

國立交通大學

生物科技學院
生化工程研究所

碩士論文

建構一個可藉由細菌細胞壁肽類調控的基因表現系統
Construction of a muropeptide regulatory expression system



研究生：楊上知

指導教授：廖光文 博士

中華民國九十五年七月

目錄 I

圖表 II

附錄 III

中文摘要 1

英文摘要 3

第一章 緒論 5

 第一節 利用誘發性轉錄因子所建構的基因調控系統 . . . 8

 一、熱感應驅動 8

 二、輻射感應驅動 9

 三、藥物感應驅動 11

 3-1 : 雙體藥物驅動模式 dimerization on
 switch 11

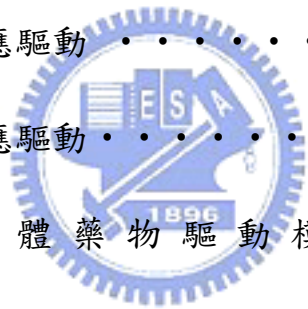
 3-2 : 利用異體的基因調控來關閉基因表現的系統模式
 allosteric off system 14

 3-3 : 利用異體的基因調控來開啟基因表現的系統模式
 allosteric on switch 16

 3-3-1 : mifepristone (RU486) 調控型 . . . 16

 3-3-2 : ecdysone systems 18

 3-3-3 : reverse tet 調控系統 19



第二節 抗生素與抗藥性基因的調控	
(β-lactamase) 的調控機制	21
第二章 實驗策略與流程	23
第一節、用 β-lactamase 的基因調控系統來作為調控型啟動子的設計基礎	23
第二節、用 VP16 的修飾來作為真核轉錄系統的應用	24
第三節、建構雙質體的 muropeptide 誘導基因表現的調控系統	24
第四節、實驗流程	25
第三章 實驗材料與方法	27
第一節、ampR 基因的取得	27
一、Morganella morganii subsp .morganii DNA 的取得	27
1-1：菌種的取得與培養	27
1-2：抽取 Morganella morganii subsp .morganii DNA	27
二、聚合酶連鎖反應以增福 ampR	28
2-1：ampR 引子的設計	28
2-2：聚合酶連鎖反應	29
三、洋菜膠電泳分析	30



四、PCR 產物純化	30
第二節、表現型 (expression) 與反應型(response)質體的 構築	31
一、表現型質體構築	31
1-1 表現 ampR-VP16 質體的建構	31
1-1-1：ampR 片段黏合	31
1-1-2：質體轉型	32
1-1-3：菌液 PCR	33
1-1-4：質體少量 DNA 分離	33
1-1-5：限制酶切割	34
1-1-6：DNA 定序及比對	35
1-1-7：質體 DNA 大量分離	35
1-1-8：VP16 的引子設計與聚合酶連鎖反應	36
1-1-9：接合 VP16 於 POST-I-ampR 中	37
1-1-10：linker 的引子設計	38
1-1-11：接合 linker 於 ampR-VP16 中間	39
1-1-12：設計新引子, 利用聚合酶連鎖反應將 ampR-linker-VP16 增幅出來	39
1-1-13：接合 ampR-linker-VP16 於 PC3.1 骨架質體	40

1-2 : ampR 表現型質體的構築	41
二、反應型質體的建構	42
2-1 : SV40-ARE-hrGFP 的構築	42
2-1-1 : SV40 的接合	42
2-1-2 : 接合 SV40 到 POST-I 上	43
2-1-3 : hrGFP 基因的取得	43
2-1-4 : 接合 hrGFP 至 SV40 之後	44
2-1-5 : ARE 的引子設計	45
2-1-6 : 接合 ARE 於 SV40-hrGFP 之間	45
2-2 : ARE-hrGFP 質體的構築	46
2-2-1 : 新 ARE 的引子設計	46
2-2-2 : 接合新 ARE 序列至 PC3.1-hrGFP 上	47
第三節 : 質體轉染	47
3-1 : seeding cells	47
3-2 : 質體轉染	48
第四節 : 微脂體包覆 muropeptide 的複合體準備	49
4-1 : muropeptide 的取得	49
4-2 : 自製微脂體包覆 muropeptide 複合體的準備	49
第五節 : ampR-VP16 蛋白質表現與 DNA 結合作用試驗	49

第六節：流式細胞分析儀	50
6-1:FACS 開機之前置作業	50
6-2:分析檢品之模式檔案使用程序	51
6-3:FACS 關機及清洗程序	54
第七節：TNF- α 及 IL-1 β 之 ELISA 測試	55
7-1：TNF- α	55
7-2：IL-1 β	56
第八節 統計分析	57
第四章 實驗結果	58
一、Morganelle <i>Morganelle</i> DNA 與 ampR 基因的取得	58
二、表現型 (expression) 與反應型 (response) 質體的構築	59
三、ampR-VP16 質體功能性測試 (蛋白質表現測試)	63
四、ampR, ampR-VP16, SV40-ARE-hrGFP, ARE-hrGFP 質體經共同轉染後交互作用測試結果	64
五、Muropeptides (inducer) 對於質體共同轉染影響的測試	65
六、Muropeptides (inducer) 的免疫性測試	67



第五章 實驗討論 68

第六章 參考文獻 73



II

圖一、利用穩定及常態性表現型的啟動子調控基因表現。其基因表現量與表現時間的關係	76
圖二、利用可調控型的啟動子調控基因表現。其基因表現量與表現時間的關係	76
圖三、dimerization on switch 的調控模式	77
圖四、Rapamycin 的調控模式	77
圖五、Tetracycline turn-off 的調控模式	78
圖六、RU486 調控系統模式	78
圖七、Tetracycline turn-on 的調控模式	79
圖八、 β -lactamase 基因活化的調控機制	80
圖九、利用 mucopeptide 活化 ampR 後與 ARE 的相互作用，以開啟下游報導基因	81
圖十、利用 VP16 來修飾原本 ampR 的原核生物轉錄因子，以達到於真核生物中應用的目的	81
圖十一、利用共同轉染 1. 表現型質體，2. 反應型質體至真核細胞中，測試在此雙質體的建構系統下，加入誘導物後使得報導基因開啟的現象	82
圖十二、建構雙質體基因調控系統所需要的質體類型	83
圖十三、本實驗的建構及測試實驗流程	83

圖十四、ampR 聚合酶連鎖反應電泳圖	84
圖十五、ampR 在兩種菌株 (pp19 與 B172) 中的胺基酸序列比較	85
圖十六、經由限制酶切割反應後得到 ampR 的 DNA 片段	86
圖十七、經由聚合酶反應後得到 VP16 的 DNA 片段	86
圖十八、經由限制酶切割反應後得到 VP16 的 DNA 片段	87
圖十九、經由限制酶切割反應後確認 CMV-ampR-linker-VP16 及 CMV-ampR 兩種表現型質體	88
圖二十、經由聚合酶連鎖反應後得到的 SV40 DNA 片段	89
圖二十一、經由限制酶切割反應後得到 SV40 的 DNA 片段	89
圖二十二、經由限制酶切割反應後得到 hrGFP 的 DNA 片段	90
圖二十三、經由限制酶切割反應後得到正接 hrGFP 的 DNA 片段	90
圖二十四、經由限制酶 (MluI 及 XhoI) 切割反應後確認 ARE 接合於 SV40-ARE-hrGFP 上	91
圖二十五、經由限制酶 (SpeI 及 XhoI) 切割反應後確認 ARE 接合於 -hrGFP 上	92
圖二十六、利用微粒小體與 ARE 的複合體測試表現型質體的功能 性	93
圖二十七、ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染結果	94
圖二十八、ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染結果	95

圖二十九、ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染結果 96

圖三十、ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染結果 97

圖三十一、ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染並加入
muropeptide 的結果 98

圖三十二、ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropeptide 的
結果 99

圖三十三、ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropeptide 的
結果 100

圖三十四、ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropeptide 的結
果 101

圖三十五、ampR-VP16 與 SV40-hrGFP 及 SV40-ARE-hrGFP 共同轉
染 102

圖三十六、ampR-VP16 與-hrGFP 及 ARE-hrGFP 共同轉染的結果 . 103

圖三十七、ampR 與 SV40-hrGFP 及 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染結果 104

圖三十八、ampR 與-hrGFP 及 ARE-hrGFP 共同轉染並的結果 . . 105

圖三十九、muropeptide 及微脂體對於 P338/D1 細胞產生 TNF- α 表現
量的影響 106

圖四十、誘導物及微脂體對於 P338/D1 細胞產生 IL-1 β 表現量的影
響 107



III

附錄 1 : CMV-ampR-linker-VP16 108

附錄 2 : CMV-ampR 115

附錄 3 : SV40-ARE-hrGFP 121

附錄 4 : ARE-hrGFP 126

附錄 5 ampR gene (strain B172) 132



建構一個可藉由細菌細胞壁胜肽調控的基因表現系統

學生：楊上知

指導教授：廖光文 博士

國立交通大學 生化工程研究所 碩士班

中文摘要：

在近來的基因治療發展中，許多研究報導發現表現基因應受到調控，以避免副作用的產生或是加強其療效。因此，一個有效率而且受外在因子調控的啟動子，對於基因治療上的應用是很重要的。在本論文的研究目的便是建構出一個可受外在因子調控的啟動子。在一些抗盤尼西林類的菌種中，具有抗藥相關的轉錄因子-ampR 已經被發現，而細菌的細胞壁胜肽 (muropeptide) 是此抗藥機制的誘導物。我們以這個抗藥性機制做為調控基因表現的基礎模式。這個基因調控系統有 2 大種類的質體，一種是常態性表現以 ampR 為主體的轉錄因子，另一種主要是帶有 ampR 結合位置 (ARE) 及報導基因 (hrGFP)。在這個建構下，我們將兩種質體同時轉染進入細胞後，在沒有加入 muropeptide 時，發現報導基因具有一定表現量。而在加入 muropeptide 後，在報導基因的表現上有兩種情況：1. 以 ampR 為系統的主要轉錄因子，則報導基因的表現量降低。2. 以 ampR-VP16 為系統的主要轉錄因子，則報導基因的表現量增加。從這個實驗結果中可以知道這個新建構的系

統，可以應用於開啟或是關閉下游基因表現的基因調控。再者，因為 muropeptide 是構成細菌細胞壁的單元物，若將來應用於生物體時，可能會引起類似菌血症的發炎反應，所以針對 muropeptide 進行了發炎反應的測試。在 $TNF-\alpha$ ，及 $IL-1\beta$ 的測試結果中發現，muropeptide 不會引起 $TNF-\alpha$ 及 $IL-1\beta$ 產生。經由這些實驗測試我們所建構的 muropeptide 基因調控系統後，我們確定可以利用 muropeptide 來調控基因的表現。將來，如果將我們所建構的 muropeptide 調控系統修是更理想的時候，我們可以將此系統與一些其它已經發表且市售化的基因調控系統作個結合，設計出一個多方調控基因表現的基因治療程序。



Construction of a muropeptide regulatory expression system

Students: Shang chih Yang

adviser : Dr Kuang Wun

Liao

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract:

A lot of reports in recent years have pointed out that the gene expression should be regulated to avoid it from being uncontrollable and to improve its efficacy. The purpose of our research is to construct a promoter which can be regulated by an external factor.

Some kinds of bacteria have already been found to be resistant to penicillin. The mechanism of the drug resistance is associated with a transcription factor, ampR, and an inducer, the muropeptide. Based on this mechanism, we designed a regulatory gene expression system in which one plasmid containing ampR or ampR-VP16 is constantly expressed whereas the other containing

ampR response element (ARE) and a reporter gene, hrGFP, is inducible. After co-transfection, hrGFP was constantly expressed without muropeptide. But with the addition of muropeptide, two situations were observed. In the system of ampR as the main transcription factor, the expression of hrGFP was low. However, in the system of ampR-VP16 as the main transcription factor, the expression of hrGFP was enhanced.

Moreover, because muropeptide is a unit that forms the cell wall of a bacterium, we carried out some in vitro tests to rule out the possibility of an immune response. TNF- α and IL-1 β were not enhanced in our assay, indicating that muropeptide will not elicit an immune response. As a result, the regulatory system we have constructed is applicable to turn on and off a gene by muropeptide.

第一章 緒論

在人類文明與科技的發展過程中，『醫療』一直是一個我們無法忽視的重要環節，因為疾病的發生往往造成了我們物質與精神上的損耗，更甚者，奪取了我們的生命。而至目前為止，治療疾病最常使用的方式就是口服、注射藥物或是外科手術。但是，這些方式是否已經足夠用來治療至目前為止已知的疾病呢？答案顯然是否定的。因為現在醫學技術的研究發展已經到了分子層次，使得我們瞭解到一些疾病產生的原因，是由於基因的損壞或是缺陷，例如：癌症，遺傳性疾病…等等。因此，如果我們能夠修補或是替換這些不正常的基因，這些疾病或許就能夠被我們所控制以及治療。

『基因治療』，便是在這個理念下所產生的新療法，而許許多多的科學家也致力於研究及發展一個安全、有效的基因治療的療程。在 1990 年美國 Blaese 博士及其團隊成功地將正常的 ADA (adenosine deaminase) 基因殖入病人（先天性免疫不全症）的淋巴球，完成基因治療第一個成功的案例 (Blaese 1993)。雖然，這樣看起來好像基因治療是個可行的醫療方式，但是也有許多不成功的案例告訴我們，對於這個新穎的醫療領域，還有許多的問題需要我們去發現及解決。

在基因治療技術的研究中，比較被重視的一個方向，是傳送治療基因的方式。因為將治療基因以高效率、高安定性的方式傳送到目標

細胞或是組織，是基因治療的必要條件。但是，近年來的研究發現到，除了傳送治療基因的方式需要改進，到了目標細胞或是組織後，內在的基因調控也是非常重要的一個環節，因為有了良好的基因表現方式，除了可以有效的表現出治療基因外，也不會引起身體太大的副作用。一般而言，利用啟動子調控基因的方式有 2 種：1.利用穩定及常態性表現的啟動子 (promoter) 調控，2.利用可調控性的啟動子調控 (Clackson 2000)。這兩種形式的調控方式所達到的治療目的各有不同，我們可以從以下的圖解中瞭解到各自的特色 (圖一，圖二)。

利用穩定及常態性表現的啟動子調控，可以知道這種方式可以使得基因產物穩定的表現出來，雖然表現的量有高有低 (取決於啟動子的能力)，但是只要是選擇適當的啟動子，就可以使表現量在基因治療所需的範圍內。但是，這種方式不能夠停止這個治療基因的表現，有可能造成過多的基因產物，而使身體產生不良的反應。

利用可調控的啟動子，我們可以控制治療基因表現的時間，在投以誘導物之後，會使得該啟動子表現下游基因，而使此基因產物達到治療用的量。而當我們完成了治療後，就可以停止投以誘導物，這樣會使得啟動子不再表現下游的治療基因。這樣一來，就可以避免身體大量累積治療基因的產物。

由此比較後，可以知道，可調控性的啟動子在基因治療的應用上

是很有幫助的。所以，我們便想要設計一個可以受到誘導物調控的啟動子，作為將來基因治療可以使用的一個原件。

在生物體中，由遺傳基因轉錄成 mRNA 進而轉譯成蛋白質的過程是一個複雜而且具有多方調控的步驟。在這個基因表現的過程中，最基本的步驟就是基因 DNA 經由酵素（RNA polymerase）作用產生一條互補的 RNA 片段，簡言之就是將 DNA 上的遺傳密碼傳遞給 RNA。這個過程便稱為『轉錄』。

一般而言，轉錄的過程可以分成 3 個階段：1. 轉錄起始：RNA polymerase 藉由一些轉錄因子的幫助座落於該基因的啟動子上。2. 核糖核酸延展：RNA polymerase 將核糖核酸依 5' 往 3' 端方向以共價鍵結合。3. 轉錄終止：當 RNA polymerase 辨識到一些代表轉錄終止的基因序列時，便會離開，轉錄作用亦即停止。由此可知，轉錄因子與啟動子或是上游的強化子（enhancer）相互結合作用是控制著轉錄起始的一個重要步驟。針對基因調控的相關研究中，有一種藉由外加四環黴素（tetracycline）來控制基因的表現與否的系統已經被發展出來（Gossen and Bujard 1992）。這個研究結果可以給我們兩個想法：第一，原核生物的轉錄因子經過加入 VP16 轉錄活化區的修飾後，可以應用在真核生物的基因調控上。第二，原核生物的抗藥性基因表現與抗生素調控的作用機制，例如盤尼西林與抗藥性基因 ampC (β

-lactamase)的相互作用關係 (Poirel, Guibert et al. 1999)可以作為一個基因調控的系統架構。參考並結合這兩種研究成果，或許是我們設計一個新的基因調控系統的重要資訊來源。關於這些研究發現以及其相關的背景，接下來的文章便逐一介紹之。

第一節 利用誘發性轉錄因子所建構的基因表現系統

在基因調控系統的建構上，一般是利用特殊的轉錄因子作為調控系統的應用。此種轉錄因子都有因為外來因子（誘導物）的影響而對下游基因的轉錄動作有促進或是抑制的特性。以下的內容就針對現在已經被發展出來的調控型基因表現系統做個間單的分類與介紹。




一、熱感應驅動

在生物體的基因調控中，有一類的基因表現模式是藉由溫度上的變化而開啟基因產物的轉錄，而這種調控類型的啟動子便稱之為熱感應啟動子（Heat-sensitive promoters）。在相關的文獻報導中，其中一種啟動子的設計便是由熱休克蛋白 70（Heat-shock protein 70）的啟動子所構成 (Vekris, Maurange et al. 2000)。在細胞實驗中經由此段啟動子所驅動的下流報導基因綠色螢光基因（GFP），會在加熱至 43°C 後的 20 至 30 分鐘到達最大表現量。在動物體實驗中，將區

域性部位升溫 5 至 8°C，而熱休克蛋白 70 的啟動子也會在這個時期開啟了轉錄動作 (Madio, van Gelderen et al. 1998)。所以藉由對於溫度變化有反應的啟動子，可以設計出由溫度調控的基因表現系統。不過，藉由溫度的變化來達到基因調控的效果，在應用上及控制基因表現的效果，都不是很理想的一種基因調控方式，所以還有其它類型的基因調控系統被發展出來，接下來介紹的是第二種：經由輻射驅動基因表現的調控模式。

二、輻射感應驅動



在癌症的治療方式中，有一部份的治療法是利用放射線照射癌細胞使其死亡而達到治療的目的。因應這種治療方式，一些研究者希望能夠藉由輻射感應驅動的啟動子，來表現治療基因以輔助放射線治療的療效。在相關的研究報導中發現，當細胞暴露在游離輻射下，生長相關一號基因 (Egr-1, growth response 1 gene) 的轉錄會有活化的現象。此外也有研究者發現，當細胞接受輻射照射後，會促進細胞核因子 κB (Nucler Factor- κB) 的表現以及其與DNA的結合能力 (Weichselbaum, Hallahan et al. 1991; Weichselbaum, Hallahan et al. 1994)。藉由這些研究報告，基因治療的研究者建立了藉由輻射驅動的啟動子。其中一種設計是利用早期生長相關基因 (Egr-1；例如

Ziff/288) 的啟動子與其特定DNA結合序列CC [A / T]₆GG (CArG)建構而成 (Datta, Rubin et al. 1992)。Weichselbaum等研究者利用Egr-1 的啟動子表現一種輻射敏感的細胞素:腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor - α)。在細胞實驗中,利用輻射線照射帶有此段輻射調控表現載體的造血細胞株HL525,在接受輻射照射後,發現TNF- α 的表現量是原始細胞株的 2.4 倍 (Weichselbaum, Hallahan et al. 1994)。而在輔助放射線治療為目的的基因治療設計中,有研究者這將治療用基因HSVtk藉由Egr-1 啟動子表現,發現帶有此輻射調控治療基因片段的細胞對於ganciclovir的敏感度比起原始細胞更加敏感。所以藉由輻射調控基因表現的系統,可以在活體外及活體內的實驗中被證實具有基因調控的效果。不過,使用輻射線當作誘導物的方式並不是一般人可以接受的一種治療方式,主要是因為輻射線本身對於正常細胞一樣具有強的殺傷力。所以,除了使用放射線治療的病患之外,此種基因調控方式並不理想。所以,接下來要介紹的第三種系統是利用外加藥物的方式來調控基因表現。除了在調控方式上是比較能讓大部分人接受外,還有在調控基因表現上的便利性。

三、 藥物感應驅動

在基因表現方式的研究中，有一種調控的系統是藉由一些小分子與其相對應的轉錄因子作用，使得下游基因進行轉錄或是停止轉錄。而這種模式的基因調控，大致上可以分為三類：1. 雙體藥物驅動模式（dimerization on switch），2. 利用異體的基因調控來關閉基因表現的系統模式（allosteric off system），3. 利用異體的基因調控來開啟基因表現的系統模式（allosteric on system）。藉由這三大類型的藥物調控系統，做為表現基因上的應用。接下來就逐段介紹這3大類的調控系統。



3-1：雙體藥物驅動模式（dimerization on switch）

此種調控系統的概念，主要是應用了轉錄因子的主要特色：區域獨立性。一般來說，轉錄因子的結構組成都含有兩個主要的區域，一個是辨識啟動子上的特殊 DNA 序列進而座落於上的 DNA 結合區域。另一個則是可與其它轉錄因子共同作用而使得轉錄啟始的活化區域。這兩個區域除了可以獨立存在，而且也可以在分離的狀況下還能保有各自原有的功能性。但是轉錄的啟始必須要兩個功能性區域同時存在才可以啟動，缺一不可。所以有一種研究蛋白質相互作用關係的方式：酵母菌雙結合系統（yeast two-hybrid system）便是利用轉錄因子的

這種特性建構而成。同樣的，dimerization on switch 的建構方式便是在特殊轉錄因子的這兩個功能性區域分別加入雙體藥物結合區域，藉由添加的雙體藥物來使得兩個功能性區域結合在一起，轉錄便得以進行。利用此種調控方式可以利用添加藥物的形式來達到開啟或是關閉啟動子的作用。意指，如果想要使該啟動子開啟下游基因的表現時，便加入完整的雙體藥物，使得轉錄因子的 DNA 結合區域跟活化區域可以結合在一起而啟動了轉錄進行。而想要停止該基因表現時，便可以加入過量的單體藥物，使得兩個區域的藥物結合區都達到飽和，因為結合位內的都是單體藥物，所以兩個區域便無法相結合使得轉錄停止 (Ho, Biggar et al. 1996)。其作用機制如 (圖三) 所示。

由於一些免疫抑制藥物便是屬於異構雙體 (heterodimerizers)，這或許是個可以拿來利用於建構雙體藥物驅動的啟動子 (Belshaw, Ho et al. 1996)。一些研究者如 Rivera 等等 (Rivera, Clackson et al. 1996) 利用 Rapamycin 驅動的基因調控便是屬於這種雙體藥物驅動的系統。Rapamycin 調控系統主要是利用 Rapamycin 可以與 FKBP (FK506 binding protein 12)，還有其相似蛋白質脂質磷酸激酶 FRAP

(FKBP-rapamycin-associated protein) 相互結合的反應作為雙體藥物調控的基礎。其中 FRAP 加上了與 Rapamycin 結合區域的修飾稱為 FRB。所以，利用 FKBP 結合轉錄因子的 DNA 結合區域和 FRAP 結合轉錄

因子的活化區域，由此構成 Rapamycin 驅動的基因調控系統。其建構模式如下（圖四）所示。

利用 Rapamycin 的調控系統中，對於報導基因的表現，其背景值是相當低的，而當加入雙體藥物時，其表現量的增加顯著（大約 10,000 倍）。為了測試其在基因治療上的應用性，有相關的文獻是利用經實驗修飾後能穩定表現此調控系統的細胞（其報導基因為人類生長賀爾蒙 human growth hormone, hGH），將這群細胞移植到裸鼠的身上，再經由靜脈注射 Rapamycin 之後（劑量為 0.3-10mg/kg），發現在裸鼠的血清中偵測到 hGH 的表現。同樣的，在沒有施打 Rapamycin 時，在其血清中所偵測到的 hGH 是幾乎可忽略的（Magari, Rivera et al. 1997）。所以，由以上這些實驗來看，這種模式的調控系統是個很好的選擇。不過，因為 Rapamycin 以及其它相關的雙體藥物，會造成抑制生物體免疫系統的現象，因為他們和原本生物體內的 FKBP 以及 FRAP 也會相互作用，雖然有些研究者經由修飾後的 Rapamycin 來解決這個缺失，不過，還有其它種類的調控模式是可以再開發測試的，以下的文章便介紹第二種模式。

3-2：利用異體的基因調控來關閉基因表現的系統模式

allosteric off system

最早被應用於這種調控模式的系統是由 Gossen 和 Bujard 所建構的 Tetracycline (tet) 基因關閉系統 (Gossen and Bujard 1992)。在這個系統中，是利用了大腸桿菌的 tet repressor (TetR) 接合皰疹病毒的 VP16 活化區域作為真核轉錄因子的活化區。這個經由修飾後的 TetR 便稱為 tTA (transactivator)。此 tTA 會經由 TetR 的 DNA 結合區域辨識 tet operator (tetO) 中的特定序列後座落於上。在這個設計下，在沒有加入 tetracycline 或是其衍生物時，tTA 會座落於 tetO 上，經由後方的 VP16 轉錄活化區，使得真核細胞的轉錄系統啟動，進而開啟下游的基因。當加入了 tetracycline 或是其衍生物之後，便使得其 DNA 結合區域產生構形上的改變而不再結合於 tetO 之上。因此，原本開啟的基因轉錄，便隨著 tTA 的離開而停止。其調控模式如 (圖五) 所示。

在生物體的實驗中，因為 tetracycline 與其衍生物對於真核細胞的毒性較低，所以可以經由加入動物飲用的水中來控制該實驗動物體中的 tet-off 基因調控系統。對於這個系統的相關應用，不論生物體外，或是生物體內的實驗，都有相當多的研究文獻已經被發表出來。例如利用此調控系統來研究細胞週期調控蛋白的作用 (Lukas,

Petersen et al. 1996; Fan and Bertino 1997)，或是病毒蛋白質的研究 (Floettmann, Ward et al. 1996; Cooke, Coates et al. 1997)。在此調控系統建立後，有許多形式的修飾都被發展出來。例如：利用組織特異性的啟動子來表現 tTA，使得此調控系統可以在特定的組織中表現 (Yu, Redfern et al. 1996)。還有載體的多樣性建構，像是單一質體 (single plasmid) (Schultze, Burki et al. 1996)，反轉錄病毒質體 (retrovirus plasmid) (Hofmann, Nolan et al. 1996)，腺相關病毒質體 (adeno-associated virus plasmid) (Bertran, Miller et al. 1996)…等等。

雖然，這種形式的跨物種基因調控系統已經被許多研究者所修飾改良。不過，這個系統仍然有一些不理想的缺失在應用於基因治療上。

1. 這個系統的『關閉』模式，並不是很適合於基因治療的應用。2. 這個系統的高背景值也是一個很大的問題，高背景值的缺點會讓這個系統失去安全性以及調控嚴謹性的基本要求 (Gossen and Bujard 1992)。所以，還有最後一種調控模式是基於這樣的不適用性改良而來，以下文章便加以介紹之。

3-3：利用異體的基因調控來開啟基因表現的系統模式

allosteric on system

在基因治療的應用上，利用藥物停止基因表現的模式是不理想的，因為要停止治療基因的表現，就必須一直給予藥物，這樣子轉錄才能夠停止。但是，要是利用這種調控系統而必須持續服用藥物，可以想見的，這樣一定會對生物體的正常生理造成影響。所以，開發出相反的調控機制（意旨：投以藥物後，會使得下游基因表現出來，而在停止給予藥物後則下游基因停止表現。）會是一個更能應用於往後基因治療的基因調控模式。基於這個理念之下，一些研究者開發出幾種不同的調控系統，例如：利用 mifepristone (RU486) (Burcin, Schiedner et al. 1999)，ecdysone systems (No, Yao et al. 1996)，與 reverse tet (Deuschle, Meyer et al. 1995) 藥物調控系統。以下，就針對這三種已發展的調控系統分別介紹之。

3-3-1：mifepristone (RU486) 調控型

這個基因調控系統的發展主要是因為研究黃體脂酮受體而來的。一些研究者利用消除式突變法 (deletion mutation) 將人類的黃體脂酮受體 (progesterone receptor) 突變掉。經過這個修飾之後，會使得黃體脂酮受體不再與人體內的黃體脂酮或是其它內生性類固醇結合，

反而會與黃體脂酮的競爭藥物 RU486 結合 (Baulieu 1989)。這個意外的發現，讓建構基因調控的研究者有了利用 RU486 做為基因調控誘導物的構想。在這個系統中的人造轉錄因子是由酵母菌的轉錄因子 Gal4 的 DNA 結合區加上經由修改過的黃體脂酮受體 RU486 結合區，和疱疹病毒的 VP16 活化區所建構而成 (Tsai, O'Malley et al. 1998)。其作用的模式如 (圖六) 所示。

利用這個基因調控系統的相關應用研究例如：利用轉殖基因小鼠含有在肝臟區域性表現 (利用組織特異性的啟動子)RU486 調控系統，經由此系統來表現人類生長賀爾蒙 (hGH)的基因 (Wang, DeMayo et al. 1997)。實驗結果也是如預期的，在沒有誘導物 RU486 的時候，在小鼠血清中的 hGH 濃度相當低，但是在加入 RU486 之後，hGH 在血清中的濃度便有顯著的增加。經由這些實驗的驗證，看來這個系統是個可以穩定表現而且有效誘導的調控式基因表現系統。不過，RU486 是個會影響類固醇類賀爾蒙調控生理現象的藥物，在啟動這個基因調控系統的同時，也影響了該生物體的正常生理運行。所以，還是可以基於這個理念來發展新的調控系統，但是得避免使用的誘導物會對於生物體產生不良影響。接下來要介紹的便是基於這個想法下所產生的改良式建構。

3-3-2 ecdysone systems

在生物體內的基因調控中，有一種方式是利用類固醇類賀爾蒙與其受體經由交互作用後可開啟或是關閉特殊基因的轉錄動作 (Yarranton 1992)。所以，如果經由上文所介紹的 RU486 來做為調控基因的誘導物，那一定會影響著許多經由類固醇類賀爾蒙所控制的基因調控。為了改善這個缺點，有一些研究者改用果蠅體內的類固醇 ecdysone 與其細胞核受體 (EcR) 當作基因調控的部分。受體接合 ecdysone 的區域稱為 Ec-binding domain，將這個區域與其它轉錄因子的 DNA 接合區，例如：大腸桿菌的 *lexA* 以及轉錄因子活化區，疱疹病毒的 VP16 融合在一起而成為一個新的人造調控型轉錄因子 (Christopherson, Mark et al. 1992)。也有一些改良過的轉錄因子被發表出來，像是原本使用 *lexA* 的 DNA 結合區改成直接使用 EcR 做為 DNA 結合區。對於這個系統的生物體外實驗測試，也是具有低背景值以及顯著的誘發基因轉錄的效果 (大約是 10,000 倍於背景值的表現量) (No, Yao et al. 1996)。不過，關於這個系統的動物體實驗就比較少有研究來驗證這個系統應用於基因治療的效果以及可能的缺點。

3-3-3 reverse tet 調控系統

這個調控系統是根據原本的 Tet-off 系統所改良而來的。一些研究者希望能夠藉由一些修改的方式，使得原本加入 tetracycline 的關閉基因機制，變成開啟基因的模式。而主要的修改有兩種：第一種是將 TetR 與強力的轉錄抑制區域結合在一起，例如：人類 Kox1 鋅指蛋白（zinc finger protein）的 Kruppel-associated box（KRAB）區域』，使得這個新的融合蛋白會座落於基因上游約幾千個鹼基對左右的位置，進而抑制了該基因的轉錄動作，在加入 tetracycline 之後則會去除這個抑制的活性，恢復原始的轉錄。這種形式的調控最多可以使得基因表現在開啟轉錄後是 50 倍於抑制時的基因表現量（Deuschle, Meyer et al. 1995）。

第二種方式則是利用化學突變的方法對原始的 TetR 進行突變，從突變的 TetR 中篩選出新的 TetR，其篩選的條件是只有加入 Tetracycline 時，這個新的 TetR 才會座落於 tetO 中特定的結合區域（Gossen, Freundlieb et al. 1995）。而利用這個新的 TetR，再將其與 VP16 的活化區融合在一起成為一個轉錄活化因子（transactivator）取名為 rtTA（reverse transactivator）。其作用的模式如（圖七）所示。

在細胞實驗中，利用這個新的轉錄因子所調控的報導基因，同樣

的，具有低背景值與高誘發的特性（在加入 Tetracycline 後大約是 1,000 倍的報導基因表現量）。後來，有研究者發現到利用 tetracycline 的衍生物 doxycycline 誘導的基因表現狀況，在這個系統下更勝於原本 tetracycline 誘導基因表現的能力。而在動物實驗方面，有研究者將此調控系統放入小鼠中成為基因轉殖小鼠，利用其報導基因 (luciferase) 的表現來測試這個系統在活體中的基因調控性。而誘導物則是使用了 doxycycline 取代原本的 tetracycline。加入誘導物的方式是將 doxycycline 放入小鼠的飲用水中，經由小鼠飲用後來誘導其調控系統的表現 (Kistner, Gossen et al. 1996)。實驗結果發現，在轉殖基因小鼠的胰臟中，其報導基因的表現量在有誘導物 (doxycycline) 存在的時候最多有 10,000 倍的增加。可以說是相當顯著的調控性基因表現。另外也有研究者利用了 rtTA 這個基因調控系統控制著分泌型的治療用蛋白質 (erythropoietin, EPO)。因為在小鼠模型中，EPO 刺激了紅血球的生成 (Bohl, Naffakh et al. 1997)。在這個實驗中作者利用了兩種不同的反轉錄病毒將這個調控系統與報導基因放入小鼠體內，其中一種是帶有骨骼肌專一性表現的啟動子 (skeletal-muscle-specific promoter) 用以表現 rtTA。另一種是帶有報導基因 EPO，接在 tetO 的後方。也是如之前實驗所得到的結果，在加入 doxycycline 之後，其報導基因的表現量有了 70 倍以上的增

加。此外，在這個實驗中也發現到，單獨一個質體（tetO-EPO）存在的時候，還是有基礎的報導基因表現，所以推論出 tetO 有基本的基因表現量，對於這個有背景基礎值表現的缺點，有許多研究者也針對這個部分做相關的修飾，希望能達到更低的背景值，以達到一個理想的基因調控系統。

第二節 抗生素與抗藥性基因的調控（ β -lactamase 的調控機制）

在介紹完基因調控的系統後，我們可以知道有一種類型的基因調控系統是藉由原核生物產生抗藥性所使用的基因調控機制而衍生出來的。所以，我們也可以利用這個設計理念來建構我們的調控系統。其中一種抗盤尼西林類抗生素的抗藥性機制，是被研究多年的一種抗藥性機制，下面就針對這種類型的抗藥性調控機制做個介紹。

在各式各樣的抗藥性的菌種中，有一類是會對抗盤尼西林類抗生素的家族（*Enterobacteriaceae*）包括 *Citrobacter freundii*，*Enterobacter cloacae*，*Morganella morganii*，*Serratia marcescens*，還有 *Yersinia enterocolitica* (Poirel, Guibert et al. 1999)。而他們的抗藥性是源自於會產生 β -lactamase 這種抗藥性蛋白質的因素。有一些研究者的研究發現，這種抗藥性基因的表現，與該細菌的細胞壁成分 muropeptide 有關係 (Jacobs, Huang et al. 1994)。根

據這些文獻的資料，盤尼西林類的抗生素會與細菌細胞膜上之盤尼西林結合蛋白 (penicillin-binding proteins) 結合，抑制了其原本的功能而產生破壞細菌生長的能力。主要是因為細菌細胞壁之主要成分為 peptidoglycan，主要的骨架由 peptidoglycan 聚合體以鏈狀交錯而成。在這個鏈狀交錯的步驟中，需要盤尼西林結合蛋白作為肽轉移酶 (transpeptidase)。故此蛋白被抑制則會影響細菌細胞壁之生成，使其產生弱點。有的細菌因內部張力很大，會自行破裂。而乙內醯胺與盤尼西林結合蛋白結合時也會使某些細菌產生自體溶解作用，而使細菌死亡。而在細菌細胞壁弱化的過程中，會產生大量的細胞壁單元體 muropeptide，這些單元體經由運輸蛋白運進細菌體內後，會與調控 β -lactamase 表現相關的轉錄因子 ampR 作用。ampR 在沒有與 muropeptide 結合時，是以抑制子的型態抑制 ampC (β -lactamase) 的表現。當 muropeptide 與 ampR 結合時，便會使得 ampR 由原來的抑制子型態轉變成活化子型態，此時 ampC 基因的轉錄才得以開始且使其活化 ampC (β -lactamase) 的基因轉錄。其作用模式如 (圖八) 所示。所以，這種抗盤尼西林類的菌種，是藉由 muropeptide 及調控型轉錄因子 ampR 的相互作用來調控抗藥性基因 ampC (β -lactamase) 的基因表現狀況。

第二章：實驗策略與流程

第一節：利用 β -lactamase 的基因調控機制來作為調控型啟動子的基礎設計。

在 β -lactamase 的基因調控研究中，經由之前的研究者的研究成果，已經知道表現出 β -lactamase 的基因是 ampC。在相關的研究中，發現與調控 ampC 表現有關的轉錄因子是命名為 ampR 的調控蛋白，而且這個轉錄因子會受到 mucopeptide 這個誘導物的出現而有開啟基因轉錄的作用。所以，我們便想利用 ampR 這個調控型的轉錄因子當作我們製作調控型啟動子的主要調控原件。所以，我們從一些文獻中找到 ampR 的基因與 ampR 結合的 DNA 特殊序列（我們稱之為 ARE，ampR response element）（Poirel, Guibert et al. 1999）。利用這參考資料中所提供的兩樣原件，我們便可以設計一個調控型的啟動子原型。其概念如（圖九）所示。

雖然，我們可以利用這個在原核生物中的調控型轉錄因子來當作我們調控型啟動子的原件。不過，我們的設計理念是希望這個調控系統能夠應用於真核生物的轉錄系統中，所以，我們必須再加上其它的原件使得這個系統可以在真核生物中表現應用。

第二節：利用 VP16 的修飾來作為真核轉錄系統的應用

在之前的研究者所建構的 Tetracycline 基因調控系統中，也是利用了原核生物的轉錄因子（TetR）來做為基因調控的主要原件，而他們同樣的必須要把這個原核的轉錄系統轉換到真核生物的體內中作應用，所以當時他們使用了皰疹病毒的 VP16 蛋白 (Triezenberg, Kingsbury et al. 1988)，因為這個蛋白質具有真核生物的轉錄活化區。所以，如果將這個部分與原本的 ampR 接和在一起的話，應該就可以達到跨物種的目的。因此，我們便想修飾一下原本的設計，接合 VP16 於 ampR 的後方。其概念如（圖十）所示。

利用這個修飾，相信可以將我們想利用的 ampR 調控型轉錄因子，使用於真核生物的轉錄系統中。



第三節：建構雙質體的 muropeptide 誘導基因表現的調控系統

在 tetracycline 的調控系統建構中，建構者利用了雙質體的方式，分別是一個帶有常態性表現調控型轉錄因子（rtTA or tTA）的質體，與一個帶有此調控型轉錄因子結合位置與報導基因的質體。經由共同轉染後便可以在生物體外或是生物體內的實驗中測試調控系統的功能性與誘發性。根據這個雙質體在建構已經被實驗證明是可行且有效的測試該基因調控系統 (Gossen and Bujard 1992)，我們便想要

參考這個雙質體的模式，來建構我們所想建構的 muropeptide-ampR 的基因調控系統。在我們建構的雙質體中，其一是藉由常態性表現型的啟動子來表現調控型轉錄因子，另一個則是帶有轉錄因子結合位和報導基因的質體。將這兩個質體共同轉染進入細胞中，其後加入誘導物 (muropeptide) 來使得報導基因表現。實驗策略圖如 (圖十一) 所示。

第四節：實驗流程

本實驗主要是要建構與測試利用 muropeptide-ampR 調控型轉錄因子來作為基因調控的啟動子的可行性。如前所述，我們想用雙質體的模式來建構這個調控型的啟動子。所以，我們首先要構築我們所要利用的質體，含有以下五種類型 (圖十二)。

