

生物技术与方法

基于 *Xcm* I 的 T 载体及其在合成生物学中的应用

段仰凯^{1,2}, 梁飞燕^{1,2}, 谈晓明², 吕雪峰²

1 中国科学院大学, 北京 100049

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

段仰凯, 梁飞燕, 谈晓明, 等. 基于 *Xcm* I 的 T 载体及其在合成生物学中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(7): 956–965.
Duan YK, Liang FY, Tan XM, et al. An *Xcm* I -generated T vector and its applications in synthetic biology. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 956–965.

摘要: 为了节约成本和提高实验效率, 以商用 pMD18-T 载体为基础, 构建获得了 pFL-XS-T 载体, 其具有符合 Biobrick 标准的串联 *Xba* I -*Xcm* I -*Xcm* I -*Spe* I 克隆序列, 通过对 *Xcm* I 的酶切处理即可以通过 TA 克隆方便地克隆 PCR 片段。克隆验证实验结果表明, 经 *Xcm* I 处理的该载体可以与 PCR 片段进行 TA 连接, 连接效率及阳性率均可以满足实验室要求并且可以得到 Biobrick 标准质粒。此外, 该载体不仅可以与其余 Biobrick 标准元件进行串联, 还可以作为功能 DNA 元件的筛选载体。

关键词: Biobrick 标准, TA 克隆, 合成生物学

An *Xcm* I -generated T vector and its applications in synthetic biology

Yangkai Duan^{1,2}, Feiyan Liang^{1,2}, Xiaoming Tan², and Xuefeng Lü²

1 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

2 Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: For more economical and efficient DNA cloning, pFL-XS-T, a Biobrick-T vector was constructed based on pMD18-T vector, carrying cloning regions of *Xba* I -*Xcm* I -*Xcm* I -*Spe* I. The results revealed that PCR products could be conveniently inserted into pFL-XS-T vector digested by *Xcm* I by means of TA cloning. The positive frequency of

Received: October 23, 2015; **Accepted:** November 16, 2015

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2013CQ045).

Corresponding authors: Xuefeng Lü. Tel: +86-532-80662629; Fax: +86-532-80662712; E-mail: lvxf@qibebt.ac.cn

山东省自然科学基金 (No. ZR2013CQ045) 资助。

recombination can meet the experimental requirements and all the plasmids obtained meet Biobrick standard. Moreover, the pFL-XS-T is compatible with other Biobrick parts, and serves as a vector for functional DNA fragments screening.

Keywords: Biobrick standard, TA cloning, synthetic biology

传统的分子生物学实验中,由于受可用酶切位点的限制,许多重组后的 DNA 无法继续拼装,因而不能满足合成生物学的大量、快速拼装的要求。Knight 发明了一套新的 DNA 组装策略并将其命名为“Biobrick”。该策略利用限制性内切酶的同尾酶,酶切后可以得到互补的粘性末端并且连接后形成的碱基序列无法被其中任何一种酶识别的原理,实现了 DNA 片段的循环组装^[1-3]。经典的 Biobrick 拼接方法,需要先通过 PCR 克隆的方式,将目的片段克隆到两翼带有 *Eco*R I -*Xba* I、*Spe* I -*Pst* I 等酶切位点的质粒上。这就需要在扩增目的片段的引物末端加上 *Xba* I 和 *Spe* I 等酶切位点,引物上额外的酶切位点的添加使得合成成本升高且步骤相对繁琐。

PCR 是分子生物学中获得体外 DNA 片段的最常用的方法,用 *Taq* DNA 聚合酶 PCR 扩增得到片段的 3'端突出一个 A 碱基^[4],TA 克隆是 *Taq* DNA 聚合酶扩增得到的 PCR 产物与载体连接最快速最有效的方法之一^[5-8]。商用 T 载体,如 pMD18-T,载体两端有 *Xba* I 等多个酶切位点可用,然而通常条件下克隆得到的质粒并不具有 Biobrick 特征,在载体的一端缺少 *Xba* I 的同尾酶 *Spe* I。若要利用 TA 克隆的方式获得 Biobrick 特征质粒,需要在目的片段的一端加入 *Spe* I 酶切位点且片段插入后需确保 pMD18-T 载体引入的 *Xba* I 和目的片段引入的 *Spe* I 酶切位点位于插入片段的两端。该方法虽

