



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103642829 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201310675252. X

(22) 申请日 2013. 12. 13

(73) 专利权人 北京全式金生物技术有限公司

地址 100192 北京市海淀区西小口路 66 号
中关村东升科技园 B-3 楼 4 层

(72) 发明人 辛文 耿亮

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 02/16594 A2, 2002. 02. 28, 全文.

CN 101659974 A, 2010. 03. 03, 全文.

CN 102206634 A, 2011. 10. 05, 全文.

Invitrogen. 定向 Topo® 克隆技术. 《www.
invitrogen.com》. 1997, 全文.

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书5页

序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

一种高效率基因定向克隆的方法

(57) 摘要

本发明公开一种高效率基因定向克隆的方法。该方法利用 Topoisomerase I 室温下 5 分钟快速连接以及体外环化原理实现高效率定向克隆的方法。该方法包括：带有 Topoisomerase I 酶识别位点以及定向序列的载体、定向引物的设计、PCR 片段的制备、以及构建目标基因的重组载体。由于所用载体带有原核表达载体的所有调控元件，因此，PCR 产物可以连接该载体，经 PCR 鉴定后无需确定目的基因的连接方向，即可直接用于原核表达。

1. 一种高效率基因定向克隆的方法,该方法包括以下步骤:

(1)载体准备:所述载体是一端为偶联拓扑异构酶I的平末端,另一端为由6个碱基组成的突出端的定向克隆或表达载体;

(2)引物设计

一条引物为常规引物,另一条引物为定向引物,其中,所述常规引物为无额外碱基和无磷酸化的与插入片段DNA互补的引物,所述定向引物的5'端依次为与步骤(1)中载体上突出端的6个碱基互补配对的碱基序列和拓扑异构酶I识别位点的互补序列“AAGGG”,且磷酸化;

(3)PCR扩增,获得插入片段DNA

使用步骤(2)的引物对模板DNA进行PCR扩增;

(4)反应

将载体,插入片段DNA,拓扑异构酶I混合,室温5分钟,获得环化产物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述拓扑异构酶I识别位点为“CCCTT”。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,该方法还包括:将步骤(4)获得的环化后产物转入大肠杆菌感受态细胞,过夜培养,然后鉴定阳性重组子。

一种高效率基因定向克隆的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域一种高效率的基因定向克隆的方法。

背景技术

[0002] 基因克隆技术是分子生物学中一项重要技术,国内外专家学者探索了很多不同的克隆方法,有非定向克隆和定向克隆,并且相应的建立了多种载体。由于非定向克隆的方法虽然操作简便,能够得到较高的克隆数,但是后续的鉴定工作比较复杂,目前较为常用的定向克隆包括2种方法:

[0003] (1)传统的T4DNA连接酶连接法

[0004] 限制性酶切载体以及片段产生互补配对的粘性末端,在T4DNA连接酶作用下形成重组分子。其原理是:在目的基因片段的两端分别设计两个酶切位点(与载体上的酶切位点相同,确保片段插入方向正确),后利用特定的限制性内切酶,分别对载体及PCR产物的片段进行双酶切后用T4DNA连接酶进行连接。该方法的缺点是:1、载体和片段包含酶切位点。目的基因片段需要根据载体的酶切位点进行比对和序列分析,确保序列内部无选定的酶切位点,设计引物,给片段的两端分别加上酶切位点和保护碱基,再次PCR后,得到带有酶切位点的基因片段序列。2、酶切后,需要对PCR产物进行纯化,该过程可采用柱式法或割胶法,耗时较长,且在一定程度上可能损伤DNA片段,或导致突变。3、T4DNA连接酶作用时间较长,一般需要再特定反应温度下,需要反应过夜或多个小时才能完成片段的连接。4、T4DNA连接酶与片段和载体的三分子碰撞连接,其三分子同时碰撞的几率与成功性都较低。

[0005] (2)DNA拓扑异构酶法

[0006] 1990年,美国科学家Shuman S.发现牛痘病毒DNA拓扑异构酶I,1991年他证明该酶特异性地识别CCCTT,而且在2分钟之内可以完成80%的连接反应,从而为应用牛痘病毒DNA拓扑异构酶I进行快速分子克隆提供了理论基础(Sekiguchi J,Cheng C,Shuman S Kinetic analysis of DNA and RNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase.J Biol Chem.1997Jun20;272(25):15721-8)。

