(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 7 月 4 日 (04.07.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/128836 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/122309

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 20 日 (20.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711490227.9 2017年12月29日 (29.12.2017) CN

(71) 申请人: 苏州金唯智生物科技有限公司 (GENEWIZ INC., SZ) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 薛高旭(XUE, Gaoxu); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 齐甜铭(QI, Tianming); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 冯爱华(FENG, Aihua); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 谢正立(XIE, Zhengli); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 贾延凯(JIA, Yankai); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 吴昕(WU, Xin); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 孙中平(SUN, Zhongping); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。 廖国娟(LIAO, Guojuan); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司(BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** IMPROVED PROMOTER AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种改进的启动子及其应用

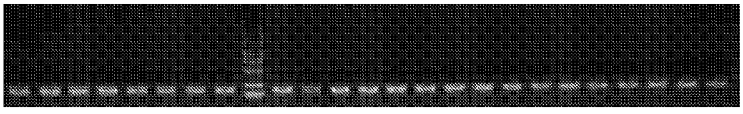


图 1

(57) **Abstract:** Disclosed are an improved promoter and the use thereof, wherein the improvement is mutating the nucleic acid sequence between the -35 region and the -10 region in the promoter region into an endonuclease recognition site. This improvement is used for overcoming the problem that transcription or translation products of an exogenous gene under a strong promoter may be toxic to the host and may thereby result in the inability to clone, and for avoiding the phenomena of false positives and false negatives during blue-white screening.

(57) 摘要: 一种改进的启动子及其应用，改进是将启动子区域中的-35区至-10区之间的核酸序列突变为核酸内切酶识别位点。该改进用于克服强启动子下外源基因的转录或翻译产物可能对宿主有毒性而导致无法克隆的问题，以及避免蓝白斑筛选时的假阳性和假阴性现象。

WO 2019/128836 A1

一种改进的启动子及其应用

技术领域

本申请属于基因工程领域，涉及一种改进的启动子及其应用，具体涉及一种改进的启动子、带有所述改进启动子的克隆载体，带有所述克隆载体的宿主细胞及其应用。

背景技术

PCR 技术的发明是分子生物学与基因工程领域的重大突破。PCR 技术诞生之后，将 PCR 产物克隆入载体(通常为质粒)的技术也获得发展。常用且相对简单的克隆方法包括 TA 克隆和平末端连接。由 Taq 酶扩增出的 PCR 产物含有 dAMP 尾巴，在 T4 连接酶的作用下，可以和含有 T 末端的载体(T 载体)连接，这就是 TA 克隆。而高保真 DNA 聚合酶通常含有 3’-5’核酸外切酶活性，它们扩增出的 PCR 产物为平末端，将这些片段与切成平末端的载体在 T4 连接酶的作用下连接就是平末端连接。这两种方法的共同特点是不需要事先用特殊的酶对 PCR 产物进行处理，而是直接连入载体，具有简单易操作的特性。

目前商业化的 T 载体和可以用于平末端克隆的载体通常是基于蓝白斑筛选的原理，蓝白斑筛选是最常用的将空载体和有插入片段的载体相分开的一种筛选方案。在这种方法中，报告基因 LacZα 作为蓝白斑筛选的标记基因，然而基于蓝白斑筛选原理的载体在克隆时有以下问题：（1）由于使用强启动子，能够大量启动外源基因的转录、翻译，导致了某些结构复杂的外源基因转录或翻译产物对宿主有毒性而无法克隆；（2）酶切载体时由于限制性内切酶残留的外切酶活性、酶切载体的反复冻融以及酶切线性化载体的长期保存等因素使得制备的载体在酶切位点缺失 1-2 碱基，导 LacZα 基因的移码突变，使得不含外源基因的克隆由于 LacZα 基因的移码突变而显白色，导致产生大量假阳性克隆；（3）在克隆外源 DNA 小片段并且外源 DNA 的插入没有改变 lacZ α 基因的读码框时会造成平板都是蓝斑的假阴性现象；（4）载体在平末端克隆大于 2kb 的外源 DNA 片段时，白斑会很少，而蓝斑却很多，而且本来就很少的白斑还可能与蓝斑长在一起，使得白斑单克隆极少，挑选足够数量的阳性克隆会很困难。此外，蓝白斑筛选还需要用到 X-gal 和 IPTG 等昂贵且有毒性的化学物质。

任何一段能够独立与转录因子结合并起始转录的 DNA 序列都可以被称为启动子。在启动子中，能够被 σ 因子识别的区域具有非常保守的序列特征。其中，在转录起始位点(+1)上游大约 10nt 以及 35nt 处的两段序列(称为-10 区与-35 区)对于σ因子的识别具有决定性的作用，因此这两段序列也被称作狭义启动子或核心启动子。除这段核心启动子区域之外，-35 区的上游序列也可能对转录的强度产生影响，这些序列被称作 UP 元件(UPelement)。

发明内容

因此，本申请要解决的技术问题在于克服现有技术中制备的克隆载体无法克隆，或产生大量假阳性或假阴性克隆，从而提供一种改进的启动子及其应用。

为达此目的，本申请采用以下技术方案：

一方面，本申请提供一种改进的启动子，所述改进的启动子为将启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为核酸内切酶识别位点而得到。

本申请中，原核生物中-35 区至-10 区之间核酸数目的变动会影响基因转录活性的高低，将启动子区域的-35 区至-10 区之间的核酸序列进行突变，从而能够被核酸内切酶识别，克隆时，先将载体制备为线性化载体，再将外源基因与线性化载体连接，使得启动子调控表达的基因活性下降，表达量下降，进而发挥功能。

所述核酸内切酶识别位点指的是能够被任意的核酸内切酶识别的位点，其对核酸内切酶不作限制，其核酸内切酶的选择主要是基于本领域技术人员实验操作的方便性，突变 1 个或几个碱基就能够突变成功即可。

根据本申请，所述改进的启动子为将 β-半乳糖苷酶的启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为核酸内切酶识别位点而得到。

本申请中，对于 β-半乳糖苷酶的启动子，将其强启动子区域-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为能够被识别的核酸内切酶识别位点，但其被剪切成线性化载体，插入外源片段后，使得 β-半乳糖苷酶强启动子由于外源 DNA 片段的插入使得活性明显下降，进而使得 lacZα 基因的表达量显著下降，进而使得含有重组质粒的菌落显白色，这样就能够克服由于采用蓝白筛选的载体存在强启动子启动外源基因的转录或翻译产物可能对宿主有毒性而导致无法克隆的问题，可以避免载体在酶切位点缺失 1-2bp 导致 lacZα 基因移码突变产生假阳性克隆的缺陷，可以消除由于外源 DNA 片段较小并且外源 DNA 的插入没有改变 lacZα 基因的读码框，造成平板都是蓝斑的假阴性现象。

根据本申请，所述 β-半乳糖苷酶的启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列如 SEQ ID NO.1-2 所示，所述 SEQ ID NO.1-2 所示的核酸序列如下：

SEQ ID NO.1：5’-TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTT-3’；

SEQ ID NO.2：5’-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3’；

本申请中，RNA 聚合酶 II 的结合部位通常在-35 区至-10 区，这两个部位都很重要: RNA 聚合酶能和-35 和-10 序列中的碱基和 DNA 主链中的磷酸基相接触；离开共同顺序较远的启动子的活性亦较弱；而申请人发现，通过突变-35 区至-10 区中的序列，尤其是 SEQ ID NO.2 所示的序列，能够插入外源基因，使得 lacZα 基因的表达量显著下降。

根据本申请，所述核酸内切酶本领域技术人员可以根据需要进行选择，可以根据突变的启动子区域的序列的不同从而选择不同的核酸内切酶识别位点，本申请选自但不限于 EcoRV、AleI、BamHI、XhoI 或 PmlI 中的任意一种或至少两种的组合。

