCG GGTCGTCCGG
1451	TTGCAAGACC AACGTTCTGG	GGATGTTCAA CCTACAAGTT	ATTTGAACTC TAAACTTGAG	ACCCGCCGTC TGGGCGGCAG	TGGATCATGA ACCTAGTACT
1501	CTTTGGGAAG GAAACCCTTC	GTCACCAAGC CAGTGGTTCG	AGGAAGTCAA TCCTTCAGTT	AGACTTTTTT TCTGAAAAAG	CGGTGGGCAA GCCACCCGTT
1551	AGGATCACGT TCCTAGTGCA	GGTTGAGGTG CCAACCTCCAC	GAGCATGAAT CTCGTACTTA	TCTACGTCAA AGATGCAGTT	AAAGGGTGGGA TTTCCACCT
1601	GCCAAGAAAA CGGTTCTTTT	GACCCGCCCC CTGGGCGGGG	CAGTGACGCA GTCACTGCGT	GATATAAGTG CTATATTCAC	AGCCCAAACG TCGGGTTTGC
1651	GGTGC GCGAG CCACGCGCTC	TCAGTTGCGC AGTCAACGCG	AGCCATCGAC TCGGTAGCTG	GTCAGACGCG CAGTCTGCGC	GAAGCTTCGA CTTCGAAGCT
1701	TCAACTACGC AGTTGATGCG	AGACAGGTAC TCTGTCCATG	CAAAACAAAT GTTTTGTTTA	GTTCTCGTCA CAAGAGCAGT	CGTGGGCATG GCACCCGTAC
1751	AATCTGATGC TTAGACTACG	TGTTTCCCTG ACAAAGGGAC	CAGACAATGC GTCTGTTACG	GAGAGAATGA CTCTCTTACT	ATCAGAATTC TAGTCTTAAG
1801	AAATATCTGC TTTATAGACG	TTCACTCACG AAGTGAGTGC	GACAGAAAGA CTGTCTTTCT	CTGTTTAGAG GACAAATCTC	TGCTTTCCCG ACGAAAGGGC
1851	TGTCAGAATC ACAGTCTTAG	TCAACCCGTT AGTTGGGCAA	TCTGTCTGTC AGACAGCAGT	AAAAGGCGTA TTTTCCGCAT	TCAGAAACTG AGTCTTTGAC
1901	TGCTACATTC ACGATGTAAG	ATCATATCAT TAGTATAGTA	GGGAAAGGTG CCCTTTCCAC	CCAGACGCTT GGTCTGCGAA	GCCTGCCTG CGTGCAGGAC
1951	CGATCTGGTC GCTAGACCAG	AATGTGGATT TTACACCTAA	TGGATGACTG ACCTACTGAC	CATCTTTGAA GTAGAAACTT	CAATAAATGA GTTATTTACT
2001	TTTAAATCAG AAATTTAGTC	GTATGGCTGC CATACCGACG	CGATGGTTAT GCTACCAATA	CTTCCAGATT GAAGGTCTAA	GGCTCGAGGA CCGAGCTCCT
2051	CACTCTCTCT GTGAGAGAGA	GAAGGAATAA CTTCCTTATT	GACAGTGGTG CTGTCAACCAC	GAAGCTCAAA CTTCGAGTTT	CCTGGCCAC GGACCGGGTG
2101	CACCACAAA GTGGTGGTTT	GCCCGCAGAG CGGGCGTCTC	CGGCATAAGG GCCGTATTCC	ACGACAGCAG TGCTGTGCTC	GGGTCTTGTC CCCAGAACAC
2151	CTTCCTGGGT GAAGGACCCA	ACAAGTACCT TGTTTATGGA	CGGACCCTTC GCCTGGGAAG	AACGGACTCG TTGCCTGAGC	ACAAGGGAGA TGTTCCCTCT
2201	GCCGGTCAAC CGGCCAGTTG	GAGGCAGACG CTCCGTCTGC	CGCGGCCCT GGCGCCGGGA	CGAGCACGAC GCTCGTGCTG	AAAGCCTACG TTTCGGATGC
2251	ACCGGCAGCT TGGCCGTGCA	CGACAGCGGA GCTGTCCGCT	GACAACCCGT CTGTTGGGCA	ACCTCAAGTA TGGAGTTCAT	CAACCACGCC GTTGGTGC GG