[0007] 1999年,Shuman S.证明DNA和DNA拓扑异构酶I共价偶联的效率在室温5分钟可以达到93%(Cheng C,Shuman S.Site-specific DNA transesterification by vaccinia topoisomerase:role of specific phosphates and nucleosides.Biochemistry.1999Dec 14;38(50):16599-612)。由于Topoisomerase的突出性能,它已被成功应用于TA克隆和定向克隆。

[0008] 以Invitrogen公司利用Topoisomerase I实现定向克隆为例,其设计原理为载体一端为4个碱基突出端,另一端为平末端,当平端插入片段与载体连接时,平端片段5'-OH攻击突出端,实现连接。这种方法虽然能实现定向克隆,但克隆效率低(www.invitrogen.com)。另外,Cheng C,2000年报道,利用拓扑异构酶I引发的内源双链DNA断裂损伤修复途径——重组侧翼连接途径实现定向克隆(Cheng C,Shuman S.Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase

IB-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol. 2000 Nov; 20(21):8059-68)。在这一途径中,牛痘病毒拓扑异构酶共价结合于DNA平末端,并催化其同具有5'缩进和3'突出尾部的DNA双链的共价连接。该方法的缺点是用“flap”随机攻击DNA双链,因而克隆效率低。

发明内容

[0009] 鉴于上述现有技术的不足,本发明要解决的技术问题是提供一种利用 Topoisomerase I 室温下5分钟快速连接以及体外环化原理实现高效率定向克隆的方法。该方法优点:通过特定引物设计,与特定的载体连接,5分钟可以完成定向克隆,克隆效率达100%,而且不受克隆基因序列的限制。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采取的技术方案是:

[0011] 本发明提供一种高效率基因定向克隆的方法,该方法包括以下步骤:

[0012] 1. 载体准备:所述载体一端为偶联拓扑异构酶I的平末端,另一端为包含6个碱基的突出端的定向克隆或表达载体;

[0013] 2. 引物设计

[0014] 一条引物为非定向引物,另一条引物为定向引物,其中,所述常规引物为无额外碱基和无磷酸化的与插入片段DNA互补的引物,所述定向引物的5'端依次为与步骤(1)中载体上突出端的6个碱基互补配对的碱基序列和拓扑异构酶I识别位点的互补序列“AAGGG”,且磷酸化;

[0015] (3)PCR扩增,获得插入片段DNA

[0016] 使用步骤(2)的引物对模板DNA进行PCR扩增;

[0017] (4)反应

[0018] 将载体,插入片段DNA,拓扑异构酶I混合,室温5分钟,获得环化产物。

[0019] 在此步骤中,三个反应同时发生,(1)不包含额外序列,无磷酸基的插入片段一端与偶联Topoisomerase I的载体的一端连接,包含额外碱基以及磷酸基的插入片段一端,由于其磷酸基的存在,无法和偶联了Topoisomerase I载体的一端发生连接;(2)Topoisomerase I识别插入片段Topoisomerase I位点,发生切割反应产生6个碱基的粘性末端。(3)自我环化,6个碱基的粘性末端和载体的粘性末端互补配对,发生环化。如图2所示。

[0020] 进一步地,步骤(1)中,载体的全长序列如序列表SEQ ID NO.1所示。

[0021] 进一步地,所述拓扑异构酶I识别位点为“CCCTT”。进一步地,上述方法还包括:将步骤(4)获得的环化后产物转入大肠杆菌感受态细胞,过夜培养,然后鉴定阳性重组子。

[0022] 鉴定阳性重组子的方法包括:

[0023] (1)PCR方法鉴定阳性重组子

[0024] 挑选克隆置于10 μ l无菌水中,涡旋混合,取1 μ l混合液于25 μ l反应体系,用定向引物和非定向引物鉴定重组子。

[0025] PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性10分钟(裂解细胞,失活核酸酶),94 $^{\circ}$ C变性30秒,55 $^{\circ}$ C退火30秒,72 $^{\circ}$ C延伸(根据片段的大小确定延伸时间)30个循环,72 $^{\circ}$ C后延伸10分钟。

