

次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット：DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

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

16°Cで2時間、Ligationさせた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った（添付資料-③）。

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

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

↓

On ice for 30 min.

↓

Incubate cells for 45 sec. at 42°C

↓

On ice for 1 min.

↓

Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37°C

↓

1 ml is recommended for plating on dish (Amp)

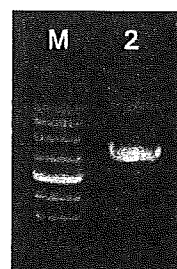
↓

Incubate overnight at 37°C

C-2-2. SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター (SYN-2245-2) の解析

SV40 Large T antigen - GFP ベクター (SYN-2245-1)と同様の手法で発現ベクターを作製した。

VG0402遺伝子クローンを鋳型として、終止コドンとアミノ酸配列の非翻訳領域（合計：355bp）を除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域（2,124bp）を増幅した（添付資料-④）。



M : Supercoiled DNA Ladder Marker

1 : SYN2245-2

ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag ORF 遺伝子をIn-Frameとなるように挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った（添付資料-⑤）。

C-2-3. hTERT - GFP ベクター (SYN-2142-1)の解析

SV40と同様にhTERTのPCRを行い、hTERTのPCR Productsを作製し、ベクターとのLigationを行うため、制限酵素 (EcoR I) 処理を以下のように

に実施した。

《PCR Productsの切断酵素処理》

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

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

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×H buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

制限酵素を用いて、37℃で16時間処理し、約2.6Kbpの切断酵素処理したベクターが確認できた。

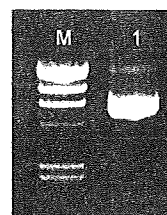
次にPCR Productsと切断酵素処理したベクターを以下の条件でLigationさせた。

使用キット：DNA Ligation Kit (Ver.2.0)

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

16℃で2時間、Ligationさせた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った（添付資料-⑥）。



M : Supercoiled DNA Ladder Marker
1 : SYN2142-1

最後に大腸菌へのTransformationは以下のように実施した。

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

↓
On ice for 30 min.

↓
Incubate cells for 45 sec. at 42℃

↓
On ice for 1 min.

↓
Add SOC medium up to 1 ml incubate by shaking (160-225 rpm) for 1 hour at 37℃

↓
1 ml is recommended for plating on dish (Amp)

↓
Incubate overnight at 37℃

C-3. 細胞への遺伝子導入結果

C-3-1. HCE への SV40 Large T antigen 遺伝子の導入

CnT-20で継代培養したHCEにSV-40 Large T antigen遺伝子を導入した。遺伝子導入は、微量エレクトロポレーション法を用いた。

遺伝子導入4時間前に培地を50% FBS含有Opti-MEM培地に変えた。2 × 10⁵ cell/mlに調整したHCEを遠心してペレットにした。このペレットをResuspension bufferで再懸濁し、この懸濁液に遺伝子 (SYN-2245-1、SYN-2245-2) を2 μ g加えた。

条件	波形	電圧 V	P. L.	Pulse 数
1	Squ	750	30	1
2	Squ	1000	30	1
3	Squ	2000	30	1
4	Squ	750	30	2
5	Squ	1000	30	2

波形 Squ : Square Wave

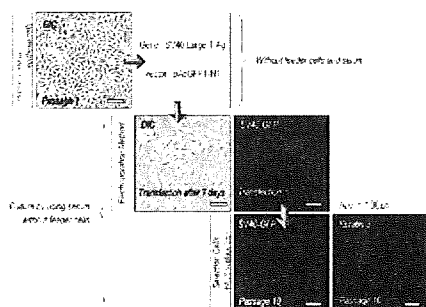
P. L. : Pulse length (msec)

遺伝子導入 24 時間後に、蛍光倒立顕微鏡 (Power IX-71、Olympus) を用いて GFP の蛍光 (遺伝子が導入された細胞) を観察した。エレクトロポレーション法を用いた実験結果は、条件 5 が最も遺伝子の導入効率が良く、およそ 21% の細胞に遺伝子が導入されていた。遺伝子が導入された細胞の名称は、『HCE-NY』とした。

C-3-2. HCE-NY細胞の選択分離

HCE-NYはGFPが導入されているため緑色の蛍光を発するが、遺伝子が導入されなかったHCE細胞は蛍光を発しない。そこで、セルソーター (FACS Vantage SE; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った。

ソーティングと継代培養を10回繰り返して実施し、HCE-NY細胞の純度は99.99%になった。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を発現していた。



C-3-3. HCE-T への hTERT 遺伝子の導入

継代培養したHCE-TにhTERT遺伝子を導入した。遺伝子導入は、微量エレクトロポレーション法を用いた。

2×10^5 cell/mlに調整したHCE-Tを遠心してペレットにした。このペレットをResuspension bufferで再懸濁し、この懸濁液に遺伝子 (SYN-2142-1) を2 μ g加えた。

条件	波形	電圧 V	P. L.	Pulse 数
1	Squ	750	30	1
2	Squ	1000	30	1
3	Squ	2000	30	1
4	Squ	750	30	2
5	Squ	1000	30	2

波形 Exp : Exponential Wave

波形 Squ : Square Wave

P. L. : Pulse length (msec)

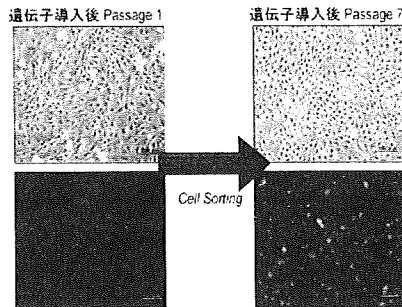
遺伝子導入24時間後に、蛍光倒立顕微鏡 (Power IX-71、Olympus) を用いてGFPの蛍光 (遺伝子が導入された細胞) を観察した。エレクトロポレーション法を用いた実験結果は、条件 5 が最も遺伝子の導入効率が良く、およそ27%の細胞に遺伝子が導入されていた。遺伝子が導入された細胞の名称は、『HCE-T hTERT』とした。

C-3-4. HCE-T hTERT細胞の選択分離

HCE-T hTERTはGFPが導入されているため緑色の蛍光を発するが、遺伝子が導入されなかったHCE-T細胞は蛍光を発しない。そこで、セルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行っ