2301	GACGCGGAGT CTGCGCCTCA	TTCAGGAGCG AAGTCCTCGC	CCTTAAAGAA GGAATTTCTT	GATACGTCTT CTATGCAGAA	TTGGGGGCAA AACCCCGTT
2351	CCTCGGACGA GGAGCCTGCT	GCAGTCTTCC CGTCAGAAGG	AGGCGAAAAA TCCGCTTTTT	GAGGGTTCTT CTCCCAAGAA	GAACCTCTGG CTTGGAGACC
2401	GCCTGGTTGA CGGACCAACT	GGAACCTGTT CCTTGGACAA	AAGACGGCTC TTCTGCCGAG	CGGGAAAAAA GCCCTTTTTT	GAGGCCGGTA CTCCGGCCAT
2451	GAGCACTCTC CTCGTGAGAG	CTGTGGAGCC GACACCTCGG	AGACTCCTCC TCTGAGGAGG	TCGGGAACCG AGCCCTTGGC	GAAAGGCGGG CTTTCGGCCC
2501	CCAGCAGCCT GGTCGTCGGA	GCAAGAAAAA CGTTCTTTTT	GATTGAATTT CTAACTTAAA	TGGTCAGACT ACCAGTCTGA	GGAGACGCAG CCTCTGCGTC
2551	ACTCAGTACC TGAGTCATGG	TGACCCCCAG ACTGGGGGTC	CCTCTCGGAC GGAGAGCCTG	AGCCACCAGC TCGGTGGTCG	AGCCCCCTCT TCGGGGGAGA
2601	GGTCTGGGAA CCAGACCCTT	CTAATACGAT GATTATGCTA	GGCTACAGGC CCGATGTCCG	AGTGGCGCAC TCACCGCGTG	CAATGGCAGA GTTACCGTCT
2651	CAATAACGAG GTTATTGCTC	GGCGCCGACG CCGCGGCTGC	GAGTGGGTAA CTCACCCATT	TTCTCGGGA AAGGAGCCCT	AATTGGCATT TTAACCGTAA
2701	GCGATTCCAC CGCTAAGGTG	ATGGATGGGC TACCTACCCG	GACAGAGTCA CTGTCTCAGT	TCACCACCAG AGTGGTGGTC	CACCCGAACC GTGGGCTTGG
2751	TGGGCCCTGC ACCCGGGACG	CCACCTACAA GGTGGATGTT	CAACCACCTC GTTGGTGGAG	TACAAACAAA ATGTTTGTFT	TTCCAGCCA AAAGGTCGGT
2801	ATCAGGAGCC TAGTCCTCGG	TCGAACGACA AGCTTGCTGT	ATCACTACTT TAGTGATGAA	TGGCTACAGC ACCGATGTCG	ACCCCTTGGG TGGGGAACCC
2851	GGTATTTTGA CCATAAAACT	CTTCAACAGA GAAGTTGTCT	TTCCACTGCC AAGGTGACGG	ACTTTTCACC TGAAAAGTGG	ACGTGACTGG TGCCTGACC
2901	CAAAGACTCA GTTTCTGAGT	TCAACAACAA AGTTGTTGTT	CTGGGGATTG GACCCCTAAG	CGACCCAAGA GCTGGGTCTT	GACTCAACTT CTGAGTTGAA
2951	CAAGCTCTTT GTTTCGAGAAA	AACATTCAAG TTGTAAGTTC	TCAAAGAGGT AGTTTCTCCA	CACGCAGAA GTGCGTCTTA	GACGGTACGA CTGCCATGCT
3001	CGACGATTGC GCTGCTAACG	CAATAACCTT GTTATTGGAA	ACCAGCACGG TGGTCGTGCC	TTCAGGTGTT AAGTCCACAA	TACTGACTCG ATGACTGAGC
3051	GAGTACCAGC CTCATGGTCG	TCCCGTACGT AGGGCATGCA	CCTCGGCTCG GGAGCCGAGC	GCGCATCAAG CGCGTAGTTC	GATGCCTCCC CTACGGAGGG
3101	GCCGTTCCCA CGGCAAGGGT	GCAGACGTCT CGTCTGCAGA	TCATGGTGCC AGTACCACGG	ACAGTATGGA TGTACATACCT	TACCTCACCC ATGGAGTGGG
3151	TGAACAACGG ACTTGTTGCC	GAGTCAGGCA CTCAGTCCGT	GTAGGACGCT CATCCTGCGA	CTTCATTTTA GAAGTAAAAAT	CTGCCTGGAG GACGGACCTC
3201	TACTTTCCCT ATGAAAGGAA	CTCAGATGCT GAGTCTACGA	GCGTACCGGA CGCATGGCCT	AACAACCTTA TTGTTGAAAT	CCTTCAGCTA GGAAGTCGAT
3251	CACTTTTGAG GTGAAAACCTC	GACGTTCCCT CTGCAAGGAA	TCCACAGCAG AGGTGTCGTC	CTACGCTCAC GATGCGAGTG	AGCCAGAGTC TCGGTCTCAG
3301	TGGACCGTCT ACCTGGCAGA	CATGAATCCT GTACTTAGGA	CTCATCGACC GAGTAGCTGG	AGTACCTGTA TCATGGACAT	TACTTGGAGC AATGAACTCG
3351	AGAACAACA TCTTGTTTGT	CTCCAAGTGG GAGGTTCCAC	AACCACCACG TTGGTGGTGC	CAGTCAAGGC GTCAGTCCG	TTCAGTTTTC AAGTCAAAAG
3401	TCAGGCCGGA AGTCCGGCCT	GCGAGTGACA CGTCACTGT	TTGGGACCA AAGCCCTGGT	GTCTAGGAAC CAGATCCTTG	TGGCTTCTCG ACCGAAGGAC