根据本申请，所述改进的启动子的-35 区至-10 区之间的核酸序列如 SEQ ID NO.3-14 所示，所述 SEQ ID NO.3-14 所示的核酸序列如下：

SEQ ID NO.3：5’- GATATCGCTTCCGGCTCG -3’；

SEQ ID NO.4：5’- CTTGATATCTCCGGCTCG’-3’；

SEQ ID NO.5：5’- CTTTATGATATCGGCTCG-3’；

SEQ ID NO.6：5’- CTTTATGCTGATATCTCG-3’；

SEQ ID NO.7：5’- CTTTATGCTTCCGATATC-3’；

SEQ ID NO.8：5’- CTTTCACCTTCGTGCTCG-3’；

SEQ ID NO.9：5’-CTCGAGGATATCGGATCC-3’；

SEQ ID NO.10：5’-CACGTGGCTTCCGGCTCG-3’；

SEQ ID NO.11：5’-CTTCACGTGTCCGGCTCG-3’；

SEQ ID NO.12：5’-CTTTATCACGTGGGCTCG-3’；

SEQ ID NO.13：5’-CTTTATGCTCACGTGTCG-3’；

SEQ ID NO.14：5’-CTTTATGCTTCCCACGTG-3’.

第二方面，本申请提供一种载体，包括如第一方面所述的改进的启动子。

根据本申请，所述载体还包括目的基因，所述目的基因可操作地连接在所述改进的启动子的核酸内切酶识别位点之间；

本申请中，所述载体本领域技术人员可以根据需要进行选择，载体的选择不会对启动子的功能造成影响，所述载体可以是克隆载体和/或表达载体，所述克隆载体用于克隆所述目的蛋白，所述表达载体用于表达所述目的蛋白，所述启动子在克隆载体或是表达载体上都能发挥功能，优选为克隆载体，所述克隆载体例如可以选择高拷贝克隆载体 pUC57、低拷贝克隆载体 pCK 或单拷贝克隆载体，其都可以带上本申请启动子，从而进行后续试验，对载体本身并不造成影响，带上本申请启动子的载体仍然是高拷贝克隆载体、低拷贝克隆载体或单拷贝克隆载体。

第三方面，本申请提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包括如第二方面所述的载体。

根据本申请，所述宿主细胞为大肠杆菌，所述大肠杆菌仅编码 β-半乳糖苷酶 C 端 ω 片段。

本申请中，所述克隆载体的 lacZα 基因编码 β-半乳糖苷酶（lacZ）N 端 α 片段，所述大

肠杆菌仅编码β-半乳糖苷酶C端ω片段，宿主和质粒编码的片段虽都没有半乳糖苷酶活性，但它们同时存在时，α片段与ω片段可通过α-互补形成具有酶活性的β-半乳糖苷酶可以将无色化合物X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)切割成半乳糖和深蓝色的物质5-溴-4-靛蓝，5-溴-4-靛蓝可使整个菌落显蓝色。而当外源DNA插入到本申请的克隆载体的β-半乳糖苷酶启动子区域后，使得lacZα的表达量显著下降，不能有效通过α-互补形成大量具有酶活性的β-半乳糖苷酶，最终导致菌落显白色。

第四方面，本申请提供一种如第二方面所述的载体的制备方法，包括如下步骤：

（1）根据要突变的核酸内切酶识别位点设计引物，以原启动子及其调控表达的基因为模板，进行PCR扩增，获得带有改进的启动子的产物；

（2）用Gibson重组的方法将步骤（1）的产物进行环化，得到带有启动子的载体；

（3）将步骤（2）所述载体进行线性化；以及

（4）将目的基因与步骤（3）所述线性化载体连接，得到所述载体。

根据本申请，步骤（1）所述引物的核酸序列如SEQ ID NO.15-38所示。

本申请中，通过SEQ ID NO.15-16所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.3所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.17-18所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.4所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.19-20所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.5所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.21-22所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.6所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.23-24所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.7所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.25-26所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.8所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.27-28所述的核酸序列的引物对对pUC57-lacZ或pCK-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.9所示的核酸序列；

通过SEQ ID NO.29-30所述的核酸序列的引物对对pCC1-lacZ进行PCR扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2所示的核酸序列突变为SEQ ID NO.10所示的核酸序列；

通过 SEQ ID NO.31-32 所述的核酸序列的引物对对 pCC1-lacZ 进行 PCR 扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2 所示的核酸序列突变为 SEQ ID NO.11 所示的核酸序列；

通过 SEQ ID NO.33-34 所述的核酸序列的引物对对 pCC1-lacZ 进行 PCR 扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2 所示的核酸序列突变为 SEQ ID NO.12 所示的核酸序列；

通过 SEQ ID NO.35-36 所述的核酸序列的引物对对 pCC1-lacZ 进行 PCR 扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2 所示的核酸序列突变为 SEQ ID NO.13 所示的核酸序列；

通过 SEQ ID NO.37-38 所述的核酸序列的引物对对 pCC1-lacZ 进行 PCR 扩增构建得到的质粒中，SEQ ID NO.2 所示的核酸序列突变为 SEQ ID NO.14 所示的核酸序列。

根据本申请，步骤（3）所述线性化为核酸内切酶酶切和/或 PCR 扩增获得。

根据本申请，步骤（1）之前还包括将调控表达的基因进行密码子优化。

根据本申请，所述调控表达的基因为 lacZ 基因，其核酸序列如 SEQ ID NO.39 所示，所述 SEQ ID NO.39 所示的核酸序列如下：

ATGACCATGCTCGAGCCAAGCTTGCATGCAGGCCTCTGCAGTCGACGGGCCCGGGATCCGATATCTAGATGCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG；

根据本申请，所述 lacZ 基因进行密码子优化，其密码子优化后的核酸序列如 SEQ ID NO.40 所示，所述 SEQ ID NO.40 所示的核酸序列如下：

ATGACCATGCTGGAACCGAGCCTGCATGCAGGTCTGTGCAGCCGTCGTGCACGCGATCCGATTAGCCGCTGCATTCGCGAAGTGCCGAGCAGCAATAGCCTGGCCGTGGTGCTGCAGCGTCGCGATTGGGAAAATCCGGGTGTGACCCAGCTGAATCGCCTGGCAGCACATCCGCCGTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAAGCACGCACCGATCGTCCGAGCCAGCAGCTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGCTATTTTCTGCTGACCCATCTGTGCGGCATTAGCCATCGCATTTGGTGCACCCTGAGCACCATTTGCAGCGATGCCGCCTAA.

第五方面，本申请提供一种制备目的蛋白的方法，包括：

在适于所述目的蛋白表达的条件下，培养第三方面所述的宿主细胞，以便获得所述目的蛋白；其中，所述宿主细胞中的载体为表达载体，所述目的蛋白是所述目的基因编码的蛋白。

第六方面，本申请提供一种试剂盒，所述试剂盒包括第一方面所述的改进的启动子、第

二方面所述的载体或第三方面所述的宿主细胞。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

（1）本申请将启动子区域的-35 区至-10 区之间的核酸序列进行突变，从而能够被核酸内切酶识别，克隆时，先将载体制备为线性化载体，再将外源基因与线性化载体连接，使得启动子活性显著下降，其调控的基因表达量显著下降，进而发挥功能；

（2）本申请对 β-半乳糖苷酶的启动子的效果明显，将其强启动子区域-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为能够被识别的核酸内切酶识别位点，当其被酶切成线性化载体，插入外源片段后，使得 β-半乳糖苷酶强启动子由于外源 DNA 片段的插入使得活性明显下降，进而使得 lacZα 基因的表达量显著下降，进而使得含有重组质粒的菌落显白色；