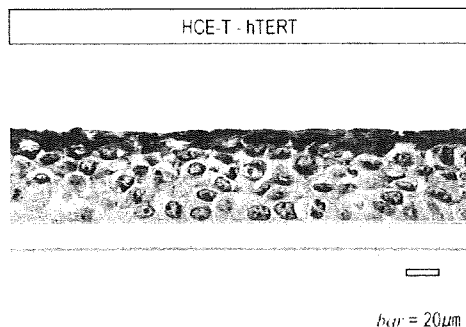
た。

ソーティングと継代培養を7回繰り返して実施し、HCE-T hTERT細胞の純度は99.99%になった。



C-4. HCE-T hTERTを用いた三次元角膜培養モデル作製の試み

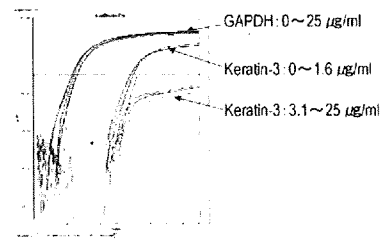
エアリフト法による培養を施した細胞をセルカルチャーインサートに載せたまま、SIPER FIXで固定し、通常の方法でパラフィン切片標本作製した。作製した標本は、HCE-T hTERTの分化能（細胞重層化）を評価するため、H.E.染色を行い観察したところ、セルカルチャーインサートのメンブレンに近い細胞から空気に暴露されている表面にむかって徐々に細胞が扁平となって重層化していることが明らかとなった。しかし、現在の条件では安定した三次元培養モデルが構築できていないことから、今後、さらに培養条件を検討する必要がある。



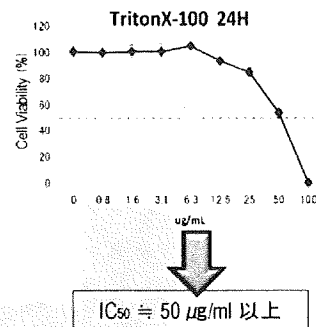
C-5. ヒト不死化角膜上皮細胞株における角膜上皮細胞特異的マーカーを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株（HCE-NY）を用いて、Triton X-100を被験物質（24時間反応）として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

角膜上皮細胞特異的マーカーの1つであるkeratin-3 mRNAの発現量は、Triton X-100を0.8~1.6 μg/mlで反応させた際は、Triton X-100を反応していないコントロールと同様であったが、3.1 μg/ml以上の濃度になるとkeratin-3 mRNAの発現量は低下し、Thresholdを0.3に設定することでkeratin-3 mRNAの発現の有無を判定できた。なお、内部標準物質としてのGAPDH mRNAの発現量は変化しなかった。



同時に実験を行ったNeutral Red法でのIC₅₀は、およそ50 μg/mlであった。



D. まとめ

D-1. 角膜輪部組織の免疫染色

既報にもあるように、角膜輪部組織において、Integrin $\beta 1$ (CD29) やp63などの角膜上皮幹／前駆細胞マーカー陽性の細胞が観察され、それらの細胞はp75NTR陽性であった。p75NTRは、水晶体上皮幹／前駆細胞や網膜幹前駆細胞で発現していることを既に報告しており、角膜上皮幹／前駆細胞においてもp75NTRが発現していることが今回の研究で明らかとなった。

D-2. HCEC-2とHCEの継代培養と分析

市販されている正常角膜上皮細胞を無血清培地 (EpiLife-KG2: EpiLifeTM+HCGS) と血清含有上皮細胞培養用培地 (M-Stars C) で培養したところ、2継代目で既に上皮細胞様形態から変化し始め、3継代目では多くの細胞がディッシュに接着することが出来ず、その後、継代することが出来なかった。平成20年度の研究結果も合わせて考慮すると、市販の正常角膜上皮細胞は、継代維持することが困難であることが明らかとなった。

一方、角膜輪部組織から分離培養したHCEは、4継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察されたが、今回の遺伝子導入実験を行うにあたっては、十分量の細胞を継代培養して確保することができた。

2継代目のHCEでは、p63陽性細胞は 78.6 ± 2.4 %、Integrin $\beta 1$ 陽性細胞は 98.7 ± 0.4 %、およびp75NTR陽性細胞は 70.2 ± 5.0 %であったことから、遺伝子導入実験を行った細胞は、角膜

上皮幹／前駆細胞マーカーを発現している細胞であった。

D-3. HCEへの遺伝子導入

平成20年度までの研究手法において、角膜上皮細胞へ遺伝子を導入することは困難であった。しかし、平成21年度に実施した新しく開発した研究手法を用いることで、世界で初めてウイルスベクターを用いることなく、角膜上皮細胞へ高効率で遺伝子が導入できることを明らかとした。

結果として、SYN-2245-1とSYN-2245-2のいずれかの遺伝子を導入して選択分離した細胞 (HCE-NY) は、現在までに30回以上の継代を行っているが、細胞増殖は衰えることなく、増え続けている。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を全ての細胞で発現していることから、角膜上皮細胞としての特性の一部は保持できていた。

D-4. HCE-Tへの遺伝子導入

SYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入して選択分離した細胞 (HCE-T hTERT) では、Integrin $\beta 1$ の発現が保持されていた。なお、SYN-2142-1 (hTERT) を導入した細胞は、細胞形態の異常 (癌化) などは起こらなかった。

D-5. HCE-T hTERTの分化能

最近の研究では、テロメラーゼを細胞に導入しても、その細胞の分化能は維持、あるいは増加することが分かってきたことから、本研究では分化能が減衰してしまったHCE-TにSYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入することで、分化能が回復するのではないかと考え、本実験を行った。

結果として、角膜上皮細胞の分化能

を回復し、細胞の重層化と細胞形態の分化が観察された。

D-6. keratin-3 mRNAを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株 (HCE-NY) を用いて、Triton X-100 を被験物質 (24時間反応) として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

Triton X-100 (24時間反応) において、従来のNeutral Red法でのIC₅₀ (約 50 µg/ml) よりも遥かに薄い濃度 (3.1 µg/ml) において、細胞への障害を検出することができた。