3451	GACCCTGTTA CTGGGACAAT	CGGCCAGCAG GGCGGTGCTC	CGAGTATCAA GCTCATAGTT	AGACATCTGC TCTGTAGACG	GGATAACAAC CCTATTGTTG
3501	AACAGTGAAT TTGTCACTTA	ACTCGTGGAC TGAGCACCTG	TGGAGCTACC ACCTCGATGG	AAGTACCACC TTCATGGTGG	TCAATGGCAG AGTTACCGTC
3551	AGACTCTCTG TCTGAGAGAC	GTGAATCCGG CACTTAGGCC	GCCCGGCCAT CGGGCCGGTA	GGCAAGCCAC CCGTTCCGGT	AAGGACGATG TTCTGTCTAC
3601	AAGAAAAGTT TTCTTTTCAA	TTTTCTCAG AAAAGGAGTC	AGCGGGGTTT TCGCCCAAG	TCATCTTTGG AGTAGAAACC	GAAGCAAGGC CTTCGTTCCG
3651	TCAGAGAAAA AGTCTCTTTT	CAAATGTGGA GTTTACACCT	CATTGAAAAG GTAACTTTTT	GTCATGATTA CAGTACTAAT	CAGACGAAGA GTCTGCTTCT
3701	GGAAATCAGG CCTTTAGTCC	ACAACCAATC TGTTGGTTAG	CCGTGGCTAC GGCACCAGAT	GGAGCAGTAT CCTCGTCATA	GGTTCTGTAT CCAAGACATA
3751	CTACCAACCT GATGGTTGGA	CCAGGCAGGC GGTCCGTCCG	AATGCGCAAG TTACGCGTTC	CAGCTACCGC GTCGATGGCG	AGATGTCAAC TCTACAGTTG
3801	ACACAAGGCG TGTGTTCCGC	TTCTTCCAGG AAGAAGGTCC	CATGGTCTGG GTACCAGACC	CAGGACAGAG GTCCTGTCTC	ATGTGTACCT TACACATGGA
3851	TCAGGGGCCC AGTCCCCGGG	ATCTGGGCAA TAGACCCGTT	AGATTCCACA TCTAAGGTGT	CACGGACGGA GTGCCTGCCT	CATTTTCACC GTAAAAGTGG
3901	CCTCTCCCCT GGAGAGGGGA	CATGGGTGGA GTACCCACCT	TTCCGACTTA AAGCCTGAAT	AACACCCTCC TTGTGGGAGG	TCCACAGATT AGGTGTCTAA
3951	CTCATCAAGA GAGTAGTTCT	ACACCCCGGT TGTGGGGCCA	ACCTGCGAAT TGGACGCTTA	CCTTCGACCA GGAAGCTGGT	CCTTCAGTGC GGAAGTCACG
4001	GGCAAAGTTT CCGTTTCAA	GCTTCCTTCA CGAAGGAAGT	TCACACAGTA AGTGTGTCTAT	CTCCACGGGA GAGGTGCCCT	CAGGTCAAGC GTCCAGTCGC
4051	TGGAGATCGA ACCTCTAGCT	GTGGGAGCTG CACCCCTGAC	CAGAAGGAAA GTCTTCCTTT	ACAGCAAACG TGTCGTTTGC	CTGGAATCCC GACCTTAGGG
4101	GAAATTCAGT CTTTAAGTCA	ACACTTCCAA TGTGAAGGTT	CTACAACAAG GATGTTGTTT	TCTGTTAATG AGACAATTAC	TGGACTTTAC ACCTGAAATG
4151	TGTGGACACT ACACCTGTGA	AATGGCGTGT TTACCGCACA	ATTCAGAGCC TAAGTCTCGG	TCGCCCCATT AGCGGGGTAA	GGCACCAGAT CCGTGGTCTA
4201	ACCTGACTCG TGGACTGAGC	TAATCTGTAA ATTAGACATT	TTGCTTGTTA AACGAACAAT	ATCAATAAAC TAGTTATTTG	CGTTTAATTC GCAAATTAAG
4251	GTTTCAGTTG CAAAGTCAAC	AACTTTGGTC TTGAAACCAG	TCTGCGTATT AGACGCATAA	TCTTTCTTAT AGAAAGAATA	CTAGTTTCCA GATCAAAGGT
4301	TGGCTACGTA ACCGATGCAT	GATAAGTAGC CTATTCATCG	ATGGCGGGTT TACCGCCCAA	AATCATTAAC TTAGTAATTG	TACAGCCCGG ATGTGGGGCC
4351	GCGTTTAAAC CGCAAATTTG	AGCGGGCGGA TCGCCCGCCT	GGGGTGGAGT CCCCACCTCA	CGTGACGTGA GCACTGCACT	ATTACGTCAT TAATGCAGTA
4401	AGGGTTAGGG TCCCAATCCC	AGGTCCTGTA TCCAGGACAT	TTAGAGGTCA AATCTCCAGT	CGTGAGTGTT GCACTCACAA	TTGCGACATT AACGCTGTAA
4451	TTGCGACACC AACGCTGTGG	ATGTGGTCTC TACACCAGAG	GCTGGGGGGG CGACCCCCCC	GGGGCCCGAG CCCCGGGCTC	TGAGCACGCA ACTCGTGCCT
4501	GGGTCTCCAT CCCAGAGGTA	TTTGAAGCGG AAACTTCGCC	GAGGTTTGAA CTCCAAACTT	CGAGCGCTGG GCTCGCGACC	CGCGCTCACT GCGCGAGTGA
4551	GGCCGTCGTT CCGGCAGCAA	TTACAACGTC AATGTTGCAG	GTGACTGGGA CACTGACCCT	AAACCCTGGC TTTGGGACCG	GTTACCCAAC CAATGGGTTG

