

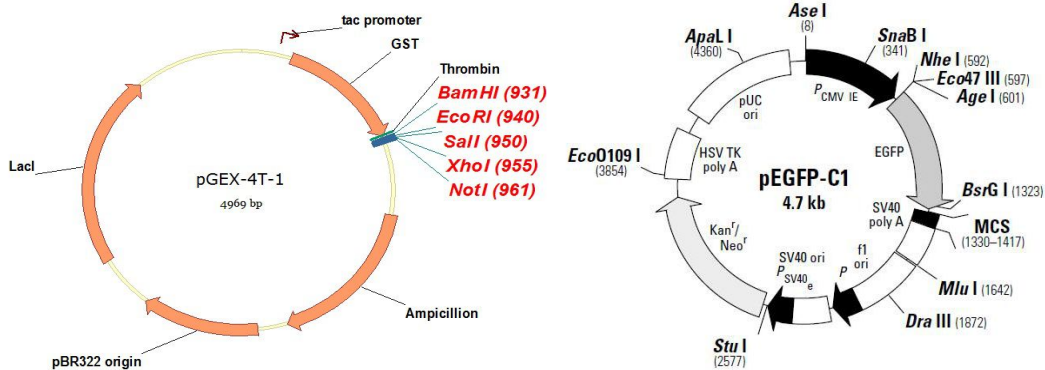
如何阅读质粒图谱？

- **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）。

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 分子通常有多个复制起始位点。ColE1 ori 只需要 1 个。慢病毒、逆转录病毒属于 RNA 病毒，只有 1 个复制起点。腺病毒也只有 1 个复制起点。

举例：



- **第二步：再看筛选标记，如抗性，决定使用什么筛选标记：**

原核筛选标记：

Ampr：水解 β -内酰胺环，解除氨苄的毒性。

Camr：生成氯霉素羟乙酰基衍生物，使之失去毒性。

Kanr：氨基糖苷磷酸转移酶，卡那霉素失活。

真核筛选标记：

Puro：puro 筛选

Neo：G418 筛选

hygr：使潮霉素 β 失活

原核和真核都可以的筛选标记：

Zeocin 可选择 Sh ble 基因表达的细胞

Blasticidin：通过干扰核糖体中肽键的形成来特异性抑制原核和真核生物的蛋白质合成

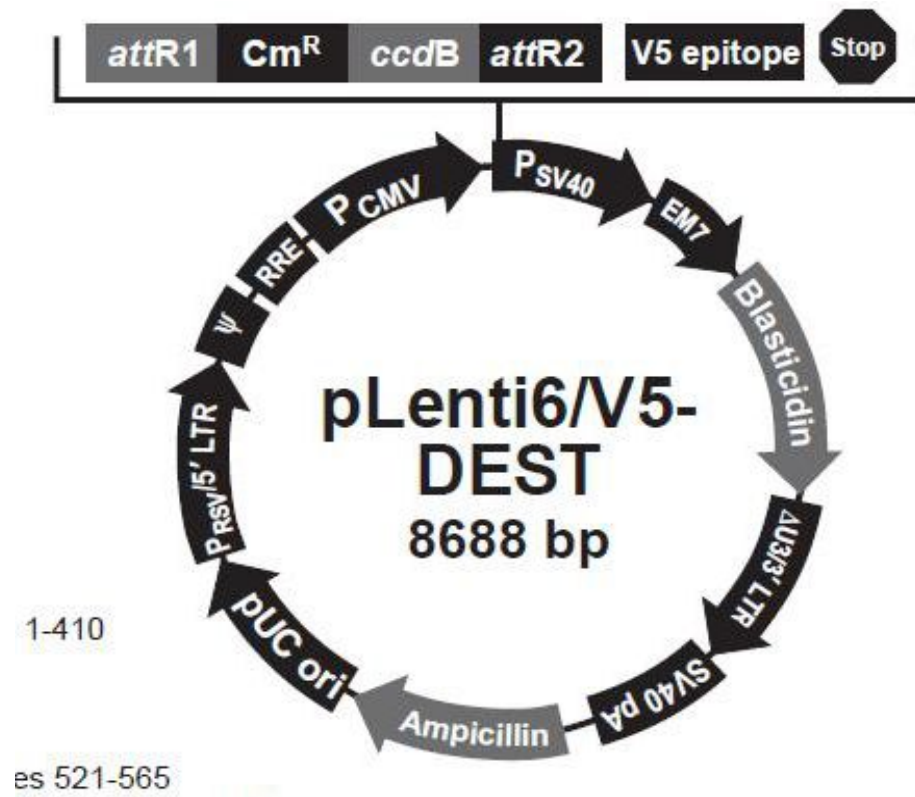
- **第三步：看多克隆位点 (MCS)。它具有多个限制酶的单一切点，决定能不能放目的基因以及如何放置目的基因。**

Invitrogen 的 Gateway 系统质粒是不需要多克隆位点的

两个 Att 位点用于同源重组，构建的过程就是目的基因通过同源重组取代 Cm 和 ccdB 基因。

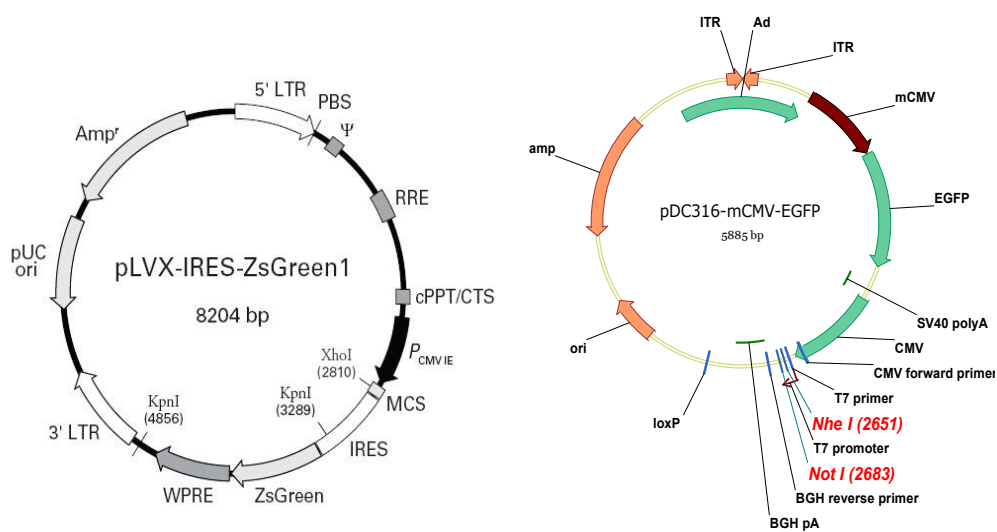
CmR 是氯霉素抗性。

ccdB (Control of cell death) 基因表达的蛋白，会破坏细菌的 DNA gyrase，造成细菌染色体的降解 导致细菌死亡。如果重组上，则 ccdB 基因表达受到阻碍，所以细胞可生长。



● 第四步：看功能元件。

载体类型、何种启动子、是否携带荧光等



如何选择合适的载体？

影响载体选择的因素：

- 原核表达 or 真核表达？
- 细胞实验（过表达 or 干扰、瞬时表达 or 稳转株、基因大小、荧光、药筛）
- 动物实验（过表达 or 干扰、注射部位、基因大小、观察周期）