在構築完成這五個質體，經過定序確定序列無誤後，我們便準備要進行活體外細胞轉染實驗。接下來的實驗便分為三個部分進行。第一、將經由轉染常態型表現 ampR-VP16 質體的細胞經過抽取蛋白質的步驟後，做以下的分析 1. 測試此蛋白質表現的情況。2. 測試此蛋白質在誘導物的出現與否和其 DNA 結合位置的作用關係。第二、經由兩兩質體配對後共同轉染，測試其共同細胞轉染造成的報導基因表現情況。第三、在重複第二部份的共同細胞轉染後，加入誘導物來測試誘導物對於這個調控系統的影響。此外，因為我們所使用的誘導物為細

菌細胞壁的成分，所以將來如果要應用於生物體時必須考慮其引起免疫反應（菌血症）的可能性。為此，我們在測試完誘導物對於調控系統的影響後，也測試了此誘導物的免疫性反應。整個實驗架構流程簡圖如（圖十三）所示。



第三章 實驗材料與方法

第一節 ampR 基因的取得

一、Morganella morganii subsp .morganii DNA 的取得

1-1：菌種的取得與培養

菌種的選擇是根據參考文獻中所應用的菌種 *Morganella morganii* subsp .morganii (Poirel, Guibert et al. 1999)，由財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (<http://www.bcrc.firdi.org.tw>) 購買其菌株名為 B172 的菌株。培養方式是利用 LB medium (10g Tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl / 1L)。



1-2：抽取 *Morganella morganii* subsp .morganii 的 DNA

首先，將原始菌種置入 5 ml 的 LB 在 37°C 搖菌培養箱中培養 18 小時，過程中利用 ampicillin (50 μ g/ml) 5 μ l 加入其中以篩選具有抗藥性的原始菌種。將 5ml 的菌液分次以 13000rpm 的速度離心於 1.5ml 的離心管中。去除上清液後以 467 μ l 的 ddH₂O 重新懸浮細菌，加入 30 μ l 10% SDS 及 3 μ l 20mg/ml proteinase K。混和均勻後，放在 37°C 的水浴槽 1 小時。依次加入各 250 μ l 的 phenol 與 chloroform。蓋緊蓋子後，上下搖晃使內容物均勻混和。將此混和物以 13000rpm 的速度離

心 2 分鐘。將離心完的上清液移至新的 1.5ml 的離心管中，再依次加入各 250 μ l 的 phenol 與 chloroform。蓋緊蓋子，再次上下搖晃以混和均勻。以 13000rpm 的速度離心 2 分鐘。將上清液移至新的 1.5ml 離心管中，加入 1/10 體積的 3M sodium acetate。加入 3M sodium acetate 後再加入 0.6 倍體積的 isopropanol，並輕輕混和內容物。將此混和物在 4°C 下以 12000rpm 的速度離心 30 分鐘。移除上清液，加入 1ml 70% 的酒精，再次於 4°C 下以 12000rpm 的速度離心 5 分鐘。移除上清液，確定管內無 70% 酒精殘留後以 100 μ l 的無菌水將 DNA 溶解。

二、聚合酶連鎖反應以增幅 ampR

2-1：ampR 引子的設計

ampR 的序列尋找是藉由 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 網站中搜尋 (Nucleotide 中搜尋 ampR 基因) 而得到。我們尋找到的 ampR 基因其 accession number 為 AJ620115，基因序列由起始密碼開始，而終於停止密碼。由此設計一對引子以增幅全長為 876 個鹼基對的 ampR 基因。

引子序列如下表所示：

名稱	序列	TM
ampR 5'	5' - atg gtc aga cgt tat ctc ccc-3'	57

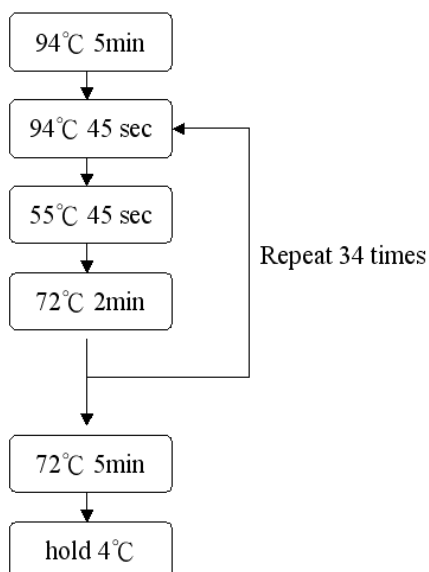
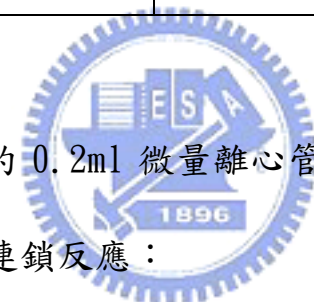
ampR 3'	5' - atcg ctgcag cgc cgc cgc cgt att cag-3'	55
---------	---	----

2-2：聚合酶連鎖反應

將已抽好的Morganii DNA取約 1 μ g置入 0.2 ml的PCR專用微量離心管中，接下來依次將 5' ampR引子 (10 μ M)，3' ampR引子 (10 μ M)，10xBuffer，2.5mM dNTP，Taq polymerase，ddH₂O加入其中。其總反應內容物及使用量如下表所示：

Template	5' primer	3' premer	10xbuffer	2.5mMdNTP	Taq	ddH ₂ O	Total
3 μ l	1 μ l	1 μ l	5 μ l	4 μ l	1 μ l	35 μ l	50 μ l

將上述配製好的 0.2ml 微量離心管置入 PCR 反應機中以下列的反應條件開始聚合酶連鎖反應：




反應完成後，將完成之產物以洋菜膠電泳分析其 DNA 片段大小。

三、洋菜膠電泳分析

洋菜膠電泳分析是以 0.8~1.5% 之洋菜膠、1 倍 TAE buffer 電泳液，置入水平電泳槽中。使用 100 伏特開始電泳 50 分鐘，電泳結束後將洋菜膠浸泡於 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 之 ethidium bromide 溶液中，染色 10-15 分鐘，再於蒸餾水中退染 10 分鐘。最後將洋菜膠取出，使用 Uni-photo gel image system (EZ lab) 照相系統，在波長 365 nm 之紫外光下觀察增幅產物，利用 marker 觀測產物大小，並照相及存檔。

四、PCR 產物純化



我們使用 (Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit) 來純化我們經由PCR反應後的產物。首先先取binding buffer，其取用量依照該PCR產物體積的 5 倍量加入欲純化的PCR產物中。混和均勻後將此混和液移至kit所附的spin column-collection tube中 (先將spin column與collection tube結合在一起)。以 12000~14000rpm的速度離心 30 秒鐘~1 分鐘。將離心至collection tube中的混和液移除，重新裝回spin column後加入 700 μl washing solution，加完之後以 12000~14000rpm的速度離心 1 分鐘。將離心至collection tube中的washing solution 移除，重新裝回spin column後再次離心。離心也是以 12000~14000rpm的速度離心 3 分鐘來移除殘留的washing solution。移除collection

tube，將spin column換至新的 1.5 ml離心管中。加入 30 μ l~50 μ l 的ddH₂O。以 12000~14000rpm的速度離心 1 分鐘將已溶好PCR產物的 ddH₂O離心至 1.5ml的離心管中。完成之產物以洋菜膠電泳分析其DNA片段和測試此產物的吸光值（OD260）以定DNA的濃度。

第二節：表現型（expression）與反應型（response）質體構築

一、表現型質體構築

1-1：表現 ampR-VP16 質體的建構

利用商品化實驗套組 POST-I TA cloning Kit 將 ampR 接合至 POST-I 的質體上經由 taq 這個聚合酶所完成的聚合酶連鎖反應物，在其末端會隨機的加上核苷酸，尤其以加上 A 的機率最高。利用這個特性，便有特殊的質體（POST-I）可將我們已經經由 taq 增幅後的 ampR 基因，接合在其設計好的 T 端。

1-1-1：ampR 片段黏合

取一 500 μ l 的微量離心管，分別將 10mM 的 ATP，2xBuffer，T4 ligase，ddH₂O，還有 POST-I 質體與 ampR 純化後的產物依 1：3 的比例置入其中以進行 DNA 黏合反應。其總反應內容物及使用量如下表所示：

POST-I	ampR	2x Buffer	10mM ATP	T4 ligase	ddH ₂ O	Total
25 ng	75 ng	5 μ l	1 μ l	1 μ l	補至	10 μ l

					10 μ l	
--	--	--	--	--	------------	--

完成反應物後，將此 500 μ l 的微量離心管放置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。

1-1-2：質體轉型

取出 DNA 黏合後的產物約 3~5 μ l 加入 POST-I Kit 中所附之 competent cell 中（competent cell 先由 -80°C 冰箱中拿出後置於冰盒上退冰，待 competent cell 由固態變成熔融態後才進行實驗），用手指輕彈管壁使質體與細胞混合均勻。放置在冰上作用 30 分鐘，而後將此含有此質體與 competent cell 之微量離心管置於 42°C 水浴加熱器中進行 Heat shock 30 秒鐘，等待 30 秒鐘到後馬上將之取出，放回冰上靜置 2 分鐘。加入 250 μ l 不含 Kanamycin 之 LB medium，在 37°C 之震盪保溫器中震盪 1 小時。將 1 個含 50 μ g/ml Kanamycin 之 LB 培養基先放在 37°C 之震盪保溫器中回溫 30 分鐘。1 小時後取出震盪完成之菌液，加入 100 μ l 於事先回溫之培養基中，將菌液塗抹均勻後培養 17-20 小時。隔日再進行挑菌即可。

1-1-3：菌液 PCR

隔日在培養基挑選數個菌落置於 3 ml 含 Kanamycin (濃度 30 μ g/ml) 之 LB medium 中，於 37°C 震盪保溫器中進行震盪 (200rpm)，培養 17-20 小時後收取菌液。每一管菌液取 0.1 μ l 作為模板，之後再依次加入 SP6 及 T7 的 primer 各 1 μ l，dNTP, Taq buffer, ddH₂O，以及 Taq (反應總體積為 50 μ l) 進行 PCR 反應，其反應循環順序為：94°C 10 分鐘 (用以打破細菌之細胞壁，使其基因外露)，94°C 1 分鐘，50°C 0.5 分鐘，72°C 1 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成。完成之產物進行洋菜膠體電泳，在此進行 PCR 可幫助我們初步確認目標基因是否成功插入載體中。



1-1-4：質體 DNA 之小量分離法

用 Gene-spin™ Miniprep purification kit (波仕特，台灣，中華民國)。取經 PCR 確認的 2.5 ml 隔夜培養之菌液置於 1.5 ml 之微量離心管中，分次以高速離心機離心 13000 rpm 在 4°C 下各離 1.5 分鐘。移除上清液。取 200 μ l Solution I 懸浮沈澱之菌塊。加入 200 μ l Solution II，翻轉微量離心管 6-8 次，而後置於室溫 5 分鐘。加入 200 μ l Solution III，同樣翻轉微量離心管 6-8 次，而後置於冰上作用 5 分鐘。以 13000 rpm 的速度在 4°C 下離心 5 分鐘。將套組中所附之膠體管柱安插入 1.5 ml 之收集管中，將離心後所得之上清液小心加入管柱

中，以 13000 rpm 的速度在 4°C 下離心 1 分鐘。將收集管中之廢液丟棄，再重新和膠體管柱組合。加入 700 μ l 之 Wash solution，以 13000 rpm 的速度在 4°C 下離心 1 分鐘以清洗管柱。移除廢液後再將此膠體管柱與收集管之組合體，以 13000 rpm 的速度在 4°C 下離心 3 分鐘，以將管柱中多餘的水分一併移除。事先將已滅菌之 ddH₂O 加溫至 60-70°C，將膠體管柱移至一新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 20-50 μ l 之加溫 ddH₂O，以 13000 rpm 的速度在 4°C 下離心 1 分鐘，以分離出質體 DNA。利用 OD260 測試其 DNA 濃度。此小量之質體 DNA 用以供作後續限制酶切割作用及定序之用。



1-1-5：限制酶切割

使用限制酶切割反應進一步確認基因是否已插入載體中。取一 0.5ml 微量離心管，加入 1 μ g 之質體 DNA，50 mg/ml 之 BSA 0.2 μ l，2.0 μ l 之 10X buffer，再加入 0.5 μ l (5U) 之限制酶 EcoR I，及 PST I (Promega, Madison, USA)，反應總體積為 20 μ l，不足的量則以滅菌之 ddH₂O 補齊。短暫離心後置於 37°C 之水浴加熱器中作用 3 小時。該反應產物以 1.5% 洋菜膠體電泳進行分析。

1-1-6：DNA 定序及比對

將經過 PCR 及限制酶切割反應初步確認構築完成之質體，從其中挑選出 3 個交與波仕特公司進行定序之工作（台灣，中華民國）。完成後將存成電腦檔「筆記本」形式之基因序列複製。利用 AlignX 軟體（vector NTI 中序列比對工具軟件），將定序後的結果與原先在 NCBI 搜尋到的序列做比對。

1-1-7：質體 DNA 之大量分離法

使用 Nucleobond AX 大量質體 DNA 分離套組（Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland），將隔夜培養之 100ml 菌液（已經經由定序確認後）加入高速離心管中。於 4°C 下以 8000 rpm 的速度離心 15 分鐘，而後倒掉上清液。將離心後所得之菌塊以 S1 buffer 4ml 懸浮完全（S1 buffer 在使用前需先加入套組中所附之冷凍乾燥 RNase，加入 RNase 之 S1 buffer 需存放於 4°C 冰箱保存）。加入 4ml 之 S2 buffer，立刻上下翻轉高速離心管 6~8 次，然後靜置在室溫中 5 分鐘，再加入 4ml S3 buffer，翻轉離心管 6~8 次，靜置於冰上 5 分鐘。在 4°C 下以 12000 rpm 的速度離心 30 分鐘。在開始離心步驟後，開始將 N2 buffer 2.5ml 加到膠體管柱中用以平衡，而後將離心完成之上清液全部加入膠體管柱中，任其自然通過管柱。以 N3 buffer 10ml 流洗管柱，並再重複此動作一次。將流洗完全之膠體管柱以套組中之圓形膠

環固定於新的 50 ml 離心管內，加入 5 ml 之 N5 buffer 將管柱中之質體 DNA 流洗出來。將流洗出之質體 DNA 分裝至 1.5 ml 之微量離心管內，每管放 0.83 ml，總計 6 小管，加入 0.7-0.8 體積之 Isopropanol (Sigma, Steinheim, Germany)，在 4°C 下以 13000 rpm 的速度離心 30 分鐘。在 Laminar flow 中將 Isopropanol 倒掉，此時應可見沈澱於管底之 DNA 團塊，之後每管加入 1ml 之 70% 無菌酒精懸浮質體 DNA。再次在 4°C 下以 13000 rpm 的速度離心 10 分鐘。在 Laminar flow 中將上層酒精液丟棄，倒放微量離心管令其靜置 5 分鐘以風乾質體 DNA。之後以 20 μ l 之無菌二次蒸餾水溶解 DNA，而後取 1 μ l 溶解完全之質體 DNA 稀釋 60 倍，以分光光度計 (Eppendorf, Hamburg, Germany) 測其濃度。分離完成之質體 DNA 置於 -20°C 冰箱中保存。

1-1-8：VP16 的引子設計與聚合酶連鎖反應

VP16 的轉錄活化區的模板序列是由市售商品化的質體 pRevTet-On™ Vector (BD Biosciences) 所得到。引子設計也是藉由此質體的序列資料所得到。

其引子的設計如下。

名稱	序列	TM
VP16 5'	5' -ATCGCTGCAG TCC GCG TAC AGC CGC GCG-3'	57
VP16 3'	5' -ATCGCTCGAG CTA CCC ACC GTA CTC GTC AA-3'	55

藉由聚合酶連鎖反應將 VP16 的基因片段增幅出來。其反應流程為 94°C 45 秒，55°C 45 秒，72°C 1 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成。最後將 PCR 所得到的產物用 1.5 % 洋菜膠進行電泳分析。

1-1-9：接合 VP16 於 POST-I-ampR 中

利用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化好 VP16 的 PCR 產物後，再經由 1.5% 洋菜膠進行電泳分析其 DNA 片段及測試 OD260 以確定其 DNA 濃度。將已經確認好之純化後的 VP16 產物，還有已經經由大量 DNA 分離後的 POST-I-ampR 產物進行限制酶切割，以 0.5 μ l (5U) 之限制酶切割 1 μ g DNA 的比例進行反應。在此所利用的限制酶為 PstI 及 XhoI。在限制酶反應完成後分別以 1.5%，0.8% 洋菜膠電泳分析進行 DNA 片段確認。確認完成後再以 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化此 DNA 產物。經由測試其 OD260 來確定 DNA 的濃度。接下來要進行 DNA 接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的 POST-I-ampR，及 VP16 DNA 片段以 1：3 的比例進行 DNA 接合的反應。將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液 PCR，小量質體 DNA

分離，限制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。
完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於-20°C
冰箱之中。

1-1-10：linker 的引子設計

在完成 POST-I-ampR-VP16 的質體後，為了增加 ampR 與 VP16 之間
的自由度，避免 VP16 轉錄活化區因為 ampR 的結構影響了其原本的活
性。所以在 ampR 與 VP16 之間設計一個可使結構自由度變高的片段
(linker)。此 linker 的設計是由 3 個 Gly 與一個 Ser 重複三次所組
成的片段所構成，其結構如下所示：

Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser

根據這個片段的構成，轉寫成 DNA 序列以設計成引子。

引子序列如下所示：

名稱	序列	TM
linker 5'	5' -ggATATC ggA ggT ggg TCA ggT ggA ggC TCg ggC ggg ggT TCC CtgCA-3'	76.4
linker 3'	5' - ACg TCC TAT AgC CTC CAC CCA gTC CAC CTC CgA gCC CgC CCC CAA ggg-3'	76.4

將兩種引子以 1：1 的比例混合後，加熱至 95°C 10 分鐘。其後置
於室溫下使其回到室溫。在完成這個步驟後，這兩股引子便可以成為
一段雙股 DNA。

1-1-11：接合 linker 於 ampR-VP16 中間

將已經經由大量DNA分離後的POST-I-ampR-VP16 產物進行限制酶切割，以 $0.5 \mu\text{l}$ (5U)之限制酶切割 $1 \mu\text{g}$ DNA的比例進行反應。在此所利用的限制酶為PstI。在限制酶反應完成後以 0.8%洋菜膠電泳分析進行DNA片段確認。確認完成後再以Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化此DNA產物。經由測試其OD260 來確定DNA的濃度。接下來要進行DNA接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的POST-I-ampR-VP16，及 linker DNA片段以 1：3 的比例進行DNA接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液PCR，小量質體DNA分離，限制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於 -20°C 冰箱之中。

1-1-12：設計新引子, 利用聚合酶連鎖反應將 ampR-linker-VP16 增幅出來

完成 ampR-linker-VP16 的序列後，要利用 CMV promoter 將此段基因在真核細胞表現出來。因此，設計了新的 ampR 5' 端引子 (kpnI) 限制酶切位。

名稱	序列	TM
----	----	----

AmpR KpnI 5'	5' -ATC ggg TAC CAT ggT Cag Acg TTA TCT CCC-3'	69.5
--------------	--	------

利用此段引子與 VP16 3' 端引子的搭配，經由聚合酶連鎖反應將 ampR-linker-VP16 增幅出來。其反應流程為 94°C 45 秒，55°C 45 秒，72°C 3 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成。最後將 PCR 所得到的產物用 1.5% 洋菜膠進行電泳分析。

1-1-13：接合 ampR-linker-VP16 於 PC3.1 骨架質體上

利用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化好 ampR-linker-VP16 的 PCR 產物後，再經由 1.5% 洋菜膠進行電泳分析其 DNA 片段及測試 OD 260 以確定其 DNA 濃度。將已經確認好之純化後的 ampR-linker-VP16 產物，還有已經經由大量 DNA 分離後的 PC3.1 產物進行限制酶切割，以 0.5 μ l (5U) 之限制酶切割 1 μ g DNA 的比例進行反應。在此所利用的限制酶為 KpnI 及 XhoI。在限制酶反應完成後分別以 1.5%，0.8% 洋菜膠電泳分析進行 DNA 片段確認。確認完成後再以 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化此 DNA 產物。經由測試其 OD 260 來確定 DNA 的濃度。接下來要進行 DNA 接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的 PC3.1，及 ampR-linker-VP16 DNA 片段以 1:3 的比例進行 DNA 接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液 PCR，小量質體 DNA 分離，限

制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於-20°C冰箱之中。

1-2：ampR 表現型質體的構築

利用設計好的ampR引子（ampR KpnI 5' , ampR 3' ）利用PC3.1 ampR-linker-VP16 質體為模板進行聚合酶連鎖反應將ampR增幅出來。其反應流程為 94°C 45 秒，55°C 45 秒，72°C 2 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成。最後將PCR所得到的產物用 1.5%洋菜膠進行電泳分析。在確認過後，利用Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化好ampR的PCR產物，再經由 1.5%洋菜膠進行電泳分析其DNA片段及測試OD 260 以確定其DNA濃度。將已經確認好之純化後的ampR產物，還有已經經由大量DNA分離後的PC3.1 產物進行限制酶切割，以 0.5 μ l (5U)之限制酶切割 1 μ g DNA的比例進行反應。在此所利用的限制酶為KpnI及XhoI。在限制酶反應完成後分別以 1.5%，0.8%洋菜膠電泳分析進行DNA片段確認。確認完成後再以Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化此DNA產物。經由測試其OD 260 來確定DNA的濃度。接下來要進行DNA接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的PC3.1，及ampR DNA片段以 1：3 的比例進行DNA接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉

型。接下來經由菌液PCR，小量質體DNA分離，限制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於-20°C冰箱之中。

二、反應型質體的建構

2-1：SV40-ARE-hrGFP 的構築

2-1-1：SV40 的引子設計與聚合酶連鎖反應

利用 pAsRed-N1 的質體序列資料設計 SV40 的引子。

名稱	序列	TM
SV ori 5'	5' -ATC GCT CGA GG TGT GGA AAG TCC CCA GG-3'	67.9
Sv ori 3'	5' -ATC GAC TAG TGG CCT CCA AAA AAG CCT CCT-3'	64.2

將質體 pAsRed-N1 當作模板，藉由聚合酶連鎖反應將 SV40 的基因片段增幅出來。其反應流程為 94°C 45 秒，55°C 45 秒，72°C 1 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成。最後將 PCR 所得到的產物用 1.5% 洋菜膠進行電泳分析。完成反應後將 PCR 產物進行純化的動作。

2-1-2：接合 SV40 到 POST-I 上

利用Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化好SV40 的PCR產物後，再經由 1.5% 洋菜膠進行電泳分析其DNA片段及測試OD 260 以確定其DNA濃度。將已經確認好之純化後的SV40 產物，還有已經經由大量DNA分離後的POST-I產物進行限制酶切割，以 0.5 μ l (5U)之限制酶切割 1 μ g DNA的比例進行反應。在此所利用的限制酶為Hind III及SpeI。在限制酶反應完成後分別以 0.8% 洋菜膠電泳分析進行DNA片段確認。確認完成後再以Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化此DNA產物。經由測試其OD 260 來確定DNA的濃度。接下來要進行DNA接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的POST-I，及SV40 DNA片段以 1 : 3 的比例進行DNA接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12 ~ 16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液PCR，小量質體DNA分離，限制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於-20°C 冰箱之中。

2-1-3 : hrGFP 基因的取得

首先利用其它已經含有 hrGFP 的質體 (NF- κ B-hrGFP)，利用限制酶 (XbaI)切割後，利用洋菜膠確認切割狀況及 DNA 片段大小，此 hrGFP DNA 片段經由切膠回收後 (QIAquick GelExtraction Kit) 最

後將此純化後所得到的產物用 1.5% 洋菜膠進行電泳分析。

2-1-4：接合 hrGFP 至 SV40 之後

將已經確認好之純化後的hrGFP產物，還有已經經由大量質體DNA分離後的POST-I-SV40 產物進行限制酶切割，以 $0.5 \mu\text{l}$ (5U)之限制酶切割 $1 \mu\text{g}$ DNA的比例進行反應。在此所利用的限制酶為XbaI。在限制酶反應完成後分別以 0.8% 洋菜膠電泳分析進行DNA片段確認。確認完成後再以Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化此DNA產物。經由測試其OD 260 來確定DNA的濃度。接下來要進行DNA接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的POST-I-SV40，及hrGFP DNA片段以 1：3 的比例進行DNA接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液PCR，少量質體DNA分離，限制酶切割確認後送定序以確認接合的狀況與序列的正確性。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於 -20°C 冰箱之中。

2-1-5：ARE 的引子設計

利用參考文獻(Poirel, Guibert et al. 1999)的資料設計 ARE 的互補引子。

名稱	序列	TM
ARE 5'	5' -ATC GAA TTC CCT GTA AGT TTT TCT TTA GGC TCT TGT TAT AAT TAA CCG ACG CGT GAA TTC ATC-3'	69.2
ARE 3'	5' -GAT GAA TTC ACG CGT CGG TTA ATT ATA ACA AGA GCC TAA AGA AAA ACT TAC AGG GAA TTC GAT-3'	69.2

將兩種引子以 1：1 的比例混合後，加熱至 95°C 10 分鐘。其後置於室溫下使其回到室溫。在完成這個步驟後，這兩股引子便可以成為一段雙股 DNA。



2-1-6：接合 ARE 於 SV40-hrGFP 之間

將已經經由大量 DNA 分離後的 POST-I-SV40-hrGFP 產物及 ARE DNA 片段進行限制酶切割，以 0.5 μ l (5U) 之限制酶切割 1 μ g DNA 的比例進行反應。在此所利用的限制酶為 EcoRI。在限制酶反應完成後分別以 0.8 % 洋菜膠電泳分析進行 DNA 片段確認。確認完成後再以 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit 純化此 DNA 產物。經由測試其 OD 260 來確定 DNA 的濃度。接下來要進行 DNA 接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的 POST-I-SV40-hrGFP，及 ARE DNA 片段以 1：3 的比例進行 DNA 接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進

行質體轉型。接下來經由菌液PCR，小量質體DNA分離，利用限制酶（MluI及XhoI）切割來確認ARE接合的狀況。完成後送定序確認其序列無誤。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於-20°C冰箱之中。

2-2：ARE-hrGFP 質體的構築

2-2-1：新 ARE 的引子設計

利用已經帶有 hrGFP 的骨架質體 POST-I-hrGFP，找尋可用的限制酶切割位來設計 ARE 的引子（HindIII，BglIII）。

名稱	序列	TM
5' -bglIII 1copy	5' -gAT CTT CgA CTA gTC CTg TAA gTT TTT CTT TAg gCT CTT gTT ATA ATT AAC CgA-3'	71.69
3' -bglIII 1copy	5' -AgC TTC ggT TAA TTA TAA CAA gAg CCT AAA gAA AAA CTT ACA ggA CTA gTC gAA-3'	71.69

將兩種引子以 1：1 的比例混合後，加熱至 95°C 10 分鐘。其後置於室溫下使其回到室溫。在完成這個步驟後，這兩股引子便可以成為一段雙股 DNA。

2-2-2：接合新 ARE 序列至 PC3.1-hrGFP 上

將已經經由大量質體DNA分離後的PC3.1-hrGFP產物及ARE DNA片段進行限制酶切割，以 $0.5 \mu\text{l}$ (5U)之限制酶切割 $1 \mu\text{g}$ DNA的比例進行反應。在此所利用的限制酶為HindIII及BglIII。在限制酶反應完成後分別以 0.8%及 1.5%的洋菜膠電泳分析進行DNA片段確認。確認完成後再以Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extration Kit純化此DNA產物。經由測試其OD 260 來確定DNA的濃度。接下來要進行DNA接合的動作。將經由限制酶切割並純化後的PC3.1-hrGFP，及ARE DNA片段以 1:3 的比例進行DNA接合的反應，將配製好的反應物置於 16°C 低溫水域槽中約 12~16 小時後進行質體轉型。接下來經由菌液PCR，小量質體DNA分離，其後利用限制酶SpeI及XhoI進行確認接合的狀況。完成後送定序確認其序列無誤。完成確認的步驟後，將此質體以大量質體DNA分離的方式保存於 -20°C 冰箱之中。


第三節：質體轉染

3-1: seeding cells

本實驗所欲進行轉染 (Transfection) 的哺乳類細胞株為BALB/3T3 (ATCC No. CCL-163)。先將 25T flask 中之BALB/3T3 的細胞培養液 (含 10%FBS之DMEM) 倒掉，加入 3 ml之 1 X PBS潤洗細胞一遍後再吸出丟棄。加入 3 ml之Trypsine (Gibco, NY, USA)，靜置

室溫中 5 分鐘。稍微以微量吸管沖洗flask底部即可將細胞懸浮於 Trypsine 中。將 3 ml 之細胞懸浮液吸放於 15 ml 離心管中，再加入 6 ml 之 1XPBS，離心 1500 rpm，4°C，5 分鐘。去除上清液，以 1 ml 之細胞培養液懸浮 BALB/3T3，進行細胞計數。取一 6 孔盤 (Corning, NY, USA)，每一孔中加入 2.5×10^5 個細胞，再加入 3 ml 之細胞培養液，將細胞置於 37°C，5% CO₂ 之細胞恆溫培養箱進行培養，預計 24 小時後進行轉染。

3-2: 質體轉染



取 2 根玻璃管，分別標記為 A 管及 B 管，各於 2 管內加入 250 μ l 之 Opti-MEM。加入 4 μ g 質體 DNA 於 A 管中，再於 B 管中加入 10 μ l 的 lipofectamine (Invitrogen)。稍後將 2 管混合於 1 管中，靜置在室溫中作用 20 分鐘，使得質體 DNA 和 lipofectamine 能穩定的結合。將前一日 seeding 完成之 6 孔盤的 BALB/3T3 取出，將其中之細胞培養液丟棄，加入 2 ml Opti-MEM 潤洗一遍細胞。20 分鐘後，每一孔 6 孔盤之細胞加入 200 μ l 之質體 DNA/ lipofectamine 混合液，注意加入時以同心圓之方式由外往內加，使其能均勻分佈在細胞周圍，之後再加入 0.8 ml 之 Opti-MEM，仍以同心圓方式滴入。完成後置於 37°C，5% CO₂ 之細胞恆溫培養箱進行培養。隔日早上於每一孔細胞各加入 2

ml 之細胞培養液，繼續培養 48 小時。

第四節：微脂體包覆 muropeptide 的複合體準備

4-1：muropeptide 的取得

在這個基因調控系統所利用的muropeptide是由Sigma公司所出產的產品N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate (A9519)，經由ddH₂O的溶解後取得。

4-2：自製微脂體包覆muropeptide複合體的準備

將4800 μ l的1XPBS，加入100 μ l的油脂（統一大豆油），100 μ l的muropeptide (1 mg/ ml)及5 μ l 50mM的PEI (Sigma)。先利用Vortex mixer將之初步混合均勻。其後利用超音波震盪器以60%的增幅效率，脈衝間隔1秒鐘，震盪此混合物共1小時（置於冰上）。完成超音波震盪後將此混合液利用0.22 μ m孔徑的過濾膜過濾。得到的濾液則為我們所要利用的誘導物。

第五節：ampR-VP16 蛋白質表現與 DNA 結合作用試驗

在構築及轉染完表現型質體後，為了確定所構築的表現型質體可正確的利用 CMV promoter 表現出蛋白質，所以我們利用了其中的一組 (CMV-ampR-linker-VP16)來做為我們測試的對象。除了測試其蛋白質

表現狀況外，我們利用的方式也可以同時測試此蛋白質 (ampR-limker-VP16) 與其 DNA 結合位 ARE 的的相互作用關係。首先將帶有 NeutrAvidin 的 microspheres (Invitrogen) 0.5 μ l 與經由帶有 Biotin 的引子所進行的 PCR 產物 (ARE) 混合好之後靜置 15 分鐘。加入 Buffer (1%BSA 在 PBS 中) 至 50 μ l 及經由 Protein extraction 所抽取好的蛋白質 ampR-VP16，混和好之後在冰上靜置 1 小時。依次加入一級抗體 (anti-VP16) 及二級抗體 (anti-rabbit)，各作用一小時。將完成反應的產物在 4°C 下以 13000rpm 的速度離心 30 分鐘。移除離心過後的上清液，再加入 Buffer 50 μ l。最後將此混合物加入 PI (50 μ l/ml) 後以流式細胞儀分析結果。



第六節、流式細胞分析儀

6-1 FACS 開機之前置作業

6-1-1 儀器上重要部分的位置及功能：

- (1) FACS 電源開關於控制面板左側。
- (2) 鞘液 (sheath) 筒及廢液筒於控制面板右側之儲液箱內。
- (3) 樣品流速控制鈕及儀器功能控制鈕位於正面。
- (4) 檢品輸注區位於樣品流速控制鈕及儀器功能控制鈕的右側。
- (5) 電腦系統 (OS2)、MO 機 (640 MB, SCSI interface) 及

印表機 (Epson stylus 830)。

6-1-2 儲液箱之處理：

1. 鞘流液筒通常以 PBS 充填至八分滿。
2. 將廢液筒加入 400 mL 之漂白水。
3. 確實蓋緊筒蓋並將所有管路裝置妥善。

6-1-3 將FACS電源開啟，此時儀器功能控制鈕應在「stand by」，Cell Quest software (CQS) 於電腦螢幕上顯示應為「not ready」，暖機 5-10 分鐘後會自動轉成「stand by」。

6-1-4 將電腦打開，開關於鍵盤右上方按鍵「<」。

6-1-5 暖機時檢查氣壓閥方向 (開機時應朝上)，將液流過濾器中之氣泡排除，執行「prime」一分鐘以排除 FACS 中之氣泡。

6-1-6 分析樣品前先使用 FACS sheath 或 PBS 進行「high run」2 分鐘。

6-1-7 將樣品置於分析管專用管架上開始進行細胞收集。

6-2 分析檢品之模式檔案使用程序

6-2-1 從電腦螢幕上「apple」選單中選擇「Cell Quest」，可見一新視窗。

1. 從「acquire」指令欄中選取「connect to cytometer」及「counters」，則出現「acquisition control」及 counter

視窗。

2. 從「cytometer」指令欄中開啟「detectors / amps」、「threshold」、「compensation」、「status」四個方塊，其主要用於收集時調整儀器之用。
3. 於「detectors / amps」中，每項參數選擇其適當之倍增模式：Lin 或 Log（一般進行細胞表面抗原分析時，FSC 和 SSC 多以 Lin 測量，而 FL1-H、FL2-H 與 FL3-H 則以 Log 測量）。
4. 於「acquisition control」中確認 setup，即電腦暫時不收取數據。
5. 於「detectors / amps」中調整「FSC」及「SSC」檢測器之訊號倍增度，使其出現在觀察區中。
6. 樣品上機分析時，若調整好參數後請使用「high run」來收樣品。庚、如有需要，可於「instrument settings」中選「save」，以儲存目前之設定，下回從事相同實驗可調出使用，屆時只需微調即可。

6-2-2 預設檔案之收集、分析及儲存數據

1. 樣品收集之基本流程：

- (1) 於「file」中選取「open」，於 Macintosh hard disk 中選取目的檔案夾，並於檔案中選擇預設的模式檔案以準

備進行樣品分析。

(2) 從「acquire」指令欄中選取「connect to cytometer」，則出現「acquisition control」視窗。

(3) 從「acquire」中選取「acquisition & storage」決定儲存多少細胞（設定目標細胞群中收集 10000 顆細胞）、哪些參數及訊號頻道等。

(4) 從「acquire」中選取「parameter description」決定檔案儲存處、名稱、樣品代號及各項參數之標記。

(5) 從「acquire」中選取「counters」以觀察分析樣品之進度。

(6) 將樣品置於檢測區後，於「acquisition control」欄中之「acquire」內的「 setup」改成「 setup」後，啟動樣品分析及數據儲存。

(7) 從「acquire」中選取「disconnect to cytometer」以斷絕電腦和儀器間之連線。

(8) 之後可進行關機或分析已儲存之數據或列印圖表及報告。

2. 樣品之分析流程：

(1) 從「file」中選取「open」，找出適用之模式檔案。

- (2) 使用滑鼠點取分析圖，選「plots」中之「format histogram」，選取「select file」選適當之所儲存的資料，選取所 gate 部分，按「ok」。
- (3) 可在圖表上加上 “marker” 以利分析之用。
- (4) 於「file」中選「quit」後，再選「don' t save」離開 CQS，並於「special」中選「shut down」來關閉電腦。

6-3 FACS 關機及清洗程序

以 3 mL 5 % 次氯酸鈉漂白水取代樣品，將樣品架置於左或右位，以外管吸取 2 mL 後將樣品架再置於中位，按「hight run」鈕 5 分鐘後，改用 3 mL 純水 (Milli-Q water) 重複此步驟。轉至「stand by」後留 1 mL 純水，於「file」中選取「quit」，選擇「don' t save」，於「special」選取「shut down」，5 分鐘後再關 FACS 電源，以延長雷射光源壽命。

第七節：TNF- α 及 IL-1 β 之 ELISA 測試

7-1：TNF- α

使用 TNF- α matched antibody pairs 自組 TNF- α ELISA 套組 (R&D system)。將套組中之 TNF- α coating Ab 以 coating buffer (pH7.4 之 1X PBS) 稀釋成 0.8 μ g/ml，取一平底 96 孔盤 (Disposable non-sterile assay plate. Corning, NY, USA)，每孔加入上述稀釋之抗體 100 μ l。放置於室溫中作用隔夜，使抗體結合在盤底。次日用力拍打 96 孔盤將抗體液倒掉，每孔加入 100 μ l 之 blocking buffer (1X PBS + 1%BSA)，在室溫中作用 1 小時。以 1X PBS (0.5% tween 20) 清洗 96 孔盤 3 次。取出標準 TNF- α 蛋白質 (原液濃度：2000pg/ml)，做連續 2 倍稀釋，分別為 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/ml。將所收集之樣本液，及 TNF- α 標準蛋白之稀釋液加入 96 孔盤中，每孔加 100 μ l，每個樣本進行 2 重複。在室溫中作 2 小時，而後以 PBS 清洗 3 次。以 1%BSA (於 PBS 中) 稀釋 biotin-labeled detecting Ab 使其濃度為 150ng/ml，每孔加入 100 μ l。以 1%BSA (於 PBS 中) 將 streptavidin-enzyme conjugate 作 1:200 之稀釋，每孔加入 100 μ l，在室溫中作用 30 分鐘。以 1X PBS (0.5% tween 20) 清洗 3 次，以期完全洗去沒有鍵結之酵素。加入 100 μ l 之酵素呈色劑 TMB，避光作用 30 分鐘令其呈色。最後每孔加入 1 N 的 HCl 100 μ l 終止反應，

以波長 450 nm 讀取吸光值即可。

7-2 : IL-1 β

使用 TNF- α matched antibody pairs 自組 IL-1 β ELISA 套組 (Endogen, MA, USA)。將套組中之 IL-1 β coating Ab 以 coating buffer (pH7.4 之 1X PBS) 稀釋成 2 μ g/ml，取一平底 96 孔盤 (Disposable non-sterile assay plate. Corning, NY, USA)，每孔加入上述稀釋之抗體 100 μ l。放置於室溫中作用隔夜，使抗體結合在盤底。次日用力拍打 96 孔盤將抗體液倒掉，每孔加入 100 μ l 之 blocking buffer (1X PBS + 1%BSA)，在室溫中作用 1 小時。以 1X PBS (0.5% tween 20) 清洗 96 孔盤 3 次。取出標準 IL-1 β 蛋白質 (原液濃度：1000pg/ml)，做連續 2 倍稀釋，分別為 500，250，125，62.5，31.25，15.625，0 pg/ml。將所收集之樣本液，及 IL-1 β 標準蛋白之稀釋液加入 96 孔盤中，每孔加 100 μ l，每個樣本進行 2 重複。在室溫中作 2 小時，而後以 PBS 清洗 3 次。以 1%BSA (於 PBS 中) 稀釋 biotin-labeled detecting Ab 使其濃度為 0.25 μ g/ml，每孔加入 100 μ l。以 1%BSA (於 PBS 中) 將 streptavidin-enzyme conjugate 作 1 : 200 之稀釋，每孔加入 100 μ l，在室溫中作用 30 分鐘。以 1X PBS (0.5% tween 20) 清洗 3 次，以期完全洗去沒有鍵結之酵素。加入 100

μl 之酵素呈色劑 TMB，避光作用 30 分鐘令其呈色。最後每孔加入 1 N 的 HCl 100 μl 終止反應，以波長 450 nm 讀取吸光值即可。

第八節 統計分析

各試驗組所得數值以 Microsoft excel 中的資料分析工具程式求取平均值及標準偏差值。而在數據中以 t 檢定（假設變異數相等）的方式進行資料分析。其分析結果若得到 $P < 0.05$ 表示組別之間有顯著差異。



第四章 實驗結果

一、 *Morganella morganii* *subsp morganii* 中 ampR 基因的取得

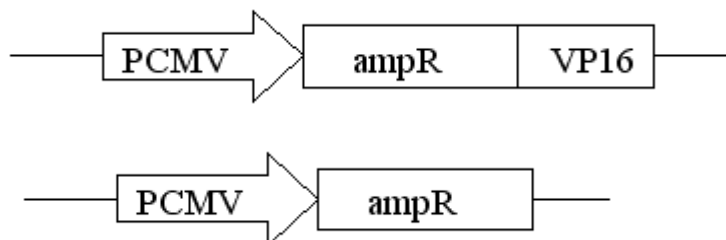
經由抽取 *Morganella morganii subsp morganii* DNA 的步驟後，將產物經由測試 OD260 及洋菜膠電泳確認。利用設計好的 ampR 引子，以抽取好的 *Morganella morganii subsp morganii* DNA 為模板進行聚合酶連鎖反應。其洋菜膠電泳分析如（圖十四）所示：

上述基因經由 TA clone 接合至 POST-I 載體。定序後的結果經由確認後已送至 NCBI 的基因資料庫中，其 accession number 為 AY973254（附錄 5）。經由軟體將之與另一菌株 *PP19* 中的 ampR 中比對之後發現有些位置有突變。比對結果如（圖十五）所示：

因為與參考文獻中的 ampR 有兩個位置的胺基酸序列不一樣，所以，我們還不能斷定我們所使用的 *B172* 菌種中所含的 ampR 的調控機制為何。因此，我們為了藉由實驗來測定此 ampR 的調控機制，遂構築以下不同質體來達到我們分析的目的。

二、表現型 (expression) 與反應型 (response) 質體的構築

2-1: 表現型質體的構築



2-1-1: ampR 的接合

我們經由設計 ampR 的引子，由 *Morganella morganii* *sudsp morganii* 的 DNA 當成模板，進行聚合酶連鎖反應所得到的 ampR DNA 片段電泳圖如 (圖十四)。在得到 ampR 的 DNA 片段後，將 ampR 基因接合至 POST-I 的質體上後以限制酶 (EcoR I) 切割以確定其是否存在。其限制酶切割電泳圖如 (圖十六)。

2-1-2: VP16 的接合

在完成 ampR 的接合後，我們想要在其後方接上皰疹病毒的轉錄活化區 VP16，所以我們藉由 pRevTet-On™ Vector (BD Biosciences) 做為模板，利用設計好的 VP16 引子進行聚合酶連鎖反應，反應完成後的產物以電泳分析其 DNA 片段，其電泳圖如 (圖十七)。其後我們以 PstI 及 XhoI 兩種限制酶接合位將 VP16 接合於 ampR 的後方。在完成 DNA 接合的動作後，我們利用限制酶切割 (PstI, XhoI) 來確定 VP16 片段是否確

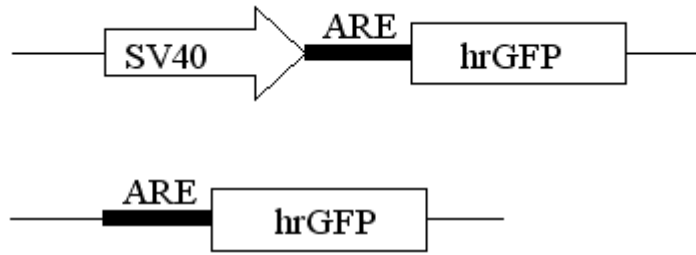
實接於ampR後方。限制酶反應完成後，其電泳圖如（圖十八）所示。

2-1-3: linker 的接合

在接合成 ampR-VP16 的質體後，我們為了避免 ampR 因為立體構形障礙而影響了 VP16 的功能性，所以加入了一段設計好的 linker。而在設計這段 linker 的時候在序列中放入了 EcoRV 限制酶切割位置，若有接上此段 DNA，則可以使用 EcoRV 切割此質體。所以，我們便利用 EcoRV 與 XhoI 限制酶切割位來確認 linker 存在與否。

此外，我們也同時構築了只含有 ampR 的表現型質體，因為在這個 ampR 表現型質體中沒有 linker 及 VP16 的存在，所以當我們同樣利用 EcoRV 及 XhoI 來切割時，只能在質體產生一個切位（XhoI），而不能切出片段。所以我們在接合各個 DNA 的步驟結束後，利用了以下幾種限制酶來確認我們構築的兩種質體（CMV-ampR-linker-VP16，及 CMV-ampR），所使用的限制酶分別為 FspI，EcoRV，和 XhoI。完成限制酶反應後的電泳圖如（圖十九）所示。

2-2: 反應型質體的構築



2-2-1：SV40 的接合

我們先利用設計好的SV40 引子，以pAsRed-N1 (BD Biosciences)為模板進行聚合酶連鎖反應，其後所得到的SV40 片段電泳圖如（圖二十）。在得到SV40 的DNA片段後，將SV40 利用Hind III及SpeI限制酶切位接合至POST-I的質體上，在接合DNA的步驟完成後以限制酶（Hind III及SpeI）切割以確定其是否存在。其限制酶切割電泳圖如（圖二十一）。



2-2-2：hrGFP 的接合

我們將另一個質體上的 hrGFP，利用限制酶 XbaI 切割下來，經由電泳確定其大小後將之利用洋菜膠上回收 DNA 的 Kit 將之純化出來。將純化出來的 hrGFP 進行 DNA 接合的步驟。完成了 DNA 接合的過程後，我們用限制酶（XbaI）切割來確認 hrGFP 接合的狀況。其電泳圖如（圖二十二）所示。因為我們只利用了單一的限制酶接合位來接合 hrGFP，所以有可能產生反接的情況，為了測試正反接的情況，我們使用了另

一個限制酶 BamH I 來做確認的動作。若是正接，則會切出約 300 多 bp 的 DNA 片段。若是反接的情況，則會切出約 1200 多 bp 的 DNA 片段。其電泳圖如（圖二十三）所示。

2-2-3：ARE 接合於 SV40-hrGFP 上

在接合好 SV40-hrGFP 之後，我們想要在中間加上一個 ampR 的 DNA 結合序列 ARE（ampR response element）。藉由參考文獻中的 ARE 序列，我們設計了互補的引子進行黏合的動作。完成 ARE 的片段後，我們利用限制酶 EcoRI 來切割此片段及 SV40-hrGFP 的質體。將經由限制酶切割並純化好的 AER 及 SV40-hrGFP 進行 DNA 接合的動作。而在 ARE 的引子設計中，我們同樣放置了一個限制酶切位 MluI。利用這個限制酶切位及 SV40-hrGFP 質體上的任一切位來測試我們是否有將 ARE 接合上去。其測試電泳圖如（圖二十四）所示。

2-2-4：ARE 接合於-hrGFP 上

除了 SV40-ARE-hrGFP 這個反應型質體要構築外，我們還需要 ARE-hrGFP 這種型態的質體。因此，我們利用了另一個只含有 hrGFP 的質體當作我們要接合 ARE 進去的骨架。而這個 ARE 序列同樣採用設計引子的方式來獲得。我們也在其中放置了限制酶 SpeI 切位作為確認

之用。而我們利用了限制酶 BglIII 及 Hind III 這兩種切位來接合 ARE 至-hrGFP 上。完成 DNA 接合後，我們利用了 SpeI 及 XhoI 來確認其 DNA 接合的狀況。其電泳圖如（圖二十五）所示。

三、ampR-VP16 質體功能性測試（蛋白質表現測試）

在構築完我們所需要的質體後（表現型及反應型）。我們想要確認我們所構築的表現型質體是否能夠正常表現其所帶有的 ampR 及 ampR-linker-VP16 融合蛋白。我們所利用的方式是藉由微粒小體（Microspheres with avidin）及 ARE (with biotin)的共同作用，使其能與 ampR 結合。經由抗體的辨認及標示（FITC）後，我們藉由流式細胞儀分析其 FITC 的表現狀況。經由實驗結果發現，加入轉染過 ampR-linker-VP16 質體的 BALB/3T3 細胞蛋白質抽取液的 FITC 表現量，相較於沒有轉染 ampR-linker-VP16 質體的 BALB/3T3 細胞蛋白質抽取液的 FITC 表現量，有一倍以上的差異。其分析結果如（圖二十六）所示。

四、ampR，ampR-VP16，SV40-ARE-hrGFP，ARE-hrGFP 質體經共同轉染後交互作用測試結果。

在建構及確認過表現型質體的功能性（CMV-promoter 可以正常表現基因）後，我們便想要瞭解在沒有誘導物（muropeptide）的情況下，究竟 ampR 這個主體轉錄因子，與它的 DNA 座落位置 ARE 之間的相互作用究竟是如何？所以我們便做了兩兩質體搭配的共同轉染實驗，希望能藉由這些不同組別的共同轉染實驗中看出 ampR 的特性。

我們將經由大量 DNA 質體分離步驟後所得到的四組質體，分別以 1. ampR-VP16 + SV40-ARE-hrGFP，2. ampR-VP16 + ARE-hrGFP，3. ampR + SV40-ARE-hrGFP，4. ampR + ARE-hrGFP 這四組的對方式進行共同轉染於 BALB/3T3 的細胞中。而我們在這四組中放置了測試共同轉染效果的對照組：質體 PC3.1 與反應型質體的共同轉染組。其中所使用的質體 PC3.1 為一個沒有 ampR-VP16 或是 ampR 基因的質體。

經過重複 3 次的轉染實驗後，我們藉由流式細胞儀偵測各組中報導基因 hrGFP 的螢光表現量來觀察這兩種質體相互作用的情況。而從這四組整理過後的數據中顯示出一個相同的現象。我們發現，當兩種質體（表現型與反應型）同時存在時，其報導基因（hrGFP）的螢光表現量都高於其對照組（反應型質體單獨存在）。在這四組的組合中，在 ampR 與 SV40-ARE-hrGFP，ARE-hrGFP 的共同轉染下，具有統計上（T

test)的顯著性 ($P < 0.05$)。各組的比較結果如 (圖二十七~三十)。

五、Muropeptides (inducer)對於質體共同轉染影響的測試

在完成表現型及反應型質體的共同轉染的實驗後，接下來便想要測試 muropeptide 對於共同轉染後的報導基因表現量到底具有什麼影響力？所以，我們除了按照之前測試雙質體的共同作用所進行的分組共同轉染外，我們在質體轉染的最後一個補細胞培養液的步驟中添加了我們所使用的 muropeptide

N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate (Sigma)。而在添加 muropeptide 測試其影響力的實驗過程中，我們發現將只有溶解在 ddH₂O 中的 muropeptide 直接加入已經轉染過的細胞中，其效果很差 (data not shown)。我們推論可能是因為此 muropeptide 進入細胞內的效率太差。因此，我們利用了自製的微脂體來攜帶我們的 muropeptide，希望能夠增加其進入細胞內的效率。

經實驗後發現，經由微質體包覆後的 muropeptide，其影響共同轉染後的報導基因表現量，開始出現了差異性。不過，我們也在後來的實驗中發現，我們自製的微脂體，在沒有包覆誘導物的時候一樣也會對共同轉染後的報導基因表現情況產生一定程度的影響。基於這樣的發現，我們在測試 muropeptide (微脂體與 muropeptide 複合體) 的

影響時，同時做了一組對照組，其在實驗條件的差異是質體轉染的步驟後添加與 muropeptide 等量的微脂體。我們藉由比較這兩組的報導基因表現量，來測試我們所建構的基因調控系統，究竟是藉由 muropeptide 的添加而加強了基因轉錄的效果，還是抑制了原本已經啟動的轉錄動作。

在各組經由雙質體共同轉染並添加 muropeptide 之後，我們發現了在 ampR-VP16 分別與 SV40-ARE-hrGFP，ARE-hrGFP 共同轉染的兩組中都有報導基因表現量增加的現象（圖三十一～三十二）。而在 ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 及 ARE-hrGFP 的這兩組中，則是得到了報導基因表現量降低的結果（圖三十三～三十四）。

在得到了 muropeptide 的影響結果後，我們想要更加的強調這些現象發生的原因是因為我們所應用的主體轉錄因子 ampR 與其 DNA 結合序列 ARE 的相互作用才能得到。於是我們便利用了去除了 ARE 結合位置的反應型質體，與原本的表现型質體進行實驗。

而由我們得到的轉染結果中可以證明，在這個基因調控系統中，ampR 與 ARE 是確實有共同作用的現象。其測試結果如（圖三十五～三十八）所示。

六、Muropeptides (inducer)的免疫性測試

經由共同轉染及誘導物 (muropeptide) 添加的實驗後，我們已經知道我們所設計的基因調控系統的確可以利用誘導物 muropeptide 來影響報導基因的表現。不過，由於 muropeptide 是構成細菌細胞壁的單元構造成分，如果將來要把這個基因調控系統應用於生物體的話，有可能會引起類似菌血症的免疫性疾病。

為了瞭解這一點，我們針對我們所使用的 muropeptide，進行免疫性的測試。我們的測試實驗是利用經計數好的 P338/D1 細胞株（一種在小鼠中似巨噬細胞種類的細胞株），添加我們所使用的 muropeptide 及微脂體。經過 12 小時的培養後，利用 ELISA 實驗來測定他們所產生的 TNF- α 及 IL-1 β 的表現量。藉以判定我們所使用的 muropeptide 是否具有引起 P338/D1 產生發炎反應的狀況。在經過二重複的實驗結果發現，我們所使用的 muropeptide 及微脂體，並不會增加 P338/D1 的 TNF- α 及 IL-1 β 的表現量。實驗結果如（圖三十九，圖四十）所示。

第五章：討論

本研究的目的主要是想要利用抗藥性菌種調控抗藥性基因表現的機制，來建構一個調控型啟動子的平台。經由整個實驗流程的執行與完成，我們在每一個階段中所得到的結果與推論，在以下的敘述中加以說明之。

首先，在我們初步構築質體並測試其共同轉染的效果中，我們發現在表現型及反應型質體上如果帶有真核細胞複製的訊息序列，在共同轉染後其報導基因表現的情況，都比沒有真核細胞複製訊息的質體來的顯著（data not shown）。由這個結果我們可以知道，要使用於基因治療用的質體，其設計必須考慮到該質體在真核細胞中進行複製的能力。因為質體經由轉染過程到細胞後，其存在的時間是短暫的。若不能在細胞中進行複製動作的話，該質體的數量會隨著時間的進行而減少。最後就會漸漸失去表現治療基因的能力，而無法好好應用。所以，能夠在真核細胞進行複製的訊息序列，是必須首先考量進去的原件。

再者，我們加入於 ampR 及 VP16 中間的 linker，雖然我們並沒有實驗直接證明 linker 存在後能提升共同轉染後該報導基因的表現量。不過，由於我們不能確定 ampR 在蛋白質結構上是否會影響後方 VP16 的轉錄活化能力。所以，具有能夠鬆散結構的 linker，對於建構一個

新的調控型轉錄因子，我們相信是個可以解決立體結構障礙的設計。

而在我們進行雙質體共同轉染的實驗結果中，我們可以發現當我們所構築的表現型與反應型質體同時存在於細胞中的時候，其報導基因的表現量都比反應型質體單獨存在時高（圖二十八～三十一）。而我們比較訝異的是，在 ampR 沒有接上 VP16 的實驗組中，其報導基因表現的程度都高於有接上 VP16 的實驗組別。我們經由文獻中的報導及得到的結果，可以做以下的解釋：在參考文獻中（Poirel, Guibert et al. 1999）提到 ampR 於某些菌種中，在沒有誘導物 muropeptide 出現時，是抑制子的功能，但是當 muropeptide 出現的時候，會轉變成活化子。所以我們所使用的 ampR 轉錄因子，在沒有 muropeptide 出現時，會以抑制子的型態調控下游基因。所以，雖然 ampR 可以座落於 ARE 上，但其構型卻不利於形成 RNA 聚合酶複合體。雖然我們在後方接上了 VP16，但是由於整體構型上的關係，使得其活化轉錄的功能減弱。反觀沒有接上 VP16 的 ampR 組別，理論上因為沒有真核的轉錄活化區，應該會使得報導基因的表現量更低。但是我們在構築此質體的時候，讓 ampR 的後方留著 His tag 的構造，以便將來純化蛋白質用。我們推測是這個後方的結構，可能在 ampR 是抑制子構型的時候，反而能和真核生物的轉錄因子相互作用而造成下游的報導基因表現的結果。

在加入誘導物後的實驗結果中。我們發現有接上 VP16 在後方的

ampR 實驗組，在 muropeptide 出現後，其報導基因的表現量都有上升的現象（圖三十二～三十三）。反觀沒有 VP16 的組別，其報導基因表現量則是都有下降的趨勢（圖三十四～三十五）。將這個現象與沒有加入 muropeptide 前的實驗結果比較，我們可以推測我們所使用的 ampR 轉錄因子，在有 muropeptide 出現後由抑制子的型態變成了活化子的型態，藉由 VP16 這個真核轉錄活化區，加強了報導基因的表現量。而沒有接上 VP16 的 ampR 實驗組，雖然在沒有 muropeptide 出現時一樣是抑制子的型態，但是因為後方存在著 His tag 的富正電結構，反而成為較好的轉錄活化結構。在有 muropeptide 出現後，ampR 變成了活化子的型態，但是這個活化子的構型，卻不利於原本的 His tag 形成 RNA 聚合酶複合體，而使報導基因的表現量下降。在這個實驗中，我們也發現微脂體對於誘導物的運送有相當大的影響，在沒有微脂體包覆的情況下，我們所添加的 muropeptide 對於共同轉染的結果沒有太大的作用，我們推論應該是該誘導物進入細胞的效率太差，以致於無法有效的調控基因表現。而在添加了微脂體後，muropeptide 所產生的調控效果才開始有顯著性。所以，利用 muropeptide 來調控基因表現的建構概念中，muropeptide 穿透細胞的效率是很重要的一個考量。所以，如果能夠再加強 muropeptide 進入細胞的效率的話，我們相信對於整個系統的調控特性，能有更顯著的差異性出現。

而最後針對我們使用的 muropeptide 進行的免疫反應測試，我們發現使用 muropeptide 並不會引起發炎反應的現象（圖三十九～四十）。由此可知，雖然細菌的完整細胞壁結構，例如 LPS，會引起生物體的發炎反應，但我們所應用的是其單元體，所以對於生物體的免疫反應可說是幾乎沒有影響的。而在試驗中，利用微脂體包覆 muropeptide 的組別，在 TNF- α 的表現量上比沒有添加任何物質的對照組還要低，我們推測可能是因為 muropeptide 在經由微脂體的攜帶下而增加其進入細胞的能力，而進入細胞中的 muropeptide 為何具有抑制 TNF- α 表現的作用，其機制則仍須釐清。

最後，總結我們的實驗成果可以得到以下幾個結論：1. 利用抗藥性菌的抗藥基因調控機制，是可以被應用於設計調控型啟動子的平台。2. 藉由皰疹病毒的 VP16 轉錄活化區，可以使我們將原核生物的轉錄因子應用於真核的轉錄系統中。3. 微脂體的應用，可以使 muropeptide 更有效的進入細胞中，使得調控基因表現的能力更顯著。

雖然，我們已經利用了 ampR-muropeptide 這個抗藥性調控系統來做出一個調控型啟動子的原型。不過，我們所建構的系統在基礎值（未加入 muropeptide）上的基因表現量太高，而在加入 muropeptide 後的差異性太低，這些缺點都必須再好好的經由其它的修飾來建構成更理想的基因調控系統，例如增加 ARE 的個數以達到表現量增加…等等的

作法。將來要把我們所建構的 muropptide 調控系統應用於基因治療上，才能夠真正的達到『收放自如』的理想境界。



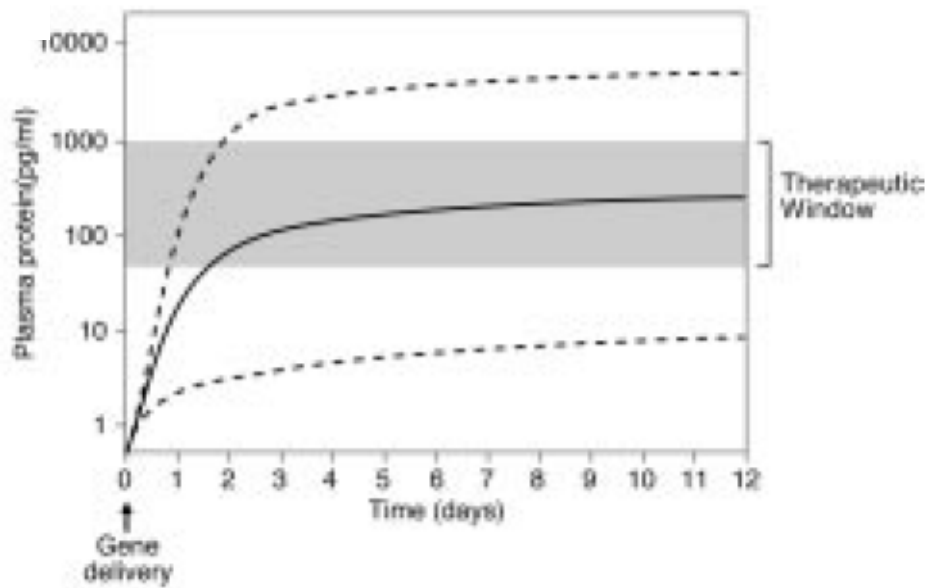
第六章 參考文獻

- Baulieu, E. E. (1989). "Contraception and other clinical applications of RU 486, an antiprogestone at the receptor." Science **245**(4924): 1351-7.
- Belshaw, P. J., S. N. Ho, et al. (1996). "Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4604-7.
- Bertran, J., J. L. Miller, et al. (1996). "Recombinant adeno-associated virus-mediated high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors." J Virol **70**(10): 6759-66.
- Blaese, R. M. (1993). "Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency." Pediatr Res **33**(1 Suppl): S49-53; discussion S53-5.
- Bohl, D., N. Naffakh, et al. (1997). "Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts." Nat Med **3**(3): 299-305.
- Burcin, M. M., G. Schiedner, et al. (1999). "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 355-60.
- Christopherson, K. S., M. R. Mark, et al. (1992). "Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6314-8.
- Clackson, T. (2000). "Regulated gene expression systems." Gene Ther **7**(2): 120-5.
- Cooke, S. J., K. Coates, et al. (1997). "Regulated expression vectors demonstrate cell-type-specific sensitivity to human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced cytostasis." J Gen Virol **78** (Pt 2): 381-92.
- Datta, R., E. Rubin, et al. (1992). "Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CArG elements." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10149-53.
- Deuschle, U., W. K. Meyer, et al. (1995). "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters." Mol Cell Biol **15**(4): 1907-14.
- Fan, J. and J. R. Bertino (1997). "Functional roles of E2F in cell cycle regulation." Oncogene **14**(10): 1191-200.
- Floettmann, J. E., K. Ward, et al. (1996). "Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines." Virology **223**(1): 29-40.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, et al. (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in

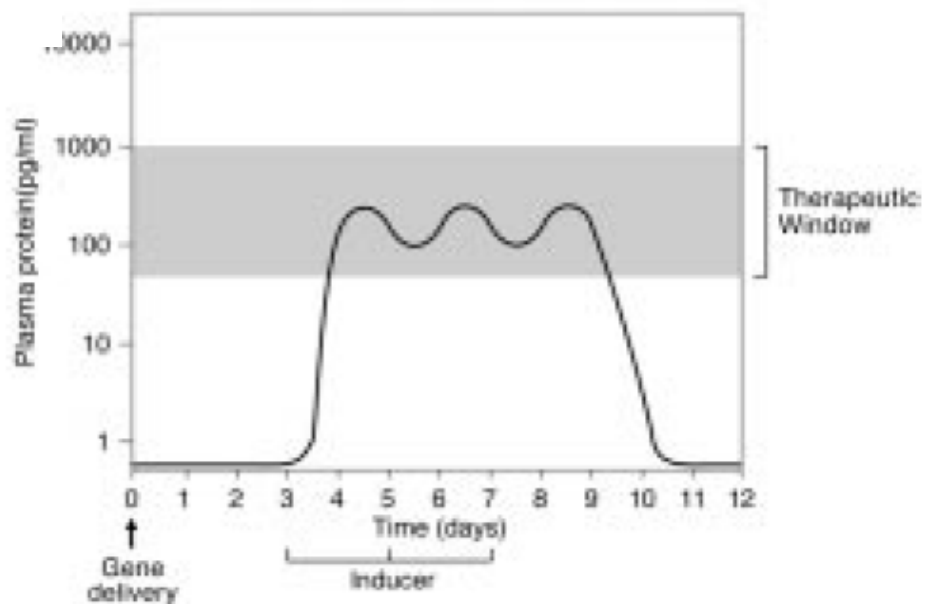
- mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-9.
- Ho, S. N., S. R. Biggar, et al. (1996). "Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation." Nature **382**(6594): 822-6.
- Hofmann, A., G. P. Nolan, et al. (1996). "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5185-90.
- Jacobs, C., L. J. Huang, et al. (1994). "Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction." Embo J **13**(19): 4684-94.
- Kistner, A., M. Gossen, et al. (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10933-8.
- Lukas, J., B. O. Petersen, et al. (1996). "Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression." Mol Cell Biol **16**(3): 1047-57.
- Madio, D. P., P. van Gelderen, et al. (1998). "On the feasibility of MRI-guided focused ultrasound for local induction of gene expression." J Magn Reson Imaging **8**(1): 101-4.
- Magari, S. R., V. M. Rivera, et al. (1997). "Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice." J Clin Invest **100**(11): 2865-72.
- No, D., T. P. Yao, et al. (1996). "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3346-51.
- Poirel, L., M. Guibert, et al. (1999). "Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **43**(4): 769-76.
- Rivera, V. M., T. Clackson, et al. (1996). "A humanized system for pharmacologic control of gene expression." Nat Med **2**(9): 1028-32.
- Schultze, N., Y. Burki, et al. (1996). "Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice." Nat Biotechnol **14**(4): 499-503.
- Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, et al. (1988). "Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression." Genes Dev **2**(6): 718-29.
- Tsai, S. Y., B. W. O'Malley, et al. (1998). "A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes." Adv Drug Deliv Rev **30**(1-3): 23-31.
- Vekris, A., C. Maurange, et al. (2000). "Control of transgene expression using local hyperthermia in combination with a heat-sensitive promoter." J Gene Med **2**(2): 89-96.
- Wang, Y., F. J. DeMayo, et al. (1997). "Ligand-inducible and liver-specific target gene

- expression in transgenic mice." Nat Biotechnol **15**(3): 239-43.
- Weichselbaum, R. R., D. Hallahan, et al. (1994). "Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response." Int J Radiat Oncol Biol Phys **30**(1): 229-34.
- Weichselbaum, R. R., D. E. Hallahan, et al. (1994). "Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells." Cancer Res **54**(16): 4266-9.
- Weichselbaum, R. R., D. E. Hallahan, et al. (1991). "Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure." J Natl Cancer Inst **83**(7): 480-4.
- Yarranton, G. T. (1992). "Inducible vectors for expression in mammalian cells." Curr Opin Biotechnol **3**(5): 506-11.
- Yu, Z., C. S. Redfern, et al. (1996). "Conditional transgene expression in the heart." Circ Res **79**(4): 691-7.

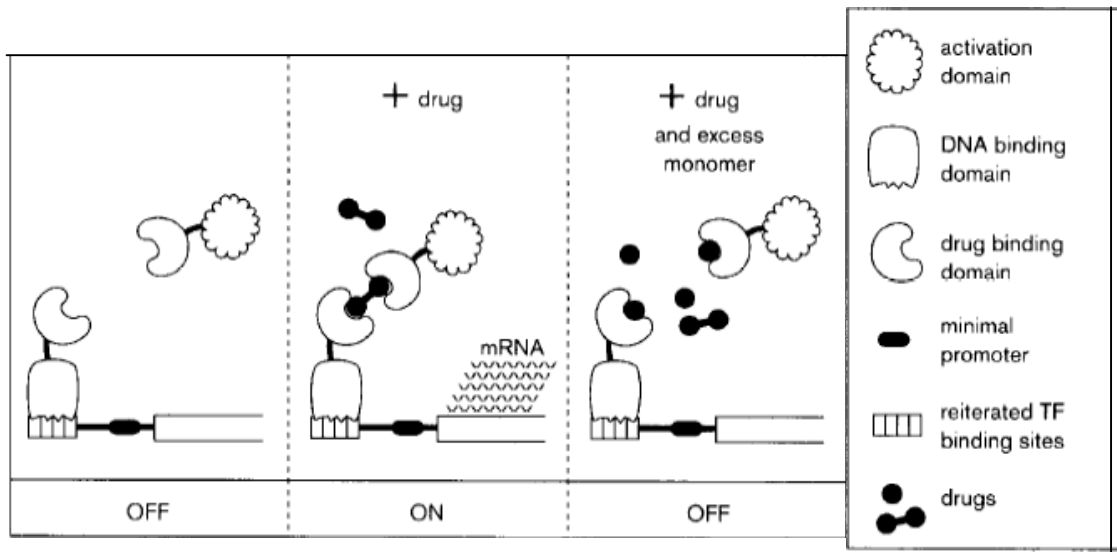




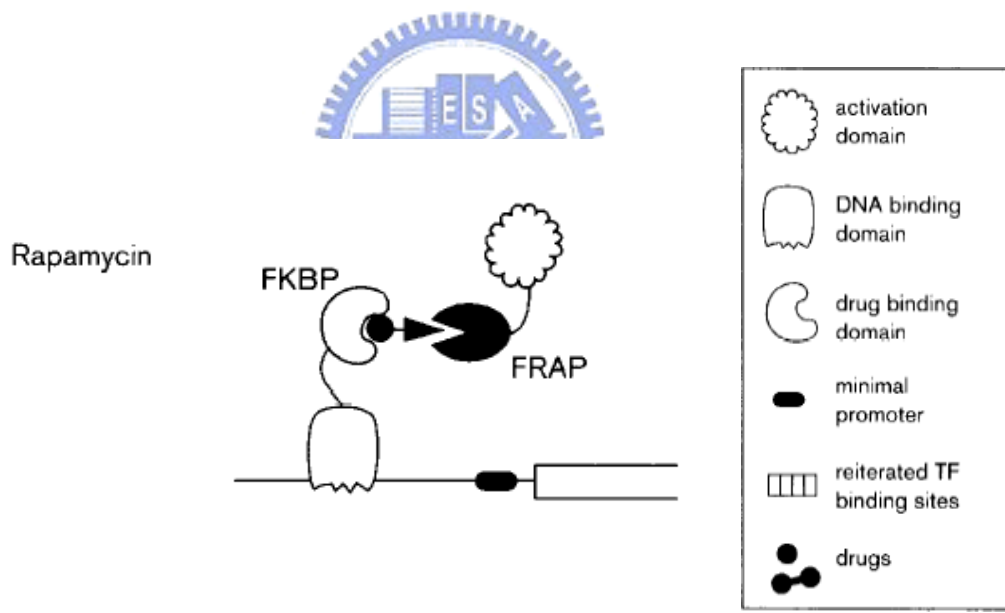
圖一、利用穩定及常態性表現型的啟動子調控基因表現。其基因表現量與表現時間的關係。(Clackson 2000)



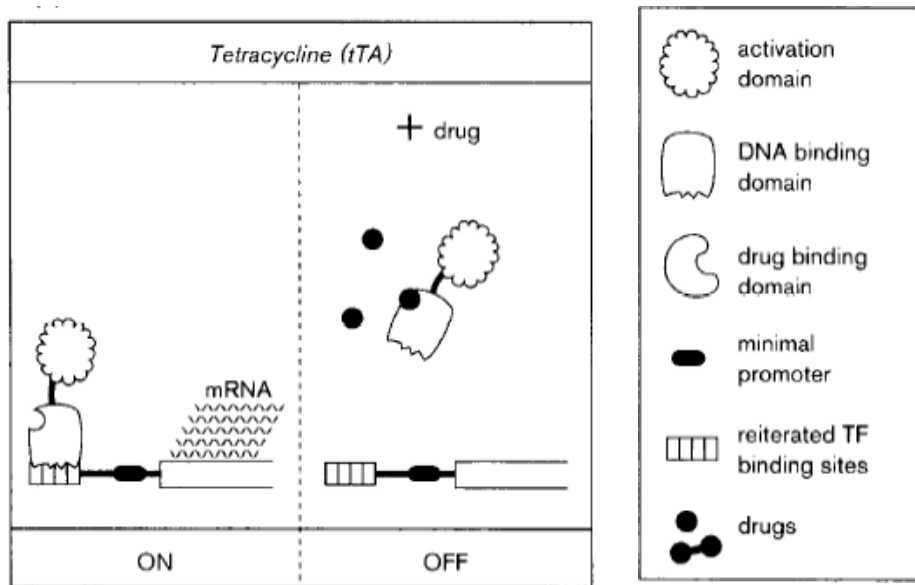
圖二、利用可調控型的啟動子調控基因表現。其基因表現量與表現時間的關係。(Clackson 2000)



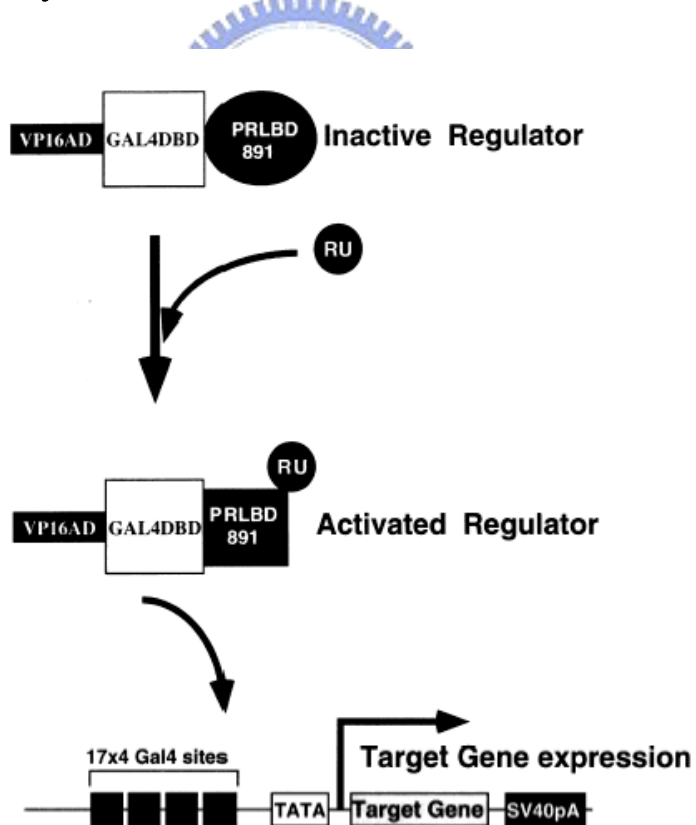
圖三、dimerization on switch 的調控模式 (Clackson 1997)



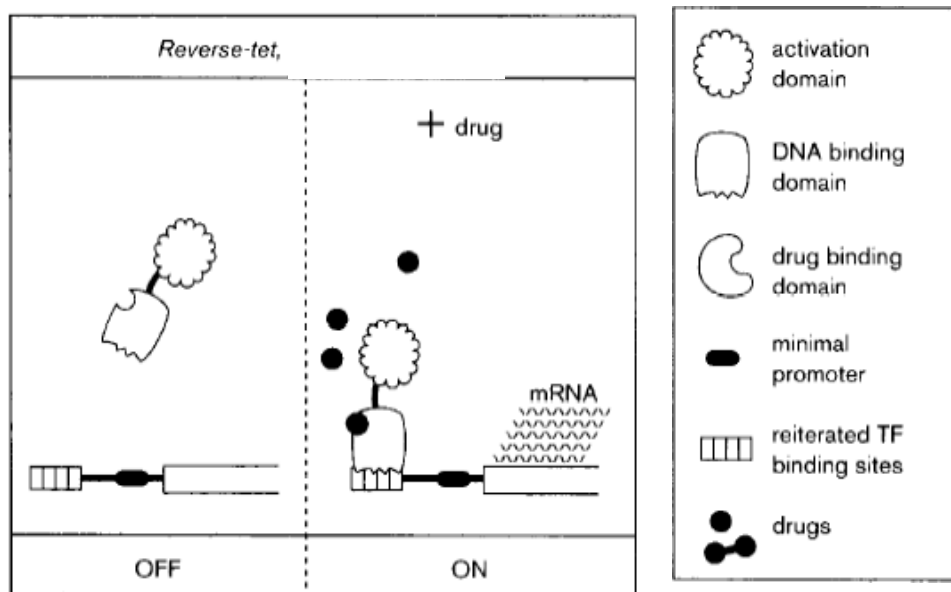
圖四、Rapamycin 的調控模式 (Clackson 1997)



圖五、Tetracycline turn-off 的調控模式 (Clackson 1997)

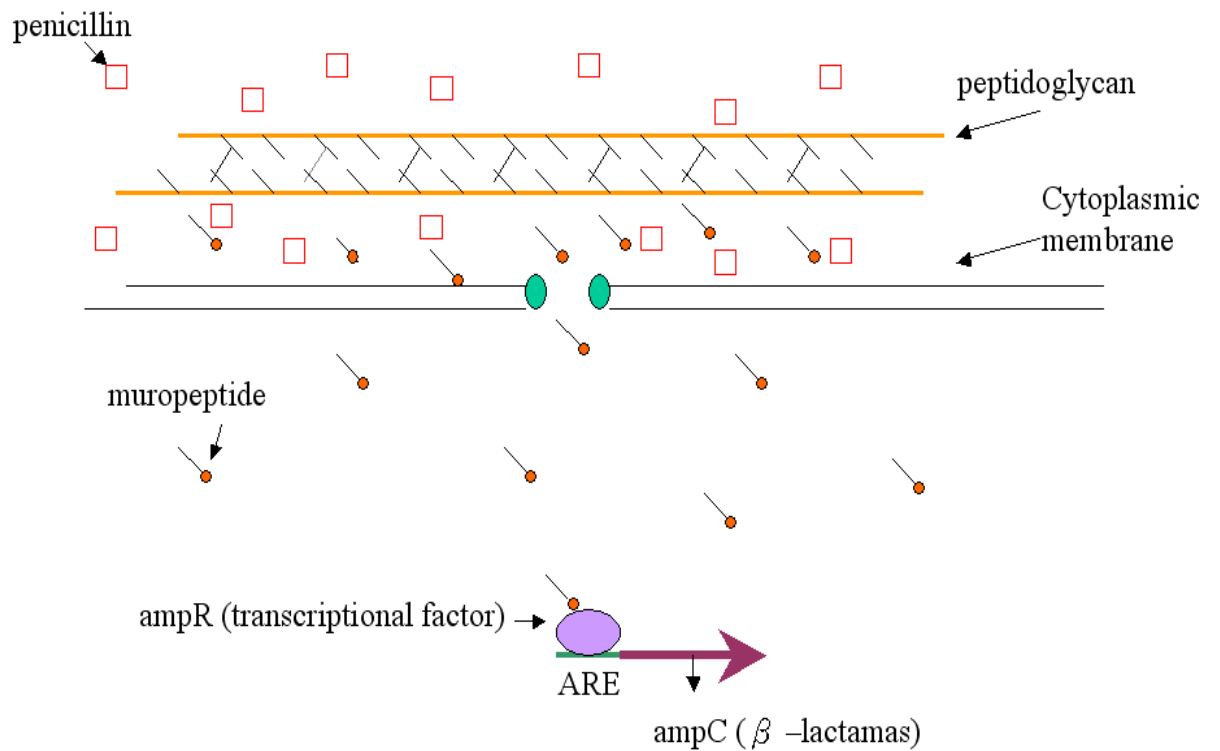


圖六、RU486 調控系統模式 (Tsai, O' Malley et al. 1998)