4601	TTAATCGCCT AATTAGCGGA	TGCAGCACAT ACGTCGTGTA	CCCCCTTTCG GGGGGAAAGC	CCAGCTGGCG GGTCGACCGC	TAATAGCGAA ATTATCGCTT
4651	GAGGCCCGCA CTCCGGGCGT	CCGATCGCCC GGCTAGCGGG	TTCCCAACAG AAGGGTTGTC	TTGCGCAGCC AACGCGTCGG	TGAATGGCGA ACTTACCGCT
4701	ATGGAAATTG TACCTTTAAC	TAAGCGTTAA ATTCGCAATT	TATTTTGTTA ATAAAACAAT	AAATTTCGCGT TTTAAGCGCA	TAAATTTTTG ATTTAAAAAC
4751	TTAAATCAGC AATTTAGTCG	TCATTTTTTT AGTAAAAAAA	AACCAATAGG TTGGTTATCC	CCGAAATCGG GGCTTTAGCC	CAAAATCCCT GTTTTAGGGA
4801	TATAAATCAA ATATTTAGTT	AAGAATAGAC TTCTTATCTG	CGAGATAGGG GCTCTATCCC	TTGAGTGTTC AACTCACAAC	TTCCAGTTTG AAGGTCAAAC
4851	GAACAAGAGT CTTGTTCTCA	CCACTATTAA GGTGATAATT	GAACGTGGAC CTTGCACCTG	TCCAACGTCA AGGTTGCAGT	AAGGGCGAAA TTCCCCGCTT
4901	AACCGTCTAT TTGGCAGATA	CAGGGCGATG GTCCCGCTAC	GCCCACTACG CGGGTGATGC	TGAACCATCA ACTTGGTAGT	CCCTAATCAA GGGATTAGTT
4951	GTTTTTTGGG CAAAAAACCC	GTCGAGGTGC CAGCTCCACG	CGTAAAGCAC GCATTTCTGT	TAAATCGGAA ATTTAGCCTT	CCCTAAAGGG GGGATTTCCC
5001	AGCCCCCGAT TCGGGGGCTA	TTAGAGCTTG AATCTCGAAC	ACGGGGAAAG TGCCCCCTTC	CCGGCGAACG GGCCGCTTGC	TGGCGAGAAA ACCGCTCTTT
5051	GGAAGGGAAG CCTTCCCTTC	AAAGCGAAAG TTTCGCTTTC	GAGCGGGCGC CTCGCCCGCG	TAGGGCGCTG ATCCCGCGAC	GCAAGTGTAG CGTTCACATC
5101	CGGTCACGCT GCCAGTGCGA	GCGCGTAACC CGCGCATTGG	ACCACACCCG TGGTGTGGGC	CCGCGCTTAA GGCGCGAATT	TGCGCCGCTA ACGCGGCGAT
5151	CAGGGCGCGT GTCCCGCGCA	CAGGTGGCAC GTCCACCGTG	TTTTCGGGGA AAAAGCCCCT	AATGTGCGCG TTACACGCGC	GAACCCCTAT CTTGGGGATA
5201	TTGTTTATTT AACAAATAAA	TTCTAAATAC AAGATTTATG	ATTCAAATAT TAAGTTTATA	GTATCCGCTC CATAGGCGAG	ATGAGACAAT TACTCTGTTA
5251	AACCCTGATA TTGGGACTAT	AATGCTTCAA TTACGAAGTT	TAATATTGAA ATTATAACTT	AAAGGAAGAG TTTCCTTCTC	TATGAGTATT ATACTCATAA
5301	CAACATTTCC GTTGTAAAGG	GTGTCGCCCT CACAGCGGGA	TATTCCCTTT ATAAGGGAAA	TTTGCGGCAT AAACGCCGTA	TTTGCCCTCC AAACGGAAGG
5351	TGTTTTTGCT ACAAAAACGA	CACCCAGAAA GTGGGTCTTT	CGCTGGTGAA GCGACCACTT	AGTAAAAGAT TCATTTTCTA	GCTGAAGATC CGACTTCTAG
5401	AGTTGGGTGC TCAACCCACG	ACGAGTGGGT TGCTCACCCA	TACATCGAAC ATGTAGCTTG	TGGATCTCAA ACCTAGAGTT	CAGCGGTAAG GTCGCCATTC
5451	ATCCTTGAGA TAGGAACTCT	GTTTTGCCCC CAAAAGCGGG	CGAAGAACGT GCTTCTTGCA	TTTCCAATGA AAAGGTTACT	TGAGCACTTT ACTCGTGAAA
5501	TAAAGTTCTG ATTTCAAGAC	CTATGTGGCG GATACACCGC	CGGTATTATC GCCATAATAG	CCGTATTGAC GGCATAACTG	GCCGGGCAAG CGGCCCGTTC
5551	AGCAACTCGG TCGTTGAGCC	TCGCCGCATA AGCGGCGTAT	CACTATTCTC GTGATAAGAG	AGAATGACTT TCTTACTGAA	GGTTGAGTAC CCAACTCATG
5601	TCACCAGTCA AGTGGTCAGT	CAGAAAAGCA GTCTTTTTCGT	TCTTACGGAT AGAATGCCTA	GGCATGACAG CCGTACTGTC	TAAGAGAATT ATTCTCTTAA
5651	ATGCAGTGCT TACGTCACGA	GCCATAACCA CGGTATTGGT	TGAGTGATAA ACTCACTATT	CACTGCGGCC GTGACGCCGG	AACTTACTTC TTGAATGAAG
5701	TGACAACGAT ACTGTTGCTA	CGGAGGACCG GCCTCCTGGC	AAGGAGCTAA TTCCTCGATT	CCGCTTTTTT GGCGAAAAAA	GCACAACATG CGTGTGTGAC

