

# 台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：確認傳染性胰臟壞死病毒之 VP 3 蛋白質進出  
細胞核的序列

學 校：臺北市立建國高級中學

作 者：王貫寧

## 作者簡介



好奇心強烈的我有滿多興趣，無論是電腦打球或是課外讀物都是我喜歡的休閒活動。以前有曾經學過跆拳道，現在已經三段了，還學了十年的鋼琴，雖然後來比較少練了，但嫌來無事實頗能沉浸於樂音的美妙之中。因為讀了不少雜七雜八的書，又喜歡探索新的東西，所以知識廣泛，但都沒能很精通，粗心也是我很大的毛病，有時候會忘東忘西的。大致上來說是個樂觀的人，有時候還會話多了點。

# 傳染性胰臟壞死病毒之 VP3 蛋白質進出細胞核的定位序列研究

## 壹、研究動機

IPNV 已是世界性分佈的魚類病原體，其感染對象以鮭魚、鱒魚為主，但也在其他魚類分離出來，如：鰻魚、吳郭魚、梭子魚、鱈魚、鱸魚、文蛤、泥鰱、虱目魚、香魚、金龍、石斑、天使魚等中皆曾發現 IPNV 之感染。足見此病毒廣泛地存在於魚貝類，常造成經濟魚貝類的重大損失。感染性胰臟壞死病毒之致病株，可造成魚類急性感染，而大量死亡。非致病株，不會造成大量死亡。國科會整合計劃之一其研究結果顯示，非致病株 IPNV 感染石斑魚死亡率只有 10%，若病毒與重金屬同時存在時，將引發 55-92% 死亡率；在弧菌( *Vibrio* ) 與 IPNV 混合感染，亦有相似結果，此說明單一病毒感染魚貝類或單一環境因子，都不會造成大量死亡，但病毒和環境因子加在一起，引發大量死亡，所以對 IPNV 的防治是很重要的，所以針對病毒基因加以研究，IPNV 是一種兩段雙股核糖核酸病毒，複製是在其細胞內的，但其轉譯出的 VP3 中，已經證明與雙股核糖核酸結合有關。近發現 Michelle Donnelly 及 Gillian Elliott 的研究論文”Nuclear Localization and Shuttling of Herpes Simplex Virus Tegument Protein”中，證明了 HSV 病毒所轉譯出的蛋白質 VP13 及 VP14 中，密集出現精胺酸(Arginine)的地方具有能將蛋白質帶入細胞核內的功能，而攜出細胞核的序列則有斷續的白胺酸(Leucine)出現。我們發現了傳染性胰臟壞死病毒(IPNV)病毒的轉譯出的 VP3 中也有能將蛋白質帶入或帶出細胞核的胺基酸序列，故欲利用實驗證明是否有類似將蛋白質送進及送出的訊息，以便進一步探討 VP3 是否進入細胞核直接調控細胞核的某些功能。

## 貳、研究目的

先前徐亞莉老師的實驗室已經證明 VP3 蛋白質可以進入細胞核，所以欲將 *vp3* 基因將其基因上帶有之轉送 VP3 蛋白質到細胞的訊號與將蛋白質送出的訊號加以缺失，截成不同片段而加以選殖，將所選殖出的質體送入細胞內，觀察其表現的位置情形及多寡，以探討 *vp3* 基因用來條控其進出細胞核的區域，進而探討傳染性胰臟壞死病毒的致病機制，尋找出解決防治其感染的方法。

## 參、實驗材料

- 一、*vp3* 基因：取自實驗室先前所構築於質體上(PET 28B-*vp3*)
- 二、菌種：TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* 與 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO®購自 Invitrogen.
- 三、Lipofectamine plus Kit 購自 Gibco
- 四、細胞株：大眼鮭魚胚胎細胞株(CHSE-214)

#### 肆、實驗過程

一、實驗室已將 *vp3* 基因構築在質體上(PET28B- *vp3*).