（3）本申请就能够克服由于采用蓝白筛选的载体存在强启动子启动外源基因的转录或翻译产物可能对宿主有毒性而导致无法克隆的问题，可以避免载体在酶切位点缺失 1-2bp 导致 lacZα 基因移码突变产生假阳性克隆的缺陷，可以消除由于外源 DNA 片段较小并且外源 DNA 的插入没有改变 lacZα 基因的读码框，造成平板都是蓝斑的假阴性现象；

（4）本申请所述的克隆载体的构建方法简单，易操作，效率高，可以在短时间内完成所述克隆载体的构建。

附图说明

图 1 为本申请实施例 2 的菌落 PCR 鉴定的电泳图，其中，DNA marker 大小为 0.1kb、0.25kb、0.5kb、0.75kb、1kb、1.5kb、2kb、3kb、5kb；

图 2 为本申请实施例 4 的菌落 PCR 鉴定的电泳图，其中，DNA marker 大小为 0.1kb、0.25kb、0.5kb、0.75kb、1kb、1.5kb、2kb、3kb、5kb；

图 3 为本申请实施例 5 的菌落 PCR 鉴定的电泳图，其中，DNA marker 大小为 0.1kb、0.25kb、0.5kb、0.75kb、1kb、1.5kb、2kb、3kb、5kb。

具体实施方式

为更进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果，以下通过具体实施方式来进一步说明本申请的技术方案，但本申请并非局限在实施例范围内。

本申请用到了遗传工程和分子生物学领域使用的常规技术和方法，一般性参考文献提供了本领域技术人员已知的定义和方法。但是，本领域的技术人员可以在本申请所记载的技术方案的基础上，采用本领域其它常规的方法、实验方案和试剂，而不限于本申请具体实施例的限定。

实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购获得的常

规产品。

术语解释：

LacZ 基因：广泛用于基因表达调控研究中的一种基因，编码的β一半乳糖苷酶（简称β-gal)是由 4 个亚基组成的四聚体，可催化乳糖的水解．Beta-gal 比较稳定，用 X-Gal 为底物进行染色时，呈蓝色，便于检测和观察，LacZ 基因的诸多优点使它成为基因工程实验中的一个常用标记基因，比如常用于转化菌株筛选，β-半乳糖苷酶显色反应选择法，即，蓝白筛选；

LacZα 基因：编码β-半乳糖苷酶（lacZ）N 端α片段，可以通过α-互补形成具有酶活性的β-半乳糖苷酶可以将无色化合物 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)切割成半乳糖和深蓝色的物质 5-溴-4-靛蓝；

核酸内切酶：在核酸水解酶中，为可水解分子链内部磷酸二酯键生成寡核苷酸的酶；

PCR 技术：聚合酶链式反应，是利用 DNA 在体外摄氏 95°高温时变性会变成单链，低温（经常是 60°C 左右）时引物与单链按碱基互补配对的原则结合，再调温度至 DNA 聚合酶最适反应温度（72°C 左右），DNA 聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。基于聚合酶制造的 PCR 仪实际就是一个温控设备，能在变性温度，复性温度，延伸温度之间很好地进行控制。

材料：

具有卡那霉素抗性的 pUC57 质粒	苏州金唯智生物科技有限公司
pCK 质粒	苏州金唯智生物科技有限公司
具有氯霉素抗性的 pCC1™ 质粒	EPICENTRE 公司
Top10F'感受态细胞	Invitrogen 公司
EcoRⅤ、AleI、BamHI、XhoI 限制性内切酶	NEB 公司
T4 DNA 连接酶	NEB 公司
lambdaDNA	NEB 公司
Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒	NEB 公司
引物合成	苏州金唯智生物科技有限公司

实施例 1：密码子优化 lacZα 基因

密码子优化 lacZα 基因，包括如下步骤：

将 pUC57 的 lacZα 基因（SEQ ID NO.39）使用密码子优化软件（Codon optimization 软件，由苏州金唯智生物科技有限公司开发）进行密码子优化，优化的 lacZα 基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成，核苷酸序列如 SEQ ID No.39 所示，具体如下：

lacZα 基因（SEQ ID NO.39）：
ATGACCATGCTCGAGCCAAGCTTGCATGCAGGCCTCTGCAGTCGACGGGCCCGGGATCC
GATATCTAGATGCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTT
CGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA
GCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG；

优化后的 lacZα 基因（SEQ ID NO.40）：
ATGACCATGCTGGAACCGAGCCTGCATGCAGGTCTGTGCAGCCGTCGTGCACGCGATCC
GATTAGCCGCTGCATTCGCGAAGTGCCGAGCAGCAATAGCCTGGCCGTGGTGCTGCAGC
GTCGCGATTGGGAAAATCCGGGTGTGACCCAGCTGAATCGCCTGGCAGCACATCCGCCG
TTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAAGCACGCACCGATCGTCCGAGCCAGCAGCTGC
GTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGCTATTTTCTGCTGACCCATCTGTGCGGCA
TTAGCCATCGCATTTGGTGCACCCTGAGCACCATTTGCAGCGATGCCGCCTAA。

实施例 2：高拷贝克隆载体的构建

高拷贝克隆载体的构建方法，包括如下具体步骤：

I）采用实施例 1 中优化后的 lacZα 基因替换 pUC57（卡那霉素抗性）的 lacZα 基因，具体如下：

（1）以具有卡那霉素抗性的 pUC57 质粒为模板，以 SEQ ID NO.41-42 为引物进行 PCR 扩增反应，具体序列如下：

SEQ ID NO.41（正向引物）：
ATGCAGGCTCGGTTCCAGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC；

SEQ ID NO.42（反向引物）：
AGCACCATTTGCAGCGATGCCGCCTAATTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACAC；

PCR 反应体系如下表 1 所示：

表 1

模板	约 50ng，0.5μL
正向引物	10pM，0.5μL
反向引物	10pM，0.5μL
dNTP	5mM each，0.5μL
5×PCR 缓冲液	10μL

pfu DNA 聚合酶	5U/μL，0.5μL
H_2O	37.5μL

；

其中，一组以水为样本的阴性对照；

反应条件如下表 2 所示：

表 2

	反应程序	循环数
扩增程序	95℃ 4min	1
	94℃ 30s	25
	58℃ 30s	
	72℃ 2min	
	72℃ 5min	1
	4℃	1

；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物；

（3）使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒将步骤（2）所得的 PCR 纯化产物与实施例 1 获得的密码子优化后的 lacZα 基因进行连接反应，连接反应体系如下表 3 所示：

表 3

PCR 扩增产物	约 200ng，5μL
lacZα 基因	约 120ng，5μL
Gibson Assembly® Master Mix	10μL
灭菌去离子 H2O	0μL

连接反应条件为：50℃连接反 1h；

（4）将上述步骤（3）中获得的连接产物转化 Top10F’感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆并进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒，并将质粒命名为 pUC57-lacZ；

II）将 pUC57-lacZ 质粒的 β-半乳糖苷酶启动子区域的-35 区与-10 区之间的序列 5’-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3’突变为能够被核酸内切酶识别的序列，具体如下：

（1）以步骤 I）构建成功的 pUC57-lacZ 质粒为模板，以引物 F1-EcoRV、R1-EcoRV、F2-EcoRV、R2-EcoRV、F3-EcoRV、R3-EcoRV、F4-EcoRV、R4-EcoRV、F5-EcoRV、R5-EcoRV、F6-AleI、R6-AleI、F7-BamHI-XhoI、R7-BamHI-XhoI（SEQ ID NO.15-SEQ ID NO.28）为引物