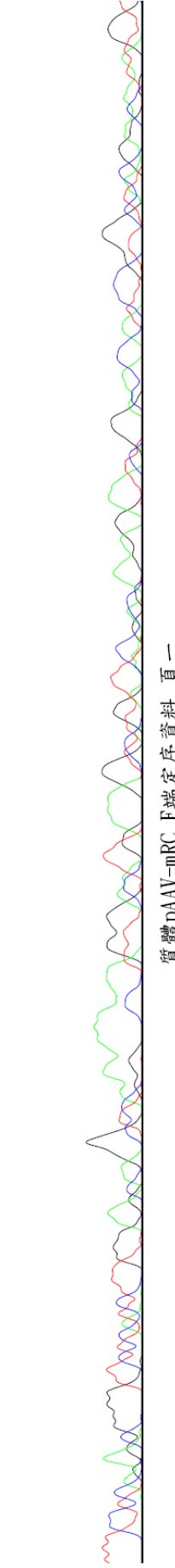
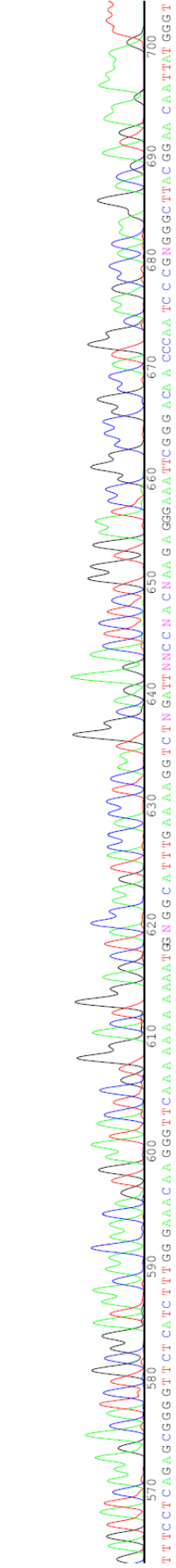
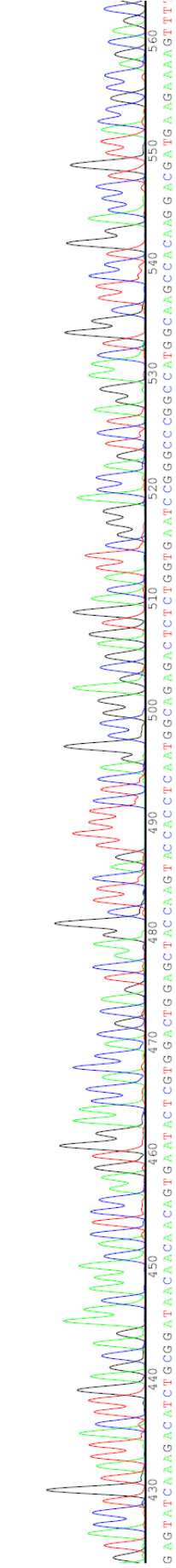
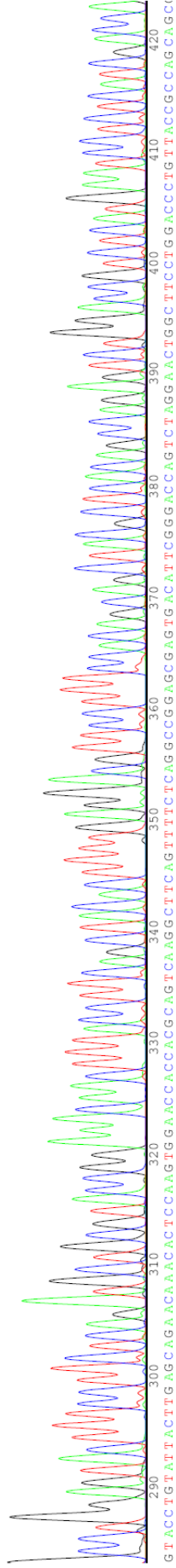
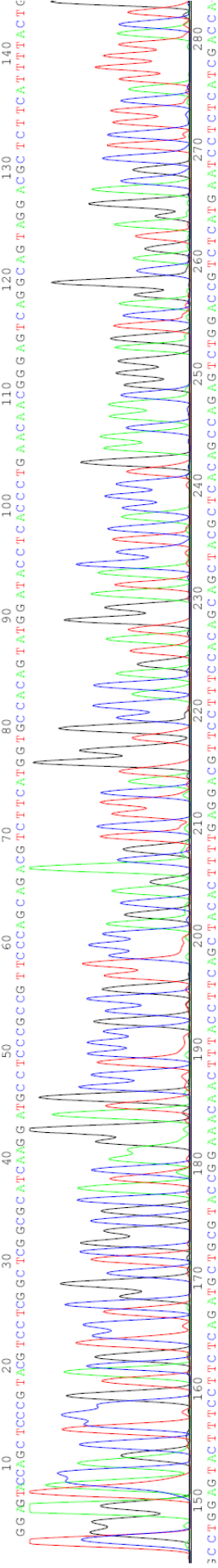
5751	GGGGATCATG CCCCTAGTAC	TAACTCGCCT ATTGAGCGGA	TGATCGTTGG ACTAGCAACC	GAACCGGAGC CTTGGCCTCG	TGAATGAAGC ACTTACTTCG
5801	CATACCAAAC GTATGGTTTG	GACGAGCGTG CTGCTCGCAC	ACACCACGAT TGTGGTGCTA	GCCTGTAGCA CGGACATCGT	ATGGCAACAA TACCGTTGTT
5851	CGTTGCGCAA GCAACGCGTT	ACTATTAAC TGATAATTGA	GGCGAACTAC CCGCTTGATG	TTACTCTAGC AATGAGATCG	TTCCCGGCAA AAGGGCCGTT
5901	CAATTAATAG GTTAATTATC	ACTGGATGGA TGACCTACCT	GGCGGATAAA CCGCCTATTT	GTTGCAGGAC CAACGTCCCTG	CACTTCTGCG GTGAAGACGC
5951	CTCGGCCCTT GAGCCGGGAA	CCGGCTGGCT GGCCGACCGA	GGTTTATTGC CCAAATAACG	TGATAAAATCT ACTATTTAGA	GGAGCCGGTG CCTCGGCCAC
6001	AGCGTGGGTC TCGCACCCAG	TCGCGGTATC AGCGCCATAG	ATTGCAGCAC TAACGTCTGTG	TGGGGCCAGA ACCCCGGTCT	TGGTAAGCCC ACCATTCCGGG
6051	TCCCGTATCG AGGGCATAGC	TAGTTATCTA ATCAATAGAT	CACGACGGGG GTGCTGCCCC	AGTCAGGCAA TCAGTCCGTT	CTATGGATGA GATACCTACT
6101	ACGAAATAGA TGCTTTATCT	CAGATCGCTG GTCTAGCGAC	AGATAGGTGC TCTATCCACG	CTCACTGATT GAGTGACTAA	AAGCATTGGT TTCGTAACCA
6151	AACTGTCAGA TTGACAGTCT	CCAAGTTTAC GGTTCAAATG	TCATATATAC AGTATATATG	TTTAGATTGA AAATCTAACT	TTTAAACTTT AAATTTTGAA
6201	CATTTTTAAT GTAAAAATTA	TTAAAAGGAT AATTTTCCTA	CTAGGTGAAG GATCCACTTC	ATCCTTTTTG TAGGAAAAAC	ATAATCTCAT TATTAGAGTA
6251	GACCAAAATC CTGGTTTTAG	CCTTAACGTG GGAATTGCAC	AGTTTTTCGTT TCAAAAGCAA	CCACTGAGCG GGTGACTCGC	TCAGACCCCG AGTCTGGGGC