[0026] (2)限制性酶切分析阳性重组子

[0027] 挑选阳性重组子,过夜培养。用试剂盒小量提取质粒,选择适宜的限制性内切酶,

酶切鉴定重组子。

[0028] (3)测序:用定向引物和非定向引物测序,确定序列的正确性。本发明构建的载体及所提供的定向克隆技术能广泛用于PCR产物的直接定向克隆及表达,具有很高的应用价值,其优势在于:1、PCR产物无需酶切、纯化,以简单快捷的方法实现5分钟快速定向克隆。2、若该方法应用于表达载体上,如本实施例中(*pEASY[®]-D1* cloning Vector),定向克隆PCR产物于的T7lac启动子高效表达的载体中直接进行表达,操作简化,重组载体经鉴定后即可立即进行蛋白表达的等工作。3、经该方法得到的重组载体,测序的成功率提高很多,能保证100%准确。

附图说明

[0029] 图1:载体 *pEASY[®]-D1* cloning Vector的图谱

[0030] 图2:使用本发明方法实现高效率定向克隆示意图;

[0031] 图3:实施例1中的PCR鉴定阳性克隆。分别插入3个目的片段1kb,2kb,3kb的PCR鉴定结果。其中:泳道M:Trans2K Plus II DNAMarker,泳道1-20:插入基因片段

具体实施方式

[0032] 本发明提供一种定向克隆方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。实施例中所用的材料及来源分别为:载体 *pEASY[®]-D1* cloning Vector(北京全式金生物技术有限公司)、引物合成(北京英俊生物技术有限公司),Topoisomerase I(北京全式金生物技术有限公司),T4polynucleotide kinase、10× NEB DNA Ligase Buffer(New England Biolabs),*TransStart[®]* FastPfu DNA Polymerase(北京全式金生物技术有限公司),(Trans1-T1 chemically competent cell(北京全式金生物技术有限公司),*EasyPure[®]* Genomic DNA Kit(北京全式金生物技术有限公司),*Trans2K[®]*Plus II DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司)

[0033] 实施例1:

[0034] 用*TransStart[®]* FastPfu DNA Polymerase扩增3个不同长度的片段,分别进行定向克隆后,用PCR的方法验证定向克隆效果。

[0035] 1.目的基因引物设计与合成

[0036] 以人基因组DNA核酸序列为模板,选取三段目的基因,基因片段大小分别为以1kb、2kb、3kb。用primer5.0软件分别设计三对引物,将定向引物磷酸化后再进行PCR反应。引物见表1。

[0037] 表1 PCR扩增所用引物、DNA片段大小

[0038]

片段名称 与大小	引物名称	引物序列 (5' -3')	序列表
F1 (1 kb)	定向引物	P- <u>GCGCTCAAGGG</u> CCGTGAGACAGT GGCTTGTCGGTA	SEQ ID NO.2

[0039]

	非定向引物	GTCCACTGGACAGCAGTAAGGACT	SEQ ID NO.3
F2 (2 kb)	定向引物	P- <u>GCGCTCAAGGG</u> GGTTCCTACAGA CACGCTGGCCGA	SEQ ID NO.4
	非定向引物	TCTGTCACCTCACAAAACAGTAC	SEQ ID NO.5
F3 (3 kb)	定向引物	P- <u>GCGCTCAAGGG</u> TGTAAGCCGCCC CGATTTAATG	SEQ ID NO.6
	非定向引物	GATGCTGAGGAGATGGAGGTGCAG	SEQ ID NO.7

[0040] 定向引物磷酸化

定向引物 1 μ gT4 polynucleotide kinase 1 μ l

[0041]

10 $\times$ NEB DNA Ligase Buffer 1 μ lddH₂O to 20 μ l[0042] 37°C 1小时。取1 μ l用于PCR(50 μ l反应体系)

[0043] 2. PCR制备插入目的基因片段

人基因组 DNA 模板 (50 ng/ μ l) 1 μ l10 $\times$ TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase Buffer 5 μ lTransStart[®] FastPfu DNA Polymerase (2.5 u/ μ l) 0.5 μ l2.5 mM dNTPs 4 μ l

[0044]