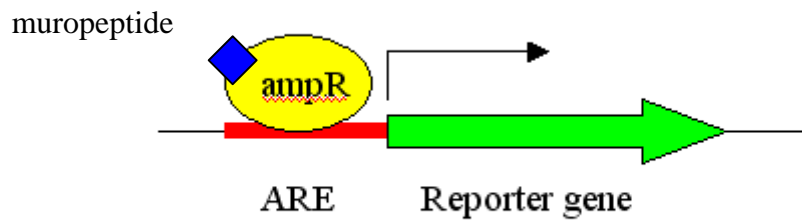
圖七、Tetracycline turn-on 的調控模式 (Clackson 1997)



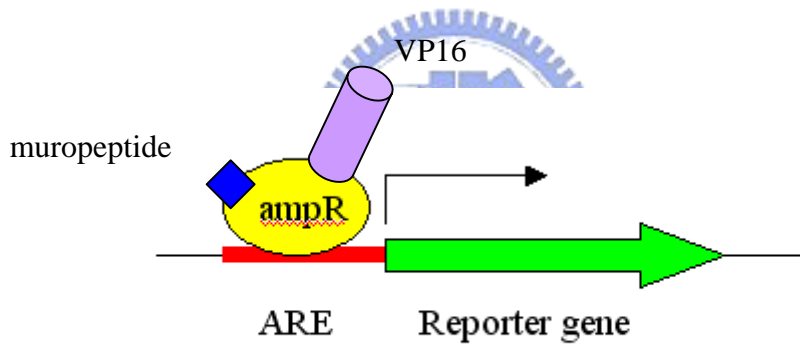


圖八、 β -lactamase 基因活化的調控機制

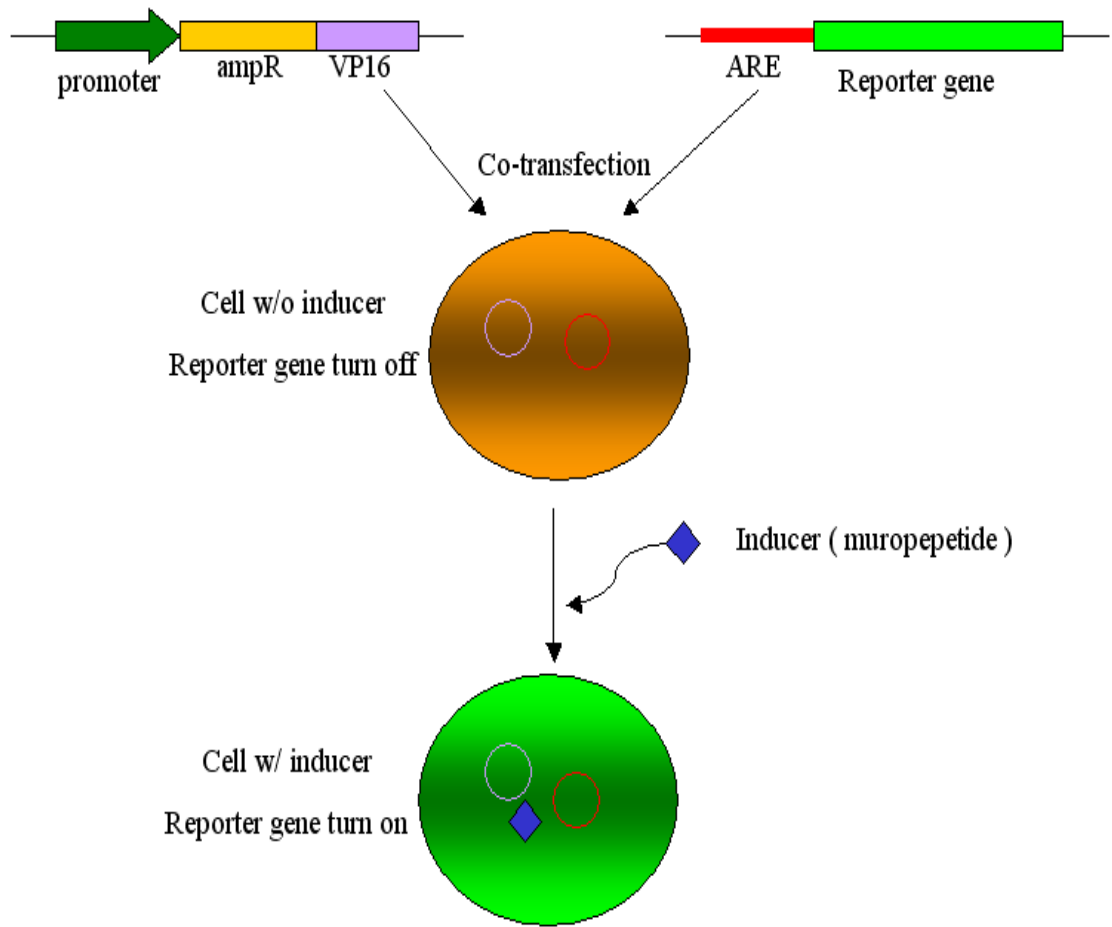
遭抗生素而弱化的細胞壁，其單元體 muropeptide 運送至細菌體內後，與調控 *ampC* (β -lactamase) 基因的調控型轉錄因子 *ampR* 共同作用，使得 *ampC* 的轉錄作用開始進行。



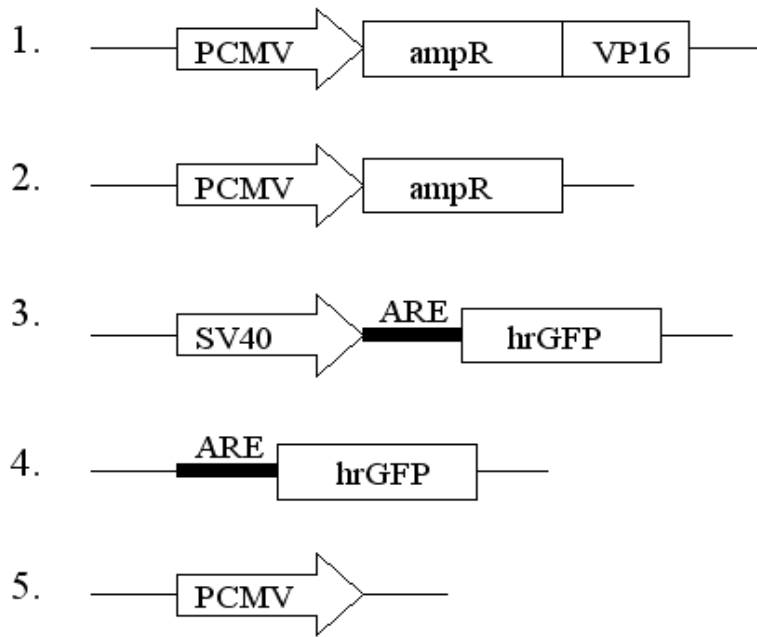
圖九、利用 muropeptide 活化 ampR 後與 ARE 的相互作用，以開啟下游報導基因。



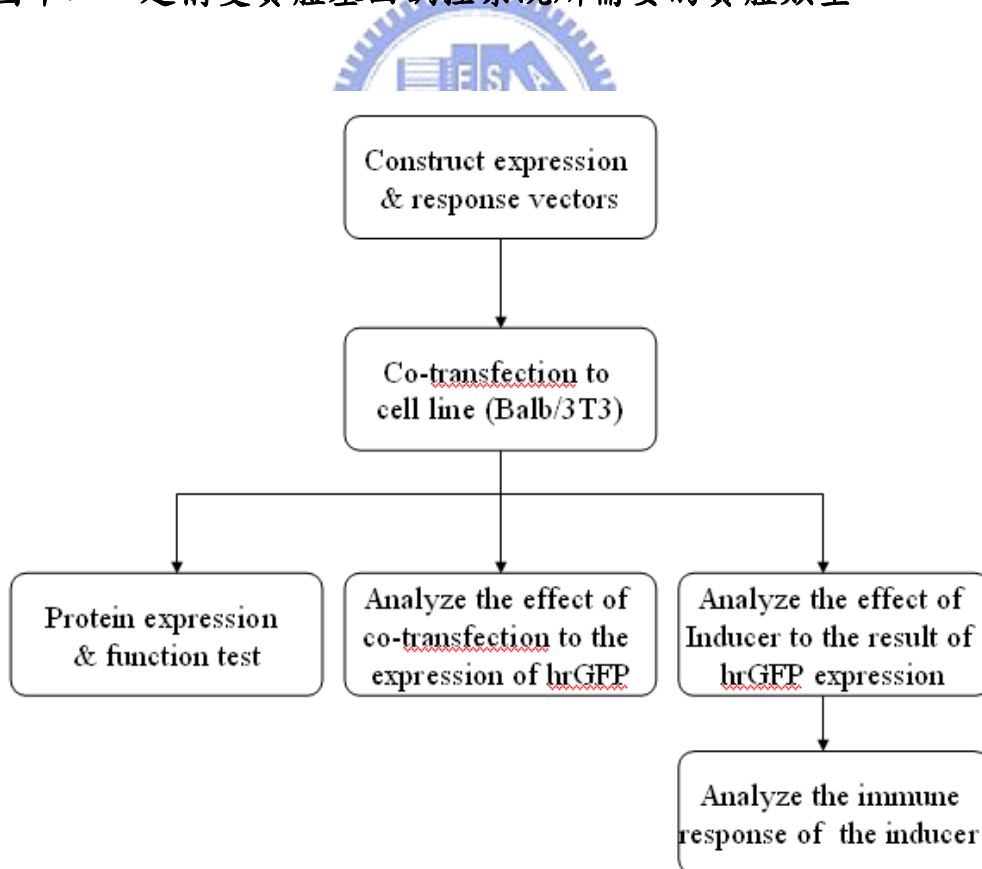
圖十、利用 VP16 來修飾原本 ampR 的原核生物轉錄因子，以達到於真核生物中應用的目的。



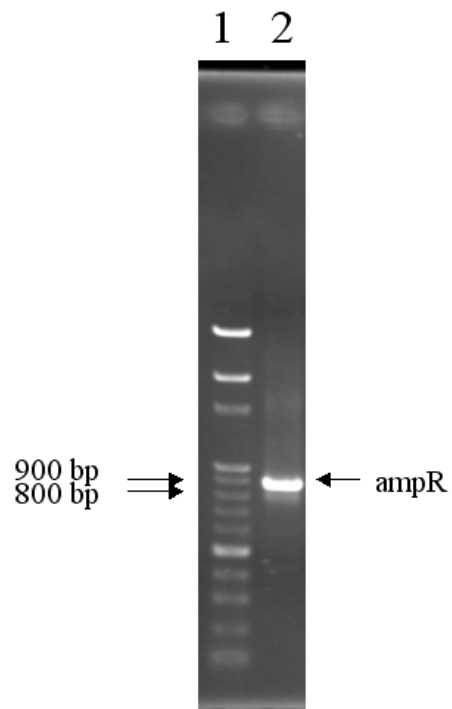
圖十一、利用共同轉染 1. 表現型質體，2. 反應型質體至真核細胞中，測試在此雙質體的建構系統下，加入誘導物後使得報導基因開啟的現象。



圖十二、建構雙質體基因調控系統所需要的質體類型。



圖十三、本實驗的建構及測試實驗流程。

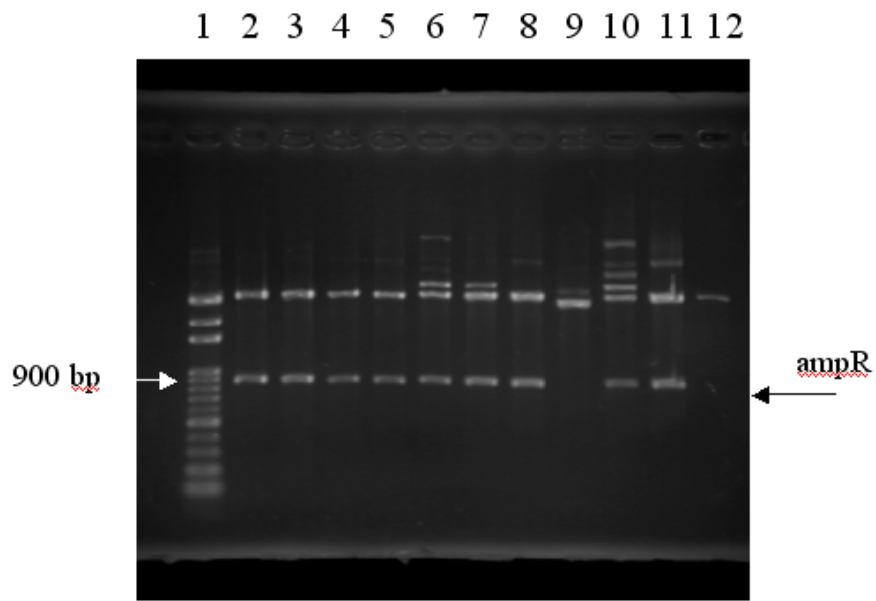


圖十四、ampR 聚合酶連鎖反應電泳圖

圖中的 lane 1 是 100bp 的 marker，lane 2 是經過 PCR 反應後的產物，其大小應為 876bp。

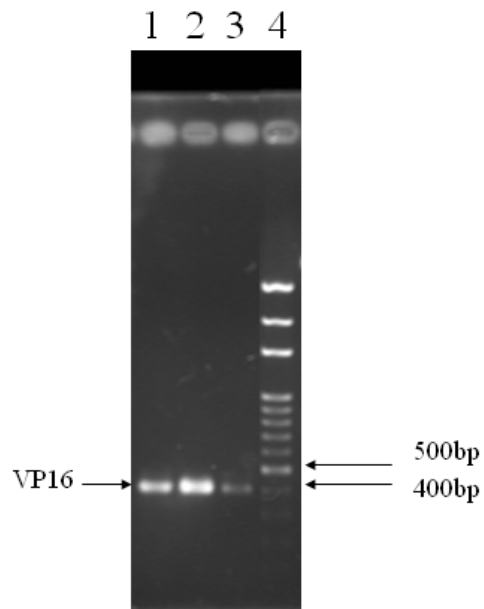
		Section 1				
	(1)	1	10	20	30	41
ampR amino acid seq from detabase	(1)	MVERRYLPLNPLRAFEAAARHLSFTRAAIELNVTHAAVSQQV				
ampR amino acid seq from B172	(1)	MVERRYLPLNPLRAFEAAARHLSFTRAAIELNVTHAAVSQQV				
Consensus	(1)	MVERRYLPLNPLRAFEAAARHLSFTRAAIELNVTHAAVSQQV				
		Section 2				
	(42)	42	50	60	70	82
ampR amino acid seq from detabase	(42)	RALEEQLGCVLFTRVSRGLVLTHEGEGLLPVLNEAFDRIAD				
ampR amino acid seq from B172	(42)	RALEEQLGCVLFTRVSRGLVLTHEGEGLLPVLNEAFDRIAD				
Consensus	(42)	RALEEQLGCVLFTRVSRGLVLTHEGEGLLPVLNEAFDRIAD				
		Section 3				
	(83)	83	90	100	110	123
ampR amino acid seq from detabase	(83)	TLECFSHGQFRERVKVGSVGTFAAGWLLPRLAGFYDSHPHI				
ampR amino acid seq from B172	(83)	TLECFSHGQFRERVKVGSVGTFAAGWLLPRLAGFYDSHPHI				
Consensus	(83)	TLECFSHGQFRERVKVGSVGTFAAGWLLPRLAGFYDSHPHI				
		Section 4				
	(124)	124	130	140	150	164
ampR amino acid seq from detabase	(124)	DLHISTHNNHVDPAAEGHDYTIRFGNGAWHESDAELIFSAP				
ampR amino acid seq from B172	(124)	DLHISTHNNHVDPAAEGHDYTIRFGNGAWHESDAELIFSAP				
Consensus	(124)	DLHISTHNNHVDPAAEGHDYTIRFGNGAWHESDAELIFSAP				
		Section 5				
	(165)	165	170	180	190	205
ampR amino acid seq from detabase	(165)	HAPLCSPAIAEQLQPPDDVHRFTLLRSFRDEWSRWLDCAG				
ampR amino acid seq from B172	(165)	HAPLCSPAIAEQLQPPDDVHRFTLLRSFRDEWSRWLDCSG				
Consensus	(165)	HAPLCSPAIAEQLQPPDDVHRFTLLRSFRDEWSRWLDCAG				
		Section 6				
	(206)	206	220	230	246	
ampR amino acid seq from detabase	(206)	GTPSPSQPVMVFDTSLAMAEAAQLGAGVAIAPVCMFSRLL				
ampR amino acid seq from B172	(206)	GTPSPSQPVMVFDTSLAMAEAAQLGAGVAIAPVCMFSRLL				
Consensus	(206)	GTPSPSQPVMVFDTSLAMAEAAQLGAGVAIAPVCMFSRLL				
		Section 7				
	(247)	247	260	270	287	
ampR amino acid seq from detabase	(247)	QSGALVQPPAAEITLGGYWLTRLQSRTEFTPAMQQFARWLLN				
ampR amino acid seq from B172	(247)	QSGALVQPPAAEITLGGYWLTRLQSRTEFTPAMQQFARWLLN				
Consensus	(247)	QSGALVQPPAAEITLGGYWLTRLQSRTEFTPAMQQFARWLLN				
		Section 8				
	(288)	288	291			
ampR amino acid seq from detabase	(288)	TAAA				
ampR amino acid seq from B172	(288)	TAAA				
Consensus	(288)	TAAA				

圖十五、ampR 在兩種菌株 (PP19 與 B172) 中的胺基酸序列比較



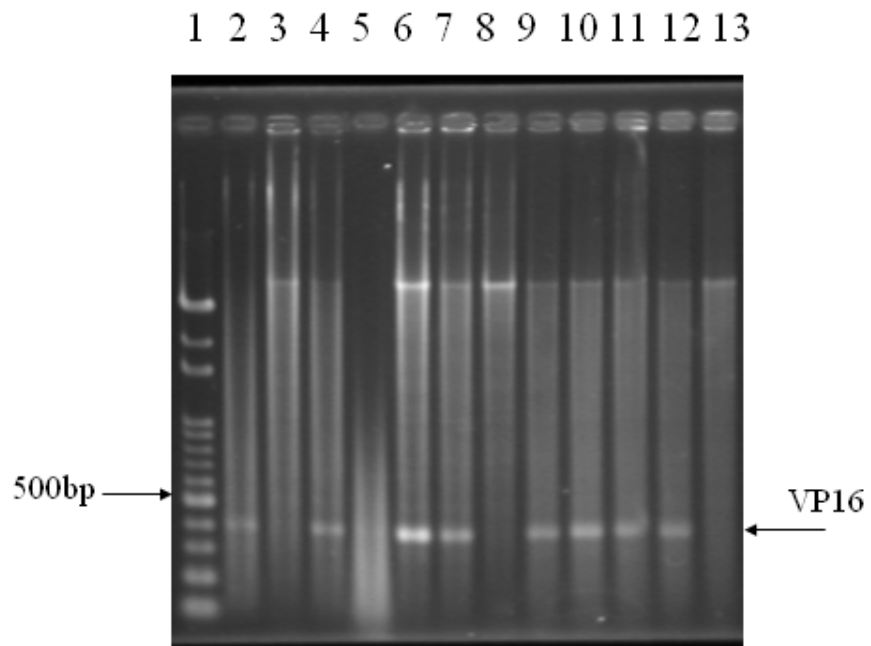
圖十六、經由限制酶切割反應後得到 ampR 的 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2-12: 若有切到 ampR 片段大小約 876 bp)



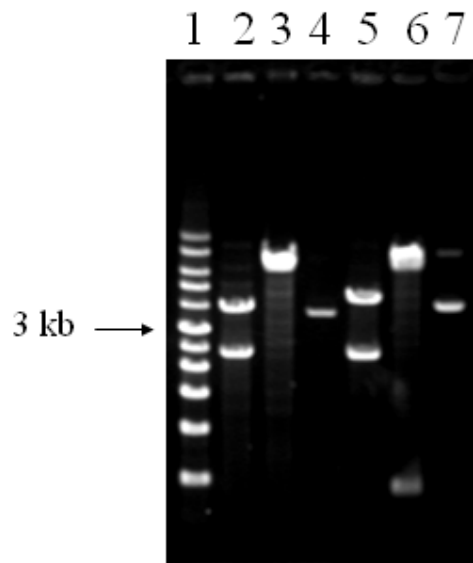
圖十七、經由聚合酶反應後得到 VP16 的 DNA 片段

(lane 4:100 bp marker, lane 1-3: VP16 片段約 390 bp)



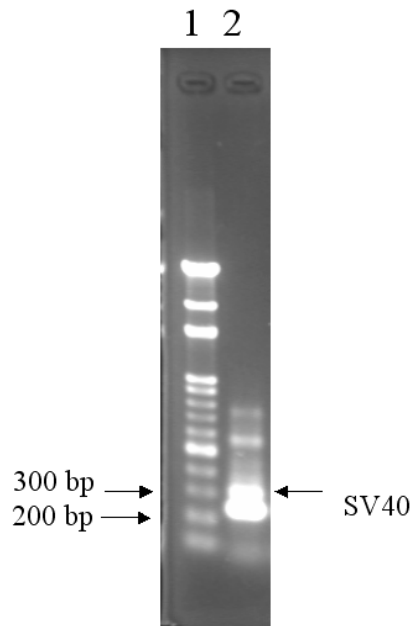
圖十八、經由限制酶切割反應後得到 VP16 的 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2-13: 若有 VP16 片段接合上，
經由限制酶切下約 390 bp)



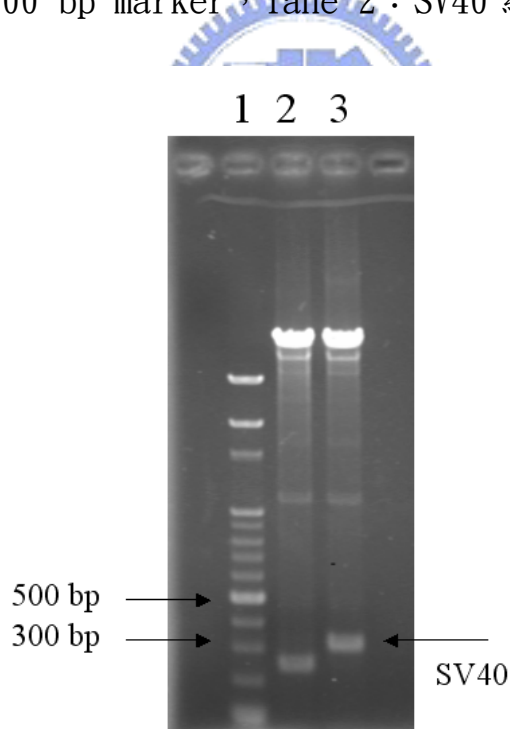
圖十九、經由限制酶切割反應後確認 CMV-ampR-linker-VP16 及 CMV-ampR 兩種表現型質體

(lane 1:1 kb marker。lane 2: 質體 CMV-ampR 經由 FspI 切割後，所產生的 DNA 片段大小約為 2366 及 3968。lane 3: 質體 CMV-ampR 經由 EcoRV 及 XhoI 切割後，所產生的 DNA 片段大小約為 6334，lane 4: 質體 CMV-ampR 未使用限制酶切割。Lane 5: 質體 CMV-ampR-linker-VP16 經由 FspI 切割後，所產生的 DNA 片段大小約為 2366 及 4396。Lane 6: 質體 CMV-ampR-linker-VP16 經由 EcoRV 及 XhoI 切割後，所產生的 DNA 片段大小約為 436 及 6362。Lane 7: 質體 CMV-ampR-linker-VP16 未使用限制酶切割。)



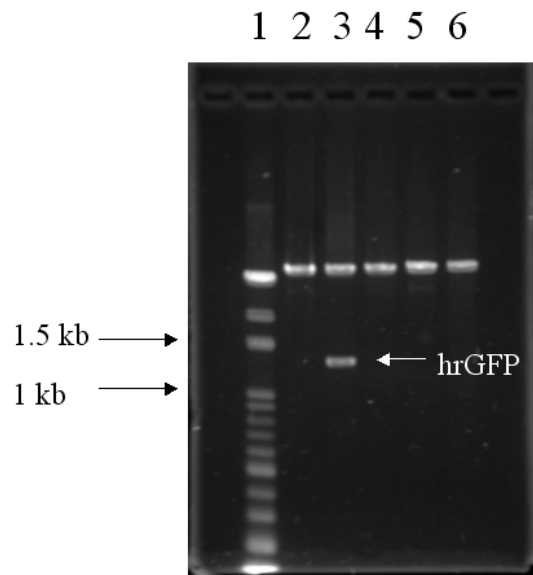
圖二十、經由聚合酶連鎖反應後得到的 SV40 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2: SV40 約 303 bp)



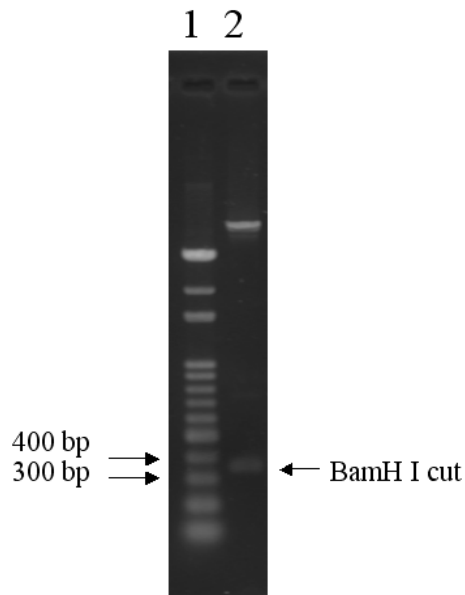
圖二十一、經由限制酶切割反應後得到 SV40 的 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2-3: 若有 SV40 片段接合上，經由限制酶切下約 303 bp)



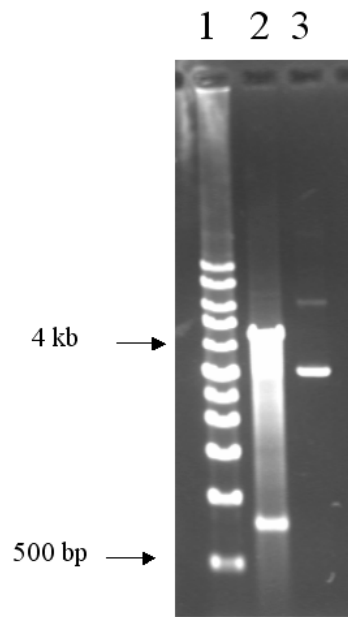
圖二十二、經由限制酶切割反應後得到 hrGFP 的 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2-6: 若有 hrGFP 片段接合上, 經由限制酶 (XbaI) 切下約 1300 bp)



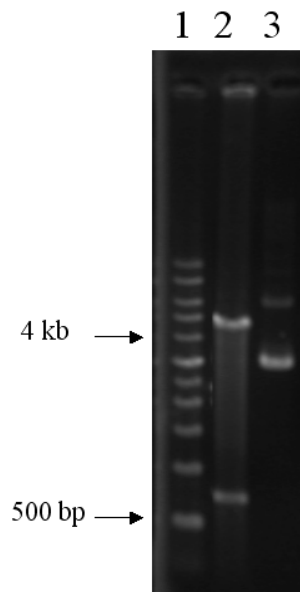
圖二十三、經由限制酶切割反應後得到正接 hrGFP 的 DNA 片段

(lane 1:100 bp marker, lane 2: 若有正向 hrGFP 片段接合上, 經由限制酶 (BamH I) 切下約 300 多 bp)



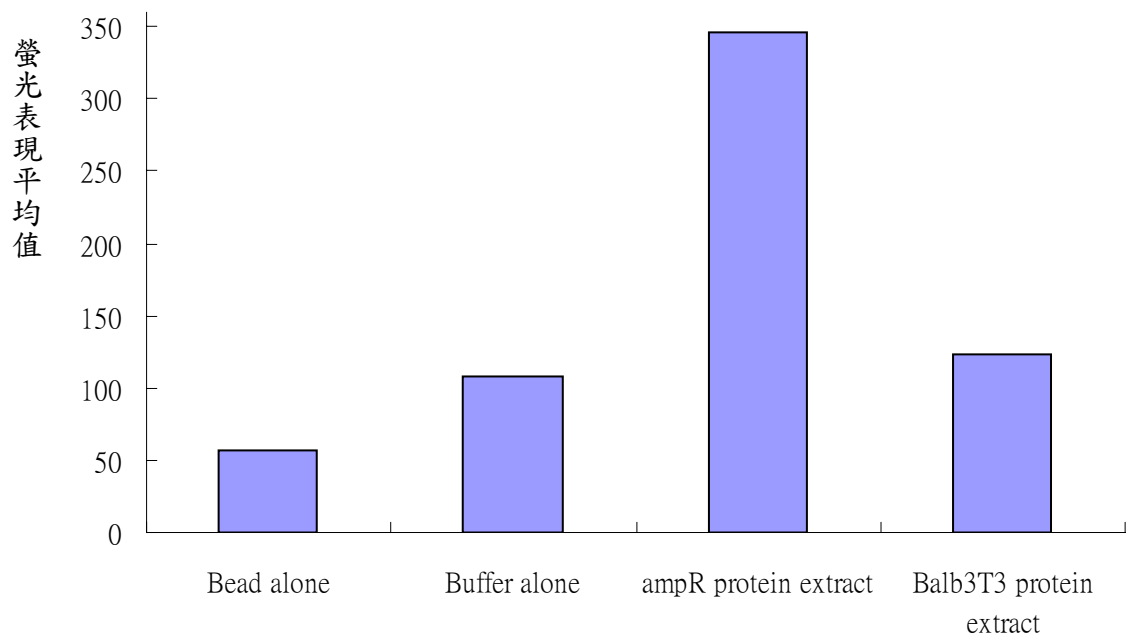
圖二十四、經由限制酶（MluI 及 XhoI）切割反應後確認 ARE 接合於 SV40-ARE-hrGFP 上。

（lane 1:1 kb marker，lane 2:經由 MluI 及 XhoI 切割後所得到的 DNA 片段約 840 bp。Lane 3:未經限制酶切割的質體 SV40-ARE-hrGFP）



圖二十五、經由限制酶（SpeI 及 XhoI）切割反應後確認 ARE 接合於 -hrGFP 上。

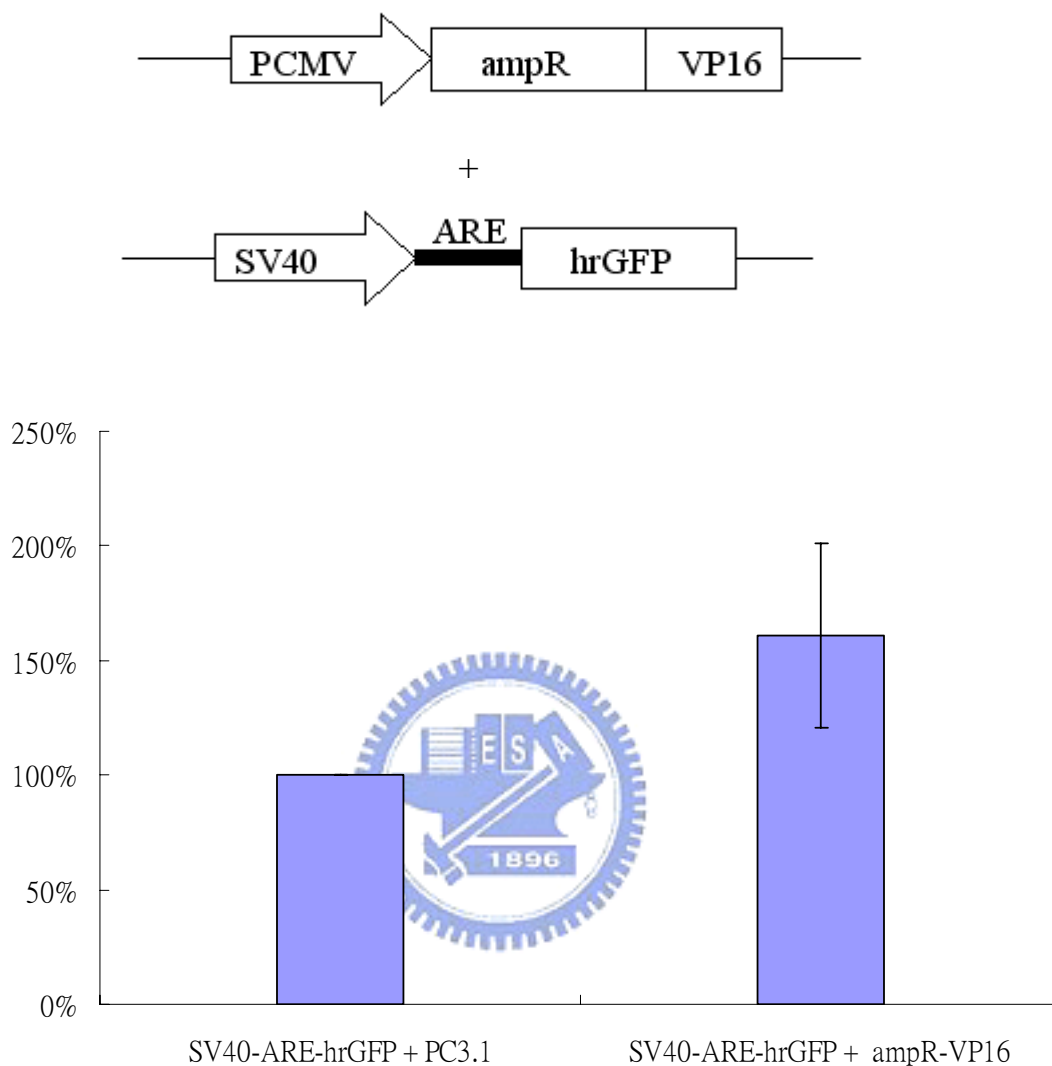
（lane 1:1 kb marker，lane 2：經由 SpeI 及 XhoI 切割後所得到的 DNA 片段約 840 bp。Lane 3：未經限制酶切割的質體 ARE-hrGFP）



圖二十六、利用微粒小體與 ARE 的複合體測試表現型質體的功能性。

在圖中其 Y 軸所表示的是螢光表現量的平均值，而 X 軸所示的是在實驗中的組別。由圖中可以明顯看到具有表現型質體 ampR 的蛋白質抽取液的 FITC 螢光表現量，是其它組別的一倍以上。

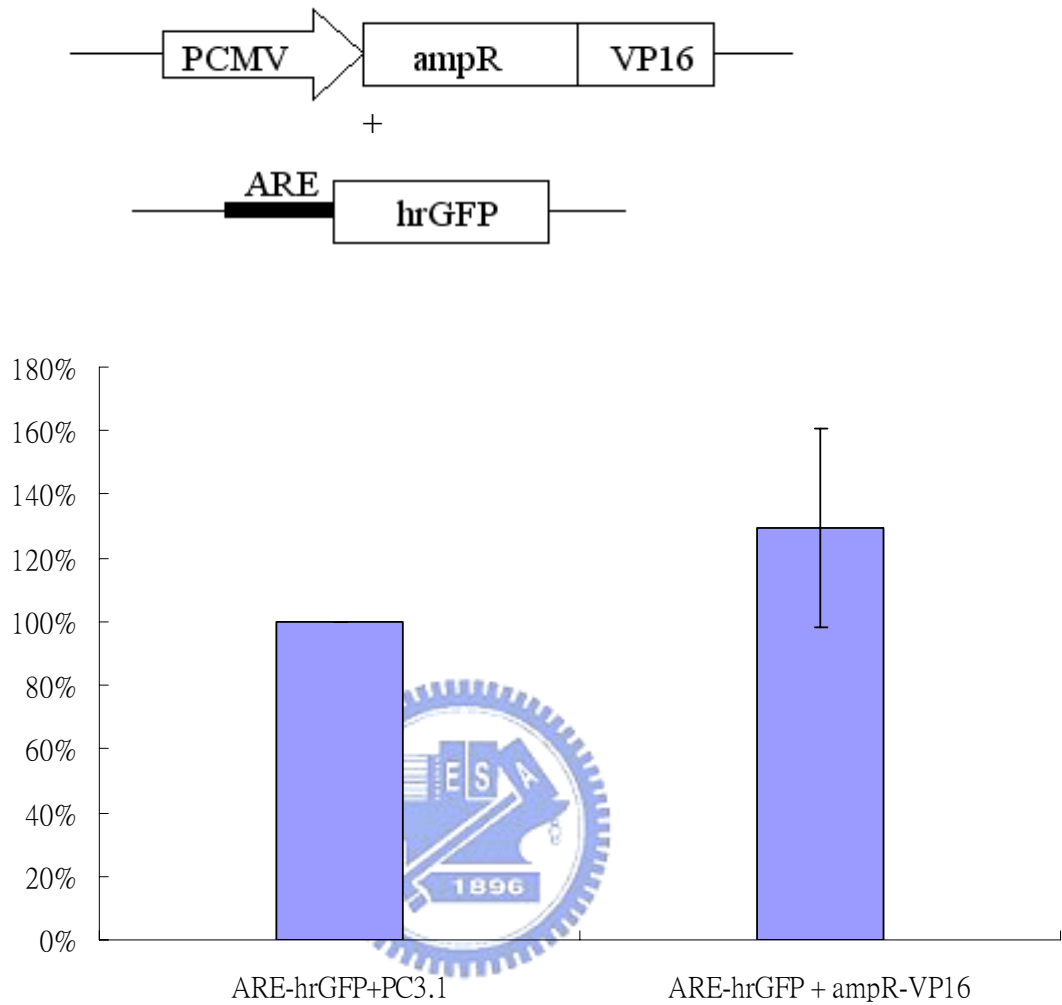
4-1：ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染測試



圖二十七、ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染結果

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR-VP16 + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（PC3.1 + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100 %。

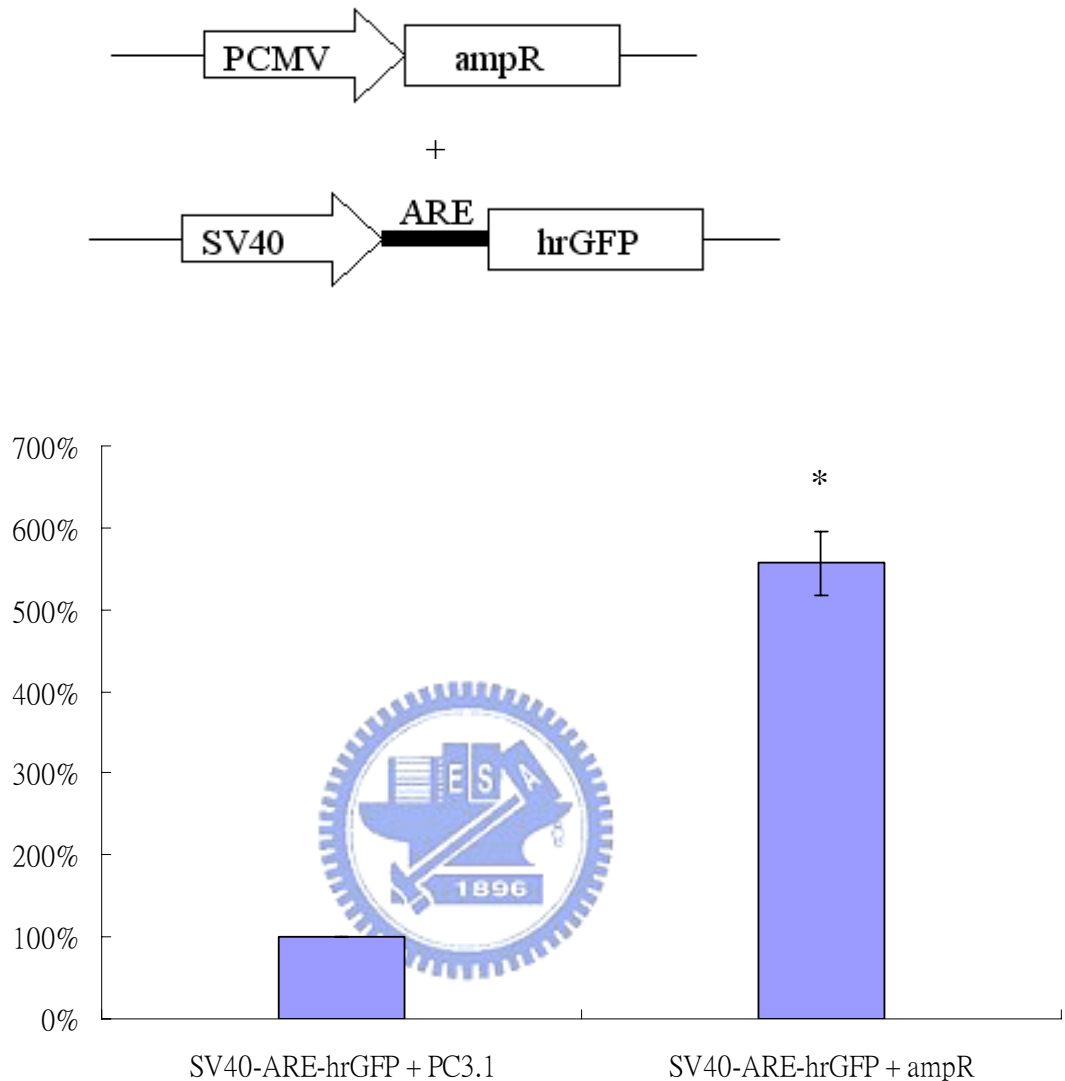
4-2 : ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染測試



圖二十八、ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染結果

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組 (ampR-VP16 + ARE-hrGFP) 的螢光強度平均值除以對照組 (PC3.1 + ARE-hrGFP) 的螢光強度平均值後乘以 100%。

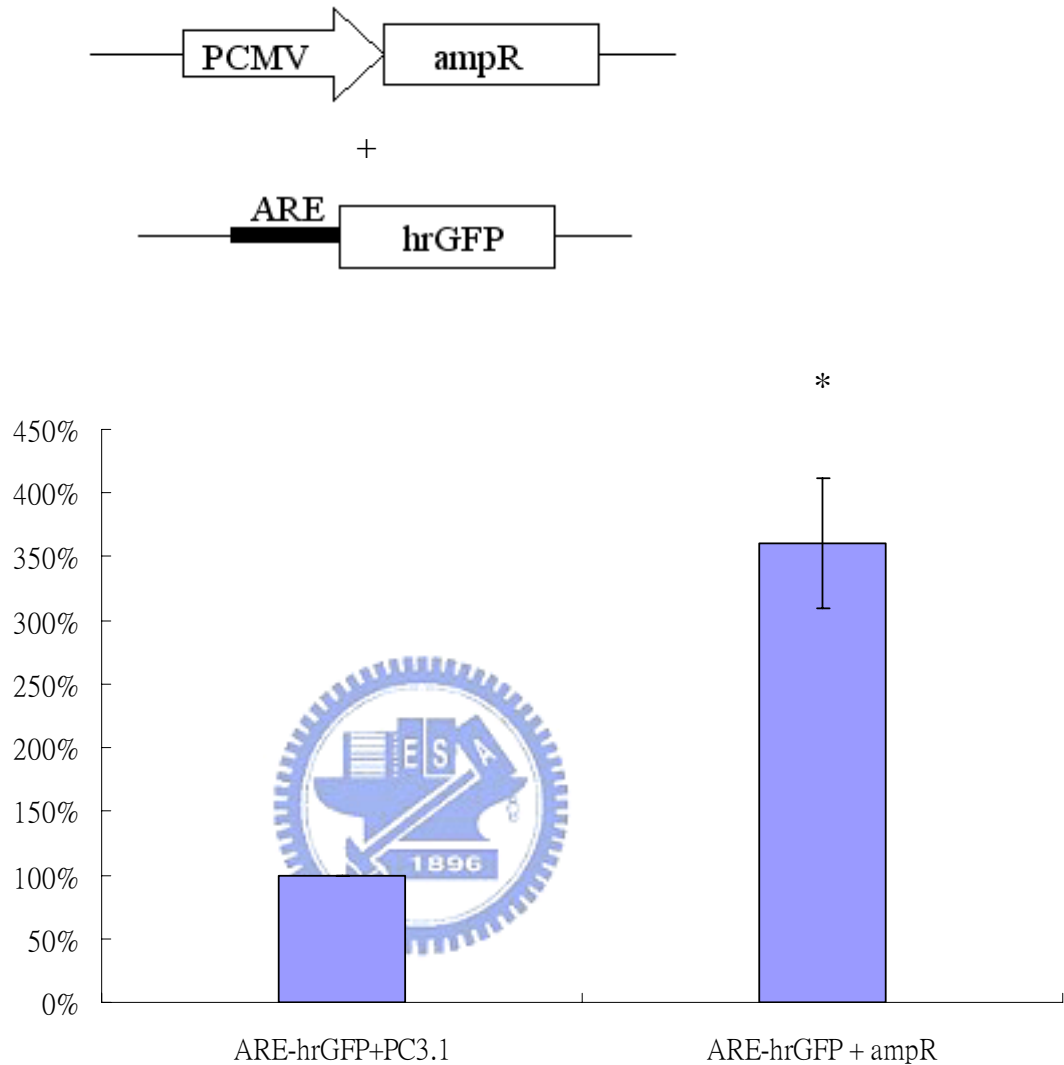
4-3：ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染測試



圖二十九、ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染結果

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（PC3.1 + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100%。

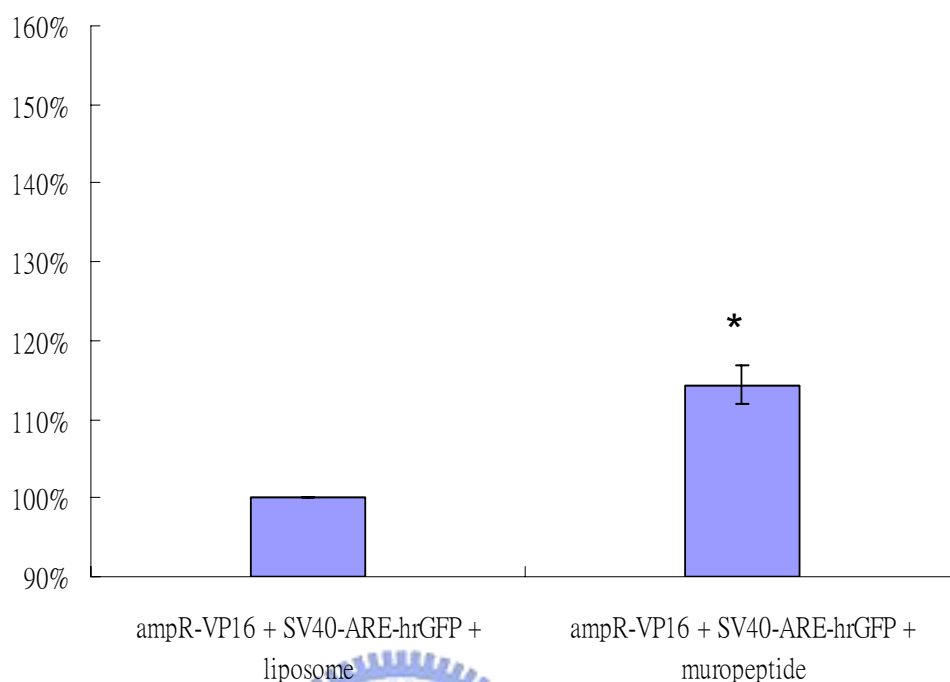
4-4：ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染測試



圖三十、ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染結果

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（PC3.1 + ARE-hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100%。

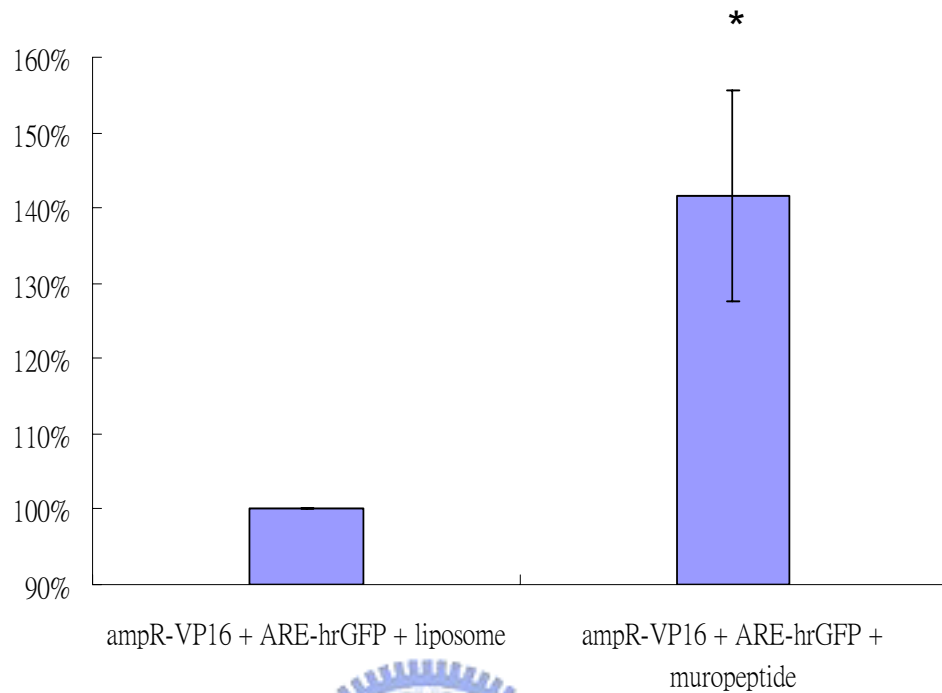
5-1: ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染後加 muropptide 的測試



圖三十一、ampR-VP16 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropptide 的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組 (ampR-VP16 + SV40-ARE-hrGFP + muropptide) 的螢光強度平均值除以對照組 (ampR-VP16 + SV40-ARE-hrGFP + liposome) 的螢光強度平均值後乘以 100%。

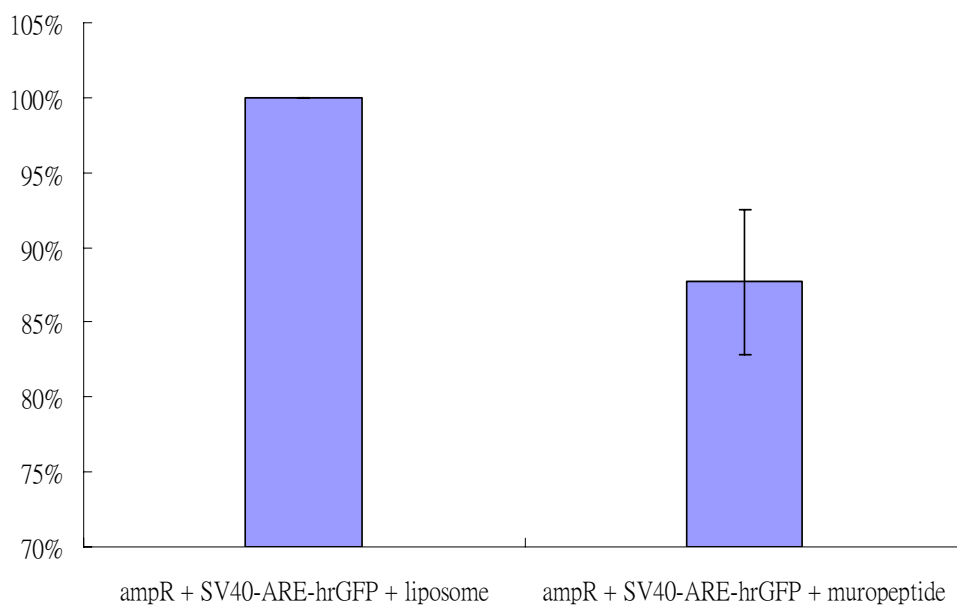
5-2：ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染後加 muropptide 的測試



圖三十二、ampR-VP16 與 ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropptide 的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR-VP16 + ARE-hrGFP + muropptide）的螢光強度平均值除以對照組（ampR-VP16 + ARE-hrGFP + liposome）的螢光強度平均值後乘以 100%。

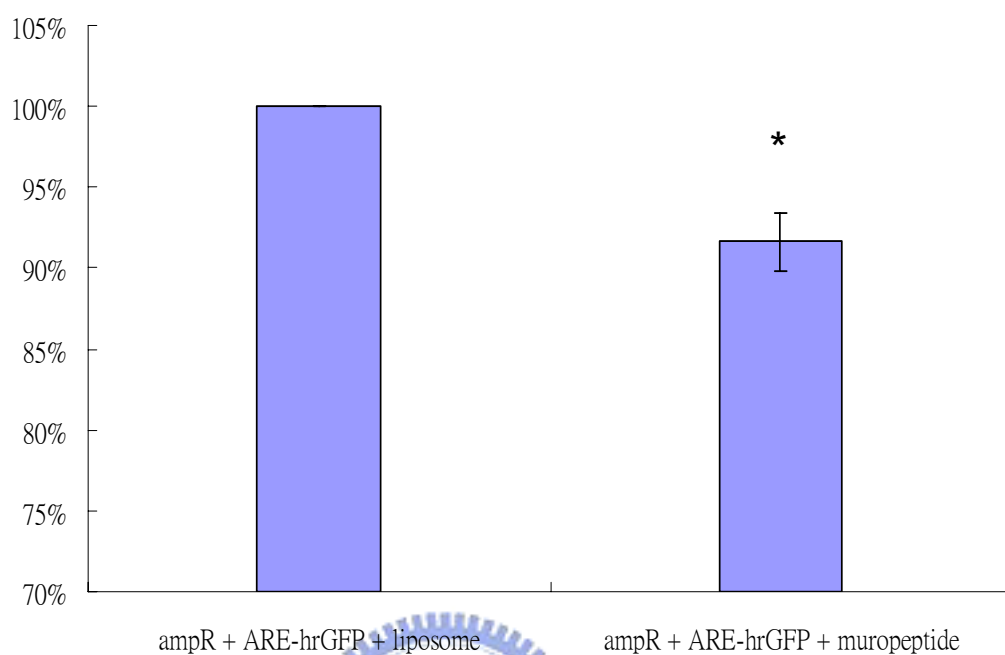
5-3：ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染後加 muropptide 的測試



圖三十三、ampR 與 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropptide 的結果。

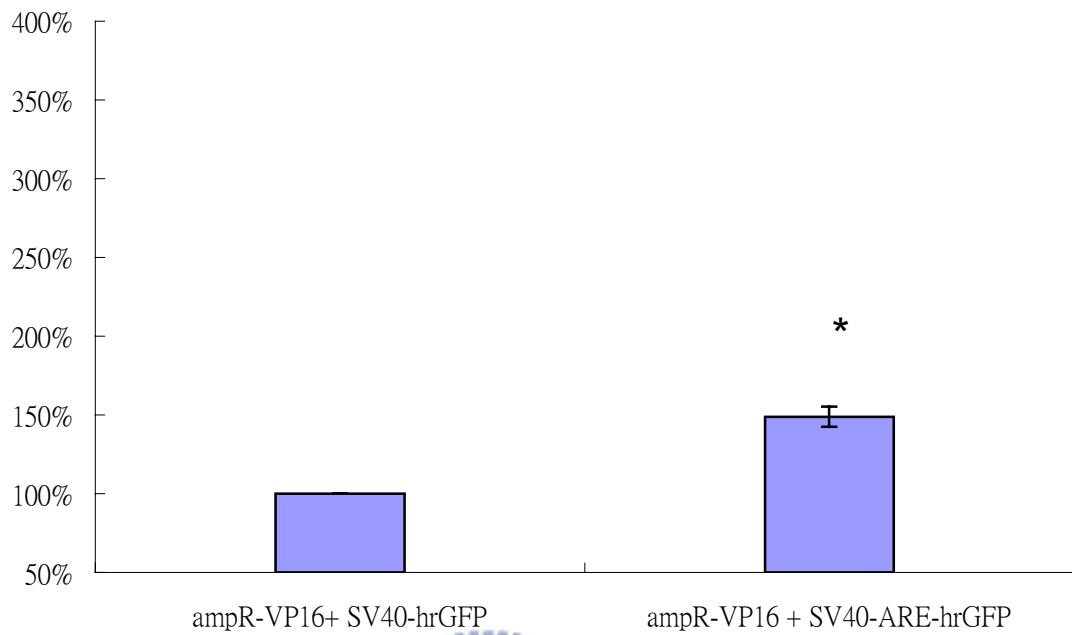
圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + SV40-ARE-hrGFP + muropptide）的螢光強度平均值除以對照組（ampR + SV40-ARE-hrGFP + liposome）的螢光強度平均值後乘以 100%。

5-4：ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染後加 muropeptide 的測試



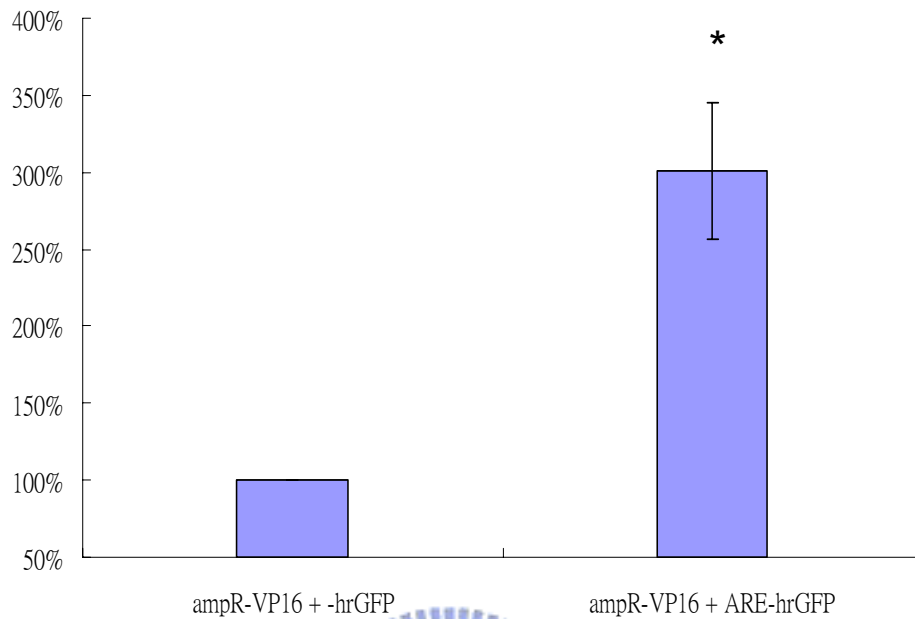
圖三十四、ampR 與 ARE-hrGFP 共同轉染並加入 muropeptide 的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + ARE-hrGFP + muropeptide）的螢光強度平均值除以對照組（ampR + ARE-hrGFP + liposome）的螢光強度平均值後乘以 100%。



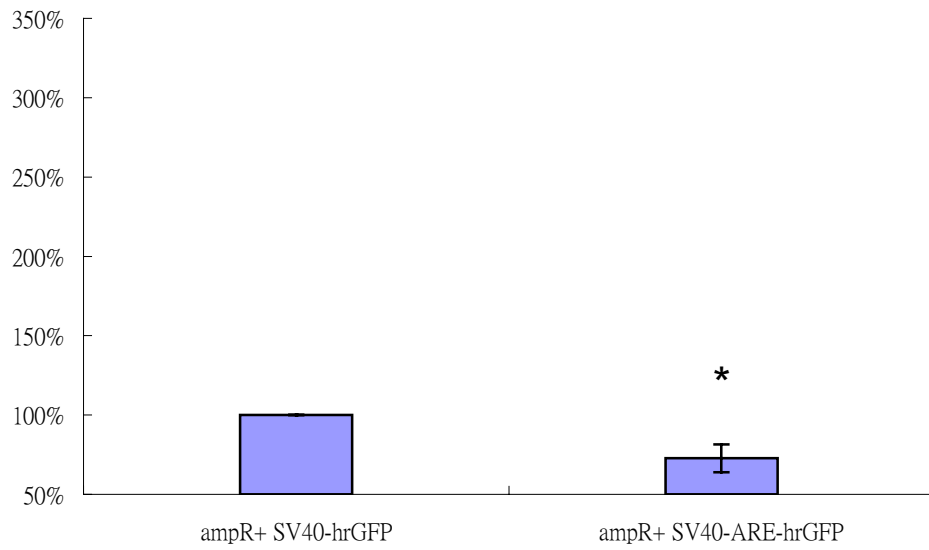
圖三十五、ampR-VP16 與 SV40-hrGFP 及 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR-VP16 + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（ampR-VP16 + SV40- hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100 %。



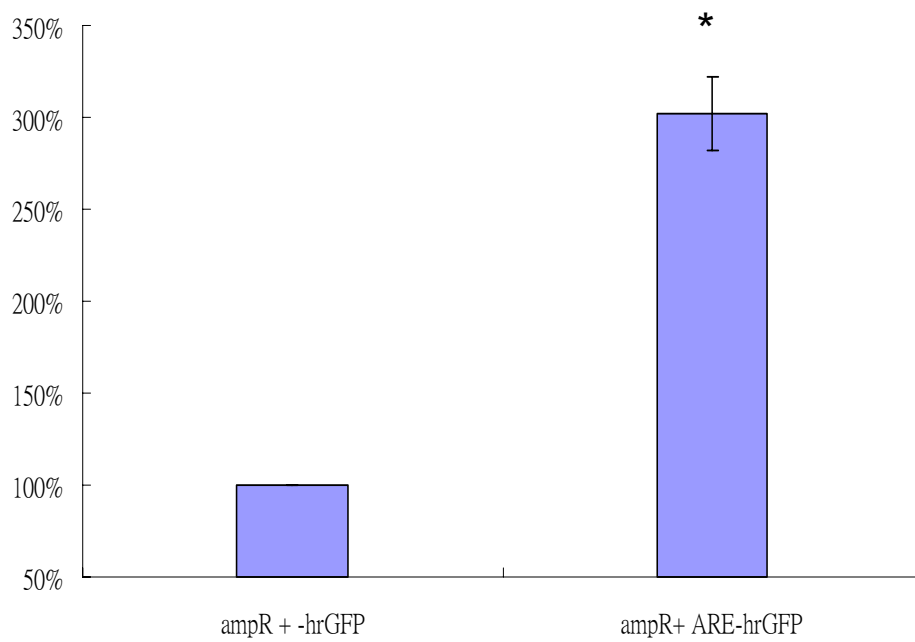
圖三十六、ampR-VP16 與-hrGFP 及 ARE-hrGFP 共同轉染的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組 (ampR-VP16 + ARE-hrGFP) 的螢光強度平均值除以對照組 (ampR-VP16 + hrGFP) 的螢光強度平均值後乘以 100%



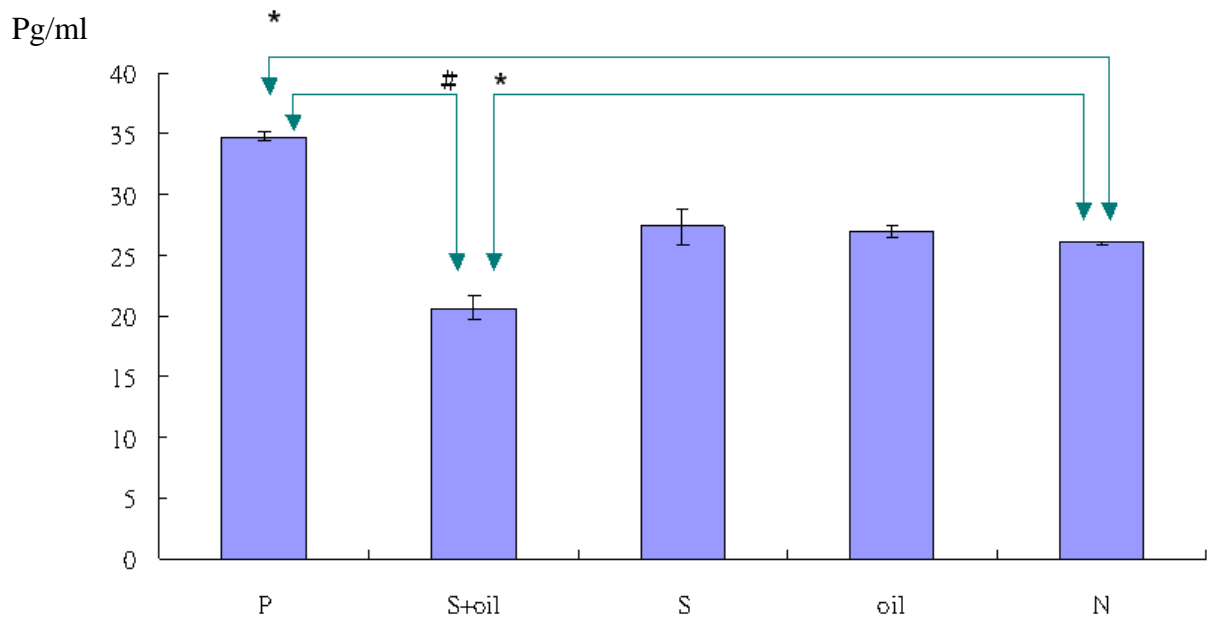
圖三十七、ampR 與 SV40-hrGFP 及 SV40-ARE-hrGFP 共同轉染的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + SV40-ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（ampR + SV40-hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100%。



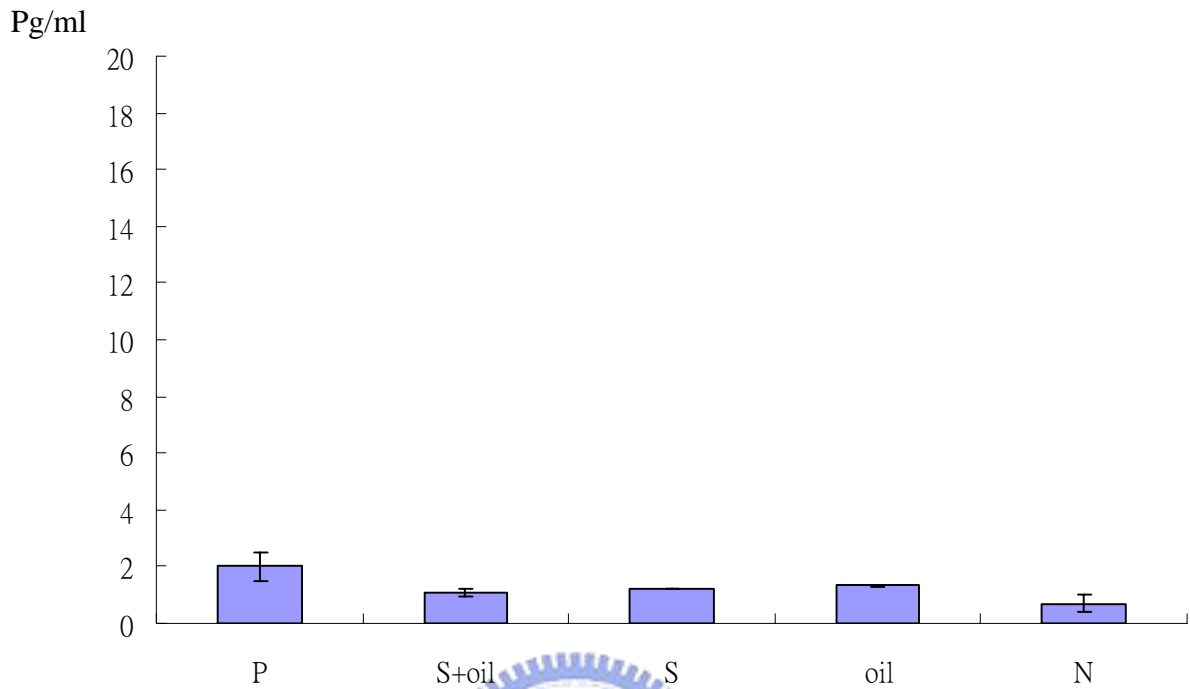
圖三十八、ampR 與-hrGFP 及 ARE-hrGFP 共同轉染並的結果。

圖中的 Y 軸所表示的是報導基因螢光強度平均值比值的百分比率。以實驗組（ampR + ARE-hrGFP）的螢光強度平均值除以對照組（ampR + hrGFP）的螢光強度平均值後乘以 100%。



圖三十九、muropeptide 及微脂體對於 P338/D1 細胞產生 TNF- α 表現量的影響。

圖中的 Y 軸代表的是經由 ELISA 所測定的 TNF- α 濃度，而 X 軸所表示的名成其代表意義為 P：LPS (0.14 nmole)，S+oil：誘導物及微脂體混合物 (4 nmole)，S：誘導物於 PBS 中 (4 nmole)，oil：微脂體單獨加入 (其加入的體積與 S+oil 組的體積相同)，N：沒有添加任何物質的細胞。 (*代表對於 N 組有顯著性差異，#代表對於 P 組也顯著性差異)。

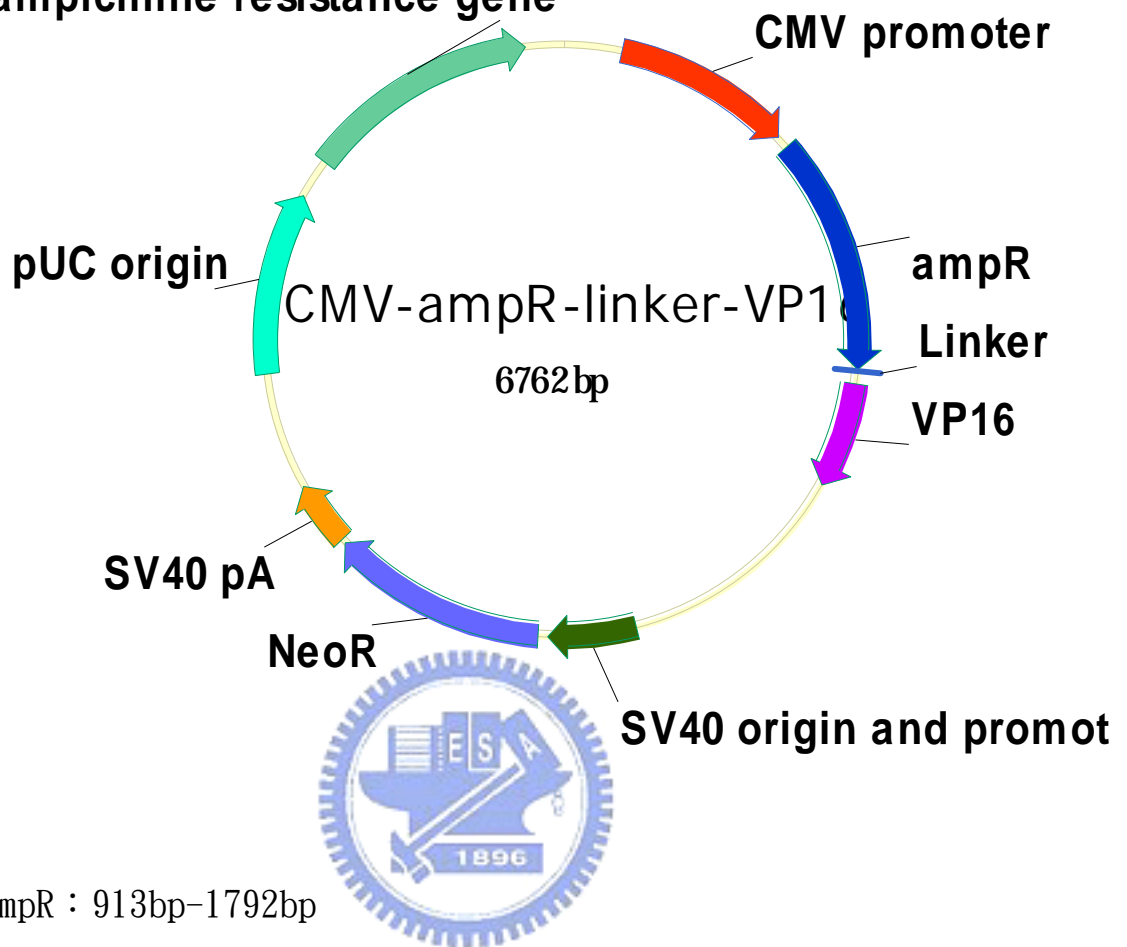


圖四十、誘導物及微脂體對於 P338/D1 細胞產生 IL-1 β 表現量的影響。

圖中的 Y 軸代表的是經由 ELISA 所測定的 IL-1 β 濃度，而 X 軸所表示的名成其代表意義為 P：LPS (0.14 nmole)，S+oil：誘導物及微脂體混合物 (4 nmole)，S：誘導物於 PBS 中 (4 nmole)，oil：微脂體單獨加入 (其加入的體積與 S+oil 組的體積相同)，N：沒有添加任何物質的細胞。

附錄 1：CMV-ampR-linker-VP16

ampicilline resistance gene



ampR : 913bp-1792bp

linker : 1792bp-1840bp

VP16:1840bp-2232bp

1	GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTCGACTCT	CAGTACAATC	TGCTCTGATG
	CTGCCTAGCC	CTCTAGAGGG	CTAGGGGATA	CCAGCTGAGA	GTCATGTTAG	ACGAGACTAC
61	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG
	GGCGTATCAA	TTCGGTCATA	GACGAGGGAC	GAACACACAA	CCTCCAGCGA	CTCATCACGC
121	CGAGCAAAAT	TAAAGCTACA	ACAAGGCAAG	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC
	GCTCGTTTTA	AATTCGATGT	TGTTCCGTTT	CGAACTGGCT	GTAAACGTAC	TTCTTAGACG
181	TTAGGGTTAG	GCGTTTTGCG	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT
	AATCCCAATC	CGCAAAACGC	GACGAAGCGC	TACATGCCCC	GTCTATATGC	GCAACTGTAA
241	GATTATTGAC	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTCAT	AGCCCATATA
	CTAATAACTG	ATCAATAAAT	ATCATTAGTT	AATGCCCCAG	TAATCAAAGTA	TCGGGTATAT
301	TGGAGTTCCG	CGTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCCGC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC
	ACCTCAAGGC	GCAATGTATT	GAATGCCATT	TACCGGGCGG	ACCGACTGGC	GGGTTGCTGG
361	CCCGCCCAT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	AACGCCAATA	GGGACTTTCC
	GGGCGGGTAA	CTGCAGTTAT	TACTGCATAC	AAGGGTATCA	TTGCGGTTAT	CCCTGAAAGG
421	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAC	TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGCCAGTA	CATCAAAGTGT
	TAACTGCAGT	TACCCACCTG	ATAAATGCCA	TTTGACGGGT	GAACCGTCAT	GTAGTTCACA
481	ATCATATGCC	AAGTACGCCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCATT
	TAGTATACGG	TTCATGCGGG	GGATAACTGC	AGTTACTGCC	ATTTACCGGG	CGGACCGTAA
541	ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA
	TACGGGTTCAT	GTA CTGGAAT	ACCCTGAAAG	GATGAACCGT	CATGTAGATG	CATAATCAGT
601	TCGCTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG
	AGCGATAATG	GTACC ACTAC	GCCAAAACCG	TCATGTAGTT	ACCCGCACCT	ATCGCCAAAC
661	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC
	TGAGTGCCCC	TAAAGGTTCA	GAGGTGGGGT	AACTGCAGTT	ACCCTCAAAC	AAAACCGTGG
721	AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACA ACTCCGC	CCCATTGACG	CAAATGGGCG
	TTTTAGTTGC	CCTGAAAGGT	TTTACAGCAT	TGTTGAGGCG	GGGTA ACTGC	GTTTACCCGC
781	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA
	CATCCGCACA	TGCCACCCTC	CAGATATATT	CGTCTCGAGA	GACCGATTGA	TCTCTTGGGT
841	CTGCTTACTG	GCTTATCGAA	ATTAATACGA	CTCACTATAG	GGAGACCCAA	GCTGGCTAGT
	GACGAATGAC	CGAATAGCTT	TAATTATGCT	GAGTGATATC	CCTCTGGGTT	CGACCGATCA
		KpnI ~~~~~				
901	TAAGCTTGGT	ACCATGGTCA	GACGTTACTCT	CCCCCTTAAC	CCGCTGCGCG	CCTTTGAGGC
	ATTGGAACCA	TGGTACCAGT	CTGCAATGAGA	GGGGGAATTG	GGCGACGCGC	GGAAACTCCG
961	CGCCGCCCGT	CATCTCAGTT	TTACCCGTGC	GGCGATTGAG	CTGAATGTCA	CCCATGCCGC
	GCGGCGGGCA	GTA GAGTCAA	AATGGGCACG	CCGCTAACTC	GACTTACAGT	GGGTACGGCG
1021	CGTCAGCCAG	CAGGTCAGGG	CTCTGGAAGA	ACA ACTCGGC	TGTGTGCTGT	TTACCCGCGT
	GCAGTCGGTC	GTCCAGTCCC	GAGACCTTCT	TGTTGAGCCG	ACACACGACA	AATGGGCGCA
1081	CTCACGCGGA	CTGGTGCTGA	CCCATGAAGG	TGAGGGATTA	CTGCCGTTGC	TCAATGAGGC
	GAGTGCGCCT	GACCACGACT	GGGTACTTCC	ACTCCCTAAT	GACGGCCACG	AGTTACTCCG
1141	GTTTTGACCGG	ATTGCGGATA	CTCTGGAGTG	TTTTTCTCAC	GGGCAGTTCC	GTGAGCGGGT
	CAA ACTGGCC	T AACGCCTAT	GAGACCTCAC	AAAAAGAGTG	CCCGTCAAGG	C ACTCGCCCA
1201	GAAAAGTCGGT	GCGGTGGGAA	CATTTGCCGC	AGGCTGGCTG	CTGCCGCGTC	TGGCCGGATT
	CTTTCAGCCA	CGCCACCCTT	GTA AACGGCG	TCCGACCGAC	GACGGCGCAG	ACCGGCCTAA

1261	TTATGACAGC AATACTGTCTG	CATCCGCATA GTAGGCGTAT	TTGATCTGCA AACTAGACGT	TATCTCCACC ATAGAGGTGG	CATAACAATC GTATTGTTAG	ATGTGGATCC TACACCTAGG
1321	GGCGGCGGAA CCGCCGCCTT	GGGCATGATT CCCGTACTAA	ATACGATCCG TATGCTAGGC	TTTCGGTAAC AAAGCCATTG	GGCGCATGGC CCGCGTACCG	ATGAAATCGGA TACTTAGCCT
1381	TGCGGAACTG ACGCCTTGAC	ATTTTCAGTG TAAAAGTCAC	CACCACACGC GTGGTGTGCG	CCCGCTGTGC GGGCGACACG	TCACCGGCCA AGTGGCCGGT	TTGCAGAGCA AACGTCTCGT
1441	GTTACAGCAG CAATGTCTGTC	CCGGATGATG GGCCTACTAC	TTCACCGCTT AAGTGGCGAA	CACGCTGCTG GTGGCAGCAG	CGCTCATTCC GCGAGTAAGG	GCCGGGATGA CGGCCCTACT
1501	ATGGAGCCGC TACCTCGGCG	TGGCTGGATT ACCGACCTAA	GTTCGGGTGG CAAGCCCACC	CACACCGCCT GTGTGGCGGA	TCCCCGTCAC AGGGGCAGTG	AGCCGGTCAT TCGGCCAGTA
1561	GGTGTTTGAC CCACAAACTG	ACCTCACTGG TGGAGTGACC	CCATGGCCGA GGTACCGGT	AGCGGCACAA TCGCCGTGTT	CTGGGTGCCG GACCCACGGC	GGGTAGCGAT CCCATCGCTA
1621	CGCACCGGTA GCGTGGCCAT	TGTATGTTCA ACATACAAGT	GCCGCCTGTT CGGCGGACAA	ACAGTCAGGC TGTCAGTCCG	GCACTGGTAC CGTGACCATG	AGCCGTTTGC TCGGCAAACG
1681	CGCAGAAATC GCGTCTTTAG	ACCCTCGGCG TGGGAGCCGC	GCTACTGGCT CGATGACCGA	GACGCGGTTA CTGCGCCAAT	CAGTCCCGTA GTCAGGGCAT	CGGAAACCCC GCCTTTGGGG
1741	GGCCATGCAG CCGGTACGTC	CAATTCGCCC GTAAAGCGGG	GCTGGCTGCT CGACCGACGA	GAATACGGCG CTTATGCCCG	GCGGCGCTGC CGCCGCGACG	AGGATATCGG TCCTATAGCC
1801	AGGTGGGTCA TCCACCCAGT	GGTGGAGGCT CCACCTCCGA	CGGGCGGGGG GCCCCCCCC	TTCCCTGCAG AAGGGACGTC	TCCGCGTACA AGGCGCATGT	GCCGCGCGCG CGGCGCGCGC
1861	TACGAAAAAC ATGCTTTTTG	AATTACGGGT TTAATGCCCA	CTACCATCGA GATGGTAGCT	GGGCCTGCTC CCCGGACGAG	GATCTCCCGG CTAGAGGGCC	ACGACGACGC TGCTGCTGCG
1921	CCCCGAAGAG GGGGCTTCTC	GCGGGGCTGG CGCCCCGACC	CGGCTCCGCG GCCGAGGCGC	CCTGTCCFTT GGACAGGAAA	CTCCCCGCGG GAGGGGCGCC	GACACACGCG CTGTGTGCGC
1981	CAGACTGTCTG GTCTGACAGC	ACGGCCCCCC TGCCGGGGGG	CGACCGATGT GCTGGCTACA	CAGCCTGGGG GTCGGACCCC	GACGAGCTCC CTGCTCGAGG	ACTTAGACGG TGAATCTGCC
2041	CGAGGACGTG GCTCCTGCAC	GCGATGGCGC CGCTACCGCG	ATGCCGACGC TACGGCTGCG	GCTAGACGAT CGATCTGCTA	TTCGATCTGG AAGCTAGACC	ACATGTTGGG TGTACAACCC
2101	GGACGGGGAT CCTGCCCCCTA	TCCCCGGGTC AGGGGCCCCAG	CGGGATTTAC GCCCTAAATG	CCCCACGAC GGGGGTGCTG	TCCGCCCCCT AGGCGGGGGA	ACGGCGCTCT TGCCGCGAGA
2161	GGATATGGCC CCTATACCGG	GACTTCGAGT CTGAAGCTCA	TTGAGCAGAT AACTCGTCTA	GTTTACCGAT CAAATGGCTA	GCCCTTGGAA CGGGAACCTT	TTGACGAGTA AACTGCCTAT
2221	CGGTGGGTAG GCCACCCATC	CTCGAGTCTA GAGCTCAGAT	GAGGGCCCCG CTCCCCGGCG	GGTTCGAAAG CCAAGCTTCC	TAAGCCTATC ATTCCGATAG	CCTAACCCCTC GGATTGGGAG
2281	TCCTCGGTCT AGGAGCCAGA	CGATTCTACG GCTAAGATGC	CGTACCGGTC GCATGGCCAG	ATCATCACCA TAGTAGTGGT	TCACCATTGA AGTGGTAACT	GTTTAAACCC CAAATTTGGG
2341	GCTGATCAGC CGACTAGTCG	CTCGACTGTG GAGCTGACAC	CCTTCTAGTT GGAAGATCAA	GCCAGCCATC CGGTCGGTAG	TGTTGTTTGC ACAACAACG	CCCTCCCCCG GGGAGGGGGC
2401	TGCCTTCCTT ACGGAAGGAA	GACCCTGGAA CTGGGACCTT	GGTGCCACTC CCACGGTGAG	CCACTGTCCT GGTGACAGGA	TTCCTAATAA AAGGATTATT	AATGAGGAAA TTACTCCTTT

2461	TTGCATCGCA AACGTAGCGT	TTGTCTGAGT AACAGACTCA	AGGTGTCATT TCCACAGTAA	CTATTCTGGG GATAAGACCC	GGGTGGGGTG CCCACCCCAC	GGGCAGGACA CCCGTCCTGT
2521	GCAAGGGGGA CGTTCCCCCT	GGATTGGGAA CCTAACCCCTT	GACAATAGCA CTGTTATCGT	GGCATGCTGG CCGTACGACC	GGATGCGGTG CCTACGCCAC	GGCTCTATGG CCGAGATACC
2581	CTTCTGAGGC GAAGACTCCG	GGAAAGAACC CCTTTCTTGG	AGCTGGGGCT TCGACCCCGA	CTAGGGGGTA GATCCCCCAT	TCCCCACGCG AGGGGTGCGC	CCCTGTAGCG GGGACATCGC
2641	GCGCATTAAAG CGCGTAATTC	CGCGGCGGGT GCGCCGCCCA	GTGGTGGTTA CACCACCAAT	CGCGCAGCGT GCGCGTCGCA	GACCGCTACA CTGGCGATGT	CTTGCCAGCG GAACGGTCCG
2701	CCCTAGCGCC GGGATCGCGG	CGCTCCTTTC GCGAGGAAAAG	GCTTTCCTCC CGAAAGAAGG	CTTCCTTTCT GAAGGAAAAGA	CGCCACG TTC GCGGTGCAAG	GCCGGCTTTC CGGCCGAAAAG
2761	CCCGTCAAAGC GGGCAGTTCG	TCTAAATCGG AGATTTAGCC	GGCATCCCTT CCGTAGGGAA	TAGGGTTCGG ATCCCAAGGC	ATTTAGTGCT TAAATCACGA	TTACGGCACC AATGCCGTGG
2821	TCGACCCCCAA AGCTGGGGTT	AAAACCTGAT TTTTGAACTA	TAGGGTGTAG ATCCCACTAC	GTTACGTTAG CAAGTGCATC	TGGGCCATCG ACCCGGTAGC	CCCTGATAGA GGGACTATCT
2881	CGTTTTTTCG GCCAAAAAGC	CCCTTTGACG GGGAAAAGTGC	TTGGAGTCCA AACCTCAGGT	CGTTCTTTAA GCAAGAAAATT	TAGTGGACTC ATCACCTGAG	TTGTTCCAAA AACAAGTTTT
2941	CTGGAACAAC GACCTTGTTG	ACTCAACCCT TGAGTTGGGA	ATCTCGGTCT TAGAGCCAGA	ATTCTTTTGA TAAGAAAAC	TTTATAAGGG AAATATTCCC	ATTTTGGGGA TAAAACCCCT
3001	TTTCGGCCTA AAAGCCGGAT	TTGGTAAAAA AACCAATTTT	AATGAGCTGA TTACTCGACT	TTTAAACAAA AAATTGTTTT	ATTTAACGCG TAAATTGCGC	AATTAATTCT TTAATTAAGA
3061	GTGGAATGTG CACCTTACAC	TGTCAGTTAG ACAGTCAATC	GGTGTGAAA CCACACCTTT	GTCCCCAGGC CAGGGGTCCG	TCCCCAGGCA AGGGGTCCGT	GGCAGAAAGTA CCGTCTTCAT
3121	TGCAAAAGCAT ACGTTTCGTA	GCATCTCAAT CGTAGAGTTA	TAGTCAGCAA ATCAGTCGTT	CCAGGTGTGG GGTCCACACC	AAAGTCCCCA TTTCAGGGGT	GGCTCCCCAG CCGAGGGGTC
3181	CAGGCAGAAAG GTCCGTCTTC	TATGCAAAAGC ATACGTTTCG	ATGCATCTCA TACGTAGAGT	ATTAGTCAGC TAATCAGTCG	AACCATAGTC TTGGTATCAG	CCGCCCTAA GGCGGGGATT
3241	CTCCGCCCAT GAGGCGGGTA	CCCGCCCTA GGGCGGGGAT	ACTCCGCCCA TGAGGCGGGT	GTTCCGCCCA CAAGGCGGGT	TTCTCCGCC AAGAGGCGGG	CATGGCTGAC GTACCGACTG
3301	TAATTTTTTT ATTAATAAAA	TATTTATGCA ATAAATACGT	GAGGCCGAGG CTCCGGCTCC	CCGCCTCTGC GGCGGAGACG	CTCTGAGCTA GAGACTCGAT	TTCCAGAAGT AAGGTCTTCA
3361	AGTGAGGAGG TCACTCCTCC	CTTTTTTGGG GAAAAAACCT	GGCCTAGGCT CCGGATCCGA	TTTGCAAAAA AAACGTTTTT	GCTCCCGGGA CGAGGGCCCT	GCTTGTATAT CGAACATATA
3421	CCATTTTTCG GGTAAAAGCC	ATCTGATCAA TAGACTAGTT	GAGACAGGAT CTCTGTCTTA	GAGGATCGTT CTCCTAGCAA	TCGCATGATT AGCGTACTAA	GAACAAGATG CTTGTTCTAC
3481	GATTGCACGC CTAACGTGCG	AGGTTCTCCG TCCAAGAGGC	GCCGCTTGGG CGGCGAACC	TGGAGAGGCT ACCTCTCCGA	ATTCGGCTAT TAAGCCGATA	GACTGGGCAC CTGACCCGTG
3541	AACAGACAAT TTGTCTGTTA	CGGCTGCTCT GCCGACGAGA	GATGCCGCCG CTACGGCGGC	TGTTCCGGCT ACAAGGCCGA	GTCAGCGCAG CAGTCGCGTC	GGGCGCCCGG CCCGCGGGCC
3601	TTCTTTTTGT AAGAAAAACA	CAAGACCGAC GTTCTGGCTG	CTGTCCGGTG GACAGGCCAC	CCCTGAATGA GGGACTTACT	PstI ACTGCAGGAC TGACGTCTTG	GAGGCAGCGC CTCCGTGCGG
3661	GGCTATCGTG CCGATAGCAC	GCTGGCCACG CGACCGGTGC	ACGGCGTTC TGCCCGCAAG	CTTGCGCAGC GAACGCGTGC	TGTGCTCGAC ACACGAGCTG	GTTGTCACTG CAACAGTGAC

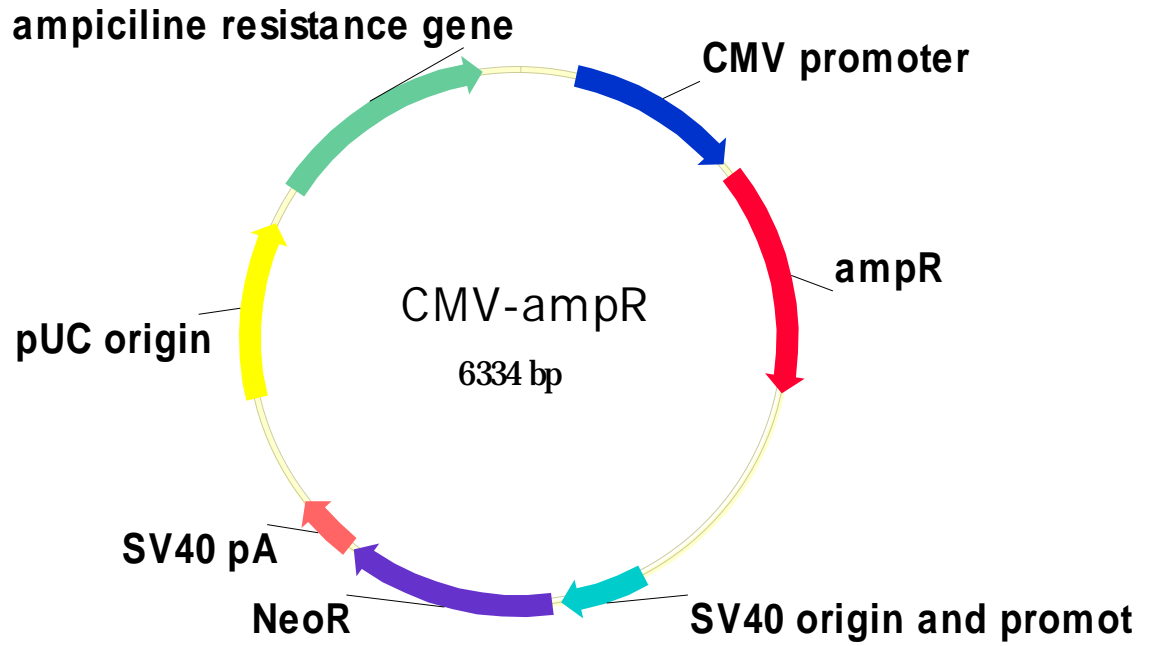
3721	AAGCGGGAAG TTCGCCCTTC	GGA CTGGCTG CCTGACCGAC	CTATTGGGCG GATAACCCGC	AAGTGCCGGG TTCACGGCCC	GCAGGATCTC CGTCCTAGAG	CTGTCATCTC GACAGTAGAG
3781	ACCTTGCTCC TGGAAACGAGG	TGCCGAGAAA ACGGCTCTTT	GTATCCATCA CATAGGTAGT	TGGCTGATGC ACCGACTACG	AATGCGGCGG TTACGCCGCC	CTGCATACGC GACGTATGCG
3841	TTGATCCGGC AACTAGGCCG	TACCTGCCCA ATGGACGGGT	TTCGACCACC AAGCTGGTGG	AAGCGAAACA TTCGCTTTGT	TCGCATCGAG AGCGTAGCTC	CGAGCACGTA GCTCGTGCAT
3901	CTCGGATGGA GAGCCTACCT	AGCCGGTCTT TCGGCCAGAA	GTCGATCAGG CAGCTAGTCC	ATGATCTGGA TACTAGACCT	CGAAGAGCAT GCTTCTCGTA	CAGGGGCTCG GTCCCCGAGC
3961	CGCCAGCCGA GCGGTCCGGCT	ACTGTTCCGC TGACAAGCGG	AGGCTCAAAG TCCGAGTTCC	CGCGCATGCC GCGCGTACGG	CGACGGCGAG GCTGCCGCTC	GATCTCGTCG CTAGAGCAGC
4021	TGACCCATGG ACTGGGTACC	CGATGCCTGC GCTACGGACG	TTGCCGAATA AACGGCTTAT	TCATGGTGGG AGTACCACCT	AAATGGCCGC TTTACCGCGC	TTTTCTGGAT AAAAGACCTA
4081	TCATCGACTG AGTAGCTGAC	TGGCCGGCTG ACCGGCCGAC	GGTGTGGCGG CCACACCGCC	ACCGCTATCA TGGCGATAGT	GGACATAGCG CCTGTATCGC	TTGGCTACCC AACCGATGGG
4141	GTGATATTGC CACTATAACG	TGAAGAGCTT ACTTCTCGAA	GCGGGCGAAT CCGCCGCTTA	GGGCTGACCG CCCGACTGGC	CTTCTCTCGT GAAGGAGCAC	CTTTACGGTA GAAATGCCAT
4201	TGCGCGCTCC AGCGGCGAGG	CGATTTCGAG GCTAAGCGTC	CGCATCGCCT GCGTAGCGGA	TCTATCGCCT AGATAGCGGA	TCTTGACGAG AGAACTGCTC	TTCTTCTGAG AAGAAGACTC
4261	CGGGACTCTG GCCCTGAGAC	GGGTTCCGGA CCCAAGCGCT	AATGACCGAC TTRACTGGCTG	CAAGCGACGC GTTCCGCTCG	CCAACCTGCC GGTTGGACGG	ATCACGAGAT TAGTGCTCTA
4321	TTCGATTCCA AAGCTAAGGT	CCGCCGCCTT GGCGGCGGAA	CTATGAAAAG GATACTTTCC	TTGGGCTTCG AACCCGAAAGC	GAATCGTTTT CTTAGCAAAA	CCGGGACGCC GGCCCTGCGG
4381	GGCTGGATGA CCGACCTACT	TCCTCCAGCG AGGAGGTCGC	CGGGGATCTC GCCCTAGAG	ATGCTGGAGT TACGACCTCA	TCTTCGCCCA AGAAGCGGGT	CCCCAACTTG GGGTTGAAAC
4441	TTTATTGCAG AAATAACGTC	CTTATAATGG GAATATTACC	TTACAAATAA AATGTTTATT	AGCAATAGCA TCGTTATCGT	TCACAAATTT AGTGTTHAAA	CACAAATAAA GTGTTTATTT
4501	GCATTTTTTT CGTAAAAAAA	CACTGCATTC GTGACGTAAG	TAGTTGTGGT ATCAACACCA	TTGTCCAAAC AACAGGTTTG	TCATCAATGT AGTAGTTACA	ATCTTATCAT TAGAATAGTA
4561	GTCTGTATAC CAGACATATG	CGTCGACCTC GCAGCTGGAG	TAGCTAGAGC ATCGATCTCG	TTGGCGTAAT AACCGCATTG	CATGGTCATA GTACCAGTAT	GCTGTTTCTT CGACAAAGGA
4621	GTGTGAAATT CACACTTTAA	GTTATCCGCT CAATAGGCGA	CACAATTCCA GTGTTAAGGT	CACAACATAC GTGTTGTATG	GAGCCGGAAG CTCGGCCTTC	CATAAAGTGT GTATTTACA
4681	AAAGCCTGGG TTTCGGACCC	GTGCCTAATG CACGGATTAC	AGTGAGCTAA TCACTCGATT	CTCACATTAA GAGTGTAATT	TTGCGTTGCG AACGCAACGC	CTCACTGCCC GAGTGACGGG
4741	GCTTTCCAGT CGAAAGGTCA	CGGGAAACCT GCCCTTTGGA	GTCGTGCCAG CAGCACGGTC	CTGCATTAAT GACGTAATTA	GAATCGGCCA CTTAGCCGGT	ACGCGCGGGG TGCGCGCCCC
4801	AGAGGCGGTT TCTCCGCCAA	TGCGTATTGG ACGCATAACC	GCGCTCTTCC CGCGAGAAGG	GCTTCCTCGC CGAAGGAGCG	TCACTGACTC AGTGACTGAG	GCTGCGCTCG CGACGCGAGC
4861	GTCGTTCCGG CAGCAAAGCCG	TGCGGCGAGC ACGCCGCTCG	GGTATCAGCT CCATAGTCGA	CACTCAAAGG GTGAGTTTCC	CGGTAATACG GCCATTATGC	GTTATCCACA CAATAGGTGT
4921	GAATCAGGGG CTTAGTCCCC	ATAACGCAGG TATTGCGTCC	AAAGAACATG TTTCTTGTAC	TGAGCAAAAG ACTCGTTTTC	GCCAGCAAAA CGGTCGTTTT	GGCCAGGAAC CCGGTCCCTG
4981	CGTAAAAAGG GCATTTTTTC	CCGCGTTGCT GGCGCAACGA	GCGGTTTTTC CCGCAAAAAG	CATAGGCTCC GTATCCGAGG	GCCCCCTGA CGGGGGGACT	CGAGCATCAC GCTCGTAGTG

5041	AAAAATCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	ATACCAGGCG
	TTTTTAGCTG	CGAGTTCAGT	CTCCACCCTG	TTGGGCTGTC	CTGATATTTT	TATGGTCCGC
5101	TTTCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCCTCT	CCTGTCCGA	CCCTGCCGCT	TACCGGATAC
	AAAGGGGAC	CTTCGAGGGA	GCACGCGAGA	GGACAAGGCT	GGGACGGCGA	ATGGCCTATG
5161	CTGTCCGCCT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GCGCTTTCTC	AATGCTCAG	CTGTAGGTAT
	GACAGGCGGA	AAGAGGGAAG	CCCTTCGCAC	CGCGAAAAG	TTACGAGTGC	GACATCCATA
5221	CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	CCCCGTTTCC
	GAGTCAAGCC	ACATCCAGCA	AGCGAGGTTT	GACCCGACAC	ACGTGCTTGG	GGGGCAAGTC
5281	CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	CGGTAACAT	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	AAGACACGAC
	GGGTGGCGA	CGCGGAATAG	GCCATTGATA	GCAGAACTCA	GGTTGGGCCA	TTCTGTGCTG
5341	TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CACTGGTAAC	AGGATTAGCA	GAGCGAGGTA	TGTAGGCGGT
	AATAGCGGTG	ACCGTCGTCG	GTGACCATTG	TCCTAATCGT	CTCGCTCCAT	ACATCCGCCA
5401	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCCTAAC	TACGGCTACA	CTAGAAGGAC	AGTATTTGGT
	CGATGTCTCA	AGAACTTCAC	CACCGGATTG	ATGCCGATGT	GATCTTCCCTG	TCATAAAACCA
5461	ATCTGCGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC	GGAAAAAGAG	TTGGTAGCTC	TTGATCCGGC
	TAGACGCGAG	ACGACTTCGG	TCAATGGAAG	CCTTTTCTC	AACCATCGAG	AACTAGGCCG
5521	AAAACAAACCA	CCGCTGGTAG	CGGTGGTTTT	TTTGTTCGCA	AGCAGCAGAT	TACGCGCAGA
	TTTGTTCGCA	GGCGACCATC	GCCACCAAAA	AAAACAAACGT	TCGTCTCTTA	ATGCGCGTCT
5581	AAAAAAGGAT	CTCAAGAAGA	TCCTTTGATC	TTTTCTACGG	GGTCTGACGC	TCAGTGGAAC
	TTTTTCTCTA	GAGTTCCTCT	AGGAAACTAG	AAAAGATGCC	CCAGACTGCG	AGTCACCTTG
5641	GAAAACCTCAC	GTTAAGGGAT	TTTGGTCATG	AGATTATCAA	AAAAGGATCTT	CACCTAGATC
	CTTTTGAGTG	CAATTCCCTA	AAACCAGTAC	TCTAATAGTT	TTTCTAGAA	GTGGATCTAG
5701	CTTTTAAATT	AAAAATGAAG	TTTTAAATCA	ATCTAAAGTA	TATATGAGTA	AACTTGGTCT
	GAAAATTTAA	TTTTTACTTC	AAAATTTAGT	TAGATTCAT	ATATACTCAT	TTGAACCAGA
5761	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA	CCTATCTCAG	CGATCTGTCT	ATTTCTGTTCA
	CTGTCAATGG	TTACGAATTA	GTCACTCCGT	GGATAGAGTC	GCTAGACAGA	TAAAGCAAGT
5821	TCCATAGTTG	CCTGACTCCC	CGTCGTGTAG	ATAACTACGA	TACGGGAGGG	CTTACCATCT
	AGGTATCAAC	GGACTGAGGG	GCAGCACATC	TATTGATGCT	ATGCCCTCCC	GAATGGTAGA
5881	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	ACCGCGAGAC	CCACGCTCAC	CGGCTCCAGA	TTTATCAGCA
	CCGGGGTCAC	GACGTTACTA	TGGCGCTCTG	GGTCCGAGTG	GCCGAGGTCT	AAATAGTCGT
5941	ATAAACCCAGC	CAGCCGGAAG	GGCCGAGCGC	AGAAAGTGGT	CTGCAACTTT	ATCCGCCTCC
	TATTTGGTCC	GTCGGCCTTC	CCGGCTCGCG	TCTTACCAG	GACGTTGAAA	TAGGCGGAGG
6001	ATCCAGTCTA	TTAATTGTTG	CCGGGAAGCT	AGAGTAAAGTA	GTTCCGCCAGT	TAATAGTTTG
	TAGGTACAGAT	AATTAACAAC	GGCCCTTCGA	TCTCATTTCAT	CAAGCGGTCA	ATTATCAAAC
6061	CGCAACGTTG	TTGCCATTGC	TACAGGCATC	GTGGTGTAC	GCTCGTCGTT	TGGTATGGCT
	GCGTTGCAAC	AACGGTAACG	ATGTCCGTAG	CACCACAGTG	CGAGCAGCAA	ACCATACCGA
6121	TCATTCAGCT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG	CGAGTTACAT	GATCCCCCAT	GTTGTGCAAA
	AGTAAGTCGA	GGCCAAGGGT	TGCTAGTTCC	GCTCAATGTA	CTAGGGGGTA	CAACACGTTT
6181	AAAGCGGTTA	GCTCCTTCGG	TCCTCCGATC	GTTGTCAGAA	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA
	TTTCGCCAAT	CGAGGAAGCC	AGGAGGCTAG	CAACAGTCTT	CATTCAACCG	GCGTCACAAT
6241	TCACTCATGG	TTATGGCAGC	ACTGCATAAT	TCTCTTACTG	TCATGCCATC	CGTAAAGATGC
	AGTGAGTACC	AATACCGTCG	TGACGTATTA	AGAGAATGAC	AGTACGGTAG	GCATTCTACG
6301	TTTTCTGTGA	CTGGTGAGTA	CTCAACCAAG	TCATTCTGAG	AATAGTGTAT	GCGGCGACCG
	AAAAGACACT	GACCACTCAT	GAGTTGGTTC	AGTAAGACTC	TTATCACATA	CGCCGCTGGC

6361	AGTTGCTCTT	GCCC GGCGTC	AATACGGGAT	AATACCGCGC	CACATAGCAG	AACTTTAAAA
	TCAACGAGAA	CGGGCCGCAG	TTATGCCCTA	TTATGGCGCG	GTGTATCGTC	TTGAAATTTT
6421	GTGCTCATCA	TTGGAAAACG	TTCTTCGGGG	CGAAAACCTCT	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG
	CACGAGTAGT	AACCTTTTGC	AAGAAGCCCC	GCTTTTGAGA	GTTCCCTAGAA	TGGCGACAAC
6481	AGATCCAGTT	CGATGTAACC	CACTCGTGCA	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACTTTC
	TCTAGGTCAA	GCTACATTGG	GTGAGCACGT	GGGTTGACTA	GAAGTCGTAG	AAAATGAAAG
6541	ACCAGCGTTT	CTGGGTGAGC	AAAAACAGGA	AGGCAAAATG	CCGCAAAAAA	GGGAATAAGG
	TGGTCGCAAA	GACCCACTCG	TTTTGTCCCT	TCCGTTTTAC	GGCGTTTTTT	CCCTTATTCC
6601	GCGACACGGA	AATGTTGAAT	ACTCATACTC	TTCCTTTTTC	AATATTATTG	AAGCATTTAT
	CGCTGTGCCT	TTACAACCTA	TGAGTATGAG	AAGGAAAAAG	TTATAATAAC	TTCGTAAATA
6661	CAGGGTTATT	GTCTCATGAG	CGGATACATA	TTTGAATGTA	TTTAGAAAAA	TAAACAAATA
	GTCCCAATAA	CAGAGTACTC	GCCTATGTAT	AAACTTACAT	AAATCTTTTT	ATTTGTTTAT
6721	GGGGTTCCGC	GCACATTTCC	CCGAAAAGTG	CCACCTGACG	TC	
	CCCCAAGGCG	CGTGTAAGG	GGCTTTTCAC	GGTGGACTGC	AG	



附錄 2：CMV-ampR



ampR : 913bp-1804bp



1	GACGGATCGG CTGCCTAGCC	GAGATCTCCC CTCTAGAGGG	GATCCCCTAT CTAGGGGATA	GGTCGACTCT CCAGCTGAGA	CAGTACAATC GTCATGTTAG	TGCTCTGATG ACGAGACTAC
61	CCGCATAGTT GGCGTATCAA	AAGCCAGTAT TTCGGTCATA	CTGCTCCCTG GACGAGGGAC	CTTGTGTGTT GAACACACAA	GGAGGTCGCT CCTCCAGCGA	GAGTAGTGCG CTCATCACGC
121	CGAGCAAAAAT GCTCGTTTTA	TTAAGCTACA AATTCGATGT	ACAAGGCAAG TGTTCCGFTC	GCTTGACCGA CGAACTGGCT	CAATTGCATG GTTAACGTAC	AAGAATCTGC TTCTTAGACG
181	TTAGGGTTAG AATCCCAATC	GCGTTTTGCG CGCAAAACGC	CTGCTTCGCG GACGAAAGCG	ATGTACGGGC TACATGCCCG	CAGATATACG GTCTATATGC	CGTTGACATT GCAACTGTAA
241	GATTATTGAC CTAATAACTG	TAGTTATTAA ATCAATAAAT	TAGTAATCAA ATCATTAGTT	TTACGGGGTC AATGCCCCAG	ATTAGTTCAT TAATCAAGTA	AGCCCATATA TCGGGTATAT
301	TGGAGTTCCG ACCTCAAGGC	CGTTACATAA GCAATGTATT	CTTACGGTAA GAATGCCATT	ATGGCCCCGC TACCGGGCGG	TGGCTGACCG ACCGACTGGC	CCCAACGACC GGGTGCTGG
361	CCCGCCCAT GGGCGGGTAA	GACGTCAATA CTGCAGTTAT	ATGACGTATG TACTGCATAC	TTCCCATAGT AAGGGTATCA	AACGCCAATA TTGCGGTTAT	GGGACTTTC CCCTGAAAGG
421	ATTGACGTCA TAACTGCAGT	ATGGGTGGAC TACCCACCTG	TATTTACGGT ATAAATGCCA	AAACTGCCCA TTTGACGGGT	CTTGGCAGTA GAACCGTCAT	CATCAAGTGT GTAGTTCACA
481	ATCATATGCC TAGTATACGG	AAGTACGCC TTCATGCGGG	CCTATTGACG GGATAACTGC	TCAATGACGG AGTTACTGCC	TAAATGGCCC ATTTACCGGG	GCCTGGCATT CGGACCGTAA
541	ATGCCAGTA TACGGTCAT	CATGACCTTA GTACTGGAAT	TGGGACTTTC ACCTGAAAAG	CTACTTGCCA GATGAACCGT	GTACATCTAC CATGTAGATG	GTATTAGTCA CATAATCAGT
601	TCGCTATTAC AGCGATAATG	CATGGTGATG GTACCACTAC	CGTTTTTGCC GCCAAAACCG	AGTACATCAA TCATGTAGTT	TGGGCGTGGA ACCCGCACCT	TAGCGGTTTG ATCGCCAAAC
661	ACTCACGGGG TGAGTGCCCC	ATTTCCAAGT TAAAGGTTCA	CTCCACCCCA GAGGTGGGGT	TTGACGTCAA AACTGCAGTT	TGGGAGTTTG ACCCTCAAAC	TTTTGGCACC AAAACCGTGG
721	AAAATCAACG TTTTAGTTGC	GGACTTTCCA CCTGAAAAGT	AAATGTCGTA TTTACAGCAT	ACAACTCCGC TGTTGAGGCG	CCCATTGACG GGGTAACCTG	CAAAATGGGCG GTTTACCCGC
781	GTAGGCGTGT CATCCGCACA	ACGGTGGGAG TGCCACCCTC	GTCTATATAA CAGATATATT	GCAGAGCTCT CGTCTCGAGA	CTGGCTAACT GACCGATTGA	AGAGAACCCA TCTCTGGGT
841	CTGCTTACTG GACGAATGAC	GCTTATCGAA CGAATAGCTT	ATTAATACGA TAATTATGCT	CTCACTATAG GAGTGATATC	GGAGACCCAA CCTCTGGGTT	GCTGGCTAGT CGACCGATCA
901	TAAGCTTGGT ATTCGAACCA	ACCATGGTCA TGGTACCAGT	GACGTTATCT CTGCAATAGA	CCCCCTTAAC GGGGGAATTG	CCGCTGCGCG GGCGACGCGC	CCTTTGAGGC GGAAACTCCG
961	CGCCGCCCCT GCGGCGGGCA	CATCTCAGTT GTAGAGTCAA	TTACCCGTGC AATGGGCACG	GGCGATTGAG CCGCTAACTC	CTGAATGTCA GACTTACAGT	CCCATGCCGC GGGTACGGCG
1021	CGTCAGCCAG GCAGTCGGTC	CAGGTCAGGG GTCCAGTCCC	CTCTGGAAGA GAGACCTTCT	ACAACTCGGC TGTTGAGCCG	TGTGTGCTGT ACACACGACA	TTACCCGCGT AATGGCGCA
1081	CTCACGCGGA GAGTGCGCCT	CTGGTGCTGA GACCACGACT	CCCATGAAAG GGTACTTCC	TGAGGGATTA ACTCCCTAAT	CTGCCGGTGC GACGGCCACG	TCAATGAGGC AGTTACTCCG
1141	GTTTGACCGG CAAACTGGCC	ATTGCGGATA TAACGCCTAT	CTCTGGAGTG GAGACCTCAC	TTTTTCTCAC AAAAAGAGTG	GGGCAGTTCC CCCGTCAAAG	GTGAGCGGGT CACTCGCCCA
1201	GAAAGTCGGT CTTTCAGCCA	GCGGTGGGAA CGCCACCCTT	CATTTGCCGC GTAAACGGCG	AGGCTGGCTG TCCGACCGAC	CTGCCGCGTC GACGGCGCAG	TGGCCGGATT ACCGCCTAA

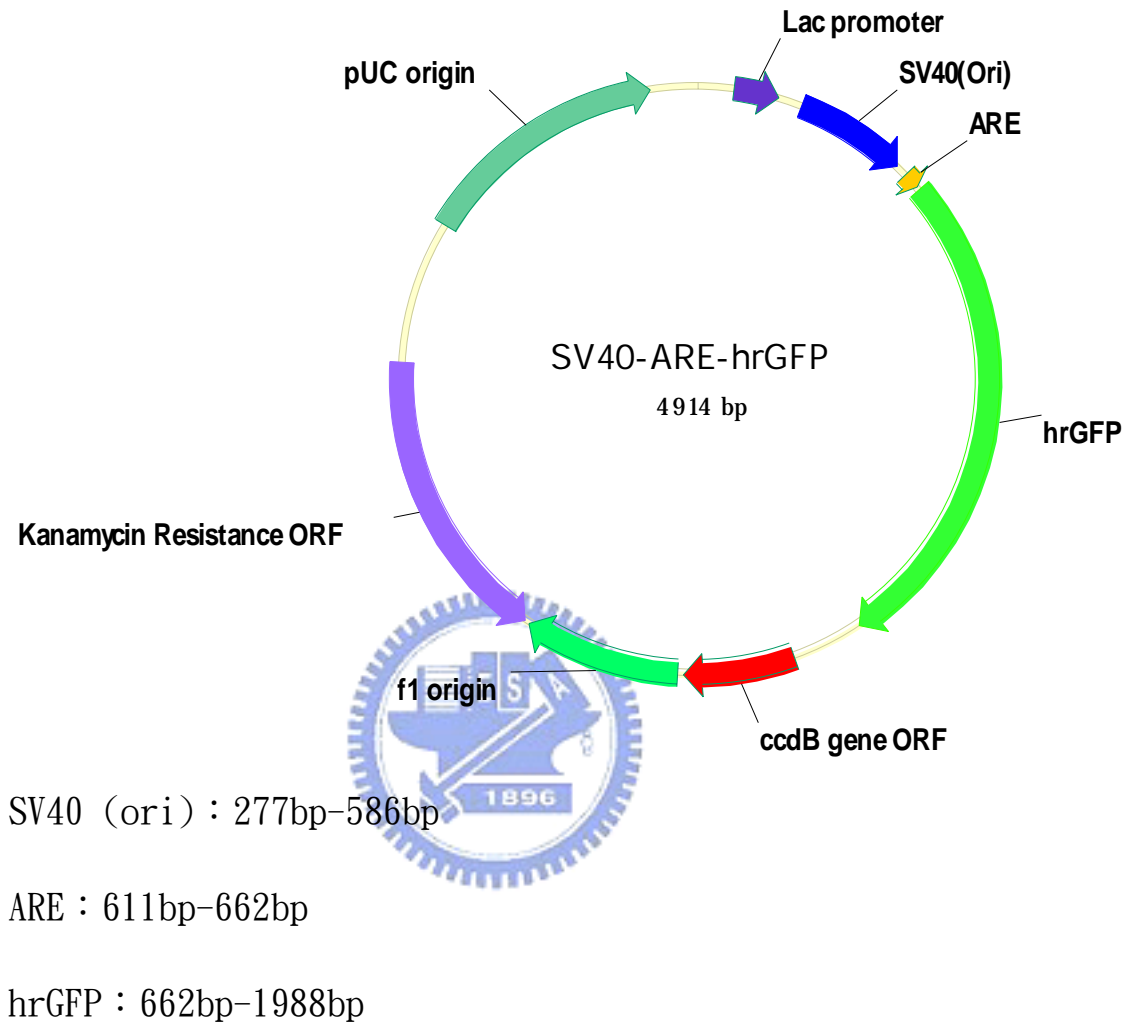
1261	TTATGACAGC AATACTGTCTG	CATCCGCATA GTAGGCGTAT	TTGATCTGCA AACTAGACGT	TATCTCCACC ATAGAGGTGG	CATAACAATC GTATTGTTAG	ATGTGGATCC TACACCTAGG
1321	GGCGGCGGAA CCGCCGCCTT	GGGCATGATT CCCCTACTAA	ATACGATCCG TATGCTAGGC	TTTCGGTAAC AAAGCCATTG	GGCGCATGGC CCGCGTACCG	ATGAATCGGA TACTTAGCCT
1381	TGCGGAACTG ACGCCTTGAC	ATTTTCAGTG TAAAAGTCAC	CACCACACGC GTGGTGTGCG	CCCCTGTGC GGGCGACACG	TCACCGGCCA AGTGGCCGGT	TTGCAGAGCA AACGTCTCGT
1441	GTTACAGCAG CAATGTCTGTC	CCGGATGATG GGCCTACTAC	TTCACCGCTT AAGTGGCGAA	CACGCTGCTG GTGCGACGAC	CGCTCATTCC GCGAGTAAGG	GCCGGGATGA CGGCCCTACT
1501	ATGGAGCCGC TACCTCGGCG	TGGCTGGATT ACCGACCTAA	GTTCGGGTGG CAAGCCACC	CACACCGCCT GTGTGGCGGA	TCCCCGTCAC AGGGGCAGTG	AGCCGGTCAT TCGGCCAGTA
1561	GGTGTTTGAC CCACAAACTG	ACCTCACTGG TGGAGTGACC	CCATGGCCGA GGTACC GGCT	AGCGGCACAA TCGCCGTGTT	CTGGGTGCCG GACCCACGGC	GGGTAGCGAT CCCATCGCTA
1621	CGCACCGGTA GCGTGCCCAT	TGTATGTTCA ACATACAAGT	GCCGCCTGTT CGGCGGACAA	ACAGTCAGGC TGTCAGTCCG	GCACTGGTAC CGTGACCATG	AGCCGTTTGC TCGGCAAACG
1681	CGCAGAAAATC GCGTCTTTAG	ACCCTCGGCG TGGGAGCCGC	GCTACTGGCT CGATGACCGA	GACGCGGTTA CTGCGCCAAT	CAGTCCCCTA GTCAGGGCAT	CGGAAAACCC GCCTTTGGGG
1741	GGCCATGCAG CCGGTACGTC	CAATTCGCCC GTTAAGCGGG	GCTGGCTGCT CGACCGACGA	GAATACGGCG CTTATGCCGC	GCGGCGCGAG CGCCGCGCTC	TACGGTGGGT ATGCCACCCA
1801	^{XhoI} AGCTCGAGTC TCGAGCTCAG	TAGAGGGCCC ATCTCCCGGG	GCGGTTGCAA CGCCAAAGTT	GGTAAGCCTA CCATTCCGGAT	TCCCTAACCC AGGGATTGGG	TCTCCTCGGT AGAGGAGCCA
1861	CTCGATTCTA GAGCTAAGAT	CGCGTACCGG GCGCATGGCC	TCATCATCAC AGTAGTAGTG	CATCACCATT GTAGTGGTAA	GAGTTTAAAC CTCAAATTTG	CCGCTGATCA GGCGACTAGT
1921	GCCTCGACTG CGGAGCTGAC	TGCCTTCTAG ACGGAAGATC	TTGCCAGCCA AACGGTCCGT	TCTGTTGTTT AGACAACAAA	GCCCCTCCCC CGGGGAGGGG	CGTGCCTTCC GCACGGAAGG
1981	TTGACCCTGG AACTGGGACC	AAGGTGCCAC TTCCACGGTG	TCCCCTGTGC AGGGTGACAG	CTTTCCTAAT GAAAGGATTA	AAAATGAGGA TTTTACTCCT	AATTGCATCG TTAACGTAGC
2041	CATTGTCTGA GTAACAGACT	GTAGGTGTCA CATCCACAGT	TTCTATTCTG AAGATAAGAC	GGGGGTGGGG CCCCCACCCC	TGGGGCAGGA ACCCCGTCCT	CAGCAAAGGG GTCGTTCCCC
2101	GAGGATTGGG CTCCTAACCC	AAGACAATAG TTCTGTTATC	CAGGCATGCT GTCCGTACGA	GGGGATGCGG CCCCTACGCC	TGGGCTCTAT ACCCGAGATA	GGCTTCTGAG CCGAAGACTC
2161	GCGGAAAAGAA CGCCTTTCTT	CCAGCTGGGG GGTCGACCCC	CTCTAGGGGG GAGATCCCCC	TATCCCCACG ATAGGGGTGC	CGCCCTGTAG GCGGGACATC	CGGCGCATT GCCGCGTAAT
2221	AGCGCGGCGG TCGCGCCGCC	GTGTGGTGGT CACACCACCA	TACGCGCAGC ATGCGCGTCG	GTGACCGCTA CACTGGCGAT	CACTTGCCAG GTGAACGGTC	CGCCCTAGCG GCGGGATCGC
2281	CCCCTCCTT GGGCGAGGAA	TCGCTTTCTT AGCGAAAAGAA	CCCTTCCTTT GGGAAGGAAA	CTCGCCACGT GAGCGGTGCA	TCGCCGGCTT AGCGGCCGAA	TCCCCTGCAA AGGGGCAGTT
2341	GCTCTAAATC CGAGATTTAG	GGGGCATCCC CCCCGTAGGG	TTTAGGGTTC AAATCCCAAG	CGATTTAGTG GCTAAATCAC	CTTTACGGCA GAAATGCCGT	CCTCGACCCC GGAGCTGGGG
2401	AAAAAACTTG TTTTTTGAAC	ATTAGGGTGA TAATCCCCT	TGGTTCACGT ACCAAGTGCA	AGTGGGCCAT TCACCCGGTA	CGCCCTGATA GCGGGACTAT	GACGGTTTTT CTGCCAAAAA
2461	CGCCCTTTGA GCGGGAAAAT	CGTTGGAGTC GCAACCTCAG	CACGTTCTTT GTGCAAGAAA	AATAGTGGAC TTATCACCTG	TCTTGTTCCA AGAACAAGGT	AACCTGGAACA TTGACCTTGT

2521	ACACTCAACC TGTGAGTTGG	CTATCTCGGT GATAGAGCCA	CTATTCTTTT GATAAGAAAA	GATTTATAAG CTAAATATTC	GGATTTTGGG CCTAAAACCC	GATTTCCGGC CTAAAGCCGG
2581	TATTGGTTAA ATAACCAATT	AAAATGAGCT TTTACTCGA	GATTTAACAA CTAAATTGTT	AAATTTAACG TTTAAATTGC	CGAATTAATT GCTTAATTAA	CTGTGGAATG GACACCTTAC
2641	TGTGTCAGTT ACACAGTCAA	AGGGTGTGGA TCCCACACCT	AAGTCCCCAG TTCAGGGGTC	GCTCCCCAGG CGAGGGGTCC	CAGGCAGAAG GTCCGTCTTC	TATGCAAAGC ATACGTTTCG
2701	ATGCATCTCA TACGTAGAGT	ATTAGTCAGC TAATCAGTCG	AACCAGGTGT TTGGTCCACA	GGAAAAGTCCC CCTTTCAGGG	CAGGCTCCCC GTCCGAGGGG	AGCAGGCAGA TCGTCCGTCT
2761	AGTATGCAAA TCATACGTTT	GCATGCATCT CGTACGTAGA	CAATTAGTCA GTAAATCAGT	GCAACCATAG CGTTGGTATC	TCCCGCCCT AGGGCGGGGA	AACTCCGCC TTGAGGCGGG
2821	ATCCCGCCCC TAGGGCGGGG	TAACTCCGCC ATTGAGGCGG	CAGTTCGCC GTCAAGGCGG	CATTCTCCGC GTAAGAGGCG	CCCATGGCTG GGGTACCGAC	ACTAATTTTT TGATTAATAA
2881	TTTATTTATG AAATAAATAC	CAGAGGCCGA GTCTCCGGCT	GGCCGCCTCT CCGGCGGAGA	GCCTCTGAGC CGGAGACTCG	TATTCCAGAA ATAAGGTCTT	GTAGTGAGGA CATCACTCCT
2941	GGCTTTTTTG CCGAAAAAAC	GAGGCCTAGG CTCCGGATCC	CTTTTGCAAA GAAAACGTTT	AAGCTCCCGG TTCGAGGGCC	GAGCTTGTAT CTCGAACATA	ATCCATTTTC TAGGTAAAAAG
3001	GGATCTGATC CCTAGACTAG	AAGAGACAGG TTCTCTGTCC	ATGAGGATCG TACTCCTAGC	TTTCGCATGA AAAGCGTACT	TTGAACAAGA AACTTGTCT	TGGATTGCAC ACCTAACGTG
3061	GCAGGTTCTC CGTCCAAGAG	CGGCCGCTTG GCCGGCGAAC	GGTGGAGAGG CCACCTCTCC	CTATTCGGCT GATAAGCCGA	ATGACTGGGC TACTGACCCG	ACAACAGACA TGTTGTCTGT
3121	ATCGGCTGCT TAGCCGACGA	CTGATGCCGC GACTACGGCG	CGTGTTCGGG GCACAAGGCC	CTGTCAGCGC GACAGTCGCG	AGGGGCGCCC TCCC CGGGG	GTTCTTTTT CCAAGAAAAA
3181	GTCAAGACCG CAGTTCTGGC	ACCTGTCCGG TGGACAGGCC	TGCCCTGAAT ACGGGACTTA	GAACTGCAGG CTTGACGTCC	ACGAGGCAGC TGCTCCGTCC	GCGGCTATCG CGCCGATAGC
3241	TGGCTGGCCA ACCGACCGGT	CGACGGGCGT GCTGCCCGCA	TCCTTGCGCA AGGAACGCGT	GCTGTGCTCG CGACACGAGC	ACGTTGTAC TGCAACAGTG	TGAAGCGGGA ACTTCGCCCT
3301	AGGGACTGGC TCCCTGACCG	TGCTATTGGG ACGATAACCC	CGAAGTGCCG GCTTCACGGC	GGGCAGGATC CCCGTCTAG	TCCTGTATC AGGACAGTAG	TCACCTTGCT AGTGGAACGA
3361	CCTGCCGAGA GGACGGCTCT	AAGTATCCAT TTCATAGGTA	CATGGCTGAT GTACCGACTA	GCAATGCGGC CGTTACGCCG	GGCTGCATAC CCGACGTATG	GCTTGATCCG CGAACTAGGC
3421	GCTACCTGCC CGATGGACGG	CATTCGACCA GTAAGCTGGT	CCAAGCGAAA GGTTCCGTTT	CATCGCATCG GTAGCGTAGC	AGCGAGCACG TCGCTCGTGC	TACTCGGATG ATGAGCCTAC
3481	GAAGCCGGTC CTTCGGCCAG	TTGTCGATCA AACAGCTAGT	GGATGATCTG CCTACTAGAC	GACGAAGAGC CTGCTTCTCG	ATCAGGGGCT TAGTCCCCGA	CGCGCCAGCC GCGGGTCCG
3541	GAACTGTTTC CTTGACAAGC	CCAGGCTCAA GGTCCGAGTT	GGCGCGCATG CCGCGCGTAC	CCCAGCGGCG GGGCTGCCGC	AGGATCTCGT TCCTAGAGCA	CGTGACCCAT GCACTGGGTA
3601	GGCGATGCCT CCGCTACGGA	GCTTGCCGAA CGAACGGCTT	TATCATGGTG ATAGTACCAC	GAAAATGGCC CTTTTACCGG	GCTTTTCTGG CGAAAAGACC	ATTCATCGAC TAAGTAGCTG
3661	TGTGGCCGGC ACACCGGCCG	TGGGTGTGGC ACCCACACCG	GGACCGCTAT CCTGGCGATA	CAGGACATAG GTCCTGTATC	CGTTGGCTAC GCAACCGATG	CCGTGATATT GGCACTATAA
3721	GCTGAAGAGC CGACTTCTCG	TTGGCGGCGA AACCGCCGCT	ATGGGCTGAC TACCCGACTG	CGCTTCTCTG GCGAAGGAGC	TGCTTTACGG ACGAAATGCC	TATCGCCGCT ATAGCGGCGA

3781	CCCGATTTCGC GGGCTAAGCG	AGCGCATCGC TCGCGTAGCG	CTTCTATCGC GAAGATAGCG	CTTCTTGACG GAAGAAGCTGC	AGTTCTTCTG TCAAGAAGAC	AGCGGGACTC TCGCCCTGAG
3841	TGGGGTTTCGC ACCCCAAGCG	GAAATGACCG CTTTACTGGC	ACCAAGCGAC TGGTTCGCTG	GCCCAACCTG CGGGTTGGAC	CCATCACGAG GGTAGTGCTC	ATTTTCGATTC TAAAGCTAAG
3901	CACCGCCGCC GTGGCGGCGG	TTCTATGAAA AAGATACTTT	GGTTGGGCTT CCAACCCGAA	CGGAATCGTT GCCTTAGCAA	TTCCGGGACG AAGGCCCTGC	CCGGCTGGAT GGCCGACCTA
3961	GATCCTCCAG CTAGGAGGTC	CGCGGGGATC GCGCCCCTAG	TCATGCTGGA AGTACGACCT	GTTCTTCGCC CAAGAAGCGG	CACCCCAACT GTGGGGTTGA	TGTTTATTGC ACAAAATAACG
4021	AGCTTATAAT TCGAATATTA	GGTTACAAAT CCAATGTTTA	AAAGCAATAG TTTCGTTATC	CATCACAAAT GTAGTGTTTA	TTCACAAATA AAGTGTTTAT	AAGCATTTTT TTCGTAAAAA
4081	TTCACTGCAT AAGTGACGTA	TCTAGTTGTG AGATCAACAC	GTTTGTCCAA CAAAACAGTT	ACTCATCAAT TGAGTAGTTA	GTATCTTATC CATAGAATAG	ATGTCTGTAT TACAGACATA
4141	ACCGTCGACC TGGCAGCTGG	TCTAGCTAGA AGATCGATCT	GCTTGGCGTA CGAACC GCAT	ATCATGGTCA TAGTACCAGT	TAGCTGTTTC ATCGACAAAAG	CTGTGTGAAA GACACACTTT
4201	TTGTTATCCG AACAAATAGGC	CTCACAATTC GAGTGTTAAG	CACACAACAT GTGTGTTGTA	ACGAGCCGGA TGCTCGGCCCT	AGCATAAAGT TCGTATTTCA	GTAAAGCCTG CATTTCGGAC
4261	GGGTGCCTAA CCCACGGATT	TGAGTGAGCT ACTCACTCGA	AACTCACATT TTGAGTGTAA	AATTGCGTTG TTAACGCAAC	CGCTCACTGC GCGAGTGACG	CCGCTTCCA GGCGAAAGGT
4321	GTCGGGAAAC CAGCCCTTTG	CTGTCTGTGCC GACAGCACGG	AGCTGCATTA TCGACGTAAT	ATGAATCGGC TACTTAGCCG	CAACGCGCGG GTTGCGCGCC	GGAGAGGCGG CCTCTCCGCC
4381	TTTGCGTATT AAACGCATAA	GGGCGCTCTT CCCGCGAGAA	CCGCTTCCTC GGCGAAGGAG	GCTCACTGAC CGAGTGACTG	TCGCTGCGCT AGCGACGCGA	CGGTGTTTCG GCCAGCAAGC
4441	GCTGCGGCGA CGACGCCGCT	GCGGTATCAG CGCCATAGTC	CTCACTCAAA GAGTGAGTTT	GCGGTAATA CCGCCATTAT	CGGTTATCCA GCCAATAGGT	CAGAATCAGG GTCTTAGTCC
4501	GGATAACGCA CCTATTGCGT	GGAAAAGACA CCTTTCTTGT	TGTGAGCAAA ACACTCGTTT	AGGCCAGCAA TCCGGTTCGTT	AAGGCCAGGA TTCCGGTCCCT	ACCGTAAAAA TGGCATTFTT
4561	GGCCGCGTTG CCGGCGCAAC	CTGGCGTTTT GACCGCAAAA	TCCATAGGCT AGGTATCCGA	CCGCCCCCT GGCGGGGGGA	GACGAGCATC CTGCTCGTAG	ACAAAAATCG TGTTTTTAGC
4621	ACGCTCAAAGT TGCGAGTTCA	CAGAGGTGGC GTCTCCACCG	GAAACCCGAC CTTTGGGCTG	AGGACTATAA TCCTGATATT	AGATAACCAGG TCTATGGTCC	CGTTTTCCCC GCAAAAGGGG
4681	TGAAAGCTCC ACCTTCGAGG	CTCGTGCGCT GAGCACGCGA	CTCCTGTTCC GAGGACAAGG	GACCCTGCCG CTGGGACGGC	CTTACCGGAT GAATGGCCTA	ACCTGTCCGC TGGACAGGCG
4741	CTTTCTCCCT GAAAAGAGGA	TCGGGAAGCG AGCCCTTCGC	TGGCGTTTT ACCGCGAAAAG	TCAATGCTCA AGTTACGAGT	CGCTGTAGGT GCGACATCCA	ATCTCAGTTC TAGAGTCAAG
4801	GGTGTAGGTC CCACATCCAG	GTTCGCTCCA CAAGCGAGGT	AGCTGGGCTG TCGACCCGAC	TGTGCACGAA ACACGTGCTT	CCCCCGTTT GGGGGGCAAG	AGCCCGACCG TCGGCTGGC
4861	CTGCGCCTTA GACGCGGAAT	TCCGGTAACT AGGCCATTGA	ATCGTCTTGA TAGCAGAACT	GTCCAACCCG CAGGTTGGGC	GTAAGACACG CATTCTGTGC	ACTTATCGCC TGAATAGCGG
4921	ACTGGCAGCA TGACCGTCGT	GCCACTGGTA CGGTGACCAT	ACAGGATTAG TGTCTAATC	CAGAGCGAGG GTCTCGCTCC	TATGTAGGCG ATACATCCGC	GTGCTACAGA CACGATGTCT
4981	GTTCTTGAAG CAAGAAGCTTC	TGGTGGCCTA ACCACCGGAT	ACTACGGCTA TGATGCCGAT	CACTAGAAGG GTGATCTTCC	ACAGTATTTG TGTCATAAAC	GTATCTGCGC CATAGACGCG

5041	TCTGCTGAAG AGACGACTTC	CCAGTTACCT GGTCAATGGA	TCGGAAAAAG AGCCTTTTTTC	AGTTGGTAGC TCAACCATCG	TCTTGATCCG AGAACTAGGC	GCAAACAAAC CGTTTTGTTG
5101	CACCGCTGGT GTGGCGACCA	AGCGGTGGTT TCGCCACCAA	TTTTTGTTTG AAAAACAAAC	CAAGCAGCAG GTTCGTCGTC	ATTACGCGCA TAATGCGCGT	GAAAAAAAAGG CTTTTTTTCC
5161	ATCTCAAGAA TAGAGTTCTT	GATCCTTTGA CTAGGAAACT	TCTTTTCTAC AGAAAAAGATG	GGGGTCTGAC CCCCAGACTG	GCTCAGTGGA CGAGTCACCT	ACGAAAACTC TGCTTTTGAG
5221	ACGTTAAGGG TGCAATTCCC	ATTTTGGTCA TAAAAACCAGT	TGAGATTATC ACTCTAATAG	AAAAAGGATC TTTTTCCTAG	TTCACCTAGA AAGTGGATCT	TCCTTTTAAA AGGAAAAATT
5281	TTAAAAATGA AATTTTACT	AGTTTTAAAT TCAAAAATTTA	CAATCTAAAG GTTAGATTTT	TATATATGAG ATATATACTC	TAAACTTGGT ATTTGAACCA	CTGACAGTTA GACTGTCAAT
5341	CCAAATGCTTA GGTTACGAAT	ATCAGTGAGG TAGTCACTCC	CACCTATCTC GTGGATAGAG	AGCGATCTGT TCGCTAGACA	CTATTTTCGTT GATAAAGCAA	CATCCATAGT GTAGGTATCA
5401	TGCCTGACTC ACGGACTGAG	CCCCTCGTGT GGGCAGCACA	AGATAACTAC TCTATTGATG	GATACGGGAG CTATGCCCTC	GGCTTACCAT CCGAATGGTA	CTGGCCCCAG GACCGGGGTC
5461	TGCTGCAATG ACGACGTTAC	ATACCGCGAG TATGGCGCTC	ACCCACGCTC TGGGTGCGAG	ACCGGCTCCA TGGCCGAGGT	GATTTATCAG CTAAATAGTC	CAATAAACCA GTTATTTGGT
5521	GCCAGCCGGA CGGTCGGCCT	AGGGCCGAGC TCCC GGCTCG	GCAGAAGTGG CGTCTTCACC	TCCTGCAACT AGGACGTTGA	TTATCCGCT AATAGGCGGA	CCATCCAGTC GGTAGGTCAG
5581	TATTAATTGT ATAATTAACA	TGCCGGGAAG ACGGCCCTTC	CTAGAGTAAG GATCTCATT	TAGTTGCGCA ATCAAGCGGT	GTTAATAGTT CAATTATCAA	TGCGCAACGT ACGCGTTGCA
5641	TGTTGCCATT ACAACGGTAA	GCTACAGGCA CGATGTCCGT	TCGTGGTGTG AGCACCACAG	ACGCTCGTCG TGCAGCAGC	TTTGGTATGG AAACCATACC	CTTCATTGAG GAAGTAAAGTC
5701	CTCCGGTTCC GAGGCCAAGG	CAACGATCAA GTTGCTAGTT	GGCGAGTTAC CCGCTCAATG	ATGATCCCCC TACTAGGGGG	ATGTTGTGCA TACAACACGT	AAAAAGCGGT TTTTTCGCCA
5761	TAGCTCCTTC ATCGAGGAAG	GGTCTCCGA CCAGGAGGCT	TCGTTGTGAG AGCAACAGTC	AAGTAAAGTTG TTCATTCAAC	GCCGCAGTGT CGGCGTCACA	TATCACTCAT ATAGTGAGTA
5821	GGTTATGGCA CCAATACCGT	GCACTGCATA CGTGACGTAT	ATTCTCTTAC TAAGAGAATG	TGTCATGCCA ACAGTACGGT	TCCGTAAGAT AGGCATTCTA	GCTTTTCTGT CGAAAAGACA
5881	GACTGGTGAG CTGACCACTC	TACTCAACCA ATGAGTTGGT	AGTCATTCTG TCAGTAAAGAC	AGAATAGTGT TCTTATCACA	ATGCGGCGAC TACGCCGCTG	CGAGTTGCTC GCTCAACGAG
5941	TTGCCCGGCG AACGGGCCCG	TCAATACGGG AGTTATGCC	ATAATACCGC TATTATGGCG	GCCACATAGC CGGTGTATCG	AGAACTTTAA TCTTGAAATT	AAGTGCTCAT TTCACGAGTA
6001	CATTGGA AAA GTAACCTTTT	CGTTCTTCGG GCAAGAAGCC	GGCGAAA ACT CCGCTTTTGA	CTCAAGGATC GAGTTCTTAG	TTACCGCTGT AATGGCGACA	TGAGATCCAG ACTCTAGGTC
6061	TCGATGTAA AAGCTACATT	CCCCTCGTGT GGGTGAGCAC	CACCCAACTG GTGGGTTGAC	ATCTTCAGCA TAGAAGTCGT	TCTTTTACTT AGAAAATGAA	TCACCAGCGT AGTGGTCGCA
6121	TTCTGGGTGA AAGACCCACT	GCAAAAACAG CGTTTTTGTC	GAAGGCAAAA CTTCCGTTTT	TGCCGCAAAA ACGGCGTTTT	AAGGGAATAA TTCCCTTATT	GGGCGACACG CCCGCTGTGC
6181	GAAATGTTGA CTTACAACT	ATACTCATAC TATGAGTATG	TCTTCCTTTT AGAAGGAAAA	TCAATATTAT AGTTATAATA	TGAAGCATT ACTTCGTAAA	ATCAGGGTTA TAGTCCCAAT
6241	TTGTCTCATG AACAGAGTAC	AGCGGATACA TCGCCTATGT	TATTTGAATG ATAAACTTAC	TATTTAGAAA ATAAATCTTT	AATAAACAAA TTATTTGTTT	TAGGGGTTCC ATCCCAAGG
6301	GCGCACATTT CGCGTGTA AAA	CCCCGAAAAG GGGGCTTTTC	TGCCACCTGA ACGGTGGACT	CGTC GCAG		

附錄 3：SV40-ARE-hrGFP



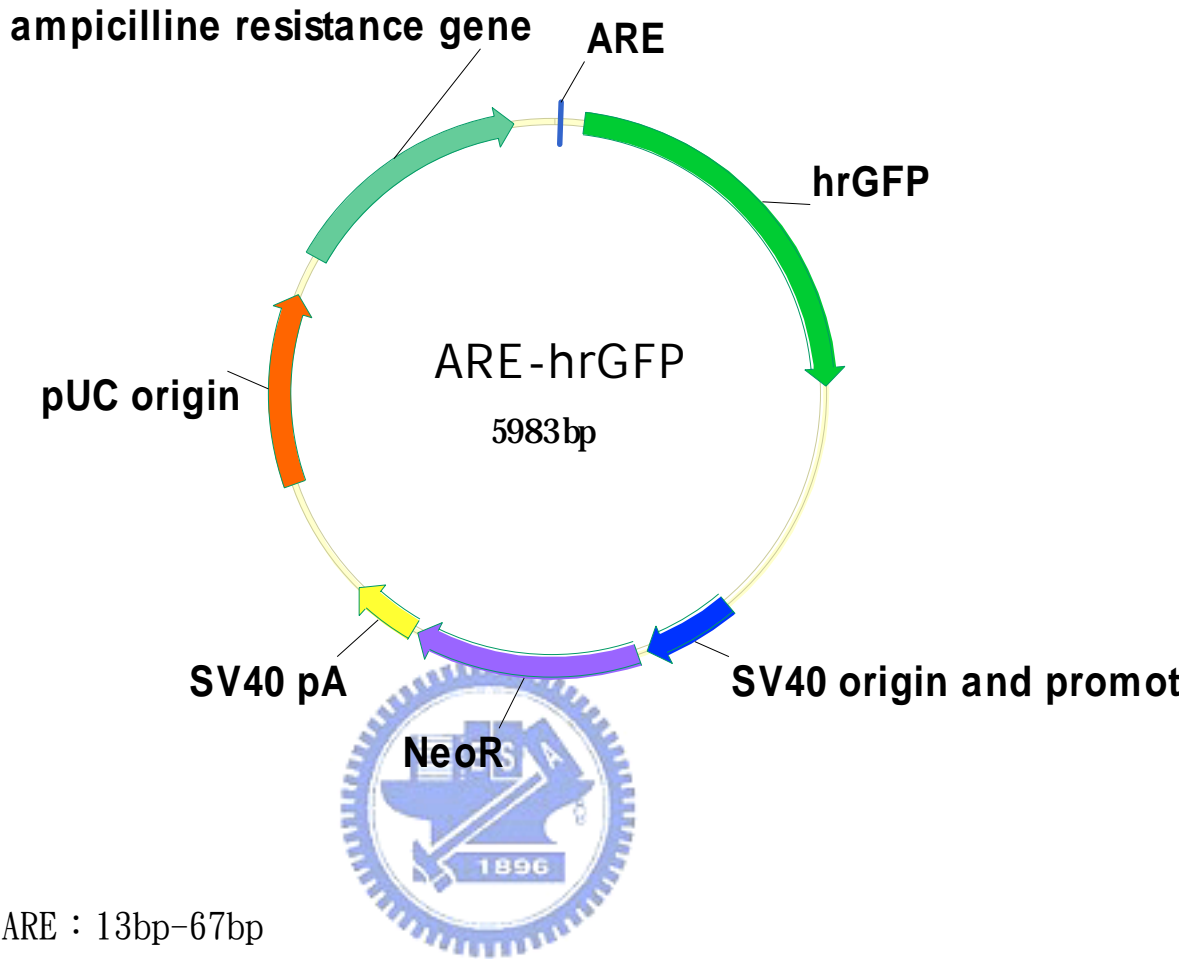
1	AGCGCCCAAT	ACGCAAACCG	CCTCTCCCGG	CGCGTTGGCC	GATTCATTAA	TGCAGCTGGC
	TCGCGGGTTA	TGCGTTTGGC	GGAGAGGGGC	GCGCAACCGG	CTAAGTAATT	ACGTCGACCG
61	ACGACAGGTT	TCCCAGACTGG	AAAGCGGGCA	GTGAGCGCAA	CGCAATTAAT	GTGAGTTAGC
	TGCTGTCCAA	AGGGCTGACC	TTTCGCCCGT	CACTCGCGTT	GCCTTAATTA	CACTCAATCG
121	TCACTCATT	GGCACCCCAG	GCTTTACTACT	TTATGCTTCC	GGCTCGTATG	TTGTGTGGAA
	AGTGAGTAAT	CCGTGGGGTC	CGAAATGTGA	AATACGAAGG	CCGAGCATAC	AACACACCTT
181	TTGTGAGCGG	ATAACAATTT	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTAT
	AACACTCGCC	TATTGTAAAA	GTGTGTCCCT	TGTCGATACT	GGTACTAATG	CGGTTTCGATA
241	TTAGGTGACA	CTATAGAATA	CTCAAGCTAT	GCATCAAAGCT	TGGTGTGGAA	AGTCCCCAGG
	AATCCACTGT	GATATCTTAT	GAGTTCGATA	CGTAGTTCGA	ACCACACCTT	TCAGGGGTCC
301	CTCCCAGCA	GGCAGAAGTA	TGCAAAAGCAT	GCATCTCAAT	TAGTCAGCAA	CCAGGTGTGG
	GAGGGTTCGT	CCGTCTTCAT	ACGTTTCGTA	CGTAGAGTTA	ATCAGTCGTT	GGTCCACACC
361	AAAGTCCCCA	GGCTCCCCAG	CAGGCAGAAG	TATGCAAAGC	ATGCATCTCA	ATTAGTCAGC
	TTTCAGGGGT	CCGAGGGGTC	GTCCGTCTTC	ATACGTTTCG	TACGTAGAGT	TAATCAGTCG
421	AACCATAGTC	CCGCCCTAA	CTCCGCCCAT	CCCGCCCCTA	ACTCCGCCCA	GTTCCGCCCA
	TTGGTATCAG	GGCGGGGATT	GAGGCGGGTA	GGGCGGGGAT	TGAGGCGGGT	CAAGGCGGGT
481	TTCTCCGCC	CATGGCTGAC	TAATTTTTTT	TATTTATGCA	GAGGCCGAGG	CCGCCTCGGC
	AAGAGGCGGG	GTACCGACTG	ATTAATAAAA	ATAAATACGT	CTCCGGCTCC	GGCGGAGCCG
541	CTCTGAGCTA	TTCCAGAAGT	AGTGAGGAGG	CTTTTTTGGG	GGCCACTAGT	AACGGCCGCC
	GAGACTCGAT	AAGGTCTTCA	TCACTCCTCC	GAAAAAACCT	CCGGTGATCA	TTGCCGGCGG
601	AGTGTGCTGG	AATTCCCTGT	AAGTTTTTCT	TTAGGCTCTT	GTTATAATTA	ACCGACGCGT
	TCACACGACC	TTAAGGGACA	TTCAAAAAAG	AATCCGAGAA	CAATATTAAT	TGGCTGCGCA
661	GAATTCACCA	TGGTGAGCAA	GCAGATCCTG	AAGAACACCG	GCCTGCAGGA	GATCATGAGC
	CTTAAGTGGT	ACCACTCGTT	CGTCTAGGAC	TTCTTGTGGC	CGGACGTCCT	CTAGTACTCG
721	TTCAAAGTGA	ACCTGGAGGG	CGTGGTGAAC	AACCACGTGT	TCACCATGGA	GGGCTGCGGC
	AAGTTCCACT	TGGACCTCCC	GCACCACTTG	TTGGTGCACA	AGTGGTACCCT	CCCGACGCCG
781	AAGGGCAACA	TCCTGTTCCG	CAACCAGCTG	GTGCAGATCC	GCGTGACCAA	GGGCGCCCCC
	TTCCCCTGT	AGGACAAGCC	GTTGGTCCGAC	CACGTCTAGG	CGCACTGGTT	CCCGCGGGGG
841	CTGCCCTTCG	CCTTCGACAT	CCTGAGCCCC	GCCTTCCAGT	ACGGCAACCG	CACCTTCACC
	GACGGGAAGC	GGAAGCTGTA	GGACTCGGGG	CGGAAGGTCA	TGCCGTTGGC	GTGGAAGTGG
901	AAGTACCCCG	AGGACATCAG	CGACTTCTTC	ATCCAGAGCT	TCCCCGCCGG	CTTCGTGTAC
	TTCATGGGGC	TCCTGTAGTC	GCTGAAAGAA	TAGGTCTCGA	AGGGGCGGCC	GAAGCACATG
961	GAGCGCACCC	TGCGCTACGA	GGACGGCGGC	CTGGTGGAGA	TCCGCAGCGA	CATCAACCTG
	CTCGCGTGGG	ACGCGATGCT	CCTGCCCGCC	GACCACCTCT	AGGCGTCGCT	GTAGTTGGAC
1021	ATCGAGGAGA	TGTTTCGTGTA	CCGCGTGGAG	TACAAGGGCC	GCAACTTCCC	CAACGACGGC
	TAGCTCCTCT	ACAAGCACAT	GGCGCACCTC	ATGTTCCCGG	CGTTGAAGGG	GTTGCTGCCG
1081	CCCGTGATGA	AGAAGACCAT	CACCGGCCTG	CAGCCCAGCT	TCGAGGTGGT	GTACATGAAC
	GGGCACTACT	TCTTCTGGTA	GTGGCCGGAC	GTCGGGTCGA	AGCTCCACCA	CATGTACTTG
1141	GACGGCGTGC	TGGTGGGCCA	GGTGATCCTG	GTGTACCGCC	TGAACAGCGG	CAAGTTCTAC
	CTGCCGCACG	ACCACCCGGT	CCACTAGGAC	CACATGGCGG	ACTTGTCCGC	GTTCAAGATG

1201	AGCTGCCACA TCGACGGTGT	TGCGCACCT ACGCGTGGGA	GATGAAAGAGC CTACTTCTCG	AAGGGCGTGG TCCCCGCACC	TGAAGGACTT ACTTCTGAA	CCCCGAGTAC GGGGCTCATG
1261	CAC TTCATCC GTGAA GTAGG	AGCACCGCCT TCGTGGCGGA	GGAGAAGACC CCTCTTCTGG	TACGTGGAGG ATGCACCTCC	ACGGCGGCTT TGCCGCCGAA	CGTGGAGCAG GCACCTCGTC
1321	CACGAGACCG GTGCTCTGGC	CCATCGCCCA GGTAGCGGGT	GCTGACCAGC CGACTGGTCG	CTGGGC AAGC GACCCGTTCC	CCCTGGGCAG GGGACCCGTC	CCTGCACGAG GGACGTGCTC
1381	TGGGTGTAAT ACCCACATTA	AGCTCGAGCG TCGAGCTCGC	GCCGCGATCC CGGCGCTAGG	GAGTTCTTCT CTCAAGAAGA	GAGCGGGACT CTCGCCCTGA	CTGGGGTTCC GACCCCAAGC
1441	ATAAAATAAA TATTTTATTT	AGATTTTATT TCTAAAATAA	TAGTCTCCAG ATCAGAGGTC	AAAAAGGGGG TTTTTCCCCC	GAATGAAGGA CTTACTTCTC	CCCCACCTGT GGGGTGGACA
1501	AGTTTGGCA TCCAAACCGT	AGCTAGCTTA TCGATCGAAT	AGTAACGCCA TCATTGCGGT	TTTGC AAGG AAAACGTTCC	CATGGA AAAAA GTACCTTTTT	TACATAACTG ATGTATTGAC
1561	AGAATAGAGA TCTTATCTCT	AGTTCAGATC TCAAGTCTAG	AAGGTCAGGA TTCCAGTCC	ACAGATGGA TGTCTACCTT	CAGCTGAATA GTCGACTTAT	TGGGCCAAAC ACCCGGTTTG
1621	AGGATATCAG TCCTATAGTC	GTGGCCCCCG CACCGGGGGC	CTGAATTGGA GACTTAACTT	ATCGATATTG TAGCTATAAC	TTACAACACC AATGTTGTGG	CCAACATCTT GGTTGTAGAA
1681	CGACGCGGGC GCTGCGCCCG	GTGGCAGGTC CACCGTCCAG	TTCCCGACGA AAGGGCTGCT	TGACGCGGT ACTGCGCCA	GAAC TTCCCG CTTGAAGGGC	CGCCGTTGT GGCGCAACA
1741	TGTTTTGGAG ACAAAACCTC	CACGGA AAGA GTGCCTTTCT	CGATGACGGA GCTACTGCCT	AAAAGAGATC TTTTCTCTAG	GTGGATTACG CACCTAATGC	TCGCCAGTCA AGCGGTCAGT
1801	AGTAACAACC TCATTGTTGG	GCGAAAAAGT CGCTTTTTCA	TGCGCGGAGG ACGCGCCTCC	AGTTGTGTTT TCAACACAAA	GTGGACGAAG CACCTGCTTC	TACCGAAAAG ATGGCTTTCC
1861	TCTTACCGGA AGAATGGCCT	AAACTCGACG TTTGAGCTGC	CAAGAAAAAT GTTCTTTTTA	CAGAGAGATC GTCTCTCTAG	CTCATAAAGG GAGTATTTCC	CCAAGAAGGG GGTTCTTTCC
1921	CGGAAAGTCC GCCTTTCAGG	AAATTGTA A TTTAAACATTT	ATGTA ACTGT TACATTGACA	ATTCAGCGAT TAAGTCGCTA	GACGAAATTC CTGCTTTAAG	TTAGCTATTG AATCGATAAC
1981	TAATACTCTA ATTATGAGAT	GAGGGCCCCA CTCCCGGGTT	TTCGCCCTAT AAGCGGGATA	AGTGAGTCGT TCACTCAGCA	ATTACAATTC TAATGTTAAG	ACTGGCCGTC TGACCGGCAG
2041	GTTTTACAAC CAAAATGTTG	GTCGTGACTG CAGCACTGAC	GGAAAACCCT CCTTTTGGGA	GGCGTTACCC CCGCAATGGG	AACTTAATCG TTGAATTAGC	CCTTGCA GCA GGAACGTCGT
2101	CATCCCCCTT GTAGGGGGAA	TCGCCAGCTG AGCGGTCGAC	GCGTAATAGC CGCATTATCG	GAAAGAGCCC CTTCTCCGGG	GCACCGATCG CGTGGCTAGC	CCTTCCCAA GGGAAGGGTT
2161	CAGTTGCGCA GTCAAACGCGT	GCCTATACGT CGGATATGCA	ACGGCAGTTT TGCCGTCAA	AAGGTTTACA TTCCAAATGT	CCTATAA AAG GGATATTTTC	AGAGAGCCGT TCTCTCGGCA
2221	TATCGTCTGT ATAGCAGACA	TTGTGGATGT AACACCTACA	ACAGAGTGAT TGTCTCACTA	ATTATTGACA TAATAACTGT	CGCCGGGGCG GCGGCCCCGC	ACGGATGGTG TGCCTACCAC
2281	ATCCCCCTGG TAGGGGGACC	CCAGTGCACG GGTCACGTGC	TCTGCTGTCA AGACGACAGT	GATAAAGTCT CTATTT CAGA	CCCGTGA ACT GGGCACTTGA	TTACCCGGTG AATGGCCAC
2341	GTGCATATCG CACGTATAGC	GGGATGAAAG CCCTACTTTC	CTGGCGCATG GACCGCGTAC	ATGACCACCG TACTGGTGGC	ATATGGCCAG TATACCGGTC	TGTGCCGGTC ACACGGCCAG
2401	TCCGTTATCG AGGCAATAGC	GGGAAGAAGT CCCTTCTTCA	GGCTGATCTC CCGACTAGAG	AGCCACCGCG TCGGTGGCGC	AAAATGACAT TTTTACTGTA	CAAAAACGCC GTTTTTGGCG

2461	ATTAACCTGA TAATTGGACT	TGTTCTGGGG ACAAGACCCC	AATATAAATG TTATATTTAC	TCAGGCCTGA AGTCCGGACT	ATGGCGAATG TACCGCTTAC	GACGCGCCCT CTGCGCGGGA
2521	GTAGCGGCGC CATCGCCGCG	ATTAAGCGCG TAATTCGCGC	CGGGTGTGGT GCCACACCA	GGTACGCGC CCAATGCGCG	AGCGTGACCG TCGCACTGGC	CTACACTTGC GATGTGAACG
2581	CAGCGCCCTA GTCGCGGGAT	GCGCCCCTC CGCGGGCGAG	CTTTCGCTTT GAAAGCGAAA	CTTCCCTTCC GAAAGGAAAG	TTTCTCGCCA AAAGAGCGGT	CGTTCGCCGG GCAAGCGGCC
2641	CTTTCCCGCT GAAAAGGGCA	CAAGCTCTAA GTTCGAGATT	ATCGGGGGCT TAGCCCCCGA	CCCTTTAGGG GGGAAATCCC	TTCCGATTTA AAGGCTAAAT	GAGCTTTACG CTCGAAATGC
2701	GCACCTCGAC CGTGGAGCTG	CGCAAAAAAC GCGTTTTTTG	TTGATTTGGG AACTAAACCC	TGATGGTTCA ACTACCAAGT	CGTAGTGGGC GCATCACCCG	CATCGCCCTG GTAGCGGGAC
2761	ATAGACGGTT TATCTGCCAA	TTTCGCCCTT AAAAGCGGAA	TGACGTTGGA ACTGCAACCT	GTCCACGTTT CAGGTGCAAG	TTTAATAGTG AAATTATCAC	GACTCTTGTT CTGAGAACAA
2821	CCAAACTGGA GGTTTTGACCT	ACAACACTCA TGTTGTGAGT	ACCCTATCGC TGGGATAGCG	GGTCTATTCT CCAGATAAGA	TTTGATTTAT AAACTAAATA	AAGGGATGTT TTCCCTACAA
2881	GCCGATTTTCG CGGCTAAAGC	GCCTATTGGT CGGATAACCA	TAAAAAATGA ATTTTTTACT	GCTGATTTAA CGACTAAATT	CAAAAAATTTT GTTTTTAAAA	AACAAAATTC TTGTTTTAAG
2941	AGAAGAATC TCTTCTTGAG	GTCAAGAAGG CAGTTCTTCC	CGATAGAAGG GCTATCTTCC	CGATGCGCTG GCTACGCGAC	CGAATCGGGA GCTTAGCCCT	GCGGCGATAC CGCCGCTATG
3001	CGTAAAGCAC GCATTTTCGTG	GAGGAAGCGG CTCCTTCGCC	TCAGCCCATT AGTCGGGTAA	CGCCGCCAAG GCGGCGGTTC	CTCTTCAGCA GAGAAGTCGT	ATATCACGGG TATAGTGCCC
3061	TAGCCAACGC ATCGGTTGCG	TATGTCCTGA ATACAGGACT	TAGCGGTCCG ATCGCCAGGC	CCACACCAG GGTGTGGGTC	CCGGCCACAG GGCCGGTGTC	TCGATGAATC AGCTACTTAG
3121	CAGAAAAGCG GTCTTTTTCGC	GCCATTTTCC CGGTAAAAGG	ACCATGATAT TGGTACTATA	TCGGCAAGCA AGCCGTTCTG	GGCATCGCCA CCGTAGCGGT	TGGGTCACGA ACCCAGTGCT
3181	CGAGATCCTC GCTCTAGGAG	GCCGTCGGGC CGGCAGCCCG	ATGCTCGCCT TACGAGCGGA	TGAGCCTGGC ACTCGGACCG	GAACAGTTCG CTTGTCAAGC	GCTGGCGCGA CGACCGCGCT
3241	GCCCCGTGATG CGGGGACTAC	CTCTTCGTCC GAGAAGCAGG	AGATCATCCT TCTAGTAGGA	GATCGACAAG CTAGCTGTTC	ACCGGCTTCC TGGCCGAAGG	ATCCGAGTAC TAGGCTCATG
3301	GTGCTCGCTC CACGAGCGAG	GATGCGATGT CTACGCTACA	TTCGCTTGGT AAGCGAACCA	GGTCGAATGG CCAGCTTACC	GCAGGTAGCC CGTCCATCGG	GGATCAAGCG CCTAGTTCCG
3361	TATGCAGCCG ATACGTCGGC	CCGCATTGCA GGCGTAAAGT	TCAGCCATGA AGTCGGTACT	TGGATACTTT ACCTATGAAA	CTCGGCAGGA GAGCCGTCCT	GCAAGGTGAG CGTTCCACTC
3421	ATGACAGGAG TACTGTCCCTC	ATCCTGCCCC TAGGACGGGG	GGCACTTCGC CCGTGAAGCG	CCAATAGCAG GGTTATCGTC	CCAGTCCCTT GGTCAGGGAA	CCCGCTTCAG GGCGAAAGTC
3481	TGACAACGTC ACTGTTGCAG	GAGCACAGCT CTCGTGTCGA	GCGCAAGGAA CGCGTTCCCT	CGCCCGTCGT GCGGGCAGCA	GGCCAGCCAC CCGGTCGGTG	GATAGCCGCG CTATCGGCGC
3541	CTGCCTCGTC GACGGAGCAG	TTGCAGTTCA AACGTCAAAGT	TTCAGGGCAC AAGTCCCCTG	CGGACAGGTC GCCTGTCCAG	GGTCTTGACA CCAGAACTGT	AAAAGAACCG TTTTCTTGGC
3601	GGCGCCCCTG CCGCGGGGAC	CGCTGACAGC GCGACTGTCTG	CGGAACACGG GCCTTGTGCC	CGGCATCAGA GCCGTAGTCT	GCAGCCGATT CGTCGGCTAA	GTCTGTTGTG CAGACAACAC
3661	CCCAGTCATA GGGTCAGTAT	GCCGAATAGC CGGCTTATCG	CTCTCCACCC GAGAGGTGGG	AAGCGCCGG TTCGCCGGCC	AGAACCTGCG TCTTGGACGC	TGCAATCCAT ACGTTAGGTA