6301	TAGAAAAGAT ATCTTTTCTA	CAAAGGATCT GTTTCCTAGA	TCTTGAGATC AGAACTCTAG	CTTTTTTTCT GAAAAAAGA	GCGCGTAATC CGCGCATTAG
6351	TGCTGCTTGC ACGACGAACG	AAACAAAAAA TTTGTTTTTT	ACCACCGCTA TGGTGGCGAT	CCAGCGGTGG GGTCGCCACC	TTTGTTTGCC AAACAAACGG
6401	GGATCAAGAG CCTAGTTCTC	CTACCAACTC GATGGTTGAG	TTTTTCCGAA AAAAAGGCTT	GGTAACTGGC CCATTGACCG	TTCAGCAGAG AAGTCGTCTC
6451	CGCAGATACC GCGTCTATGG	AAATACTGTT TTTATGACAA	CTTCTAGTGT GAAGATCACA	AGCCGTAGTT TCGGCATCAA	AGGCCACCAC TCCGGTGGTG
6501	TTCAAGAACT AAGTTCTTGA	CTGTAGCACC GACATCGTGG	GCCTACATAC CGGATGTATG	CTCGCTCTGC GAGCGAGACG	TAATCCTGTT ATTAGACAAA
6551	ACCAGTGGCT TGGTCACCGA	GCTGCCAGTG CGACGGTCAC	GCGATAAGTC CGCTATTCAG	GTGTCTTACC CACAGAAATG	GGGTTGGACT CCCAACCTGA
6601	CAAGACGATA GTTCTGCTAT	GTTACCGGAT CAATGGCCTA	AAGGCGCAGC TTCCGCGTGC	GGTCGGGCTG CCAGCCCGAC	AACGGGGGGT TTGCCCCCA
6651	TCGTGCACAC AGCACGTGTG	AGCCCAGCTT TCGGGTCGAA	GGAGCGAACG CCTCGCTTGC	ACCTACACCG TGGATGTGGC	AACTGAGATA TTGACTCTAT
6701	CCTACAGCGT GGATGTCGCA	GAGCTATGAG CTCGATACTC	AAAGCGCCAC TTTCGCGGTG	GCTTCCCGAA CGAAGGGCTT	GGGAGAAAGG CCCTCTTTCC
6751	CGGACAGGTA GCCTGTCCAT	TCCGGTAAGC AGGCCATTTC	GGCAGGGTCG CCGTCCCAGC	GAACAGGAGA CTTGTCCCTCT	GCGCACGAGG CGCGTGCTCC
6801	GAGCTTCCAG CTCGAAGGTC	GGGGAAACGC CCCCTTTGCG	CTGGTATCTT GACCATAGAA	TATAGTCTCG ATATCAGGAC	TCGGGTTTCG AGCCCAAAGC
6851	CCACCTCTGA GGTGGAGACT	CTTGAGCGTC GAACTCGCAG	GATTTTTGTG CTAAAAACAC	ATGCTCGTCA TACGAGCAGT	GGGGGGCGGA CCCCCGCCT