二、將 *vp3* 基因以 PCR 的方式截出五種片段。

- 1、DNA 為全長之 *vp3* 基因 \_\_\_\_\_
- 2、缺失推測為進入核訊號之部分 \_\_\_\_\_
- 3、缺失推測為帶出核訊號部分 \_\_\_\_\_
- 4、僅留下推測為進入核訊號部分 \_\_\_\_\_
- 5、缺失推測為進入核訊號及帶出核訊號部分 \_\_\_\_\_

H <sub>2</sub> O	34μl	(1) 94°C	4:00
Template DNA	1μl	(2) 94°C	0:30
10X PCR Buffer	5μl	(3) 50°C	0:30
25mM Mg <sup>2+</sup>	6μl	(4) 72°C	1:00
1mM dNTP	1μl	(5) Go to (2) for 35 cycles	
50ng/μl Primer1 and 2	各 1μl	(6) 72°C	10:00
Taq (5U/μl)	1μl		
Total	50μl		

三、純化 PCR product

- 1、PCR 產物進行 1.5%電泳
- 2、EtBr stain and cut the sample
- 3、秤重，加三倍體積 NaI 溶解，4min
- 4、加入 EZ-GLASSMILK 和 DNA 接合，10min
- 5、用每分鐘 10000 轉的速率離心 30 秒，去除上清液
- 6、用 NEW Wash 後，離心吸去上清液，重複三次
- 7、烘乾
- 8、用水 10μl 溶出 DNA，離心後收集上清液，兩次
- 9、跑電泳，確認純化的完成

四、選殖。將純化完的 DNA 接上 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO 之載體，送入 Chemically Competent E. coli 培養，可篩選有接入基因之質體。

1、

1、PCR product	3μl
Salt Solution	1μl
TOPO <sup>®</sup> vector	1μl

室溫下五分鐘

- 2、取至 TOP10 Chemically Competent E. coli 培養，置於冰上 30 分鐘，使 DNA 附在細胞膜上。
- 3、42°C，30sec，使 DNA 進入細胞。
- 4、冰上，2min，復原細胞膜孔隙
- 5、培養液 30μl，放至 37°C 培養箱培養一小時。
- 6、塗菌於培養皿。

五、將培養皿上之菌落拿到培養液養，以 PCR 檢測質體是有我們所需要的基因接入。

1、

H <sub>2</sub> O	17.5μl	(1) 94°C	4:00
菌液	0.5μl	(2) 94°C	0:30
PCR Buffer	2.5μl	(3) 50°C	0:30
Mg <sup>2+</sup>	3μl	(4) 72°C	1:00
DNTP	0.5μl	(5) Go to (2) for 35 cycles	
Primer: BGH Reverse	0.25μl	(6) 72°C	10:00
Primer: GFP forward primer	0.25μl		
Taq	0.5μl		
Total	25μl		

2、跑電泳。

六、純化菌內質體

1、**Cell Harvesting**: 將菌液約 3ml 離心 10 min.

2、**Cell Suspension**: Add 200μl of Cell Suspension Buffer (G1) (containing RNase A) to the pellet and suspend the cells until homogeneous.

3、**Cell Lysis**: Add 200μl of Cell Lysis Buffer (G2). Mix gently by inverting the capped tube five times. Incubate at room temperature for 5 min.

4、**Neutralization**: Add 267μl of Neutralization Buffer (G3) and mix immediately by inverting the tube five times. Centrifuge the mixture at 10000 × g for 10 min

5、**Cartridge Loading**: place a spin cartridge in a 2-ml wash tube. Load the supernatant from step 4 into the spin cartridge. Centrifuge at 10000 × g for 1 min. Discard the flow-through.

6、**(Optional Wash)**: Place the spin cartridge back into the 2-ml wash tube. Add 500μl of Optional Wash Buffer (GX) to the spin cartridge. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 10000 × g for 1 min. Discard the flow-through.