基因正向引物 (10 μ M) 1 μ l基因反向引物 (10 μ M) 1 μ lddH₂O 37.5 μ l总体积 50 μ l

[0045] PCR反应程序为:94°C预变性2分钟;94°C30秒,55°C30秒,2kb/分钟于72°C延伸,共

30个循环;72℃10分钟;PCR结束后,取5μl于1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

[0046] 3、连接体系:5μl

[0047] pEASY-D1 (10 ng/μl) 1 μl

Insert 1 μl

[0048] Topoisomerase I (10 ng/μl) 1 μl

ddH₂O 补至 5 μl

[0049] 轻轻混匀,室温25℃,放置5分钟。

[0050] 4、转化

[0051] 将连接产物

[0052] 分别转入大肠杆菌感受态细胞(Trans1-T1 chemically competent cell)中,过夜培养。

[0053] 5、PCR鉴定插入片段

[0054] 挑取平板中白色克隆各挑去20个于10ul无菌水中,涡旋震荡。取1μl作为模板,进行后续的菌落PCR鉴定。

[0055] PCR反应体系

模板 1 μl

2×EasyTaq SuperMix 12.5 μl

[0056] T7 promoter primer (10 μM) 0.5 μl

T7 terminator primer (10μM) 0.5 μl

dd H₂O to 25 μl

[0057] PCR反应程序94℃10分钟,94℃30秒,55℃30秒,72℃X秒(取决于片段长度)。72℃5分钟。

序列表

<110> 北京全式金生物技术有限公司
 <120> 一种高效率基因定向克隆的方法
 <130>
 <160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 5722
 <212> DNA
 <213> pEASY-D1 载体序列

<400> 1
 [0001] gttcctctac cgcgggttgt cagggggcgc gtgccccgga cggtggtatg ggtgcggcctt 60
 tgttcgcgag tactcgggct tcaccgctcg ggctagaagg gtagccact acagccgcta 120
 tatccgcggt cgttggcgtg gacaccgögg ccactacggc cggtgctacg caggccgcat 180
 ctctagctc tagagctagg gcgctttaat tatgctgagt gatatcccc taacactcgc 240
 ctattgttaa ggggagatct ttattaaaac aaattgaaat tcttctcta tatgtatacg 300
 ccccaagagt agtagtagta gtagtaccat accgatcgt taaccgggaa cgcgagttcc 360
 cggttaagct cgagttgcta ggccgacgat tgtttcgggc ttctcttga cteaaccgac 420
 gacgggtggcg actcggttatt gatcgattg gggaaccccg gagatttgcc cagaactcct 480
 caaaaaacga ctttctctct tgatataggc ctatagggcg ttctcgggc cgtcatggcc 540
 gtattgggtc ggatacggat gtcgtaggtc ccactgccac ggctctact gctactcgcg 600
 taacaatcta aagtatgtgc cacggactga cgcaatcgtt aaattgacac tatttgatgg 660
 cgtaatttcg aatagctact attcgacagt ttgtactctt aattaagaac ttctgctttc 720
 ccggagcact atgcggataa aaatatccaa ttacagtact attattacca agaactctgc 780
 agtccaccgt gaaaagcccc ttacacgcg ccttggggat aaacaaataa aaagatttat 840
 gtaagtttat acataggcga gtactctgtt attgggacta ttacgaagt tattataact 900
 ttttcttct catactcata agttgtaaag gcacagcggg aataaggga aaaacgccgt 960
 aaaacggaag gacaaaaacg agtgggtctt tgcgaccact ttcattttct acgacttcta 1020
 gtcaaccac gtgtcaccc aatgtagctt gacctagagt tgtegccatt ctaggaactc 1080
 tcaaaagcgg ggttcttgc aaaagggttac tactcgtgaa aatttcaaga cgataaccg 1140
 cgccataata gggcacaact gcggcccgtt ctcggtgagc cagcggcgta tgtgataaga 1200
 gtcttactga accaactcat gagtggtcag tgtcttttcg tagaatgcct accgtactgt 1260
 cattctctta atacgtcacg acggtattgg tactcactat tgtgacgccg gttgaatgaa 1320
 gactgttgct agcctcctgg ctctctcgat tggcgaaaaa acgtgttgta cccctagta 1380
 cattgagcgg aactagcaac ccttggcctc gacttacttc ggtatggttt gctgctcgca 1440
 ctgtggtgct acggacgtcg ttaccgttgt tgcaacgcgt ttgataattg accgcttgat 1500
 gaatgagatc gaagggccgt tgttaattat ctgacctacc tccgcctatt tcaacgtcct 1560
 ggtgaagacg cgagccggga aggcgcgacc accaaataac gactatttag acctcgcca 1620
 ctgcaccca gagcgccata gtaacgtcgt gaccccggtc taccattcgg gagggcatag 1680
 catcaataga tgtctgccc ctacgtccgt tgataacctac ttgctttatc tgtctagcga 1740
 ctctatccac ggagtgacta attcgtaacc attgacagtc tggttcaaatt gagtatatat 1800
 gaaatctaac taaattttga agtaaaaatt aaattttcct agatccactt ctaggaaaaa 1860