E. 考察と結論

正常ヒト角膜輪部組織から分離培養したHCEを用いて、ウイルスベクターを用いることなく、世界で初めて角膜上皮細胞の不死化細胞 (HCE-NY) の作出に成功した。今後、HCE-NYのクローニングを行い、不死化細胞株として確立させること、HCE-NYとHCE (正常角膜上皮細胞) の相同性評価と遺伝子導入による影響、および不死化細胞の証明実験を行っていく必要がある。

既報の論文において、角膜上皮細胞に遺伝子を導入する研究では、全てウイルスベクターを使用している。つまり、ウイルスベクターを用いなければ、角膜上皮細胞に遺伝子を導入することが難しいということを示していると考えている。平成20年度で検討した方法は、一般的な研究で使用している方法の90%以上を検証しているが、遺伝子導入は成功しなかったが、平成21年度に開発した新しい遺伝子導入・選

択分離法を用いることで、不死化角膜上皮細胞を作出することができた。

本研究は“新規眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発”であることから、もし新しい角膜上皮細胞株が作製された場合、細胞を使用する環境が必ず管理された場所 (例えばP2実験室など) で実施されるということは保証されないことも考えられるため、ウイルスベクターを元々使用しない細胞を用いることがベストである。

HCE-Tにおいても、平成21年度に開発した遺伝子導入・選択分離法を使用することで、hTERT遺伝子を導入することに成功し、結果として分化能を回復させることができた。今後、HCE-T hTERT、およびHCE-NYを用いて、より安定した三次元角膜上皮培養モデルの培養法を検討していく必要がある。

眼刺激性試験代替法における新しい指標・評価マーカーの検索において、keratin-3が候補の1つとして利用できる可能性を示すことができた。今後、様々な被験物質による細胞障害を行い、指標・評価マーカーとしての有用性を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., and Horiguchi M.: A study of cultured human corneal epithelial stem /

progenitor cells derived from the corneal limbus. In vitro Cell. Dev. Biol. (under submitted)

2. 学会発表

- Yamamoto N., Taniguchi K., Hirano K, Horiguchi M., Katoh M, Hata K. and Kojima H.: Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture condition. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences 2009. [参考資料-⑦]
- 山本直樹, 平野耕治, 谷川篤宏, 加藤雅一, 畠賢一郎, 小島肇, 堀口正之, 谷口孝喜. 角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代培養法および遺伝子導入の検討. 第82回日本組織培養学会, 2009. (栃木・宇都宮) [参考資料-⑧]
- 山本直樹, 平野耕治, 谷川篤宏, 加藤雅一, 畠賢一郎, 小島肇, 綾木雅彦, 堀口正之, 谷口孝喜. 角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法および遺伝子導入法の検討. 第41回日本臨床分子形態学会総会, 2009. (兵庫・神戸) [参考資料-⑨]
- 山本直樹, 平野耕治, 谷口孝喜. ヒト角膜上皮細胞の分離培養法と不死化細胞株の樹立. 第41回藤田学園医学会総会, 2009. (愛知・豊明) [参考資料-⑩]

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今のところ、新規特許出願については未定である。

本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせ

ない特許は以下のとおりである。

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

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

添付資料-①

SV40 Large T Ag のアミノ酸配列 (708 アミノ酸残基)

1 mdkvlnrees lqlmdllgle rsawgniplm rkaylkkcke fhpdkggdee kmkkmntlyk
61 kmedgvkyah qpdfggfwda teiptygtde weqwwnafne enlfcseemp ssddeatads
121 qhstppkkkr kvedpkdfps ellsfishav fsnrllacfa iyttkekaal lykkimekys
181 vtfisrhnsy nhnilffltp hrhrvsainn yaqklctfsf lickgvnkey lmysaltrdp
241 fsvieeslpg glkehdfnpe eaeetkqvs w klvteyamet koddvllllg mylefqysfe
301 mclkcikkeq pshykyhekh yanaaifads knqkticqqa vdtvlakkrv dslqltreqm
361 ltnrfdlld rmdimfgstg sadieewmag vawlhcllpk mdsvvdyflk cmvynipkkkr
421 ywlfkgpids gkttlaaall elcggkalnv nlpdrlnfe lgvaidqflv vfedvkgtgg
481 esrdlpsgqg innldnrdy ldgsvkvnle kkhlnkrtqi fppgivtmne ysvpktlqar
541 fvkqidfrpk dylkhclers efllekriiq sgiallmli wyrpvaefaq siqsrivewk
601 erldkefsls vyqkmkfnva mgigvldwlr nsdddedsq enadknedgg eknmedsghe
661 tgidsqsqgs fqapqssqsv hdhnqpyhic rgftcfkkpp tpppepet

備考

- ・NCBI の Accession Number : NP_043127 を基準とした。
- ・623 I ⇒ V、637 E ⇒ D のアミノ酸置換が生じる。

SV40 Large T antigen の DNA シーケンス結果 (2,479 bp)

ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
TAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAATATTCCTCTGATGAGAAAGGC
ATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAA
GAAAAAATGAAGAAAATGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAG
TAAAATATGCTCATCAACCTGACTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGA
GGTATTTGCTTCTTCCTTAAATCCTGGTGTGATGCAATATACTGCAAAC
AATGGCCTGAGTGTGCAAAAAAATGTCTACTAACTGCATATGCTTGCT
GTGCTTACTGAGGATGAAGCATGAAAATAGAAAATTATACAGGAAAGAT
CCACTTGTGTGGGTTGATTGCTACTGCTTCGATTGCTTTAGAATGTGGT
TTGGACTTGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATT
GGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTATAAGGTAAATATAAAATTTT
TAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGA
TTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAA
TGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAG
GCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGG
TAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCA
TGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAA
AGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAAAAATTATGGAAAAATATTCTGTA
ACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTT
ACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATT
GTGTACCTTTAGCTTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGA
TGTATAGTGCTTAACTAGAGATCCATTTTCTGTTATTGAGGAAAGTTTG
CCTGGTGGGTAAAGGAGCATGATTTTAATCCAGAAGAAGCAGAGGAAA
CTAAACAAGTGCTCCTGGAAGCTTGTAACAGAGTATGCAATGGAAACAAA
ATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAATTTCACTACA
GTTTTGAAATGTGTTTAAAATGTATTA AAAAAGAACAGCCAGCCACTAT
AAGTACCATGAAAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGCTGACAGCAA
AAACCAAAAAACCATATGCCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGCTAAA
AAGCGGGTTGATAGCCTACAACCTAAGAGAACAAATGTTAACAAACA
GATTTAATGATCTTTTGGATAGGATGGATATAATGTTTGGTTCTACAGGC
TCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTGCTTGGCTACACTGTT
TGTTGCCAAAATGGATTCAGTGGTGTATGACTTTTTTAAAATGCATGGT
GTACAACATTCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATTGATA
GTGGTAAAACCTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGGGGAA
AGCTTTAAATGTTAATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACTTTGAGCTAGGA
GTAGCTATTGACCAGTTTTTGTAGTATTTTGTAGGATGTAAAGGGCACTG

GAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCAGGTCAGGGAATTAATAACCTGGA
CAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTTAAGGTAAACTTAGAAAAG
AAACACCTAAATAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAATAGTCACCAT
GAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTAAAACAA
ATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCAGTG
AGTTTTTGTTAGAAAAGAGGATAATTCAAAGTGGCATTGCTTTGCTTCTT
ATGTTAATTTGGTACAGACCTGTGGCTGAGTTTGCTCAAAGTATTCAGA
GCAGAATTGTGGAGTGGAAAGAGAGATTGGACAAAGAGTTTAGTTTGT
CAGTGTATCAAAAAATGAAGTTTAATGTGGCTATGGGAGTTGGAGTTTT
AGATTGGCTAAGAAACAGTGATGATGATGATGATGACAGCCAGGAAAAT
GCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGACTCAGGG
CATGAAACAGGCATTGATTCACAGTCTCAAGGCTCATTTTCAGGCCCTC
AGCCCTCACAGTCCTCACAGTCTGTTTCATGATCATAATCAGCCATATCAC
ATCTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGA
ACCTGAAACA

【備考】

- ・ 開始コドンの ATG をボールドとアンダーラインで示した。
- ・ 塗りつぶし部分は、上記アミノ酸配列をコードしない非翻訳領域を示す。



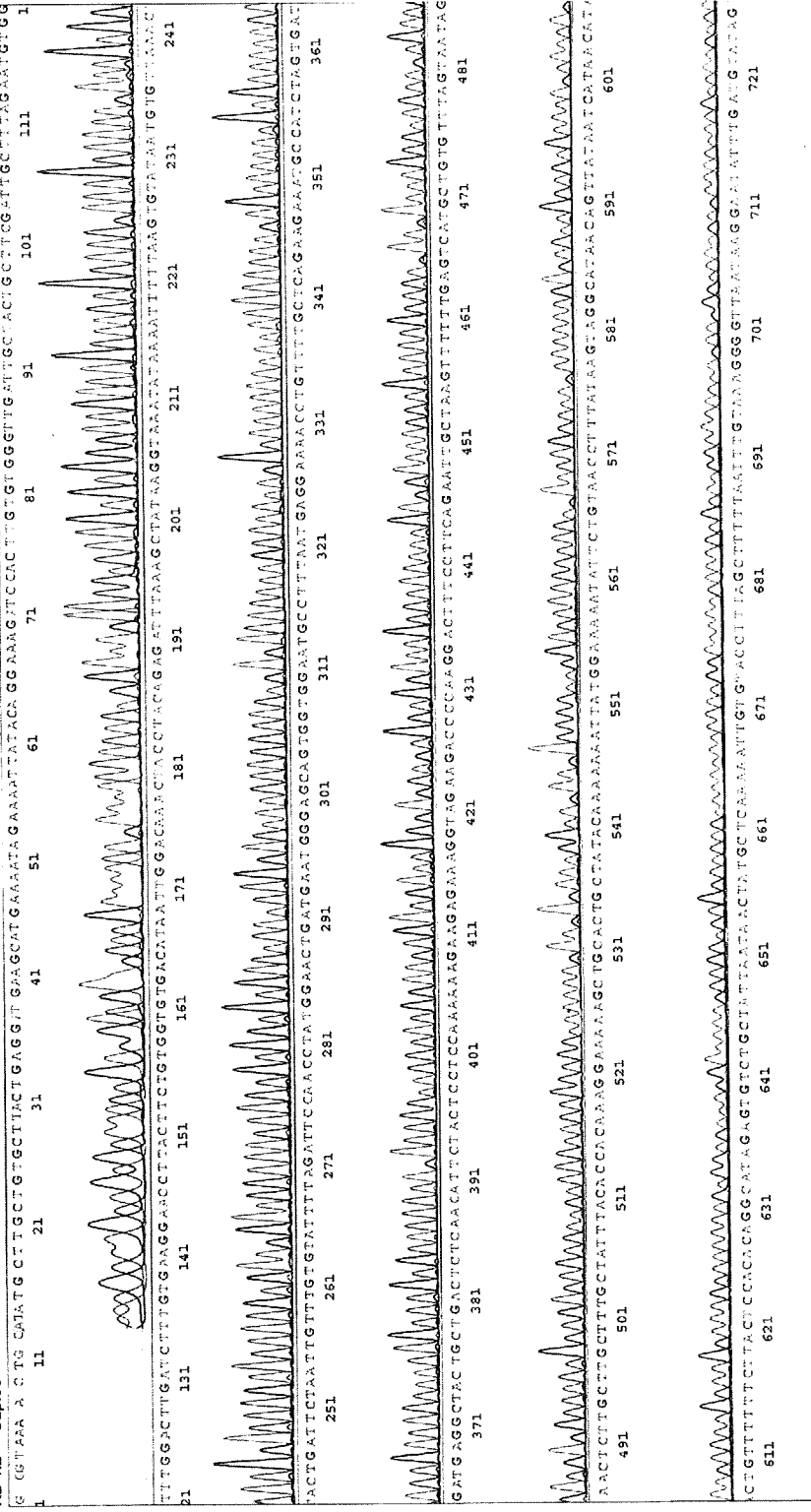
SIN G:157 A:174 T:256 C:143

KB.bcp

KB 12 Cap:50

Version 5.2 Patch2 HISCV Bases: 1007

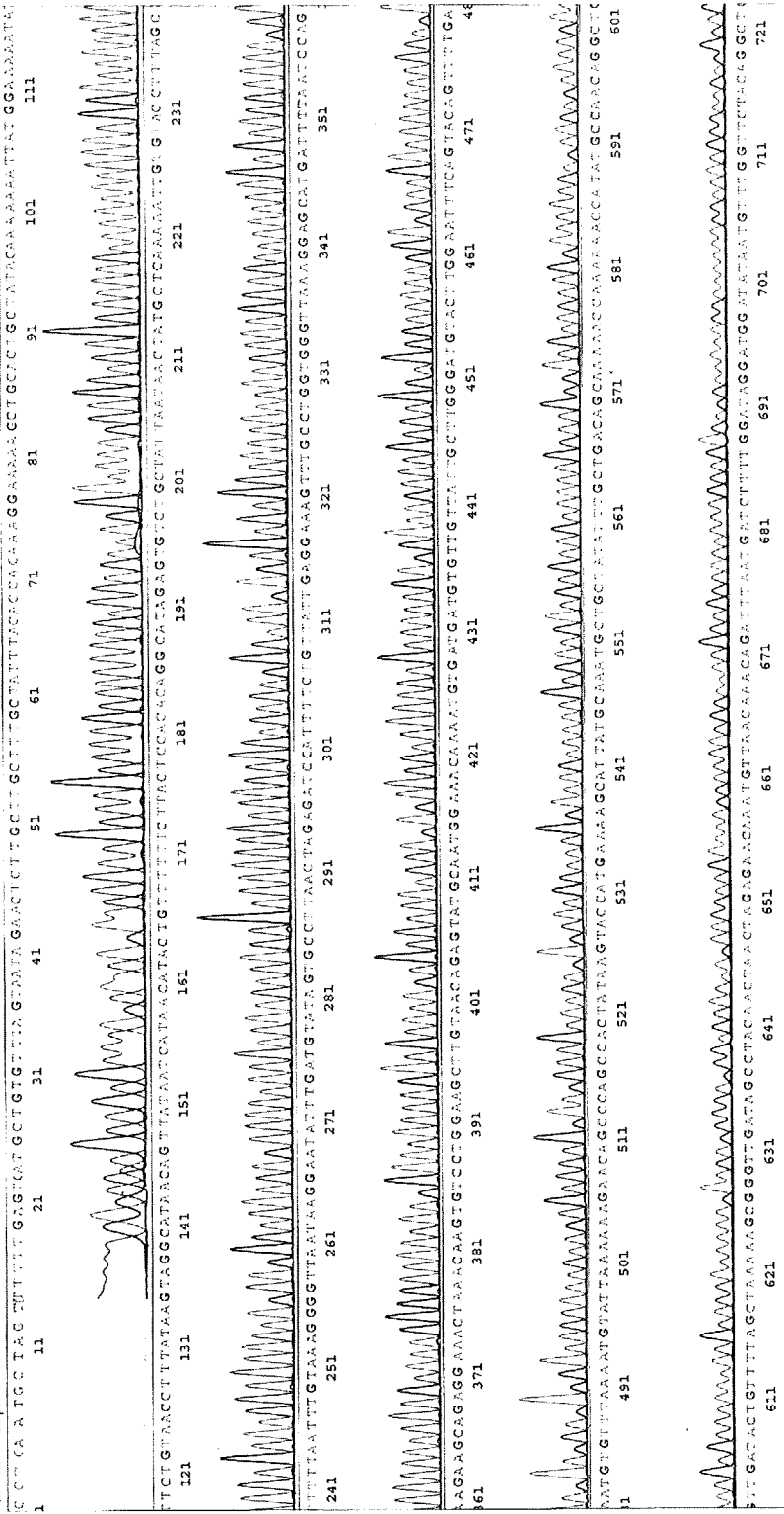
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr 28,2009 11:13PM, CST
 Apr 28,2009 11:36PM, CST
 Spacing:15.05 Pts/Panel/450
 Plate Name: 20090428N01R03





S/N G:170 A:199 T:272 C:161
 KB.bcp
 KB 1.2 Cap.79
 Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 991
 Pls 1895 to 15960 Pk1 Loc:1894
 KB 3730_POP7_BDTV3.mob
 SYN2245-1-1_SYN2245P2
 SYN2245-1-1_SYN2245P2

Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr. 28, 2009 11:13PM, CST
 Apr. 28, 2009 11:36PM, CST
 Spacing: 15.12 Pls/Panel1450
 Plate Name: 20090428N01R03