进行 PCR 扩增反应，具体序列如下表 4：

表 4

编号	序列
SEQ ID NO.15(F1-EcoRV)	CCGGAAGCGATATCTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTG
SEQ ID NO.16(R1-EcoRV)	CCCCAGGCTTTACAGATATCGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
SEQ ID NO.17(F2-EcoRV)	GAGCCGGAGATATCAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
SEQ ID NO.18(R2-EcoRV)	CAGGCTTTACACTTGATATCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG
SEQ ID NO.19(F3-EcoRV)	TACGAGCCGATATCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT
SEQ ID NO.20(R3-EcoRV)	GCTTTACACTTTATGATATCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
SEQ ID NO.21(F4-EcoRV)	ACATACGAGATATCAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCT
SEQ ID NO.22(R4-EcoRV)	TTACACTTTATGCTGATATCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA
SEQ ID NO.23(F5-EcoRV)	ACAACATAGATATCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTG
SEQ ID NO.24(R5-EcoRV)	CACTTTATGCTTCCGATATCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA
SEQ ID NO.25(F6-AleI)	AACATACGAGCACGAAGGTGAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGA
SEQ ID NO.26(R6-AleI)	TACACTTTCACCTTCGTGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
SEQ ID NO.27(F7-BamHI-XhoI)	CATAGGATCCGATATCCTCGAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
SEQ ID NO.28(R7-BamHI-XhoI)	TACACTCGAGGATATCGGATCCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA

具体的 PCR 反应体系如表 1 所示，反应条件如表 2 所示；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后分别使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒进行连接反应，连接反应体系如下表 5 所示：

表 5

PCR 扩增产物	约 300ng，10μL
Gibson Assembly® Master Mix	10μL

灭菌去离子 H2O	0μL

连接反应条件：50℃连接反应 1 小时；

（3）将步骤（2）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒构建，分别命名为 pUC57-lacZ-Mu-1（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-GATATCGCTTCCGGCTCG-3'，质粒由 F1-EcoRV+R1-EcoRV 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-2（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTGATATCTCCGGCTCG-3'，质粒由 F2-EcoRV+R2-EcoRV 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-3（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGATATCGGCTCG-3'，质粒由 F3-EcoRV+R3-EcoRV 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-4（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGCTGATATCTCG-3'，质粒由 F4-EcoRV+R4-EcoRV 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-5（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGCTTCCGATATC-3'，质粒由 F5-EcoRV+R5-EcoRV 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-6（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTCACCTTCGTGCTCG-3'，质粒由 F6-AleI+R6-AleI 引物构建）、pUC57-lacZ-Mu-7（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTCGAGGATATCGGATCC-3'，质粒由 F7-BamHI-XhoI+R7-BamHI-XhoI 引物构建）。

III）载体克隆实验

（1）将步骤 II）构建正确的质粒 pUC57-lacZ-Mu-1、pUC57-lacZ-Mu-2、pUC57-lacZ-Mu-3、pUC57-lacZ-Mu-4、pUC57-lacZ-Mu-5 用 EcoRV 限制酶进行酶切，pUC57-lacZ-Mu-6 使用 AleI 限制酶进行酶切，pUC57-lacZ-Mu-7 用 BamHI 和 XhoI 限制酶进行酶切，酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化；

（2）合成反向互补的 24、48bp 引物，并退火形成双链 DNA，反向互补的 24、48bp 引物核苷酸序列如 SEQ ID NO.43-SEQ ID NO.46 所示，具体如下：

SEQ ID NO.43：TTCATACAGCAGGCTATGTTTAGG；

SEQ ID NO.44：CCTAAACATAGCCTGCTGTATGAA；

SEQ ID NO.45：TAAGCCGATACTGTATTTTTTATCCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATT；

SEQ ID NO.46：AATTTCACACAGGAAACAGCTATGGATAAAAAATACAGTATCGGCTTA；

（3）以 λ DNA 为模板，F-λDNA-200bp+R-λDNA-200bp 为引物进行 PCR 扩增，所述引物 F-λDNA-200bp、R-λDNA-200bp 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.47-SEQ ID NO.48 所示，具体如下：

SEQ ID NO.47（F-λDNA-200bp）：AATGGTCAGGATCCGTTGAATGGGCGGATGCTAATTACTATCTCCCG；

SEQ ID NO.48（R-λDNA-200bp）：TGAAGAACCTCGAGTTATGCTCTATAAAGTAGGCATAAACACCCAGC；

PCR 反应体系如表 1 所示，PCR 扩增程序如表 6 所示：

表 6

	反应程序	循环数
扩增程序	95℃ 4min	1
	94℃ 30s	25
	58℃ 30s	
	72℃ 15s	
	72℃ 3min	1
	4℃	1

（4）将步骤（3）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后使用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行酶切，酶切反应体系如下表 7 所示：

表 7

PCR 扩增产物	约 900ng，12μL
BamHI	1μL
XhoI	1μL
10×buffer	2μL
灭菌去离子 H_2O	4μL

酶切反应条件：37℃酶切 1 小时，酶切产物使用 Axygen 纯化试剂盒进行回收纯化；

（5）将步骤（2）退火形成的 24、48bp 的片段分别与步骤（1）酶切纯化的 pUC57-lacZ-Mu-1、pUC57-lacZ-Mu-2、pUC57-lacZ-Mu-3、pUC57-lacZ-Mu-4、pUC57-lacZ-Mu-5、pUC57-lacZ-Mu-6 载体进行连接反应，将步骤（4）纯化的酶切产物与步骤（1）酶切纯化的 pUC57-lacZ-Mu-7 载体进行连接反应，连接反应体系如下表 8 所示：

表 8

外源 DNA	约 90ng，3μL
酶切后的载体	约 30ng，1μL
10×缓冲液	1μL
T4 DNA 连接酶	1μL
灭菌去离子 H_2O	4μL

连接反应条件：22℃连接反应 1 小时；

（6）将上述步骤（5）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日从克隆约 200bp（pUC57-lacZ-Mu-7

载体）DNA 片段的平板上挑取 24 个白色单克隆进行菌落 PCR 鉴定，PCR 反应体系如表 9 所示：

表 9 PCR 反应体系

菌液模板	3μL
F-λDNA-200bp	10pM，0.5μL
R-λDNA-200bp	10pM，0.5μL
dNTP	5mM each，0.5μL
10×Taq buffer	5μL
Taq DNA 聚合酶	5U/μL，0.5μL
H_2O	40μL

PCR 扩增程序如下表 10 所示：

表 10

	反应程序	循环数
扩增程序	95℃ 6min	1
	94℃ 30s	25
	58℃ 30s	
	72℃ 15s	
	72℃ 3min	1
	4℃	1

PCR 鉴定结果如图 1 所示。

图 1 结果显示所有克隆均为阳性克隆，从 24 个菌检阳性的克隆中随机挑选 12 个克隆，同时，从克隆 24、48bp 外源 DNA 片段的平板上分别挑取 12 个白色单克隆分别进行 Sanger 测序，测序结果显示所有克隆的序列均正确，实验结果表明，本申请的载体可以用于克隆不小于 24bp 的外源 DNA。

实施例 3 三种突变型 pUC57-lacZ-Mu-2 质粒的构建

pUC57-lacZ-Mu-2 质粒构建的方法，包括如下步骤：

（1）以实施例 2 中构建的质粒 pUC57-lacZ-Mu-2 为模板，分别以 F1-del+R1-del、F2-del+R2-del、F3-del+R3-del 为引物进行 PCR 扩增反应，所述引物 F1-del、R1-del、F2-del、R2-del、F3-del、R3-del 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.49-SEQ ID NO.54 所示，具体如下：

SEQ ID NO.49（F1-del）：ATACGAGCCGGAGAATCAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT；

SEQ ID NO.50（R1-del）：GCTTTACACTTGATTCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG；

SEQ ID NO.51（F2-del）：TACGAGCCGGAGATTCAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG；

SEQ ID NO.52（R2-del）：GGCTTTACACTTGAATCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG；