6901	GCCTATGGAA	AAACGCCAGC	AACGCGGCCT	TTTTACGGTT	CCTGGCCTTT
	CGGATACCTT	TTTGCGGTCG	TTGCGCCGGA	AAAATGCCAA	GGACCGGAAA
6951	TGCTGGCCTT	TTGCTCACAT	GTTCTTTTCT	GCGTTATCCC	CTGATTCTGT
	ACGACCGGAA	AACGAGTGTA	CAAGAAAGGA	CGCAATAGGG	GACTAAGACA
7001	GGATAACCGT	ATTACCGCCT	TTGAGTGAGC	TGATACCGCT	CGCCGCAGCC
	CCTATTGGCA	TAATGGCGGA	AACTCACTCG	ACTATGGCGA	GCGGCGTCGG
7051	GAACGACCGA	GCGCAGCGAG	TCAGTGAGCG	AGGAAGCGGA	AGAGCGCCCA
	CTTGCTGGCT	CGCGTCGCTC	AGTCACTCGC	TCCTTCGCCT	TCTCGCGGGT
7101	ATACGCAAAC	CGCCTCTCCC	CGCGCGTTGG	CCGATTCATT	AATGCAGCTG
	TATGCGTTTG	GCGGAGAGGG	GCGCGCAACC	GGCTAAGTAA	TTACGTCGAC
7151	GCACGACAGG	TTTCCCGACT	GGAAAGCGGG	CAGTGAGCGC	AACGCAATTA
	CGTGCTGTCC	AAAGGGCTGA	CCTTTCGCCC	GTCACTCGCG	TTGCGTTAAT
7201	ATGTGAGTTA	GCTCACTCAT	TAGGCACCCC	AGGCTTTACA	CITTATGCTT
	TACACTCAAT	CGAGTGAGTA	ATCCGTGGGG	TCCGAAATGT	GAAATACGAA
7251	CCGGCTCGTA	TGTTGTGTGG	AATTGTGAGC	GGATAACAAT	TTCACACAGG
	GGCCGAGCAT	ACAACACACC	TTAACACTCG	CCTATTGTTA	AAGTGTGTCC
7301	AAACAGCTAT	GACCATGATT	ACGCCAA		
	TTTGTGATA	CTGGTACTAA	TGCGGTT		