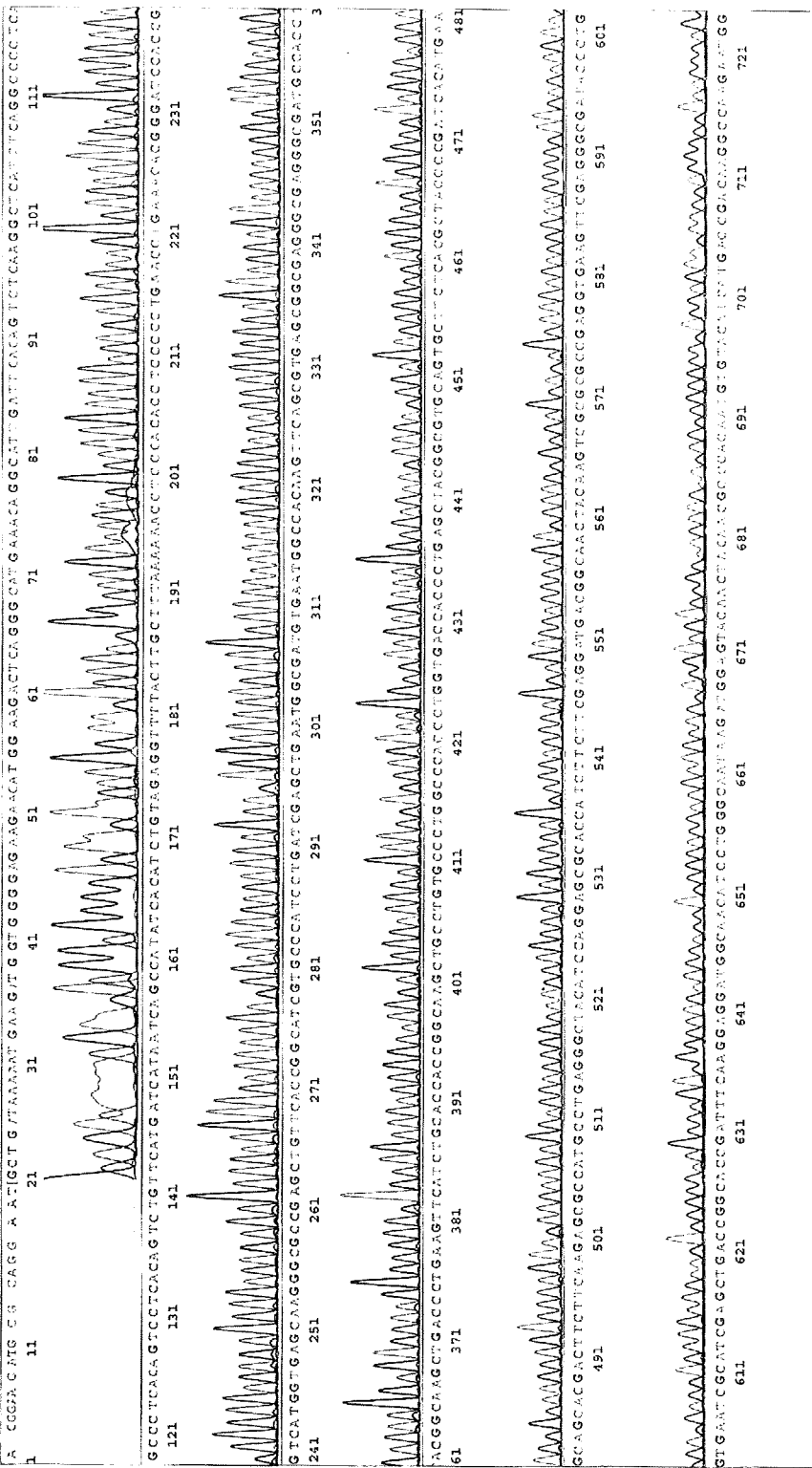
Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST Electropherogram Data Page 1 of 1



S/N G:146 A:139 T:145 C:191
 KB.bcp
 KB 1.2 Cap:77

SYN2245-1-1_SYN2245P5
 SYN2245-1-1_SYN2245P5
 KB_3730_POPT_BDTv3.mob
 Pls 1891 to 15960 Pk1 Loc:1890
 Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1015

Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr 28.2009 11:13PM, CST
 Apr 28.2009 11:36PM, CST
 Spacing:14.96 Pls/Panel1450
 Plate Name: 20090428N01R03



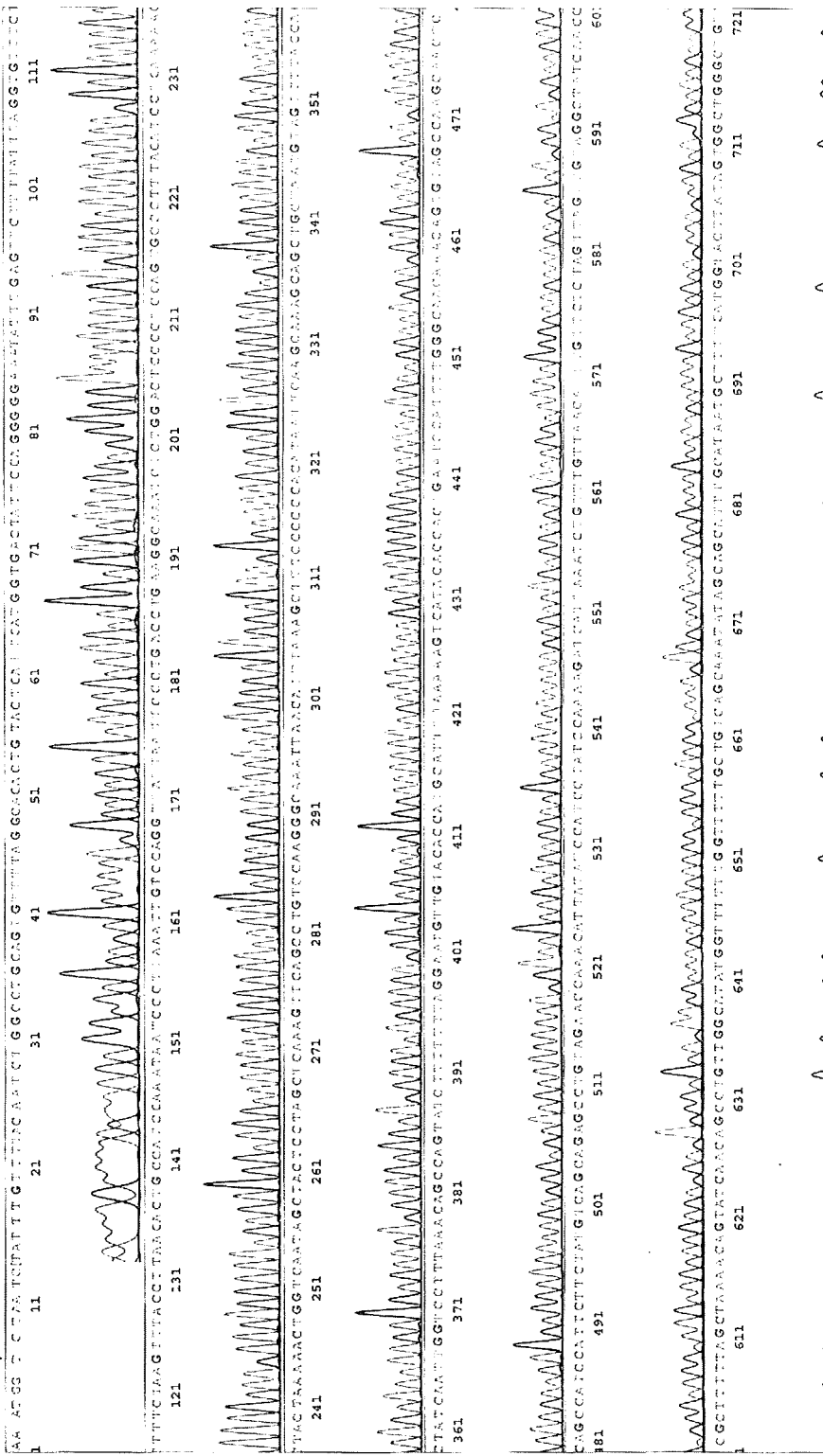
Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST
 Electropherogram Data Page 1 of 1