	ctattagagt	actggtttta	gggaattgca	ctcaaaagca	aggtgactcg	cagtctgggg	1920
	catcttttct	agtttcctag	aagaactcta	ggaaaaaaag	acgcgcatta	gacgacgaac	1980
	gtttgttttt	ttgggtggcga	tggtcgccac	caaacaaacg	gcctagttct	cgatggttga	2040
	gaaaaaggct	tccattgacc	gaagtcgtct	cgcgtctatg	gtttatgaca	ggaagatcac	2100
	atcggcata	atccggtggt	gaagttcttg	agacatcgtg	gcggatgtat	ggagcgagac	2160
	gattaggaca	atggtcaccg	acgacggtea	ccgtatttca	gcacagaatg	gcccacactg	2220
	agttctgcta	tcaatggcct	attccgcgtc	gccagcccga	cttgccccc	aagcacgtgt	2280
	gtcgggtcga	acctcgcttg	ctggatgtgg	cttgactcta	tggatgtcgc	actcgatact	2340
	ctttcgcggt	gcgaagggt	tccctctttc	cgctgtcca	taggccattc	gccgtcccag	2400
	ccttgctctc	tcgcgtgctc	cctcgaaggt	ccccctttgc	ggaccataga	aatatcagga	2460
	cagcccaaag	cggtggagac	tgaactcgca	gctaaaaaca	ctacgagcag	tccccccgcc	2520
	tcggatacct	ttttgcggtc	gttgcgcggg	aaaaatgcca	aggaccggaa	aacgaccgga	2580
	aaacgagtgt	acaagaaagg	acgcaatagg	ggactaagac	acctattggc	ataatggcgg	2640
	aaactcactc	gactatggcg	agcggcgctc	gcttgctggc	tcgcgtcgct	cagtcactcg	2700
	ctccttcgcc	ttctcgcgga	ctacgccata	aaagaggaat	gcgtagacac	gccataaagt	2760
	gtggcgttac	cacgtgagag	tcatgttaga	cgagactacg	gcgtatcaat	tcggtcatat	2820
	gtgaggcgat	agcgatgcac	tgaccagta	ccgacgcggg	gctgtgggcg	gttgtgggcg	2880
	actgcgcggg	actgcccgaa	cagacgaggg	ccgtaggcga	atgtctgttc	gacactggca	2940
	gaggccctcg	acgtacacag	tctccaaaag	tggcagtagt	ggctttgcgc	gtcccgtcga	3000
	cgccatttcg	agtagtcgca	ccagcacttc	gctaagtgtc	tacagacgga	caagtaggcg	3060
	caggtcgagc	aactcaaaga	ggtcttcgca	attacagacc	gaagactatt	tcgcccggta	3120
	caattccgcg	caaaaaagga	caaaccagtg	actacggagg	cacattcccc	ctaaagacaa	3180
[0002]	gtacccccat	tactatggct	actttgctct	ctcctacgag	tgctatgcc	aatgactact	3240
	acttgtacgg	gccaatgacc	ttgcaacact	cccatttggt	gaccgccata	cctacgccgc	3300
	cctggctctct	ttttagttag	tcccagttac	ggtcgcgaag	caattatgtc	tacatccaca	3360
	aggtgtccca	tcggtcgtcg	taggaagcta	cgtctaggcc	ttgtattacc	acgtcccgcg	3420
	actgaaggcg	caaaggctct	aaatgctttg	tgcctttggc	ttctggtaag	tacaacaacg	3480
	agtccagcgt	ctgcaaaacg	tcgtcgtcag	cgaagtgcga	gcgagcgcac	agccactaag	3540
	taagacgatt	ggtcattccg	ttggggcggt	cggatcggcc	caggagtgtc	tgctctcggt	3600
	ctagtacgcg	tgggcaccgg	tcctgggttg	cgacgggctc	tacgcggcgc	acgccgacga	3660
	cctctaccgc	ctgcgtctac	tatacaagac	ggttcccaac	caaacgcgta	agtgtcaaga	3720
	ggcgtttctta	actaaccgag	gttaagaacc	tcaccactta	ggcaatcgct	ccacggcggc	3780
	cgaaggtaag	tccagctcca	ccgggccgag	gtacgtggcg	ctgcgttgcg	ccccccgctc	3840
	tgttccatat	cccgcccgcg	atgttaggta	cggttgggca	aggtacacga	gcggtccgc	3900
	cgtatttiagc	ggcactgcta	gtcgccaggt	tactagcttc	aatccgacca	ttctcggcgc	3960
	tcgctaggaa	cttcgacagg	gactaccagc	agtagatgga	cggacctgtc	gtaccggacg	4020
	ttgcgcccgt	agggtacagg	cggecttcgc	tcttcttagt	attaccctt	ccggtaggtc	4080
	ggagcgcagc	gcttgccgtc	gttctgcctc	gggtcgcgca	gccggcggtg	cgcccgctat	4140
	taccggacga	agagcggtt	tgcaaaccac	cgccttggtc	actgcttcgc	aactcgctcc	4200
	cgcacgttct	aaggcttatg	gcgttcgctg	tccggctagt	agcagcgcga	ggtcgttttc	4260
	gccaggagcg	gcttttactg	ggtctcgcga	cggccgtgga	caggatgtc	aacgtactat	4320
	ttcttctgtc	agtattcacg	ccgctgctat	cagtacgggg	cgcgggtggc	cttctcgac	4380
	tgaccaact	tccgagagtt	cccgtagcca	gtctaggggc	cacggattac	tactcgatt	4440
	gaatgtaatt	aacgcaacgc	gagtgcggg	cgaaaggcca	gccctttgga	cagcacggtc	4500
	gacgtaatta	cttagccggt	tgcgcgcccc	tctccgcca	acgcataacc	cgcggtccca	4560
	ccaaaaagaa	aagtggtcac	tctgcccgtt	gtcgactaac	gggaagtggc	ggaccggggc	4620