File: 14.9-6MRC-PVP3F(67) Run Ended: Jan 17, 2006, 12:37:41 Signal G:429 A:260 T:292 C:553 Comment:  
Sample: 9-6MRC-PVP3F(67) Lane: 14 Base spacing 10.11 968 bases in 12097 scans Page 1 of 2









L14 peptide		TP A549.1	C2C12 12.51	GE11	RG2 P2L
胜肽片段長度	14 個胺基酸	20 個胺基酸	12 個胺基酸	12 個胺基酸	8 個胺基酸
	細胞株 或者 細胞受器	B16F10	C2C12	RG2	RG2
		<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
		皮膚	肌肉		腦 (神經膠細胞)
隨機胜肽庫	—	a vast library of peptides for identifying ligands	Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit	landscape f8-1/8-mer phage display library	
噬菌體種類	—	fd phage	fd phage	M13 bacteriophage	Filamentous phage
胜肽片段位置	—	Minor coat protein pIII	Minor coat protein pIII	Minor coat protein pIII	Major coat protein, pVIII
Copies/viron	—	5copies	5copies	5copies	4000copies
構型逼迫式與否	—	否	否	否	否

附錄七，載入胜肽導引式基因傳遞系統的胜肽片段性質

引子名稱	長度	5' RES	序列	Tm*3
pVP3F (BsiWI)	21mer	BsiWI	5' ACGGTTCAGGTGTTTACTGAC 3'	54.9°C
pVP3R (XcmI)	20mer	XcmI	5' CATCTCTGTCCAGAGACC 3'	57.4°C
VP3BamHI F	34mer	BamHI	5' TCATGGATCCGAACTAATACGATGGCTACAGGCA 3'	54.4°C
VP3NE XhoI R	35mer	XhoI	5' TAGACTCGAGCCCCAGATTACGAGTCAGGTATCTGG 3'	57.0°C
MVP3F*1	46mer		5'GTATCTACCAAACCTCCAGGCAGGCAATGCGCAAGCAGCTACCGCAG 3'	37.8°C /82.8°C
MVP3R*1	30mer		5'CTGGAGGTTGGTAGATACAGAACCATACTG 3'	37.8°C /59.6°C
M2VP3F*1	36mer		5' GGCTAGCGGAGCGGCCCGCAAGCAGCTACCGCAGA 3'	68.4°C /85.1°C
M2VP3R*1	39mer		5' CGCGGCCGCTCCGCTAGCCTGGAGGTTGGTAGATACAGA 3'	68.4°C /81.1°C
IIF*2	37mer		5' CTAGCACTTTTGCCCTCCGCGGTGATAATCCACAAGC 3'	75.9°C
IIR*2	37mer		5' GGCCGCTTGTGGATTATCACCCGGAGGGCAAAAGTG 3'	80.6°C
TP. A549 F*2	67mer		5'CTAGCATGACCGTGTGTGCAACGCGAGCCAGCGCCAGGCGCATGCCGA GGCGACCGCGGTGAGCCTGGC 3'	99.7°C
TP. A549 R*2	67mer		5'GGCCGCCAGGCTCACCCGGTCCCTGGCCATGGCCCTGGCGCTGGC TCGCGTTGCACACCGGTCA TG 3'	100°C

GE11 F*2	43mer	5' CTAGCTATCAATTGGTATGGCTATACCCCGCAGAACGTGATTGC 3'	74.9°C
GE11 R*2	43mer	5' GGCCCGCAATCACGTTCTGCGGGTATAGCCATACCAATGATAG 3'	79.2°C
C2C12 12.51 F*2	43mer	5' CTAGCACCGCGCGGCAACATAAAGAAGAAGAACTGATTGC 3'	80.5°C
C2C12 12.51 R*2	43mer	5' GGCCCGCAATCAGTTCTTCTTTATGTTGCCCGCGCGGTG 3'	84.5°C
RG2 P2L F*2	31mer	5' CTAGCGATTATGATATGACCAAAAACACCGC 3'	64.1°C
RG2 P2L R*2	31mer	5' GGCCCGCGGTGTTTGGTCAATATCATAATCG 3'	70.2°C

附錄八，引子序列

\*1，用於 site-directed mutagenesis 之引子。

\*2，直接互補黏合之引子。

\*3，扣除非互補序列，使用 Vector NTI 進行 Tm 值的計算。



AAV antibody	A1	A69	B1	D3	A20	C24-B	C37-B
Specificity in immunoprecipitations	VP1, complexes with VP1	VP1, VP2, complexes containing VP1 or VP2	VP1, VP2, VP3	VP1, -2, and -3; capsids	Capsids	Capsids; VP1, -2, and -3(weakly)	Capsids; VP1, -2, and -3(weakly)
Western blot	VP1* <sup>1</sup>	VP1, VP2	VP1, VP2, VP3* <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND
Neutralization of AAV-2 infection				-	+	+	+
Recognized epitope sequence	KRVLEPLGL	LNFGQTGDADSV	IGTRYLTR	SRNWLPGPCY	HYFGYSTPWG, VFMVPQ	ND	SADNNNSEYSWT, LPGMVWQDRD
IgG subclass	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Capsid ELISA				+	+	+	+
AAV-2 ELISA				+	+	+	+
Application			+		+		
Affinity chromatography							
Immunoblotting	+	+	+		-		
Immunoprecipitation	+	+	+		+		
Immunohistochemistry	+	+	+		+		
Immunofluorescence	+	+	+		+		
ELISA	+		+		+		
Neutralization					+		

\*<sup>1</sup>A1 reacts with VP 1 of adeno-associated virus. In immunoprecipitation, an occasional reaction with a non-AAV derived protein is found.

\*<sup>2</sup>The antibody is useful for characterization of different stages of infection.

附錄九，可以辨識 AAV2 的抗體