Applied Biosystems

SIN C:177 A:205 T:326 C:290
KB.bcp
KB 1.2 Cap.75

SYN2245-1-1_SYN2245P6
SYN2245-1-1_SYN2245P6
KB_3730_POP7_BDTV3.mob
Pls 1901 to 15960 Pk1 Loc:1900
Version 5.2 Patch2 HISOV Bases: 1006

Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
Apr 28,2009 11:13PM, CST
Apr 28,2009 11:36PM, CST
Spacing:14.93 Pls/Panel1450
Plate Name: 20090428ND1R03



SV40 Large T Antigen ORF の DNA シーケンス結果 (2,124 bp)

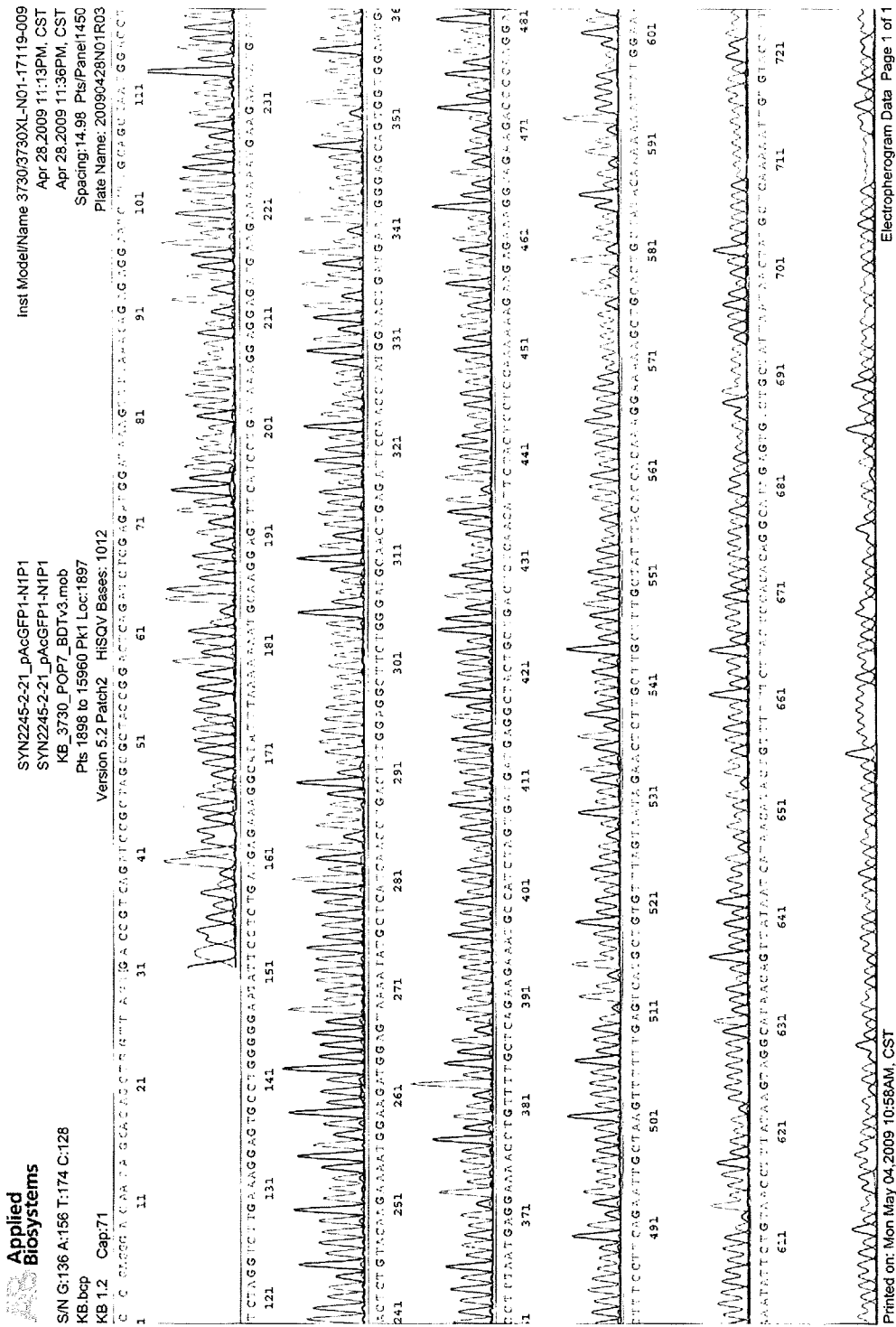
ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
TAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAATATTCCTCTGATGAGAAAGGC
ATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAA
GAAAAAATGAAGAAAATGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAG
TAAAATATGCTCATCAACCTGACTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGA
GATTCCAACCTATGGAACCTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTT
AATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATG
AGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAA
GGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGT
CATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCAC
AAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAAAAATTTATGGAAAAATATTTCT
GTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTT
CTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAA
ATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATT
TGATGTATAGTGCCTTAACTAGAGATCCATTTTCTGTTATTGAGGAAAGT
TTGCCTGGTGGGTAAAGGAGCATGATTTAATCCAGAAGAAGCAGAGG
AAACTAAACAAGTGTCCTGGAAGCTTGTAAACAGAGTATGCAATGGAAAC
AAAATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAAATTTCACT
ACAGTTTTGAAATGTGTTTAAAATGTATTA AAAAAGAACAGCCCAGCCA
CTATAAGTACCATGAAAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGCTGACA
GCAAAAACCAAAAAACCATATGCCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGC
TAAAAAGCGGGTTGATAGCCTACA AACTAGAGAACAAATGTTAACA
AACAGATTTAATGATCTTTTGGATAGGATGGATATAATGTTTGGTTCTAC
AGGCTCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTGCTTGGCTACAC
TGTTTGTGCCCCAAAATGGATTCAGTGGTGTATGACTTTTTTAAAATGCAT
GGTGTACAACATTCCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATT
GATAGTGGTAAAACTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGG
GGAAAGCTTTAAATGTTAATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACTTTGAGCT
AGGAGTAGCTATTGACCAGTTTTTLAGTAGTTTTTGAGGATGTAAAGGGC
ACTGGAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCAGGTCAGGGAATTAATAACC
TGGACAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTTAAGGTAAACTTAGA
AAAGAAACACCTAAATAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAATAGTCA
CCATGAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTAAA
ACAAATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCA
GTGAGTTTTTGTAGAAAAGAGGATAATTC AAAGTGGCATTGCTTTGCT
TCTTATGTTAATTTGGTACAGACCTGTGGCTGAGTTTGCTCAAAGTATTC