7、**Cartridge Wash**: Place the spin cartridge back into the 2-ml wash tube. Add 700μl of Wash Buffer (G4) (containing ethanol) to the spin cartridge. Centrifuge at 10000 × g for 1 min. Discard the flow-through. Centrifuge again at 10000 × g for 1 min to remove residual wash buffer.

8、**Plasmid Elution**: Place the spin cartridge into a 1.5ml recovery tube (supplied). Add 50μl of deionized water directly to the center of the spin cartridge. Centrifuge at 10000 × g for 1 min. Add 50μl of deionized water directly to the center of the spin cartridge again. Centrifuge at 10000 × g for 1 min.

9、稀釋 30 倍測 OD 值後換算其濃度

七、定序

取 0.2ug 之殖體 DNA 與 8ul 定序藥劑(ABI)，及 3.2pmole 之引子，最後體積為 20ul，作 PCR 反應後，以酒精沉澱法將 DNA 沉澱，在送交專門機器定序。將定序確認無誤之殖體 DNA 進行大量培養。

## 八、抽出質體

- 1、菌液約 200ml 離心
- 2、倒去上清液，倒置於紙上晾乾
- 3、各加 4ml solution 1a 以打散細胞(見附錄 3)
- 4、冰上作用二十分鐘
- 5、加入 4ml solution 2，冰上十分鐘，打破細胞
- 6、加入 9ml solution 3 中和
- 7、離心 10k 10min
- 8、將上清液換置 40ml 的離心管
- 9、加入 0.6 倍體積的 isopropanol 在冰上作用 10 分鐘使其沉澱
- 10、離心 10k 10min
- 11、加入 4ml solution 4 溶出 DNA，冰上十分鐘
- 12、離心 10k 10min
- 13、將上清液移置另一管中，加入 4ml isopropanol，冰上十分鐘
- 14、離心 10k 10min，倒去上清液
- 15、加入 4ml dH<sub>2</sub>O，打散後再加入 10 $\mu$ l 的 DNase free RNase (5mg/ml) 16 放在 37 $^{\circ}$ C 20min，吃掉 RNA
- 17、加入 1ml solution 3，室溫 5min
- 18、離心 10k 10min
- 19、把上清液倒入 14ml 的離心管，加入 3ml isopropanol 室溫 10min 使沉 DNA 沉澱
- 20、離心 10k 10min，倒去上清液
- 21、加入 600 $\mu$ l TE buffer 把 DNA 溶出
- 22、離心 10k 10min 將上清液分至兩管 1.5ml tube 中
- 23、各加入 30 $\mu$ l 3M sodium acetate (鹽類，助沉澱)
- 24、加入 750 $\mu$ l 95% ethanol 使 DNA 聚集
- 25、離心 10k 10min
- 26、用 1ml 70% ethanol wash 兩次
- 27、Dry 乾，加入 40 $\mu$ l TE 溶解即可
- 28、稀釋 50 倍測 OD

## 九、將所構築之殖體 DNA 送入鮭魚胚胎細胞中進行基因表現。

- 1、在 6well 培養皿中培養 CHSE 細胞。待細胞長至七分滿即可進行轉殖。
- 2、1 $\mu$ g DNA 加入 6 $\mu$ l 的 PLUS Reagent 室溫下反應 15 分鐘，使 PLUS Reagent 附著於 DNA 上
- 3、以 100 $\mu$ l Serum-free Dilutiam 稀釋 4 $\mu$ l 的 Lipofectamine Reagent
- 4、將 2、3 兩管混合，室溫下 15 分鐘
- 5、取掉 cells 的 medium 用 PBS wash 兩次
- 6、加入 0.8ml transfection 於 cell 上
- 7、將 4 (DNA 的複合物)加入 cell，輕輕混合 18 $^{\circ}$ C 約 17hours
- 8、換成含血清的 medium 至 3ml