SEQ ID NO.53（F3-del）：ATACGAGCCGGAGATCAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG；

SEQ ID NO.54（R4-del）：GGCTTTACACTTGATCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG；

PCR 反应体系如实施例 2 中表 1 所示，PCR 扩增程序如表 2 所示；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后分别使用 Gibson Assembly® Master Mix（NEB）试剂盒进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 中表 5 所示；

连接反应条件：50℃连接反应 1 小时。

（3）将步骤（2）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒，最终获得三种突变型的 pUC57-lacZ-Mu-2 质粒，分别命名为 pUC57-lacZ-Mu-2A、pUC57-lacZ-Mu-2B、pUC57-lacZ-Mu-2C；

其中，pUC57-lacZ-Mu-2A 的 EcoR Ⅴ酶切位点突变为 GATTC，即序列由 5'-CTTGATATCTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTGATTCTCCGGCTCG-3'、pUC57-lacZ-Mu-2B 的 EcoR Ⅴ酶切位点突变为 GAATC，即序列由 5'-CTTGATATCTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTGAATCTCCGGCTCG-3'、pUC57-lacZ-Mu-2C 的 EcoR Ⅴ酶切位点突变为 GATC，即序列由 5'-CTTGATATCTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTGATCTCCGGCTCG-3'；

（4）将步骤（3）正确的 pUC57-lacZ-Mu-2A、pUC57-lacZ-Mu-2B、pUC57-lacZ-Mu-2C 质粒分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日发现 3 个平板的菌落均为蓝色，每个平板分别挑取 5 个单克隆进行 Sanger 测序，测序结果显示所有克隆的序列均正确。

实验结果表明：三种突变型 pUC57-lacZ-Mu-2 质粒（pUC57-lacZ-Mu-2A、pUC57-lacZ-Mu-2B、pUC57-lacZ-Mu-2C）的 β-半乳糖苷酶启动子仍有活性，在 IPTG 的诱导条件下，能够表达 lacZα 使菌落显蓝色。同时，实验结果说明：经过 EcoRV 酶切线性化的 pUC57-lacZ-Mu-2 载体在酶切位点一端（pUC57-lacZ-Mu-2A、pUC57-lacZ-Mu-2B 质粒）或两

端（pUC57-lacZ-Mu-2C 质粒）缺失 1 个碱基的线性化载体自连后仍能够表达 lacZα 使菌落显蓝色，即本申请的载体经过核酸内切酶酶切不会因为酶切位点一端或两端缺失 1 个碱基发生自连而产生假阳性克隆。

实施例 4 低拷贝克隆载体的构建及功能验证

低拷贝克隆载体的构建方法，包括如下具体步骤：

I）采用实施例 1 中优化后的 lacZα 基因替换 pCK 质粒的 lacZα 基因，具体如下：

（1）以 pCK 质粒为模板，以 SEQ ID NO.55-56 为引物进行 PCR 扩增反应，具体序列如下：

SEQ ID NO.55（正向引物）：ATGCAGGCTCGGTTCCAGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC；

SEQ ID NO.56（反向引物）：AGCACCATTTGCAGCGATGCCGCCTAATTAAGCCAGCCCCGAGTAGCTAGACAGG；

PCR 反应体系如实施例 2 的表 1 所示，反应条件如是实施例 2 表 2 所示；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物；

（3）使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒将步骤（2）所得的 PCR 纯化产物与实施例 1 获得的密码子优化后的 lacZα 基因进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 的表 3 所示；

连接反应条件为：50℃连接反 1h；

（4）将上述步骤（3）中获得的连接产物转化 Top10F’感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆并进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒，并将质粒命名为 pCK-lacZ；

II）将 pCK-lacZ 质粒的 β-半乳糖苷酶启动子区域的-35 区与-10 区之间的序列 5’-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3’突变为能够被核酸内切酶识别的序列，具体如下：

（1）以步骤 I）构建成功的 pCK-lacZ 质粒为模板，以引物 F1-EcoRV、R1-EcoRV、F2-EcoRV、R2-EcoRV、F3-EcoRV、R3-EcoRV、F4-EcoRV、R4-EcoRV、F5-EcoRV、R5-EcoRV、F6-AleI、R6-AleI、F7-BamHI-XhoI、R7-BamHI-XhoI（SEQ ID NO.15-SEQ ID NO.28）为引物进行 PCR 扩增反应，具体序列如实施例 2 的表 4 所示，具体的 PCR 反应体系如实施例 2 的表 1 所示，反应条件如实施例 2 的表 2 所示；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩

增产物，然后分别使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 的表 5 所示；

连接反应条件：50℃连接反应 1 小时；

（3）将步骤（2）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒构建，分别命名为 pCK-lacZ-Mu-1（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3' 突变为 5'-GATATCGCTTCCGGCTCG-3'，质粒由 F1-EcoRV+R1-EcoRV 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-2（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3' 突变为 5'-CTTGATATCTCCGGCTCG-3'，质粒由 F2-EcoRV+R2-EcoRV 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-3（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3' 突变为 5'-CTTTATGATATCGGCTCG-3'，质粒由 F3-EcoRV+R3-EcoRV 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-4（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGCTGATATCTCG-3'，质粒由 F4-EcoRV+R4-EcoRV 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-5（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3' 突变为 5'-CTTTATGCTTCCGATATC-3'，质粒由 F5-EcoRV+R5-EcoRV 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-6（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTCACCTTCGTGCTCG-3'，质粒由 F6-AleI+R6-AleI 引物构建）、pCK-lacZ-Mu-7（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3' 突变为 5'-CTCGAGGATATCGGATCC-3'，质粒由 F7-BamHI-XhoI+R7-BamHI-XhoI 引物构建）。

III）载体克隆实验

（1）将步骤 II）构建正确的质粒 pCK-lacZ-Mu-1、pCK-lacZ-Mu-2、pCK-lacZ-Mu-3、pCK-lacZ-Mu-4、pCK-lacZ-Mu-5 用 EcoRV 限制酶进行酶切，pCK-lacZ-Mu-6 使用 AleI 限制酶进行酶切，pCK-lacZ-Mu-7 用 BamHI 和 XhoI 限制酶进行酶切，酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化；

（2）合成反向互补的 24、48bp 引物，并退火形成双链 DNA，反向互补的 24、48bp 引物核苷酸序列如实施例 2 的 SEQ ID NO.43-SEQ ID NO.46 所示；

（3）以 λ DNA 为模板，F-λDNA-200bp+R-λDNA-200bp 为引物进行 PCR 扩增，所述引物 F-λDNA-200bp、R-λDNA-200bp 的核苷酸序列如实施例 2 的 SEQ ID NO.47-SEQ ID NO.48 所示；

PCR 反应体系如实施例 2 的表 1 所示，PCR 扩增程序如表 6 所示；

（4）将步骤（3）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后使用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行酶切，酶切反应体系如实施例

2 表 7 所示；

酶切反应条件：37℃酶切 1 小时，酶切产物使用 Axygen 纯化试剂盒进行回收纯化；

（5）将步骤（2）退火形成的 24、48bp 的片段分别与步骤（1）酶切纯化的 pCK-lacZ-Mu-1、pCK-lacZ-Mu-2、pCK-lacZ-Mu-3、pCK-lacZ-Mu-4、pCK-lacZ-Mu-5、pCK-lacZ-Mu-6 载体进行连接反应，将步骤（4）纯化的酶切产物与步骤（1）酶切纯化的 pCK-lacZ-Mu-7 载体进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 表 8 所示；

连接反应条件：22℃连接反应 1 小时；

（6）将上述步骤（5）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的卡那霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日从克隆约 200bp（pCK-lacZ-Mu-7 载体）DNA 片段的平板上挑取 12 个白色单克隆进行菌落 PCR 鉴定，PCR 反应体系如表 9 所示；