tctctcaacg	tcgttcgcca	ggtgcgacca	aacgggggtcg	tccgctttta	ggacaaacta	4680
ccaccaattg	ccgccctata	ttgtactcga	cagaagccat	agcagcatag	ggtgatggct	4740
ctataggcgt	ggttgcgcgt	cgggcctgag	ccattaccgc	gcgtaacgcg	ggtcgcggta	4800
gactagcaac	cgttggtcgt	agcgtcaccc	ttgtacggg	agtaagtcgt	aaacgtacca	4860
aacaactttt	ggcctgtacc	gtgaggtcag	cgggaaggga	aggcgatagc	cgacttaaac	4920
taacgctcac	tctataaata	cggtcggtcg	gtctgcgtct	gcgcggctct	gtcttgaatt	4980
acccggggga	ttgtcgcgct	aaacgaccac	tgggttacgc	tgggtctacga	ggtgcgggctc	5040
agcgcattgg	agaagtaccc	tcttttatta	tgacaactac	ccacagacca	gtctctgtag	5100
ttctttattg	cggccttgta	atcacgtccg	tcgaagggtg	cgttaccgta	ggaccagtag	5160
gtcgcctatc	aattactagt	cgggtgactg	cgcaacgcgc	tcttctaaca	cgtggcggcg	5220
aatgtccga	agctgcggcg	aagcaagatg	gtagctgtgg	tgggtgcgacc	gtgggtcaac	5280
tagccgcgct	ctaaattagc	ggcgtgttta	aacgctgccg	cgcacgtccc	ggtctgacct	5340
ccaccgttgc	ggttagtcgt	tgtgacaaa	cgggcgggtca	acaacacggt	gcgccaaccc	5400
ttacattaag	tcgaggcggg	agcggcgaag	gtgaaaaagg	gcgcaaaagc	gtctttgcac	5460
cgaccggacc	aagtgggtcg	ccctttgcc	gactattctc	tgtggccgta	tgagacgctg	5520
tagcatattg	caatgaccaa	agtgttaagt	gtgggactta	actgagagaa	ggcccgcgat	5580
agtacggtat	ggcgtttcc	aaaacgcggt	aagctaccac	aggccctaga	gctgcgagag	5640
ggaatacgct	gaggacgtaa	tccttcgtcg	ggtcatcatc	caactccggc	aactcgtggc	5700
ggcggcggtc	cttaccacgt	ac				5722

[0003] <210> 2
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> F1 定向引物

<400> 2
 gcgctcaagg gccgtgagac agtggccttg cggta 35

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> F1 非定向引物

<400> 3
 gtccactgga cagcagtaag gact 24

<210> 4
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> F2 定向引物

<400> 4
 gcgctcaagg gggttcctac agacacgctg gccga 35

<210>	5	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	F2 非定向引物	
<400>	5	
	tctgtcacct cacaaaacag tac	23
<210>	6	
<211>	33	
<212>	DNA	
[0004]<213>	F3 定向引物	
<400>	6	
	gcgctcaagg gtgtaagccg ccccgattta atg	33
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	F3 非定向引物	
<400>	7	
	gatgctgagg agatggaggt gcag	24