## 9、於顯微鏡下觀察 GFP 的螢光

### 十、提高鮭魚胚胎細胞株之表現量。

- 1、100mm 培養皿中培養 CHSE 細胞。帶細胞長至七分滿即可進行轉殖。
- 2、在 polystyrene tube 內製備溶液 A 及 B
  - A: 每一欲轉殖之培養皿，加入 9 $\mu$ g 的 DNA，以 OPTI-MEM 培養基稀至 300 $\mu$ l。
  - B: 26 $\mu$ l 之 lipofectamine 溶劑加入 274 $\mu$ l 之 OPTI-MEM 培養基至 300 $\mu$ l。
- 3、混合 A、B，置於室溫下 45 分鐘。
- 4、移走培養皿內之培養基，以不含血清及抗生素之培養基清洗細胞兩次。
- 5、加 6.4 $\mu$ l 之 OPTI-MEM 培養基至培養皿內。
- 6、將 lipofectamine-DNA 複合物溫和的加入培養皿，在 18 $^{\circ}$ C 下培養 12 小時。
- 7、換掉原培養基，加入 10 $\mu$ l M-10 培養基(含抗生素、血清及 800 $\mu$ g/ml geneticine ) 選殖。
- 8、每五天換一次選擇性培養基，直至可選殖出單一細胞群落為止。
- 9、經由 G-418 篩選之轉殖細胞群落，由倒立式像位差顯微鏡觀察挑選周圍無其他小的細胞群落，在培養皿下用筆標示。將培養皿移至無菌操作台。
- 10、將培養皿內之培養基吸出，用 PBS 清洗兩次。
- 11、以 yellow tip 在所做記號周圍刮走零散細胞。
- 12、在欲挑選群落上套上圓形圈套環，在環內加入 15 $\mu$ l trypsin，作用一分鐘。
- 13、加入少許培養基，以 pipette 吸放十次，打散細胞。
- 14、吸至加滿培養基(含 0.8 $\mu$ g G-418)之 24 well，待其至加滿後繼代至 25T flask，75T flask。

### 伍、實驗結果：

#### 一、將 *vp3* 基因以 PCR 的方式截出五種片段。

- 1、DNA 之 *vp3* 基因全長 732bp
- 2、截去推測為進入端部分，剩下 609bp
- 3、截去推測為帶出端部分，512bp
- 4、僅留下推測為進入端部分，141bp
- 5、截去推測為進入端及帶出端部分，389bp (圖一)

#### 二、純化 PCR 完的 DNA

進行洋菜膠電泳後切下 DNA 區塊，把膠體部分溶掉，回收 DNA。

#### 三、構築 VP3 之表現載體

將 DNA 構築到質體 pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO<sup>®</sup>上，送入大腸桿菌培養。

#### 四、篩選構築成功之載體

把菌液塗於培養基(含 ampicillin)上，有接入質體者才能長成菌落，將菌落編號，挑一點菌做 PCR，若其內質體無 DNA 接入，則只會切割在質體的轉殖位置，電泳後的大小約為 240bp，若有 DNA 接入則會加上 DNA 的大小。(圖二圖三)

#### 五、質體方向之鑑定

用 GFP forward primer 及 PCR 出各序列時 3'端的引子做 PCR，進行電泳分析。若方向正確，可得到所求 DNA 的大小，若方向錯誤則僅能得到約 vector 的大小及引子大小的位置。(圖四)

#### 六、嵌入點質體序列分析

定序結果僅有四個殖體的序列與我們所需要的相符，其他有有些是不完整得基因以及有點突變的現象，所以構築成功 3 種殖體，仍有 2 種尚須努力。

#### 七、鮭魚胚胎細胞之轉殖

將細菌大量培養後抽出純化其質體，純化出殖體 DNA 的品質還不錯，以 lipofectamine 轉殖到鮭魚胚胎細胞中，景由螢光顯微鏡的觀察，發現其表現的百分比很低，所以正以 0.8ug/ml G-418 將沒轉殖殖體的細胞殺死，藉由轉殖成功的細胞繁殖來提供表現的百分比。在轉殖的細胞中我們發現細胞外型沒有顯著變化，可見我們轉殖的濃度對細胞尚未造成明顯的傷害，有些細胞並沒有打散，可能減少轉殖的效率，視野中表現病毒基因的細胞不多，所以待提高表現量後才進行細胞染上，以區分表現之位置。