PCR 扩增程序如表 10 所示。

图 2 结果显示所有克隆均为阳性克隆，其它平板分别挑取 12 个白色单克隆连同菌检均阳性的 12 个单克隆分别进行 Sanger 测序，测序结果显示所有克隆的序列均正确，实验结果表明，本申请的载体可以用于克隆不小于 24bp 的外源 DNA。

实施例 5 单拷贝克隆载体的构建及功能验证

单拷贝克隆载体的构建方法，包括如下具体步骤：

I）采用实施例 1 中优化后的 lacZα 基因替换 pCC1 质粒的 lacZα 基因，具体如下：

（1）以 pCC1 质粒为模板，以 SEQ ID NO.57-58 为引物进行 PCR 扩增反应，具体序列如下：

SEQ ID NO.57（正向引物）：ATGCAGGCTCGGTTCCAGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC；

SEQ ID NO.58（反向引物）：AGCACCATTTGCAGCGATGCCGCCTAATTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACAC；

PCR 反应体系如实施例 2 的表 1 所示，反应条件如下表 11 所示：

表 11

	反应程序	循环数
扩增程序	95℃ 4min	1
	94℃ 30s	25
	58℃ 30s	
	72℃ 5min	
	72℃ 8min	1

	4℃	1

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物；

（3）使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒将步骤（3）所得的 PCR 纯化产物与实施例 1 获得的密码子优化后的 lacZα 基因进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 的表 12 所示：

表 12

PCR 扩增产物	约 387ng，9μL
lacZα 基因	约 100ng，1μL
Gibson Assembly® Master Mix	10μL
灭菌去离子 H2O	0μL

连接反应条件为：50℃连接反 1h；

（4）将上述步骤（3）中获得的连接产物转化 Top10F’感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的氯霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆并进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒，并将质粒命名为 pCC1-lacZ；

II）将 pCC1-lacZ 质粒的 β-半乳糖苷酶启动子区域的-35 区与-10 区之间的序列 5’-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3’突变为能够被核酸内切酶识别的序列，具体如下：

（1）以步骤 I）构建成功的 pCC1-lacZ 质粒为模板，以引物 pCC1-lacZ 质粒为模板，以引物 F1-PmlI+R1-PmlI 、 F2-PmlI+R2-PmlI 、 F3-PmlI+R3-PmlI 、 F4-PmlI+R4-PmlI 、 F5-PmlI+R5-PmlI、F7-BamHI-XhoI+R7-BamHI-XhoI（SEQ ID NO.29- SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.27-SEQ ID NO.28）为引物进行 PCR 扩增反应，具体序列如表 13 所示：

表 13

编号	序列
SEQ ID NO.29(F1-PmlI)	CCGGAAGCCACGTGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTG
SEQ ID NO.30(R1-PmlI)	CCCCAGGCTTTACACACGTGGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
SEQ ID NO.31(F2-PmlI)	GAGCCGGACACGTGAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
SEQ ID NO.32(R2-PmlI)	CAGGCTTTACACTTCACGTGTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG
SEQ ID NO.33(F3-PmlI)	TACGAGCCCACGTGATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT
SEQ ID NO.34(R3-PmlI)	GCTTTACACTTTATCACGTGGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
SEQ ID	ACATACGACACGTGAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCT

NO.35(F4-PmlI)	
SEQ ID NO.36(R4-PmlI)	TTACACTTTATGCTCACGTGTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA
SEQ ID NO.37(F5-PmlI)	ACAACATACACGTGGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTG
SEQ ID NO.38(R5-PmlI)	CACTTTATGCTTCCCACGTGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA
SEQ ID NO.27(F7-BamHI-XhoI)	CATAGGATCCGATATCCTCGAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
SEQ ID NO.28(R7-BamHI-XhoI)	TACACTCGAGGATATCGGATCCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA

具体的 PCR 反应体系如实施例 2 的表 1 所示，反应条件如表 11 所示；

（2）将步骤（1）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后分别使用 Gibson Assembly® Master Mix 试剂盒进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 的表 14 所示：

表 14

PCR 扩增产物	约 490ng，10μL
Gibson Assembly® Master Mix	10μL
灭菌去离子 H2O	0μL

连接反应条件：50℃连接反应 1 小时；

（3）将步骤（2）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的氯霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日挑取蓝色单克隆进行 Sanger 测序，保留测序正确的质粒构建，分别命名为 pCC1-lacZ-Mu-1（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CACGTGGCTTCCGGCTCG-3'，质粒由 F1-PmlI+R1-PmlI 引物构建）、pCC1-lacZ-Mu-2（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTCACGTGTCCGGCTCG-3'，质粒由 F2-PmlI+R2-PmlI 引物构建）、pCC1-lacZ-Mu-3（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATCACGTGGGCTCG-3'，质粒由 F3-PmlI+R3-PmlI 引物构建）、pCC1-lacZ-Mu-4（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGCTCACGTGTCG-3'，质粒由 F4-PmlI+R4-PmlI 引物构建）、pCC1-lacZ-Mu-5（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTTTATGCTTCCCACGTG-3'，质粒由 F5-PmlI+R5-PmlI 引物构建）、pCC1-lacZ-Mu-6（将 5'-CTTTATGCTTCCGGCTCG-3'突变为 5'-CTCGAGGATATCGGATCC-3'，质粒由 F7-BamHI-XhoI+R7-BamHI-XhoI 引物构建）。

III）载体克隆实验

（1）将步骤 II）构建正确的质粒 pCC1-lacZ-Mu-1、pCC1-lacZ-Mu-2、pCC1-lacZ-Mu-3、pCC1-lacZ-Mu-4、pCC1-lacZ-Mu-5 用 PmlI 限制酶进行酶切，pCC1-lacZ-Mu-6 使用 BamHI 和 XhoI 限制酶进行酶切，酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化；

（2）合成反向互补的 24、48bp 引物，并退火形成双链 DNA，反向互补的 24、48bp 引物核苷酸序列如实施例 2 的 SEQ ID NO.43-SEQ ID NO.46 所示；

（3）以 λ DNA 为模板，F-λDNA-200bp+R-λDNA-200bp 为引物进行 PCR 扩增，所述引物 F-λDNA-200bp、R-λDNA-200bp 的核苷酸序列如实施例 2 的 SEQ ID NO.47-SEQ ID NO.48 所示；

PCR 反应体系如表 1 所示，PCR 扩增程序如表 6 所示；

（4）将步骤（3）获得的 PCR 反应液经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化得到 PCR 扩增产物，然后使用 BamHI 和 XhoI 对纯化的 PCR 扩增产物进行酶切，酶切反应体系如实施例 2 表 7 所示；

酶切反应条件：37℃酶切 1 小时，酶切产物使用 Axygen 纯化试剂盒进行回收纯化；

（5）将步骤（2）退火形成的 24、48bp 的片段分别与步骤（1）酶切纯化的 pCC1-lacZ-Mu-1、pCC1-lacZ-Mu-2、pCC1-lacZ-Mu-3、pCC1-lacZ-Mu-4、pCC1-lacZ-Mu-5 载体进行连接反应，将步骤（4）纯化的酶切产物与步骤（1）酶切纯化的 pCC1-lacZ-Mu-6 载体进行连接反应，连接反应体系如实施例 2 表 7 所示；

连接反应条件：22℃连接反应 1 小时；

（6）将上述步骤（5）中获得的连接产物分别转化 Top10F'感受态细胞，最终涂布含 IPTG 及 X-gal 的氯霉素抗性的 LB 平板并 37℃培养过夜，次日从克隆约 200bp（pCC1-lacZ-Mu-6 载体）DNA 片段的平板上挑取 24 个白色单克隆进行菌落 PCR 鉴定，PCR 反应体系如表 9 所示；