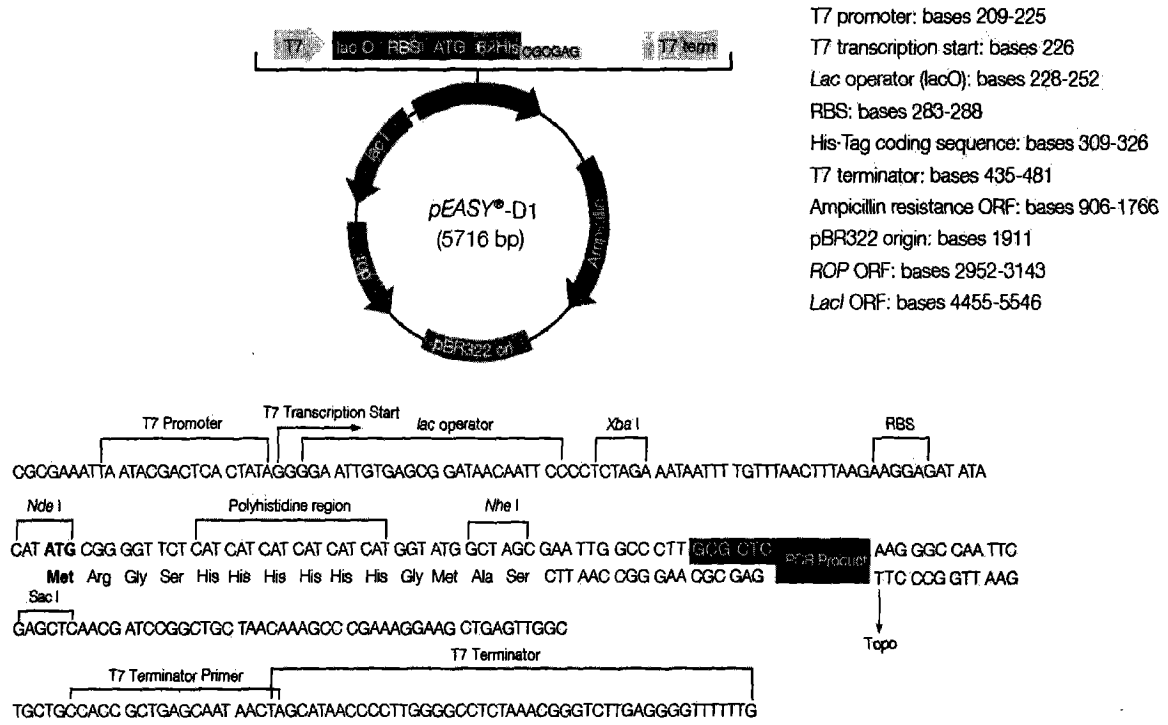
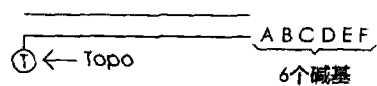
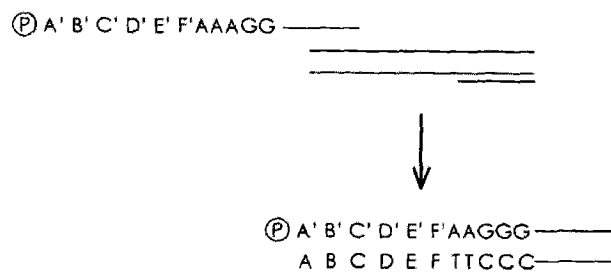