#### 陸、討論：

- 一、如果 VP3 真的是由所預測的地方帶入或帶出其的細胞核，那麼其在細胞核內的調控機制是什麼？如果其由兩端下手，是否能發展出有效的疫苗來防止 IPNV 的肆虐？
- 二、實驗尚未弄完，做不完的原因可能是因為
  - 1、對實驗的環境、器材、過程不太熟悉，要花點時間適應及學習。
  - 2、尚未抓到訣竅，所以產物的質和量不高。
  - 3、學校時間以及到實驗場所的距離使得實驗的機會受限。
  - 4、有時候自己的粗心及對方法的不清楚而使得實驗步驟一再重做

#### 柒、結論：

VP3 是一種蛋白激酶，可以活化其他蛋白質，但是它也跟核酸有鍵結的現象，在不同的位置可能扮演著不同的功能機制，有趣的地方在於它會進出細胞核，那它在細胞核內是否會活化其他的蛋白質，而和核酸又是怎麼作用的，VP3 蛋白質上所看到疑似能將蛋白質帶進帶出的序列，這便是其進出的關鍵嗎？目前所培育的細胞表現量太少還不夠完整的說明，且細胞尚未對細胞核的位置進行染色觀察，所以還不清楚其表現的位置，目前觀察到缺失進入細胞核片段(2 號)，缺失出來細胞核片段(3 號)，及缺失兩端片段(5 號)的 vp3 基因其蛋白質的表現對細胞的外型看不出明顯的差異，可能百分比太少，需要加以篩選細胞並培養出能穩定表現的細胞株，來提高表現量，進而證明 VP3 上所攜帶的訊號。

#### 捌、展望：

- 一、實驗尚未完成，希望能繼續研究

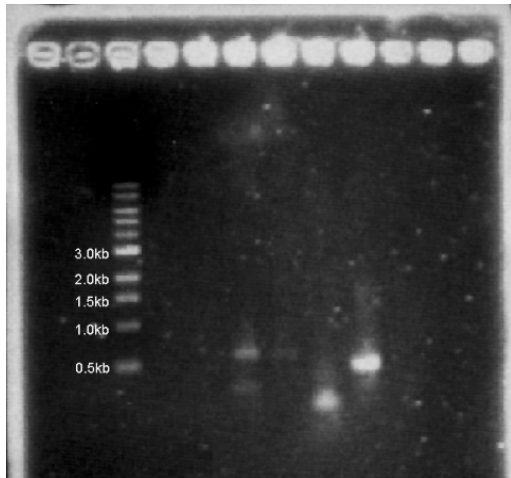


- 1、將細胞染色，觀察基因在細胞中表現的位置。
  - 2、選殖尚未完成缺失病毒基因(vp3)之質體。
  - 3、建立穩定表現之缺失病毒基因(vp3)質體的細胞株。
  - 4、找出 VP3 進入端及帶出端最重要訊號的標誌。
- 二、病毒爲了複製自己，進入細胞核以抑制細胞本身活動，知道 VP3 調控其進出細胞核的區域後，不但可以想出方法干擾其帶入及帶出的功能，降低 IPNV 所產生的危害，更能進一步研究其在細胞核內的調控機制。
- 三、IPNV 僅僅有五個基因卻能條控一個細胞的生理機能，這五個基因必定是最基本也是最重要的，那其他病毒是否也有類似的基因及條控機制存在。