PCR 扩增程序如表 10 所示，结果如图 3 所示。

图 3 电泳结果显示所有克隆均为阳性克隆，从 24 个菌检阳性的克隆中随机挑选 12 个克隆，同时，从克隆 24、48bp 外源 DNA 片段的平板上分别挑取 12 个白色单克隆分别进行 Sanger 测序，测序结果显示所有克隆的序列均正确，实验结果表明，本申请的载体可以用于克隆不小于 24bp 的外源 DNA。

综上所述，本申请通过对 β-半乳糖苷酶强启动子区域的-35 区与-10 区之间的序列进行突变形成能够被核酸内切酶识别酶切的位点，当克隆时，先用合适的核酸内切酶将载体酶切或 PCR 的方法制备线性化载体，然后将外源基因与线性化载体连接，使得 β-半乳糖苷酶强启动

子由于外源 DNA 片段的插入使得活性明显下降，进而使得 lacZα 基因的表达量显著下降，进而使得含有重组质粒的菌落显白色；本申请通过上述方法克服了常见的由于采用蓝白筛选的载体存在强启动子启动外源基因的转录或翻译产物可能对宿主有毒性而导致无法克隆的问题，而且可以避免载体在酶切位点缺失 1-2bp 导致 lacZα 基因移码突变产生假阳性克隆的缺陷，并且可以消除由于外源 DNA 片段较小并且外源 DNA 的插入没有改变 lacZα 基因的读码框，造成平板都是蓝斑的假阴性现象。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法，但本申请并不局限于上述详细方法，即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种改进的启动子，其为将启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为核酸内切酶识别位点而得到。

2、根据权利要求 1 所述的改进的启动子，其中，所述改进的启动子为将 β-半乳糖苷酶的启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列突变为核酸内切酶识别位点而得到。

3、根据权利要求 2 所述的改进的启动子，其中，所述 β-半乳糖苷酶的启动子区域中的-35 区至-10 区之间的核酸序列如 SEQ ID NO.1-2 所示。

4、根据权利要求 2 所述的改进的启动子，其中，所述核酸内切酶为 EcoRV、AleI、BamHI、XhoI 或 PmlI 中的任意一种或至少两种的组合。

5、根据权利要求 2 所述的改进的启动子，其中，所述改进的启动子的-35 区至-10 区之间的核酸序列如 SEQ ID NO.3-14 所示。

6、一种载体，其包括如权利要求 1-5 中任一项所述的改进的启动子。

7、根据权利要求 6 所述的载体，其中，所述载体还包括目的基因，所述目的基因可操作地连接在所述改进的启动子的核酸内切酶识别位点之间。

8、根据权利要求 7 所述的载体，其中，所述载体为克隆载体和/或表达载体，优选为克隆载体。

9、一种宿主细胞，其包括如权利要求 6-8 中任一项所述的载体。

10、根据权利要求 9 所述的宿主细胞，其中，所述宿主细胞为大肠杆菌。

11、根据权利要求 10 所述的宿主细胞，其中，所述大肠杆菌仅编码 β-半乳糖苷酶 C 端 ω 片段。

12、一种如权利要求 6-8 中任一项所述的载体的制备方法，其包括如下步骤：

（1）根据要突变的核酸内切酶识别位点设计引物，以原启动子及其调控表达的基因为模板，进行 PCR 扩增，获得带有改进的启动子的产物；

（2）用 Gibson 重组的方法将步骤（1）的产物进行环化，得到带有启动子的载体；

（3）将步骤（2）所述载体进行线性化；以及

（4）将目的基因与步骤（3）所述线性化载体连接，得到所述载体。

13、根据权利要求 12 所述的制备方法，其中，步骤（1）所述引物的核酸序列如 SEQ ID NO.15-38 所示；

优选地，步骤（3）所述线性化为核酸内切酶酶切和/或 PCR 扩增获得；

优选地，步骤（1）之前还包括将调控表达的基因进行密码子优化；

优选地，所述调控表达的基因为 lacZ 基因，其核酸序列如 SEQ ID NO.39 所示；

优选地，所述 lacZ 基因进行密码子优化，其密码子优化后的核酸序列如 SEQ ID NO.40 所示。

14、一种制备目的蛋白的方法，其包括：

在适于所述目的蛋白表达的条件下，培养权利要求 9-11 中任一项所述的宿主细胞，以便获得所述目的蛋白；

其中，所述宿主细胞中的载体为表达载体，所述目的蛋白是所述目的基因编码的蛋白。

15、一种试剂盒，其包括权利要求 1-5 中任一项所述的改进的启动子、权利要求 6-8 中任一项所述的载体或权利要求 9-11 中任一项所述的宿主细胞。

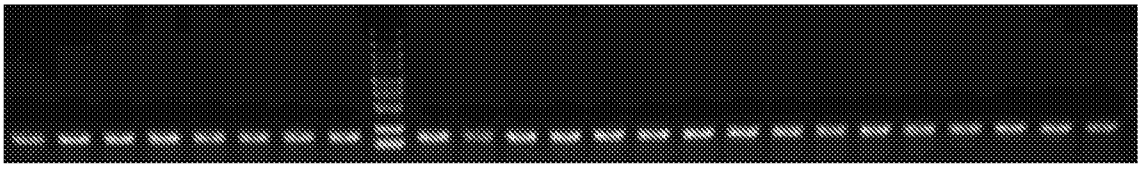


图 1

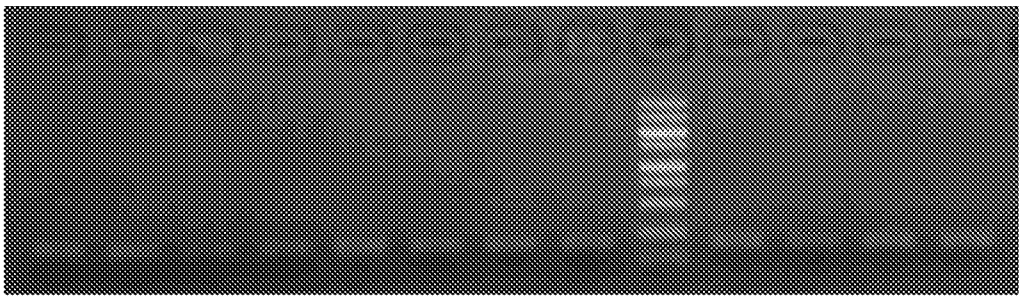


图 2

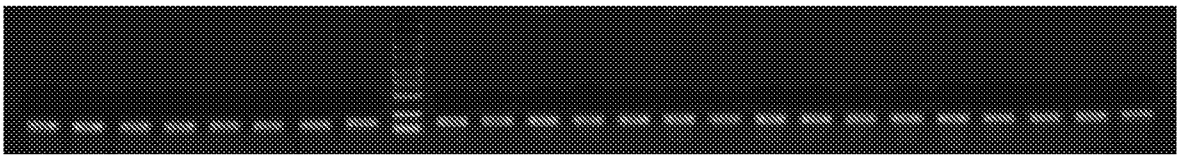


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/122309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE: 启动子, 改造, 突变, 内切酶, 半乳糖苷酶, -10, -35, promot?r, muta+, lacZ, restriction enzyme; GENBANK +EMBL+中国专利生物序列检索系统, GENBANK+EMBL+NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: search for SEQ ID NOs. 1-14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108165551 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 15 June 2018 (2018-06-15) see claims 1-10	1-15
PX	CN 108060168 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 22 May 2018 (2018-05-22) see claims 1-10	1-15
PX	CN 108118058 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 05 June 2018 (2018-06-05) see claims 1-10	1-15
PX	CN 108118059 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 05 June 2018 (2018-06-05) see claims 1-10	1-15
PX	CN 108130338 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 08 June 2018 (2018-06-08) see claims 1-10	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 March 2019	**22 March 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/122309