图1

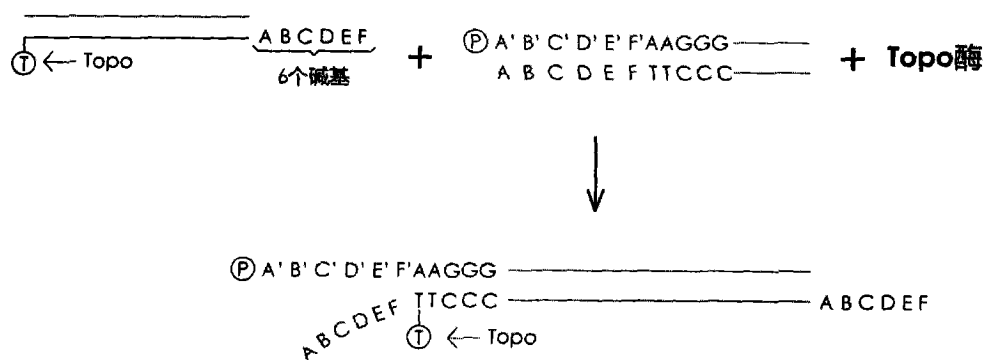
1、载体制备



2、引物设计和PCR扩增



3、定向克隆



4、环化

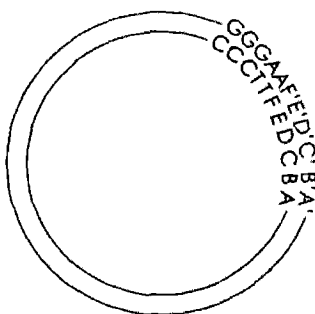


图2

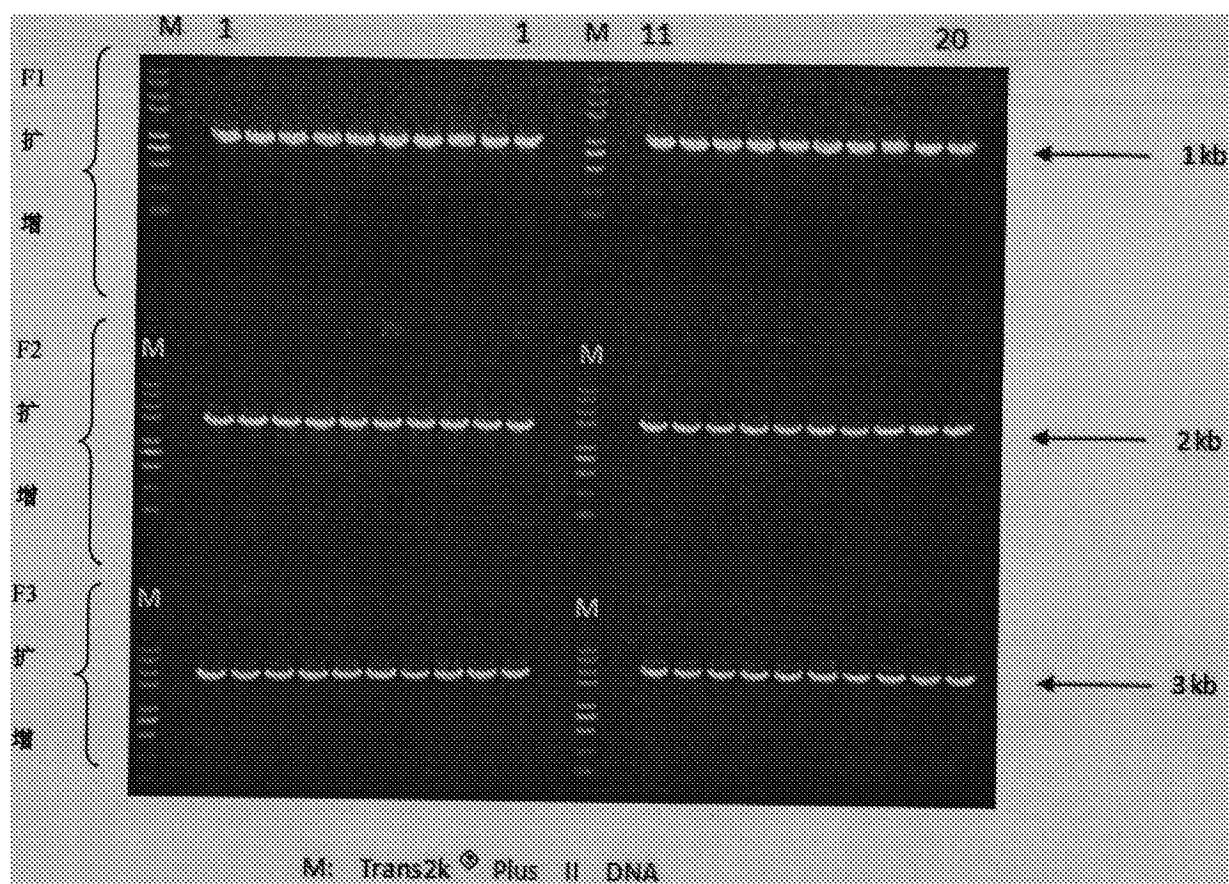


图3