#### 玖、參考文獻

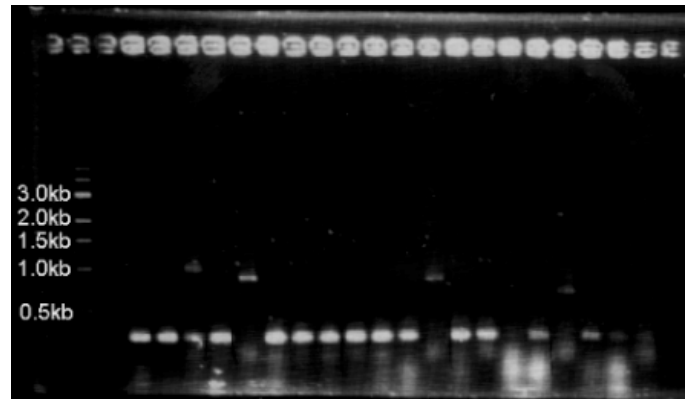
- 一、林志信，傳染性胰臟壞死病毒之 *vp3* 基因功能與 DNA 疫苗之初步研究,台灣，中華民國 88 年 6 月。
- 二、張信之，病毒世界——現代分子病毒學大綱，第一版，台北市，藝軒, p2-38~p2-39, 1999(民 88).
- 三、Michelle Donnelly and Gillian Elliott, March. 2001, Nuclear Localization and Shuttling of Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP13/14, Journal of Virology, Vol. 75, No. 6, p2566~2574.

## 圖片



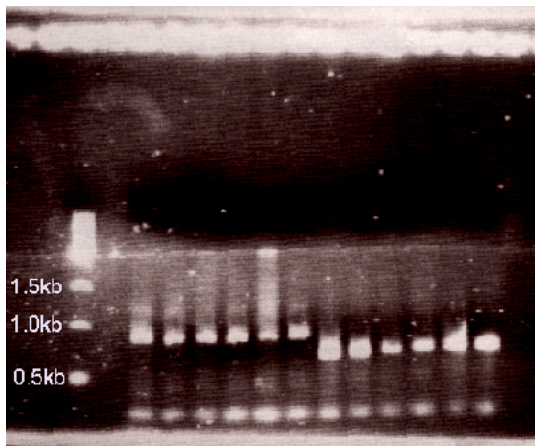
圖一

將病毒基因以 PCR 放大，經由電泳後，出來的五種序列，由左至右分別為所要選殖的片段。



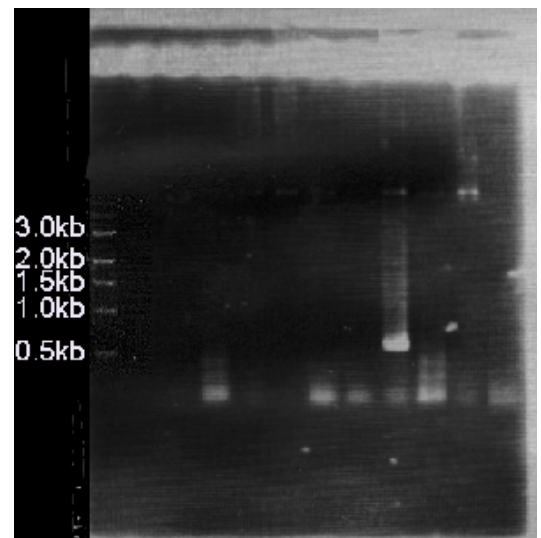
圖二

將轉形後的 *E. coli* 做 PCR 反應後跑的電泳，0.5kb 以下的位置是 RNA，有接入 DNA 的質體要大於 0.5kb。



圖三

選出有接入的菌株進行純化後質體 DNA 再做 PCR 後，進行電泳分析。



圖四

篩選成功構築的質體後，進一步確定質體的方向性是否正確，以質體上的一個引子加上病毒基因上引子進行 PCR 反應。

## 附錄(一) vp3基因序列

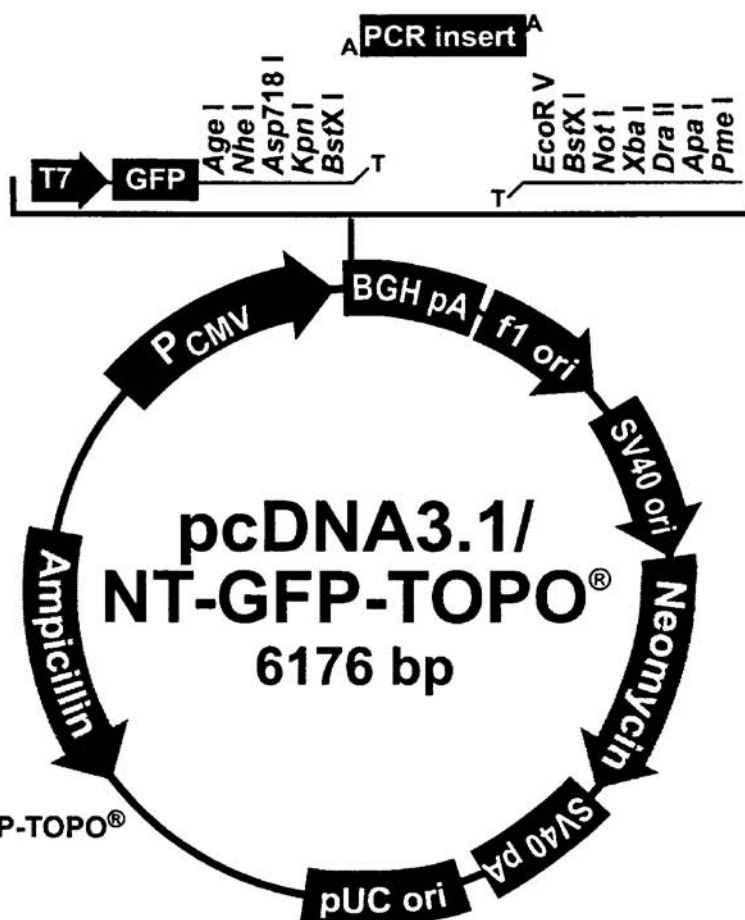
1	ATG	AGA	ACA	ACT	GCA	TCA	GGG	ATG	GAC	GCA	GAA	CTG	CAG	GGG	CTG	CTG	CAG	GCC	ACC	ATG	60
1	M	R	T	T	A	S	G	M	D	A	E	L	Q	G	L	L	Q	A	T	M	20
61	GCC	AGA	GCA	AAA	GAA	GTG	AAG	GAC	GCC	GAA	GTG	TTC	AAA	CTT	CTG	AAA	CTC	ATG	TCA	TGG	120
21	A	R	A	K	E	V	K	D	A	E	V	F	K	L	L	K	L	M	S	W	40
121	ACA	AGA	AAG	AAC	GAC	CTC	ACA	GAT	CAC	ATG	TAT	GAG	TGG	TCA	AAG	GAG	<u>GAC</u>	CCT	GAT	GCA	180
41	T	R	K	N	D	L	T	D	H	M	Y	E	W	S	K	E	D	P	D	A	60
181	ATC	AAA	TTT	GGC	AGG	CTC	GTC	AGC	ACC	CCC	CCA	AAA	CAC	CAA	GAG	AAG	CCA	AAA	GGA	CCT	240
61	I	K	F	G	R	L	V	S	T	P	P	K	H	Q	E	K	P	K	G	P	80
241	GAC	CAG	CAC	<u>ACA</u>	GCC	CAG	GAG	GCA	AAG	GCC	ACC	AGG	<u>ATC</u>	TCA	CTG	GAC	GCC	GTC	AAA	GCC	300
81	D	Q	H	T	A	Q	E	A	K	A	T	R	I	S	L	D	A	V	K	A	100
301	GGC	GCA	GAC	TTT	GCC	TCC	CCA	GAG	TGG	ATC	GCG	GAG	AAC	AAC	TAC	CGC	GGC	CCA	<u>GCC</u>	CCA	360
101	G	A	D	F	A	S	P	E	W	I	A	E	N	N	Y	R	G	P	<u>A</u>	P	120
361	GGC	CAG	TTC	AAG	TAC	TAC	ATG	ATA	ACG	GGC	AGA	GTC	CCA	AAC	CCC	GGA	GAA	GAG	TAC	GAG	420
121	G	Q	F	K	Y	Y	M	I	T	G	R	V	P	N	P	G	E	E	Y	E	140
421	GAC	TAT	GTG	CGA	AAA	CCG	ATA	ACC	CGA	CCA	ACC	GAC	ATG	GAC	AAA	ATC	AGA	CGC	CTA	GCC	480
141	D	Y	V	R	K	P	I	T	R	P	T	D	M	D	K	I	R	R	L	A	160
481	AAC	AGT	GTC	TAC	GGC	CTG	CCC	CAC	CAA	GAA	CCC	GCA	CCA	GAC	GAC	TTC	TAC	CAG	GCA	GTC	540
161	N	S	V	Y	G	L	P	H	Q	E	P	A	P	D	D	F	Y	Q	A	V	180
541	<u>GGC</u>	GAG	GTG	<u>TTT</u>	GCA	GAA	AAC	GGG	GGA	AGA	GGG	CCC	GAC	CAA	GAC	CAA	ATG	CAA	GAC	CTG	600
181	<u>G</u>	E	V	F	A	E	N	G	G	R	G	P	D	Q	D	Q	M	Q	D	L	200
601	AGG	GAC	<u>CTG</u>	GCA	AGG	CAG	ATG	AAA	CGA	CGA	CCC	CGA	CCA	GCT	GAG	ACA	CGC	AGG	CAA	ACC	660
201	R	D	L	A	R	Q	M	K	R	R	P	R	P	A	E	T	R	R	Q	T	220
661	AAG	ACT	CCA	CCC	AGG	GCG	GCA	ACC	TCC	AGT	GGA	TCG	CGG	TTT	ACC	CCC	TCC	GGC	GAT	GAC	720
221	K	T	P	P	R	A	A	T	S	S	G	S	R	F	T	P	S	G	D	D	240
681	GGA	GAA	GTG	TAA	CAGCTA																698
241	G	E	V	*																244	

Fig 6 : T42G 株 IPNV 之 VP3 核酸氨基酸序列分析。核酸序列號碼以轉譯之起使點“A”TG 為+1 而氨基酸序列號碼則以第一個methionione 為+1。

## pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO® Map

### Map

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO® vector. The vector is supplied linearized between base pairs 1678 and 1679. This is the TOPO® Cloning site. **The complete nucleotide sequence is available for downloading from our World Wide Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or from Technical Service (page 32).**



### Comments for pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO® 6176 nucleotides

- CMV promoter: bases 209-863
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- GFP ORF: bases 905-1621
- GFP Forward priming site: bases 1512-1529
- Multiple cloning site: bases 1645-1754
- TOPO® Cloning site: 1690-1691
- BGH reverse priming site: bases 1766-1783
- BGH polyadenylation sequence: bases 1769-1996
- f1 origin of replication: bases 2042-2470
- SV40 promoter and origin: bases 2498-2806
- Neomycin resistance gene: bases 2881-3675
- SV40 polyadenylation sequence: bases 3849-3979
- pUC origin: bases 4362-5035 (opposite strand)
- Ampicillin resistance gene: bases 5180-6040 (opposite strand)

附錄(三)

solution 1a	(每 200ml 菌)			
	Tris	1.0M	pH7.6	150μl
	EDTA	0.5M	pH8.0	120μl
	Glucose	0.5M		600μl
	dH <sub>2</sub> O			5.1ml
solution 1b	將 1a 加入 12mg lysozyme			
solution 2	SDS	20%		600μl
	NaOH	5M		480μl
	dH <sub>2</sub> O			10.92ml
solution 3	Ammonium Acetate	7.5M	pH7.6	4℃
solution 4	Ammonium Acetate	2M	pH7.4	