3721	CTTGTTCAAT GAACAAGTTA	CATGCGAAAC GTACGCTTTG	GATCCTCATC CTAGGAGTAG	CTGTCTCTTG GACAGAGAAC	ATCAGATCTT TAGTCTAGAA	GATCCCCTGC CTAGGGGACG
3781	GCCATCAGAT CGGTAGTCTA	CCTTGGCGGC GGAACCGCCG	GAGAAAAGCCA CTCTTTTCGGT	TCCAGTTTAC AGGTCAAATG	TTTGCAGGGC AAACGTCCCG	TTCCCAACCT AAGGGTTGGA
3841	TACCAGAGGG ATGGTCTCCC	CGCCCCAGCT GCGGGGTCTGA	GGCAATTCCG CCGTTAAGGC	GTTGCTTGC CAAGCGAACG	TGTCCATAAA ACAGGTATTT	ACCGCCAGT TGGCGGGTCA
3901	CTAGCTATCG GATCGATAGC	CCATGTAAGC GGTACATTTCG	CCACTGCAAG GGTGACGTTT	CTACCTGCTT GATGGACGAA	TCTCTTTGCG AGAGAAAACGC	CTTGCCTTTT GAACGCAAAA
3961	CCCTTGTCCA GGGAACAGGT	GATAGCCCAG CTATCGGGTC	TAGCTGACAT ATCGACTGTA	TCATCCGGGG AGTAGGCCCC	TCAGCACCGT AGTCGTGGCA	TTCTGCGGAC AAGACGCCTG
4021	TGGCTTTCTA ACCGAAAAGAT	CGTGAAAAGG GCACTTTTCC	ATCTAGGTGA TAGATCCACT	AGATCCTTTT TCTAGGAAAA	TGATAATCTC ACTATTAGAG	ATGACCAAAA TACTGGTTTT
4081	TCCCTTAAAG AGGGAATTGC	TGAGTTTTTCG ACTCAAAAAGC	TTCCACTGAG AAGGTGACTC	CGTCAGACCC GCAGTCTGGG	CGTAGAAAAG GCATCTTTTC	ATCAAAAGGAT TAGTTTCTTA
4141	CTTCTTGAGA GAAGAACTCT	TCCTTTTTTTT AGGAAAAAAA	CTGCGCGTAA GACGCGCATT	TCTGCTGCTT AGACGACGAA	GCAAAACAAA CGTTTGTTTT	AAACCACCGC TTTGGTGGCG
4201	TACCAGCGGT ATGGTCGCCA	GGTTTGTTTG CCAAAACAAAC	CCGGATCAAG GGCCTAGTTC	AGCTACCAAC TCGATGGTTG	TCTTTTTCCG AGAAAAAGGC	AAGGTAACGT TTCCATTGAC
4261	GCTTCAGCAG CGAAGTCGTC	AGCGCAGATA TCGCGTCTAT	CCAAATACTG GGTTTATGAC	TCCTTCTAGT AGGAAGATCA	GTAGCCGTAG CATCGGCATC	TTAGGCCACC AATCCGGTGG
4321	ACTTCAAGAA TGAAGTTCTT	CTCTGTAGCA GAGACATCGT	CCGCCTACAT GGCGGATGTA	ACCTCGCTCT TGGAGCGAGA	GCTAATCCTG CGATTAGGAC	TTACCAGTGG AATGGTCACC
4381	CTGCTGCCAG GACGACGGTC	TGGCGATAAG ACCGCTATTC	TCGTGTCTTA AGCACAGAAT	CCGGGTTGGA GGCCCAACCT	CTCAAGACGA GAGTTCTGCT	TAGTTACCGG ATCAATGGCC
4441	ATAAGGCGCA TATTCCGCGT	GCGGTCCGGC CGCCAGCCCG	TGAACGGGGG ACTTGCCCCC	GTTGCTGCAC CAAGCACGTG	ACAGCCCAGC TGTCGGGTCTG	TTGGAGCGAA AACCTCGCTT
4501	CGACCTACAC GCTGGATGTG	CGAACTGAGA GCTTGACTCT	TACCTACAGC ATGGATGTCTG	GTGAGCTATG CACTCGATAC	AGAAAAGCGCC TCTTTCGCGG	ACGCTTCCCG TGCGAAGGGC
4561	AAGGGAGAAA TTCCCTCTTT	GGCGGACAGG CCGCCTGTCC	TATCCGGTAA ATAGGCCATT	GCGGCAGGGT CGCCGTCCCA	CGGAACAGGA GCCTTGTCCT	GAGCGCACGA CTCGCGTGCT
4621	GGGAGCTTCC CCCTCGAAGG	AGGGGAAAC TCCCCCTTTG	GCCTGGTATC CGGACCATAG	TTTATAGTCC AAATATCAGG	TGTCGGGTTT ACAGCCCAA	CGCCACCTCT GCGGTGGAGA
4681	GACTTGAGCG CTGAACTCGC	TCGATTTTTG AGCTAAAAAC	TGATGCTCGT ACTACGAGCA	CAGGGGGGCG GTCCCCCGC	GAGCCTATGG CTCGGATACC	AAAAACGCCA TTTTTGCGGT
4741	GCAACGCGGC CGTTGCGCCG	CTTTTTACGG GAAAAATGCC	TTCTGGGCT AAGGACCCGA	TTTGTGGCC AAACGACCGG	TTTTGCTCAC AAAACGAGTG	ATGTTCTTTC TACAAGAAAAG
4801	CTGCGTTATC GACGCAATAG	CCCTGATTCT GGGACTAAGA	GTGGATAACC CACCTATTGG	GTATTACCGC CATAATGGCG	CTTTGAGTGA GAAACTCACT	GCTGATACCG CGACTATGGC
4861	CTCGCCGCAG GAGCGGCGTC	CCGAACGACC GGCTTGCTGG	GAGCGCAGCG CTCGCGTCGC	AGTCAGTGAG TCAGTCACTC	CGAGGAAGCG GCTCCTTCGC	GAAG CTTC

附錄 4：ARE-hrGFP



ARE : 13bp-67bp

hrGFP : 95bp-1454bp

1	GACGGATCGG CTGCCTAGCC	^{BglIII} GAGATCTTCG CTCTAGAAGC	^{SpeI} ACTAGTCCTG TGATCAGGAC	TAAGTTTTTC ATTCAAAAAG	TTTAGGCTCT AAATCCGAGA	TGTTATAAAT ACAATATTA
61	^{HindIII} AACCGAAGCT TTGGCTTCGA	TCTACGGTAC AGATGCCATG	^{BamHI} CCATTGGATC GGTAACTTAG	^{EcoRI} CCTGAATTTCG GGACTTAAAGC	TATATAAGCA ATATATTTCGT	TCCACGGGTC AGGTGCCCCAG
121	CGAGCTAAAT GCTCGATTTA	TCACCATGGT AGTGGTACCA	GAGCAAGCAG CTCGTTCGTC	ATCCTGAAGA TAGGACTTCT	ACACCGGCCT TGTGGCCGGA	GCAGGAGATC CGTCCTCTAG
181	ATGAGCTTCA TACTCGAAGT	AGGTGAACCT TCCACTTGG	GGAGGGCGTG CCTCCCGCAC	GTGAACAACC CACTTGTGG	ACGTGTTCAC TGCACAAGTG	CATGGAGGGC GTACCTCCCG
241	TGCGGCAAGG ACGCCGTTCC	GCAACATCCT CGTTGTAGGA	GTTCCGGCAAC CAAGCCGTTG	CAGCTGGTGC GTCGACCACG	AGATCCGCGT TCTAGGCGCA	GACCAAGGGC CTGGTTCCCG
301	GCCCCCTGC CGGGGGGACG	CCTTCGCCTT GGAAGCGGAA	CGACATCCTG GCTGTAGGAC	AGCCCCGCCT TCGGGGCGGA	TCCAGTACGG AGGTTCATGCC	CAACCGCACC GTTGGCGTGG
361	TTCACCAAGT AAGTGGTTCA	ACCCCGAGGA TGGGGCTCCT	CATCAGCGAC GTAGTCGCTG	TTCTTCATCC AAGAAGTAGG	AGAGCTTCCC TCTCGAAGGG	CGCCGGCTTC GCGGCCGAAG
421	GTGTACGAGC CACATGCTCG	GCACCCTGCG CGTGGGACGC	CTACGAGGAC GATGCTCCTG	GGCGGCCTGG CCGCCGGACC	TGGAGATCCG ACCTCTAGGC	CAGCGACATC GTCGCTGTAG
481	AACCTGATCG TTGGACTAGC	AGGAGATGTT TCCTCTACAA	CGTGTACCGC GCACATGGCG	GTGGAGTACA CACCTCATGT	AGGGCCGCAA TCCCGGCGTT	CTTCCCCAAC GAAGGGGTTG
541	GACGGCCCCG CTGCCGGGGC	TGATGAAGAA ACTACTTCTT	GACCATCACC CTGGTAGTGG	GGCCTGCAGC CCGGACGTCG	CCAGCTTCGA GGTCGAAGCT	GGTGGTGTAC CCACCACATG
601	ATGAACGACG TACTTGCTGC	GCGTGCTGGT CGCACGACCA	GGGCCAGGTG CCCGGTCCAC	ATCCTGGTGT TAGGACCACA	ACCGCCTGAA TGGCGGACTT	CAGCGGCAAG GTCGCCGTTT
661	TTCTACAGCT AAGATGTCTGA	GCCACATGCG CGGTGTACGC	CACCCTGATG GTGGGACTAC	AAGAGCAAAG TTCTCGTTCC	GCGTGGTCAA CGCACCACTT	GGACTTCCCC CCTGAAGGGG
721	GAGTACCACT CTCATGGTGA	TCATCCAGCA AGTAGGTCGT	CCGCCTGGAG GGCGGACCTC	AAGACCTACG TTCTGGATGC	TGGAGGACGG ACCTCCTGCC	CGGCTTCGTG GCCGAAGCAC
781	GAGCAGCACG CTCGTCGTGC	AGACCGCCAT TCTGGCGGTA	CGCCCAGCTG GCGGGTCGAC	ACCAGCCTGG TGGTCGGACC	GCAAGCCCCT CGTTCCGGGA	GGGCAGCCTG CCCCTCGGAC
841	CACGAGTGGG GTGCTCACCC	TGTAATAGCT ACATTATCGA	CGAGCGGCCG GCTCGCCGGC	CGATCCGAGT GCTAGGCTCA	TCTTCTGAGC AGAAGACTCG	GGGACTCTGG CCCTGAGACC
901	GGTTCGATAA CCAAGCTATT	AATAAAAAGAT TTATTTTCTA	TTTATTTAGT AAATAAAATCA	CTCCAGAAAA GAGGTCTTTT	AGGGGGGAAT TCCCCCTTA	GAAGGACCCC CTTCTGGGG
961	ACCTGTAGGT TGGACATCCA	TTGGCAAGCT AACCGTTCGA	AGCTTAAAGTA TCGAATTCAT	ACGCCATTTT TGCGGTAAAA	GCAAGGCATG CGTTCCGTAC	GAAAAATACA CTTTTTATGT
1021	TAAGTGAAGT ATTGACTCTT	TAGAGAAGTT ATCTCTTCAA	CAGATCAAAG GTCTAGTTCC	TCAGGAACAG AGTCCTTGTC	ATGGAACAGC TACCTTGTCG	TGAATATGGG ACTTATACCC
1081	CCAAACAGGA GGTTTGTCTT	TATCAGGTGG ATAGTCCACC	CCCCCGCTGA GGGGGCGACT	ATTGGAATCG TAACCTTAGC	ATATTGTTAC TATAACAATG	AACACCCCAA TTGTGGGGTT
1141	CATCTTCGAC GTAGAAGCTG	GCGGGCGTGG CGCCCGCACC	CAGGTCTTCC GTCCAGAAGG	CGACGATGAC GCTGCTACTG	GCCGGTGAAC CGGCCACTTG	TTCCCGCCGC AAGGGCGGCG
1201	CGTTGTTGTT GCAACAACAA	TTGGAGCACG AACCTCGTGC	GAAAGACGAT CTTCTGCTA	GACGGAAAAA CTGCCTTTTT	GAGATCGTGG CTCTAGCACC	ATTACGTCCG TAATGCAGCG

1261	CAGTCAAGTA	ACAACCGCGA	AAAAGTTGCG	CGGAGGAGTT	GTGTTTGTGG	ACGAAGTACC
	GTCAGTTCAT	TGTTGGCGCT	TTTTCAACGC	GCCTCCTCAA	CACAAACACC	TGCTTCATGG
1321	GAAGGTCTT	ACCGAAAAAC	TCGACGCAAG	AAAAATCAGA	GAGATCCTCA	TAAAGGCCAA
	CTTCCAGAA	TGGCCTTTTG	AGCTGCGTTC	TTTTTAGTCT	CTCTAGGAGT	ATTTCCGGTT
1381	GAAGGGCGGA	AAGTCCAAAT	TGTA AAAATGT	AACTGTATTC	AGCGATGACG	AAATTCTTAG
	CTTCCCGCCT	TTCAGGTTTA	ACATTTTACA	TTGACATAAG	TCGCTACTGC	TTTAAGAATC
1441	CTATTGTAAT	^{XbaI} ACTCTAGACT	AGAGGGCCCG	CGGTTCGAAAG	GTAAGCCTAT	CCCTAACCCCT
	GATAACATTA	TGAGATCTGA	TCTCCCGGGC	GCCAAGCTTC	CATTCCGGATA	GGGATTGGGA
1501	CTCCTCGGTC	TCGATTCTAC	GCGTACCGGT	CATCATCACC	ATCACCATTG	AGTTTTAAACC
	GAGGAGCCAG	AGCTAAGATG	CGCATGGCCA	GTAGTAGTGG	TAGTGGTAAAC	TCAAATTTGG
1561	CGCTGATCAG	CCTCGACTGT	GCCTTCTAGT	TGCCAGCCAT	CTGTTGTTTG	CCCCTCCCCC
	GCGACTAGTC	GGAGCTGACA	CGGAAATCA	ACGGTTCGGTA	GACAACAAAC	GGGGAGGGGG
1621	GTGCCTTCCT	TGACCCTGGA	AGGTGCCACT	CCCCTGTCC	TTTCCTAATA	AAATGAGGAA
	CACGGAAGGA	ACTGGGACCT	TCCACGGTGA	GGGTGACAGG	AAAGGATTAT	TTTACTCCTT
1681	ATTGCATCGC	ATTGTCTGAG	TAGGTGTCAT	TCTATTCTGG	GGGGTGGGGT	GGGGCAGGAC
	TAAAGTAGCG	TAAACAGACTC	ATCCACAGTA	AGATAAGACC	CCCCACCCCA	CCCCGTCTCG
1741	AGCAAAGGGG	AGGATTGGGA	AGACAATAGC	AGGCATGCTG	GGGATGCGGT	GGGCTCTATG
	TCGTTCCCCC	TCCTAACCCCT	TCTGTTATCG	TCCGTACGAC	CCCTACGCCA	CCCAGATAC
1801	GCTTCTGAGG	CGGAAAGAAC	CAGCTGGGGC	TCTAGGGGGT	ATCCCCACGC	GCCCTGTAGC
	CGAAGACTCC	GCCTTTCTTG	GTCGACCCCG	AGATCCCCCA	TAGGGGTGCG	CGGGACATCG
1861	GGCGCATTAA	GCGCGGCGGG	TGTGGTGGTT	ACGCGCAGCG	TGACCCTAC	ACTTGCCAGC
	CCGCGTAATT	GCGCGCCGCC	ACACCACCAA	TGCGCGTCCG	ACTGGCGATG	TGAACGGTCG
1921	GCCCTAGCGC	CCGCTCCTTT	CGCTTTCTTC	CCTTCCTTTC	TCGCCACGTT	CGCCGGCTTT
	CGGGATCGCG	GGCGAGGAAA	GCGAAAAGAAG	GGAAAGGAAAAG	AGCGGTGCAA	GCGGCCGAAA
1981	CCCCGTCAAG	CTCTAAATCG	GGGCATCCCT	TTAGGGTTCC	GATTTAGTGC	TTTACGGCAC
	GGGGCAGTTC	GAGATTTAGC	CCCGTAGGGA	AATCCCCAAGG	CTAAATCACC	AAATGCCGTG
2041	CTCGACCCCA	AAAAACTTGA	TTAGGGTGAT	GGTTCACGTA	GTGGGCCATC	GCCCTGATAG
	GAGCTGGGGT	TTTTTGAACT	AATCCCCTA	CCAAAGTGCAT	CACCCGGTAG	CGGGACTATC
2101	ACGGTTTTTC	GCCCTTTGAC	GTTGGAGTCC	ACGTTCTTTA	ATAGTGGACT	CTTGTTCCAA
	TGCCAAAAAAG	CGGAAACTG	CAACCTCAGG	TGCAAGAAAT	TATCACCTGA	GAACAAGGTT
2161	ACTGGAACAA	CACTCAACCC	TATCTCGGTC	TATTCTTTTG	ATTTATAAGG	GATTTTGGGG
	TGACCTTGTT	GTGAGTTGGG	ATAGAGCCAG	ATAAGAAAAC	TAAATATTCC	CTAAAACCCC
2221	ATTTCCGCCT	ATTGGTAAA	AAATGAGCTG	ATTTAACAAA	AATTTAACGC	GAATTAATTC
	TAAAAGCCGGA	TAACCAATTT	TTTACTCGAC	TAAATTGTTT	TTAAATTGCG	CTTAATTAAG
2281	TGTGGAATGT	GTGTCAGTTA	GGGTGTGGAA	AGTCCCCAGG	CTCCCCAGGC	AGGCAGAAGT
	ACACCTTACA	CACAGTCAAT	CCCACACCTT	TCAGGGGTCC	GAGGGGTCCG	TCCGTCTTCA
2341	ATGCAAAGCA	TGCATCTCAA	TTAGTCAGCA	ACCAGGTGTG	GAAAGTCCCC	AGGCTCCCCA
	TACGTTTCGT	ACGTAGAGTT	AATCAGTCGT	TGGTCCACAC	CTTTCAGGGG	TCCGAGGGGT
2401	GCAGGCAGAA	GTATGCAAAG	CATGCATCTC	AATTAGTCAG	CAACCATAGT	CCCGCCCTA
	CGTCCGTCTT	CATACGTTTC	GTACGTAGAG	TTAATCAGTC	GTTGGTATCA	GGGCGGGGAT
2461	ACTCCGCCCA	TCCCGCCCT	AACTCCGCC	AGTTCCGCC	ATTCTCCGCC	CCATGGCTGA
	TGAGGCGGGT	AGGGCGGGGA	TTGAGGCGGG	TCAAGGCGGG	TAAGAGGCGG	GGTACCGACT

2521	CTAATTTTTT GATTAATAAAA	TTATTTATGC AATAAATACG	AGAGGCCGAG TCTCCGGCTC	GCCGCCTCTG CGGCGGAGAC	CCTCTGAGCT GGAGACTCGA	ATTCCAGAAG TAAGTCTTTC
2581	TAGTGAGGAG ATCACTCCTC	GCTTTTTTGG CGAAAAAAC	AGGCCTAGGC TCCGGATCCG	TTTTGCAAAA AAAACGTTTT	AGTCCCCGGG TCGAGGGCCC	AGCTTGTATA TCGAACATAT
2641	TCCATTTTCG AGGTAAAAAGC	GATCTGATCA CTAGACTAGT	AGAGACAGGA TCTCTGTCCT	TGAGGATCGT ACTCCTAGCA	TTCGCATGAT AAGCGTACTA	TGAACAAGAT ACTTGTCTTA
2701	GGATTGCACG CCTAACGTGC	CAGGTTCTCC GTCCAAGAGG	GGCCGCTTGG CCGGCGAACC	GTGGAGAGGC CACCTCTCCG	TATTCGGCTA ATAAGCCGAT	TGACTGGGCA ACTGACCCGT
2761	CAACAGACAA GTTGTCTGTT	TCGGCTGCTC AGCCGACGAG	TGATGCCGCC ACTACGGCGG	GTGTTCCGGC CACAAGGCCG	TGTCAGCGCA ACAGTCGCGT	GGGGCGCCCG CCCCGCGGGC
2821	GTTCTTTTTG CAAGAAAAAC	TCAAAGACCGA AGTTCTGGCT	CCTGTCCGGT GGACAGGCCA	GCCCTGAATG CGGGACTTAC	AACTGCAGGA TTGACGTCTT	CGAGGCAGCG GCTCCGTCCG
2881	CGGCTATCGT GCCGATAGCA	GGCTGGCCAC CCGACCGGTG	GACGGGCGTT CTGCCCGCAA	CCTTGCGCAG GGAACGCGTC	CTGTGCTCGA GACACGAGCT	CGTTGTCACT GCAACAGTGA
2941	GAAGCGGGAA CTTCGCCCTT	GGGACTGGCT CCCTGACCGA	GCTATTGGGC CGATAACCCG	GAAAGTCCGG CTTCACGGCC	GGCAGGATCT CCGTCTAGA	CCTGTCACT GGACAGTAGA
3001	CACCTTGCTC GTGGAACGAG	CTGCCGAGAA GACGGCTCTT	AGTATCCATC TCATAGGTAG	ATGGCTGATG TACCGACTAC	CAATGCGGGC GTTACGCCGC	GCTGCATACG CGACGTATGC
3061	CTTGATCCGG GAACTAGGCC	CTACCTGCCC GATGGACGGG	ATTCGACCAC TAAGCTGGTG	CAAGCGAAAC GTTTCGCTTTG	ATCGCATCGA TAGCGTAGCT	GCGAGCACGT CGCTCGTGCA
3121	ACTCGGATGG TGAGCCTACC	AAGCCGGTCT TTCGGCCAGA	TGTCGATCAG ACAGCTAGTC	GATGATCTGG CTACTAGACC	ACGAAAGACA TGCTTCTCGT	TCAGGGGCTC AGTCCCCGAG
3181	GCGCCAGCCG CGCGGTCGGC	AACTGTTCGC TTGACAAGCG	CAGGCTCAAG GTCCGAGTTC	GCGCGCATGC CGCGCGTACG	CCGACGGCGA GGCTGCCGCT	GGATCTCGTC CCTAGAGCAG
3241	GTGACCCATG CACTGGGTAC	GCGATGCCTG CGCTACGGAC	CTTGCCGAAT GAACGGCTTA	ATCATGGTGG TAGTACCACC	AAAATGGCCG TTTTACCGGC	CTTTTCTGGA GAAAAGACCT
3301	TTCATCGACT AAGTAGCTGA	GTGGCCGGCT CACCGGCCGA	GGGTGTGGCG CCCACCCGC	GACCGCTATC CTGGCGATAG	AGGACATAGC TCCTGTATCG	GTTGGCTACC CAACCGATGG
3361	CGTGATATTG GCACTATAAC	CTGAAAGAGCT GACTTCTCGA	TGGCGGCGAA ACCGCCGCTT	TGGGCTGACC ACCCGACTGG	GCTTCCTCGT CGAAGGAGCA	GCTTTACGGT CGAAATGCCA
3421	ATCGCCGCTC TAGCGGCGAG	CCGATTCGCA GGCTAAGCGT	GCGCATCGCC CGCGTAGCGG	TTCTATCGCC AAGATAGCGG	TTCTTGACGA AAGAACTGCT	GTTCTTCTGA CAAGAAGACT
3481	GCGGGACTCT CGCCCTGAGA	GGGTTTCGG CCCCAAGCGC	AAATGACCGA TTTACTGGCT	CCAAGCGACG GGTTCGCTGC	CCCAACCTGC GGTTGGACG	CATCACGAGA GTAGTGCTCT
3541	TTTCGATTCC AAAGCTAAGG	ACCGCCGCCT TGGCGGCGGA	TCTATGAAAG AGATACTTTC	GTTGGGCTTC CAACCCGAAG	GGAATCGTTT CCTTAGCAAA	TCCGGGACGC AGGCCCTGCG
3601	CGGCTGGATG GCCGACCTAC	ATCCTCCAGC TAGGAGGTTCG	GCGGGATCT CGCCCTAGA	CATGCTGGAG GTACGACCTC	TTCTTCGCCC AAGAAAGCGGG	ACCCCAACTT TGGGGTTGAA
3661	GTTTATTGCA CAATAAACGT	GCTTATAATG CGAATATTAC	GTTACAAATA CAATGTTTTAT	AAGCAATAGC TTCGTTATCG	ATCACAAATT TAGTGTPTAA	TCACAAATAA AGTGTTTTATT
3721	AGCATTTTTT TCGTAATAAAA	TCACTGCATT AGTGACGTAA	CTAGTTGTGG GATCAACACC	TTTGTCCAAA AAACAGGTTT	CTCATCAATG GAGTAGTTAC	TATCTTATCA ATAGAATAGT
3781	TGTCTGTATA ACAGACATAT	CCGTCGACCT GGCAGCTGGA	CTAGCTAGAG GATCGATCTC	CTTGGCGTAA GAACCGCATT	TCATGGTCAT AGTACCAGTA	AGCTGTTTTCC TCGACAAAGG

3841	TGTGTGAAAT ACACACTTTA	TGTTATCCGC ACAATAGGCG	TCACAATTCC AGTGTAAAGG	ACACAACATA TGTGTTGTAT	CGAGCCGGAA GCTCGGCCCT	GCATAAAGTG CGTATTTTAC
3901	TAAAGCCTGG ATTTCCGGACC	GGTGCCTAAT CCACGGATTA	GAGTGAGCTA CTCACTCGAT	ACTCACATTA TGAGTGTAAT	ATTGCGTTGC TAACGCAACG	GCTCACTGCC CGAGTGACGG
3961	CGCTTTCCAG GCGAAAAGTTC	TCGGGAAAACC AGCCCTTTGG	TGTCGTGCCA ACAGCACGGT	GCTGCATTA CGACGTAATT	TGAATCGGCC ACTTAGCCGG	AACGCGCGGG TTGCGCGCCC
4021	GAGAGGCGGT CTCTCCGCCA	TTGCGTATTG AACGCATAAC	GGCGCTCTTC CCGCGAGAAAG	CGCTTCTCTG GCGAAGGAGC	CTCACTGACT GAGTGACTGA	CGCTGCGCTC GCGACGCGAG
4081	GGTCGTTCCG CCAGCAAGCC	CTGCGGCGAG GACGCGCTC	CGGTATCAGC GCCATAGTCG	TCACTCAAAG AGTGAGTTTC	GCGGTAATAC CGCCATTATG	GGTTATCCAC CCAATAGGTG
4141	AGAATCAGGG TCTTAGTCCC	GATAACGCAG CTATTGCGTC	GAAGAACAAT CTTTCTTGTA	GTGAGCAAAA CACTCGTTTT	GGCCAGCAAA CCGGTCGTTT	AGGCCAGGAA TCCGGTCTTT
4201	CCGTA AAAAAG GGCATT TTTTC	GCCGCGTTGC CGCGCAACG	TGGCGTTTTT ACCGCAAAAA	CCATAGGCTC GGTATCCGAG	CGCCCCCTG GCGGGGGGAC	ACGAGCATCA TGCTCGTAGT
4261	CAAAAATCGA GTTTTTAGCT	CGCTCAAGTC GCGAGTTCAG	AGAGGTGGCG TCTCCACCGC	AAACCCGACA TTTGGGCTGT	GGACTATAAA CCTGATATTT	GATACCAGGC CTATGGTCCG
4321	GTTTCCCCCT CAAAGGGGGA	GGAAGCTCCC CCTTCGAGGG	TCGTGCGCTC AGCACGCGAG	TCCTGTTCCG AGGACAAGGC	ACCCTGCCGC TGGGACGGCG	TTACCGGATA AATGGCCTAT
4381	CCTGTCCGCC GGACAGGCGG	TTTCTCCCTT AAAGAGGGAA	CGGGAAGCGT GCCCTTCGCA	GGCGCTTTCT CCGCGAAAAG	CAATGCTCAC GTTACGAGTG	GCTGTAGGTA CGACATCCAT
4441	TCTCAGTTCG AGAGTCAAGC	GTGTAGGTCG CACATCCAGC	TTGCTCCAA AAGCGAGGTT	GCTGGGCTGT CGACCCGACA	GTGCACGAAC CACGTGCTTG	CCCCCGTTCA GGGGCAAGT
4501	GCCCCAGCCG CGGGCTGGCG	TGCGCCTTAT ACGCGGAATA	CCGGTAACTA GGCCATTGAT	TCGTCTTGAG AGCAGAACTC	TCCAACCCGG AGGTTGGGCC	TAAGACACGA ATTCTGTGCT
4561	CTTATCGCCA GAATAGCGGT	CTGGCAGCAG GACCGTCGTC	CCACTGGTAA GGTGACCATT	CAGGATTAGC GTCCTAATCG	AGAGCGAGGT TCTCGCTCCA	ATGTAGGCGG TACATCCGCC
4621	TGCTACAGAG ACGATGTCTC	TTCTTGAAGT AAGAACTTCA	GGTGGCCTAA CCACCGGATT	CTACGGCTAC GATGCCGATG	ACTAGAAGGA TGATCTTCTC	CAGTATTTGG GTCATAAAAC
4681	TATCTGCGCT ATAGACGCGA	CTGCTGAAGC GACGACTTCG	CAGTTACCTT GTCAATGGAA	CGGAAAAAGA GCCTTTTTCT	GTTGGTAGCT CAACCATCGA	CTTGATCCGG GAACTAGGCC
4741	CAAACAAACC GTTTTGTTGG	ACCGCTGGTA TGGCGACCAT	GCGGTGGTTT CGCCACCAAA	TTTTGTTTGC AAAACAAACG	AAGCAGCAGA TTCGTCTGCT	TTACGCGCAG AATGCGCGTC
4801	AAAAAAAAGGA TTTTTTTTCT	TCTCAAAGAAG AGAGTTCTTC	ATCCTTTGAT TAGGAAACTA	CTTTTCTACG GAAAAGATGC	GGGTCTGACG CCCAGACTGC	CTCAGTGGA GAGTCACCTT
4861	CGAAAACTCA GCTTTTGAGT	CGTTAAGGGA GCAATTCCT	TTTTGGTCAT AAAACCAGTA	GAGATTATCA CTCTAATAGT	AAAAGGATCT TTTTCTAGA	TCACCTAGAT AGTGGATCTA
4921	CCTTTTAAAT GGAAAAATTA	TAAAAATGAA ATTTTACTT	GTTTTAAATC CAAAATTTAG	AATCTAAAAGT TTAGATTTCA	ATATATGAGT TATATACTCA	AAACTTGGTC TTTGAACCAG
4981	TGACAGTTAC ACTGTCAATG	CAATGCTTAA GTTACGAATT	TCAGTGAGGC AGTCACTCCG	ACCTATCTCA TGGATAGAGT	GCGATCTGTC CGCTAGACAG	TATTTGTTTC ATAAAGCAAG
5041	ATCCATAGTT TAGGTATCAA	GCCTGACTCC CGGACTGAGG	CCGTGCTGTA GGCAGCACAT	GATAACTACG CTATTGATGC	ATACGGGAGG TATGCCCTCC	GCTTACCATC CGAATGGTAG
5101	TGGCCCCAGT ACCGGGGTCA	GCTGCAATGA CGACGTTACT	TACCGCGAGA ATGGCGCTCT	CCCACGCTCA GGGTGCGAGT	CCGGCTCCAG GGCCGAGGTC	ATTTATCAGC TAAATAGTCG

5161	AATAAACCCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAAGTGGT	CCTGCAACTT	TATCCGCCTC
	TTATTGGTC	GGTCGGCCTT	CCCGGCTCGC	GTCTTCACCA	GGACGTTGAA	ATAGGCGGAG
5221	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC	TAGAGTAAGT	AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT
	GTAGGTCAGA	TAATTAACAA	CGGCCCTTCG	ATCTCATTCA	TCAAGCGGTC	AATTATCAAA
5281	GCGCAACGTT	GTTGCCATTG	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCGT	TTGGTATGGC
	CGCGTTGCAA	CAACGGTAAC	GATGTCCGTA	GCACCACAGT	GCGAGCAGCA	AACCATACCG
5341	TTCATTCAGC	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
	AAGTAAGTCG	AGGCCAAGGG	TTGCTAGTTC	CGCTCAATGT	ACTAGGGGGT	ACAACACGTT
5401	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTGAGA	AGTAAAGTTGG	CCGCAGTGTT
	TTTTCGCCAA	TCGAGGAAGC	CAGGAGGCTA	GCAACAGTCT	TCATTCAACC	GGCGTCACAA
5461	ATCACTCATG	GTTATGGCAG	CACTGCATAA	TTCTCTTACT	GTCATGCCAT	CCGTAAGATG
	TAGTGAGTAC	CAATACCGTC	GTGACGTATT	AAGAGAATGA	CAGTACGGTA	GGCATTCTAC
5521	CTTTTCTGTG	ACTGGTGAGT	ACTCAACCAA	GTCATTCTGA	GAATAGTGTA	TGCGGCGACC
	GAAAAAGACAC	TGACCACTCA	TGAGTTGGTT	CAGTAAGACT	CTTATCACAT	ACGCCGCTGG
5581	GAGTTGCTCT	TGCCCGGCGT	CAATACGGGA	TAATACCGCG	CCACATAGCA	GAACTTTAAA
	CTCAACGAGA	ACGGGCCGCA	GTTATGCCCT	ATTATGGCGC	GGTGTATCGT	CTTGAAATTT
5641	AGTGCTCATC	ATTGGAAAAC	GTTCTTCGGG	GCGAAAACCTC	TCAAGGATCT	TACCGCTGTT
	TCACGAGTAG	TAACCTTTTG	CAAGAAGCCC	CGCTTTTGAG	AGTTCCTAGA	ATGGCGACAA
5701	GAGATCCAGT	TCGATGTAAC	CCACTCGTGC	ACCCAACTGA	TCTTCAGCAT	CTTTTACTTT
	CTCTAGGTCA	AGCTACATTG	GGTGAGCACG	TGGGTTGACT	AGAAGTCGTA	GAAAAATGAAA
5761	CACCAGCGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGGCAAAAAT	GCCGCAAAAA	AGGGAATAAG
	GTGGTCGCAA	AGACCCACTC	GTTTTGTGCC	TTCCGTTTTA	CGGCGTTTTT	TCCCTTATTC
5821	GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT	CTTCCTTTTT	CAATATTATT	GAAGCATTTA
	CCGCTGTGCC	TTTACAACTT	ATGAGTATGA	GAAGGAAAAA	GTTATAATAA	CTTCGTAAT
5881	TCAGGGTTAT	TGTCTCATGA	GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT
	AGTCCCAATA	ACAGAGTACT	CGCCTATGTA	TAAACTTACA	TAAATCTTTT	TATTTGTTTA
5941	AGGGGTCCG	CGCACATTTT	CCCGAAAAGT	GCCACCTGAC	GTC	
	TCCCCAAGGC	GCGTGTAAG	GGGCTTTTCA	CGGTGGACTG	CAG	

附錄 5 ampR gene (strain B172)

LOCUS AY973254 876 bp DNA linear BCT 17-APR-2005
 DEFINITION *Morganella morganii* subsp. *morganii* strain B172 AmpR gene, complete cds.
 ACCESSION AY973254
 VERSION AY973254.1 GI:62512102
 KEYWORDS .
 SOURCE *Morganella morganii* subsp. *morganii*
 ORGANISM [Morganella morganii subsp. morganii](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Morganella*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 876)
 AUTHORS Yang, S.C., Chien, J.C. and Liao, K.W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-MAR-2005) Biological Science and Technology, National Chiao Tung University, 75 Bo-Ai Street, Hsin-Chu, R.O.C
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..876
 /organism="Morganella morganii subsp. morganii"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="B172"
 /sub_species="morganii"
 /db_xref="taxon:180434"
 CDS 1..876
 /note="transcription factor"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="AmpR"
 /protein_id="AAX84552.1"
 /db_xref="GI:62512103"
 /translation="MVRRYLPLNPLRAFEEAAARHLSFTRAAIELNVTHAAVSQQVRAL
 EEQLGCVLFTRVSRGLVLTHEGGLLPVLNEAFDRIADTLECFSHGQFRERVKVGAVG
 TFAAGWLLPRLAGFYDShPHIDLHISTHNNHVDPAEEGHDYTIIRFGNGAWHESDAELI
 FSAPHAPLCPAIAEQLQOPDDVHRFTLLRSFRDEWSRWLDCSGGTPPSPSQPVMVF
 DTSLAMAEAAQLGAGVAIAPVCMFSRLLQSGALVQFFAAEITLGGYWLTRLQSRTEP
 AMQQFARWLLNTAAA"
 ORIGIN
 1 atggtcagac gttatctccc ccttaaccgg ctgcccgcct ttgaggccgc cccccgcat
 61 ctcagtttta cccgtgccc gattgagctg aatgtcacc atgccgccgt cagccagcag
 121 gtcagggctc tggaagaaca actcggctgt gtgctgttta cccgcgtctc acgcccactg
 181 gtgctgacct atgaaggatg gggattactg ccgggtctca atgaggcgtt tgaccggatt
 241 gccgatactc tggagtgttt ttctcacggg cagttccgtg agccgggtgaa agtcgggtgcg
 301 gtgggaacat ttgccgcagg ctggctgctg ccgcgtctgg ccgatttta tgacagccat
 361 ccgcatattg atctgcatat ctccacccat aacaatcatg tggatccggc gccggaaggg
 421 catgattata cgatccggtt cggtaacggc gcatggcatg aatcggatgc ggaactgatt
 481 ttcagtgcac cacacgcccc gctgtgctca ccggccattg cagagcagtt acagcagccg
 541 gatgatgttc accgcttcac gctgtgctgc tcattccgcc gggatgaatg gagccgctgg
 601 ctggattggt cgggtggcac accgccttcc ccgtcacagc cggatcatgt gtttgacacc
 661 tcaactggcca tggccgaagc ggcacaactg ggtgccgggg tagcgtatgc accggtatgt
 721 atgttcagcc gcctgttaca gtcagggcca ctgggtacagc cgtttgccc agaaatcacc
 781 ctcggcggct actggctgac gcggttacag tcccgtacgg aaaccccgcc catgcagcaa
 841 ttcgcccgcg ggctgctgaa tacggcggcg gcgtaa