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108588102 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 28 September 2018 (2018-09-28) see claims 1-10	1-15
A	CN 104513830 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 April 2015 (2015-04-15) see entire document	1-15
A	CN 107058316 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 18 August 2017 (2017-08-18) see entire document	1-15
A	CN 1425071 A (GENENCOR INTERNATIONAL, INC.) 18 June 2003 (2003-06-18) see entire document	1-15
A	CN 105907632 A (NANJING JUSHA DISPLAY TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 August 2016 (2016-08-31) see entire document	1-15
A	WO 0022112 A1 (UNIV. GEORGIA RES. FOUND. ET AL.) 20 April 2000 (2000-04-20) see entire document	1-15
A	HU, Feishu et al. "Associations between Hepatitis B Virus Basal Core Promoter/Pre-Core Region Mutations and the Risk of Acute-on-Chronic Liver Failure: a Meta-Analysis" *Virology Journal*, Vol. 12, No. (87), 31 December 2015 (2015-12-31), ISSN: 1743-422X, pages 1-13, see entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/122309

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 108165551 A	15 June 2018	None	
CN 108060168 A	22 May 2018	None	
CN 108118058 A	05 June 2018	None	
CN 108118059 A	05 June 2018	None	
CN 108130338 A	08 June 2018	None	
CN 108588102 A	28 September 2018	None	
CN 104513830 A	15 April 2015	CN 104513830 B	11 August 2017
CN 107058316 A	18 August 2017	None	
CN 1425071 A	18 June 2003	KR 20020073497 A	26 September 2002
		JP 4870306 B2	08 February 2012
		EP 1244794 A1	02 October 2002
		AT 374822 T	15 October 2007
		DE 60036641 T2	03 July 2008
		US 6509185 B1	21 January 2003
		DK 1244794 T3	28 January 2008
		DE 60036641 D1	15 November 2007
		MX PA02006614 A	10 September 2004
		CN 1313615 C	02 May 2007
		CN 101054588 A	17 October 2007
		EP 1244794 B1	03 October 2007
		CA 2396250 C	24 February 2009
		US 6911322 B2	28 June 2005
		AU 2739001 A	24 July 2001
		CA 2396250 A1	19 July 2001
		WO 0151643 A1	19 July 2001
		US 2003148461 A1	07 August 2003
		JP 2003519492 A	24 June 2003
CN 105907632 A	31 August 2016	CN 105907632 B	12 January 2018
		WO 2017185738 A1	02 November 2017
WO 0022112 A1	20 April 2000	CA 2346122 A1	20 April 2000
		EP 1121425 A1	08 August 2001
		MX PA01003770 A	06 May 2002
		US 6818611 B1	16 November 2004
		DE 69926009 D1	04 August 2005
		AT 298796 T	15 July 2005
		AU 773428 B2	27 May 2004
		EP 1121425 B1	29 June 2005
		AU 6427099 A	01 May 2000
		US 2004235091 A1	25 November 2004
		BR 9914519 A	03 July 2001
		CA 2346122 C	22 January 2013
		WO 0022112 A9	24 August 2000
		US 7122516 B2	17 October 2006
		JP 2002534059 A	15 October 2002

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/122309

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i；C12N 15/70(2006.01)i；C12N 1/21(2006.01)i；C12P 21/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N，C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS，TWABS，HKABS，MOABS，DWPI，SIPOABS，CNTXT，TWTXT，WOTXT，USTXT，EPTXT，JPTXT，CNKI，WEB OF SCIENCE：启动子，改造，突变，内切酶，半乳糖苷酶，-10，-35，promot?r，muta+，lacZ，restriction enzyme；GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统：对SEQ ID NOs.1-14的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 108165551 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 6月 15日 (2018-06-15) 参见权利要求1-10	1-15
PX	CN 108060168 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 5月 22日 (2018-05-22) 参见权利要求1-10	1-15
PX	CN 108118058 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 6月 5日 (2018-06-05) 参见权利要求1-10	1-15
PX	CN 108118059 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 6月 5日 (2018-06-05) 参见权利要求1-10	1-15
PX	CN 108130338 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 6月 8日 (2018-06-08) 参见权利要求1-10	1-15
PX	CN 108588102 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2018年 9月 28日 (2018-09-28) 参见权利要求1-10	1-15
A	CN 104513830 A (华东理工大学) 2015年 4月 15日 (2015-04-15) 参见全文	1-15

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 3月 4日	2019年 3月 22日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 邢云龙 电话号码 62411094

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/122309

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107058316 A (江南大学) 2017年 8月 18日 (2017-08-18) 参见全文	1-15
A	CN 1425071 A (金克克国际有限公司) 2003年 6月 18日 (2003-06-18) 参见全文	1-15
A	CN 105907632 A (南京巨鲨显示科技有限公司) 2016年 8月 31日 (2016-08-31) 参见全文	1-15
A	WO 0022112 A1 (UNIV GEORGIA RES FOUND等) 2000年 4月 20日 (2000-04-20) 参见全文	1-15
A	Feishu Hu等. "Associations between hepatitis B virus basal core promoter/pre-core region mutations and the risk of acute-on-chronic liver failure: a meta-analysis" Virology Journal, 第12卷, 第87期, 2015年 12月 31日 (2015-12-31), ISSN: 1743-422X, 第1-13页, 参见全文	1-15

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/122309

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108165551	A	2018年 6月 15日	无			
CN	108060168	A	2018年 5月 22日	无			
CN	108118058	A	2018年 6月 5日	无			
CN	108118059	A	2018年 6月 5日	无			
CN	108130338	A	2018年 6月 8日	无			
CN	108588102	A	2018年 9月 28日	无			
CN	104513830	A	2015年 4月 15日	CN	104513830	B	2017年 8月 11日
CN	107058316	A	2017年 8月 18日	无			
CN	1425071	A	2003年 6月 18日	KR	20020073497	A	2002年 9月 26日
				JP	4870306	B2	2012年 2月 8日
				EP	1244794	A1	2002年 10月 2日
				AT	374822	T	2007年 10月 15日
				DE	60036641	T2	2008年 7月 3日
				US	6509185	B1	2003年 1月 21日
				DK	1244794	T3	2008年 1月 28日
				DE	60036641	D1	2007年 11月 15日
				MX	PA02006614	A	2004年 9月 10日
				CN	1313615	C	2007年 5月 2日
				CN	101054588	A	2007年 10月 17日
				EP	1244794	B1	2007年 10月 3日
				CA	2396250	C	2009年 2月 24日
				US	6911322	B2	2005年 6月 28日
				AU	2739001	A	2001年 7月 24日
				CA	2396250	A1	2001年 7月 19日
				WO	0151643	A1	2001年 7月 19日
				US	2003148461	A1	2003年 8月 7日
				JP	2003519492	A	2003年 6月 24日
CN	105907632	A	2016年 8月 31日	CN	105907632	B	2018年 1月 12日
				WO	2017185738	A1	2017年 11月 2日
WO	0022112	A1	2000年 4月 20日	CA	2346122	A1	2000年 4月 20日
				EP	1121425	A1	2001年 8月 8日
				MX	PA01003770	A	2002年 5月 6日
				US	6818611	B1	2004年 11月 16日
				DE	69926009	D1	2005年 8月 4日
				AT	298796	T	2005年 7月 15日
				AU	773428	B2	2004年 5月 27日
				EP	1121425	B1	2005年 6月 29日
				AU	6427099	A	2000年 5月 1日
				US	2004235091	A1	2004年 11月 25日
				BR	9914519	A	2001年 7月 3日
				CA	2346122	C	2013年 1月 22日
				WO	0022112	A9	2000年 8月 24日
				US	7122516	B2	2006年 10月 17日
				JP	2002534059	A	2002年 10月 15日