AGAGCAGAATTGTGGAGTGGAAAGAGAGATTGGACAAAGAGTTTAGTT
TGTCAGTGTATCAAAAAATGAAGTTTAATGTGGCTATGGGAGTTGGAGT
TTTAGATTGGCTAAGAAACAGTGATGATGATGATGATGACAGCCAGGAA
AATGCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGACTCA
GGGCATGAAACAGGCATTGATTCACAGTCTCAAGGCTCATTTTCAGGCC
CTCAGTCCTCACAGTCTGTTTCATGATCATAATCAGCCATATCACATCTGT
AGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTG
AAACA

【備考】

- ・SV40 Large-T antigen (2,479bp) より非翻訳領域 (合計 355bp) を除いた 2,124bp の塩基配列を示す。

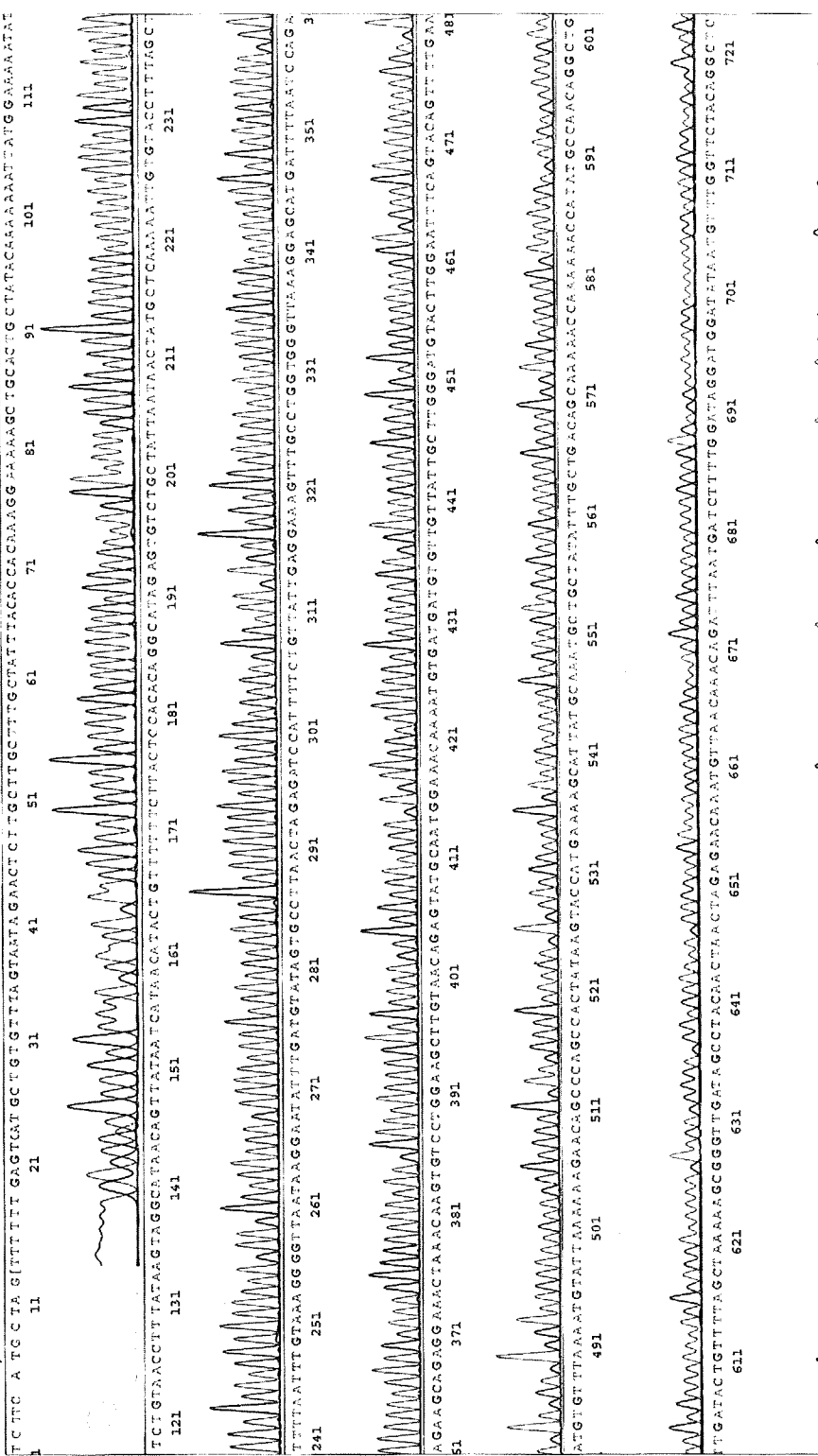
SV40 Large T antigen ORF (SYN-2245-2) のシーケンス片鎖解析





SYN2245-2-21_SYN2245P2
 SYN2245-2-21_SYN2245P2
 KB_3730_POP7_BDIV3.mob
 PIs 1881 to 15960 Pk1 Loc:1880
 Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 999
 Plate Name: 20090428N01R03

Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr 28, 2009 11:13PM, CST
 Apr 28, 2009 11:36PM, CST
 Spacing: 15.01 PIs/Panel1450



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST