**一、如何阅读质粒图谱（转）**

载体主要有病毒和非病毒两大类，其中质粒DNA是一种新的非病毒转基因载体。

**一、一个合格质粒的组成要素**

复制起始位点Ori，即控制复制起始的位点。原核生物DNA分子中只有一个复制起始点。而真核生物DNA分子有多个复制起始位点。

抗生素抗性基因：可以便于加以检测，如Amp+ ，Kan+

多克隆位点：MCS克隆携带外源基因片段

P/E：启动子/增强子

Terms：终止信号

加poly（A）信号：可以起到稳定mRNA作用

**二、如何阅读质粒图谱**

第一步：首先看Ori的位置，了解质粒的类型（原核/真核/穿梭质粒）

            Ori的箭头指复制方向，其他元件标注的箭头多指转录方向（正向）。

第二步：再看筛选标记，如抗性，决定使用什么筛选标记：

（1）Ampr：水解β-内酰胺环，解除氨苄的毒性。

（2）tetr ：可以阻止四环素进入细胞。

（3）camr：生成氯霉素羟乙酰基衍生物，使之失去毒性。

（4）neor（kanr）：氨基糖苷磷酸转移酶，使G418（卡那霉素衍生物）失活。

（5）hygr：使潮霉素β失活。

第三步：看多克隆位点（MCS）。它具有多个限制酶的单一切点，便于外源基因的插入。如果在这些位点外有外源基因的插入，会导致某种标志基因的失活，而便于筛选。决定能不能放目的基因以及如何放置目的基因。

第四步：再看外源DNA插入片段大小。质粒一般只能容纳小于10Kb的外源DNA片段。一般来说，外源DNA片段越长，越难插入，越不稳定，转化效率越低。

第五步：是否含有表达系统元件，即启动子－核糖体结合位点－克隆位点－转录终止信号。这是用来区别克隆载体与表达载体。克隆载体中加入一些与表达调控有关的元件即成为表达载体。选用那种载体，还是要以实验目的为准绳。

**相关概念**：

启动子－核糖体结合位点－克隆位点－转录终止信号

启动子－促进DNA转录的DNA顺序，这个DNA区域常在基因或操纵子编码顺序的上游，是DNA分子上可以与RNApol特异性结合并使之开始转录的部位，但启动子本身不被转录。

增强子/沉默子－为真核基因组（包括真核病毒基因组）中的一种具有增强邻近基因转录过程的调控顺序。其作用与增强子所在的位置或方向无关。即在所调控基因上游或下游均可发挥作用。沉默子－负增强子，负调控序列。

核糖体结合位点/起始密码/SD序列（Rbs/AGU/SDs）：mRNA有核糖体的两个结合位点，对于原核而言是AUG（起始密码）和SD序列。

转录终止顺序（终止子）/翻译终止密码子：结构基因的最后一个外显子中有一个AATAAA的保守序列，此位点down－stream有一段GT或T富丰区，这2部分共同构成poly（A）加尾信号。结构基因的最后一个外显子中有一个AATAAA的保守序列，此位点down－stream有一段GT或T富丰区，这2部分共同构成poly（A）加尾信号。

**三、载体及其分类**

载体：即要把一个有用的基因（目的基因——研究或应用基因）通过基因工程手段送到生物细胞（受体细胞），需要运载工具（交通工具）携带外源基因进入受体细胞，这种运载工具就叫做载体（vector）。

P.S.基因工程所用的vector实际上是DNA分子，是用来携带目的基因片段进入受体细胞的DNA。

**载体的分类**

按功能分成：（1）克隆载体：都有一个松弛的复制子，能带动外源基因，在宿主细胞中复制扩增。它是用来克隆和扩增DNA片段（基因）的载体。（所以有时实验时扩增效率低下，要注意是不是使用的严谨型载体）（2）表达载体：具有克隆载体的基本元件（ori,Ampr,Mcs等）还具有转录/翻译所必需的DNA顺序的载体。
    按进入受体细胞类型分：（1）原核载体（2）真核载体（3）穿梭载体（sbuttle vector）指在两种宿主生物体内复制的载体分子，因而可以运载目的基因（穿梭往返两种生物之间）。  P.S. 穿梭质粒含原核和真核生物2个复制子，以确保两类细胞中都能扩增。

基因工程载体的3个特点：

（一）都能独立自主的复制：载体DNA分子中有一段不影响它们扩增的非必需区域，如MCS，插在其中的外源DNA片段，能被动的跟着载体一起复制/扩增，就像载体的正常成分一样。

（二）都能便利的加以检测： 如载体的药物抗性基因，多是抗生素抗性基因，将受体细胞放在含有该抗生素培养板上培养生长时，只有携带这些抗性基因的载体分子的受体细胞才能存活。

（三）都能容易进入宿主细胞中去，也易从宿主细胞中分离纯化出来。

**四、载体的选择和制备**

选择载体主要依据构建的目的，同时要考虑载体中应有合适的限制酶切位点。如果构建的目的是要表达一个特定的基因，则要选择合适的表达载体。

    载体选择主要考虑下述3点：

1、 构建DNA重组体的目的，克隆扩增/表达表达，选择合适的克隆载体/表达载体。

2、载体的类型：

（1）克隆载体的克隆能力－据克隆片段大小（大选大，小选小）。如<10kb选质粒。

（2）表达载体据受体细胞类型－原核/真核/穿梭，E.coli/哺乳类细胞表达载体。

（3）对原核表达载体应该注意3点：

    ①选择合适的启动子及相应的受体菌；

    ②用于表达真核蛋白质时注意克服4个困难和阅读框错位；

    ③表达天然蛋白质或融合蛋白作为相应载体的参考。

3、载体MCS中的酶切位点数与组成方向因载体不同而异，适应目的基因与载体易于链    接，不产生阅读框架错位。选用质粒（最常用）做载体的4点要求：

①选分子量小的质粒，即小载体（1－1.5kb）→不易损坏，在细菌里面拷贝数也多

（也有大载体）；

②一般使用松弛型质粒在细菌里扩增不受约束，一般10个以上的拷贝，而严谨型

质粒<10个。

③必需具备一个以上的酶切位点，有选择的余地；

④必需有易检测的标记，多是抗生素的抗性基因，不特指多位Ampr（试一试）。

无论选用哪种载体，首先都要获得载体分子，然后采用适当的限制酶将载体DNA进行切割，获得分子，以便于与目的基因片段进行连接。

**二、pET32a(+)自身载体表达的片段大小**

The expected fusion protein expressed encoded by just the pET-32a(+) vector alone would be around 20.4 kDa. The Trx-tag by itself would contribute 12kDa. The rest is due to the two His-tags (0.8kDa each) and the S-tag (1.7kDa). The remaining 5.1kDa is due to the intervening（?） 54 amino acids between the tags and until the stop codon.

三、**pET32系列载体的载体序列地址**

pET-32a(+) Vector Sequence
[http://www.embl-hamburg.de/~geer ... ET/pET-32a\_seq.html](http://www.helixnet.cn/uchome/link.php?url=http://www.embl-hamburg.de%2F%7Egeerlof%2FwebPP%2Fvectordb%2Fbact_vectors%2Fmaps_seqs_mcs%2FpET%2FpET-32a_seq.html#tc_qz_original=287987394)
pET-32b(+) Vector Sequence
[http://www.embl-hamburg.de/~geer ... ET/pET-32b\_seq.html](http://www.helixnet.cn/uchome/link.php?url=http://www.embl-hamburg.de%2F%7Egeerlof%2FwebPP%2Fvectordb%2Fbact_vectors%2Fmaps_seqs_mcs%2FpET%2FpET-32b_seq.html#tc_qz_original=287987394)
pET-32c(+) Vector Sequence
[http://www.embl-hamburg.de/~geer ... ET/pET-32c\_seq.html](http://www.helixnet.cn/uchome/link.php?url=http://www.embl-hamburg.de%2F%7Egeerlof%2FwebPP%2Fvectordb%2Fbact_vectors%2Fmaps_seqs_mcs%2FpET%2FpET-32c_seq.html#tc_qz_original=287987394)

**四、pET系列载体阅读方法**

ori是复制起始点，细的黑箭头是几个不同的转录区，其箭头方向不同，说明每个表达产物（如kan抗性基因、LacI等）都有独立的promoter，有时与T7 promoter方向相反。粗的黑箭头是MCS，用于目的基因的插入，箭头方向表明目的基因的转录方向，它的转录方向可以与其它几个不同的转录区相同，也可以不同，如Kan抗性基因、LacI的方向是一样的，可能与调控相关，不同的载体是不一样的。一个载体可只看它的启动子到终止子那一段，其它的可以考虑少些。

**五、pET表达菌株的相关信息**

（ DE3 ）指宿主为 λ DE3 溶原菌，其染色体上带有一拷贝由 lacUV5 启动子控制的 T7 RNA 聚合酶基因。这类菌株适用于从克隆到 pET载体的目标基因生产蛋白。命名为 pLysS 和 pLysE 的宿主菌带有编码 T7 溶菌酶（为 T7 RNA 聚合酶的天然抑制物）的 pET 相容性质粒。带有 pLysS 的细胞产生少量溶菌酶，而 pLysE 宿主菌产生更大量酶。这些菌株用于在诱导前抑制 T7 RNA 聚合酶的基础表达，这样可以稳定编码影响细胞生长和活力的目标蛋白的 pET 重组体。带有 pLacI 的宿主菌产生额外的抑制 pETBlue 和 pTriEx 载体基础表达的 lac 阻遏蛋白。 λ DE3 溶原化试剂盒用于制备其它遗传背景的新表达宿主菌。
     AD494 菌株为硫氧还蛋白还原酶 ( trxB ) 突变菌株，能够在胞浆内形成二硫键，提供了生产正确折迭的活性蛋白的潜力。 TrxB 突变可用卡那霉素选择，因此该菌株建议用于带氨苄抗性标记 bla 的质粒。
     B834 为 BL21 的亲本菌株。这些蛋白酶缺陷宿主菌为甲硫氨酸营养缺陷型，可用 35 S- 甲硫氨酸和硒代甲硫氨酸对目标蛋白进行高特异活性标记，从而用于结晶学研究。
     BL21 应用最广的宿主菌来源，具有 lon 和 ompT 蛋白酶缺陷的优点。
     BL21 TrxB 菌株在蛋白酶缺陷 BL21 背景上具有与 AD494 菌株相同的硫氧还蛋白还原酶突变 ( trxB ) 。由于 trxB 宿主有利于胞浆内二硫键形成，它们的使用可增加正确折迭的蛋白组分。 TrxB 突变可用卡那霉素选择，因此该菌株建议用于带氨苄抗性标记 bla 的质粒。
     BLR 为 BL21 的 recA - 衍生菌株，能够改善质粒单体产量，有助于稳定含有重复序列或其产物能够引起 DE3 噬菌体丢失的目标质粒。
     HMS174 菌株在 K-12 背景上提供了 recA 突变。与 BLR 一样，这些菌株能够稳定其产物能够引起 DE3 噬菌体丢失的某些目标基因。
     NovaBlue 适合 用作初始克隆宿主菌的 K-12 菌株，具有高转化效率、蓝 / 白斑筛选能力（与合适质粒）和导致优质质粒 DNA 高产的recA endA 突变。由于存在 F 附加体编码的 lacI q 阻遏蛋白， NovaBlue 的 DE3 溶原菌是一个非常有用的严紧型宿主菌。
     Origami 为 K-12 衍生的宿主菌，硫氧还蛋白还原酶突变 ( trxB ) 和谷胱甘肽还原酶 ( gor ) 基因均为突变，能够大大增强胞浆内二硫键的形成。研究表明即使总体表达水平相似， Origami （ DE3 ）表达的活性蛋白比其它宿主菌高 10 倍以上。 Origami 宿主菌与氨苄抗性质粒相容，可用于 pET-32 载体，硫氧还蛋白标签能够进一步增强在胞浆内形成二硫键。 TrxB 和 gor 突变可分别用卡那霉素和四环素选择，因此该菌株建议用于带氨苄抗性标记 bla 的 pET 质粒。
     Origami B 宿主菌来源于 BL21 lacZY 突变株，还带有与原始 Origami 菌株相同的 TrxB / gor 突变。 Origami B 菌株集 BL21 、Tuner 和 Origami 宿主菌的优点于一体。 TrxB 和 gor 突变可分别用卡那霉素和四环素选择，因此该菌株建议用于带氨苄抗性标记 bla 的pET 质粒。
     Rosetta 宿主菌从 BL21 衍生而来，可增强带有大肠杆菌稀有密码子的真核蛋白的表达。该菌株通过一个相容性氯霉素抗性质粒补充密码子 AUA 、 AGG 、 AGA 、 CUA 、 CCC 和 GGA 的 tRNAs 。这样 Rosetta 菌株提供了“万能”的翻译，从而避免因大肠杆菌密码子使用频率导致的表达限制。 tRNA 基因由它们的天然启动子驱动。在 Rosetta （ DE3 ） pLysS 和 Rosetta （ DE3 ） pLacI 中，稀有 tRNA 基因存在于分别带有 T7 溶菌酶和 lac 阻遏基因的同一质粒上。
     Tuner 菌株为 BL21 的 lacZY 缺失突变株，能够调整培养物中所有细胞的蛋白表达水平。 lac 通透酶（ lacY ）突变使得 IPTG 均匀进入群体所有细胞，从而具有浓度依赖、水平均一的诱导表达。通过调整 IPTG 浓度，表达可从极低水平调节到极强、完全诱导的表达水平（通常与 pET 载体相关）。低水平表达有时可能增强难表达蛋白的溶解性和活性。 Tuner （ DE3 ） pLacI 菌株与 pETBlue 和 pTriEx 载体的表达相容。

**六、pGEX载体的特点**

pGEX特点就是带有GST标签，可以增加目的蛋白的溶解度，别的没什么特点，属于大众型载体，目前也较常使用。