然克隆效率高,但扩增片段的引物末端还需加入 *Spe* I 酶切位点且克隆后需要鉴定插入方向,这使得引物合成成本升高且步骤仍然相对繁琐。

由此可见,获得一个带有 Biobrick 酶切位点的 T 载体就可以解决传统 Biobrick 组件获取方法所面临的问题。许多研究报道过利用限制性内切酶可以构建 T 载体^[9-11],其中 *Xcm* I 构建 T 载体的研究尤其得到了广泛关注^[12-16]。*Xcm* I 为一种 II 型限制性内切酶,识别位点为 5'-CCANNNNN|NNNNNTGG-3',如果设计第 5 个 N 为 T,*Xcm* I 酶切后在 3'端突出一个 T,可以与 *Taq* 聚合酶反应产物上的 3'端单 A 突出配对,直接进行亚克隆或测序。但是目前还没有利用 *Xcm* I 构建符合 Biobrick 规范 T 载体的研究报道。事实上,pMD18-T 与符合 Biobrick 规范 T 载体的主要区别只是在 pMD18-T 的 *Hind* III 一端缺少 *Spe* I 酶切位点。因此,将一段一端带有 *Xcm* I 酶切位点,另一端带有 *Xcm* I 和 *Spe* I 酶切位点的 PCR 产物与 pMD18-T 载体经过 TA 克隆连接,会得到一个符合 Biobrick 规则的 T 载体质粒,得到的质粒再经过 *Xcm* I 酶切便可以得到符合 Biobrick 规范的 T 载体(图 1),该载体不仅可以与 DNA 片段进行 TA 克隆连接,而且克隆后的片段还可以利用 Biobrick 规则进行后续组装(图 1)。因此,本文按照该方法构建了 Biobrick-T 载体并对该载体的克隆效率及应用的有效性进行了验证。

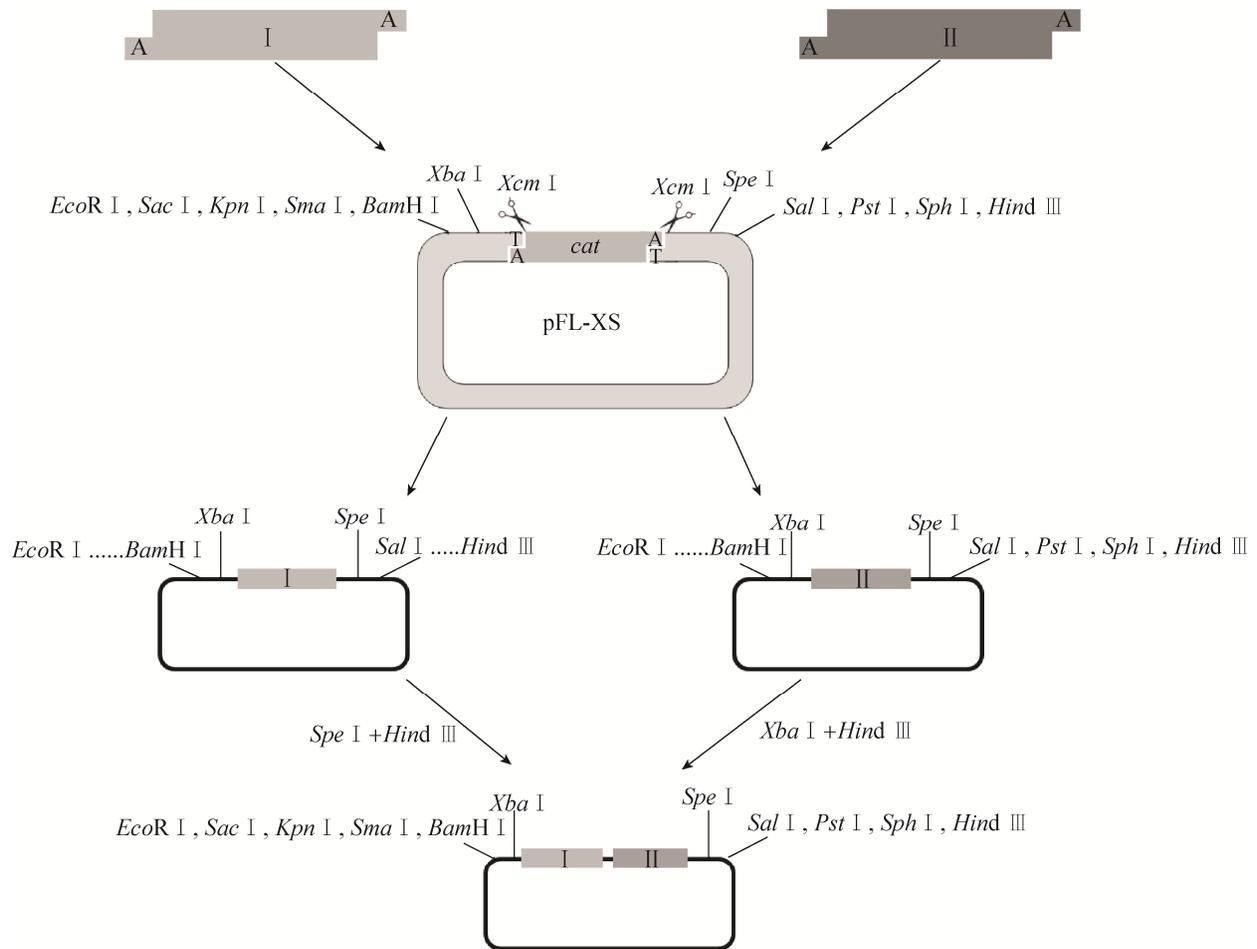


图1 基于 *Xcm* I 的 T 载体构建及其在合成生物学中应用示意图

Fig. 1 The schematic diagram of construction of an *Xcm* I -generated T vector and its application in synthetic biology.

1 材料与方法

1.1 试剂

pMD18-T 载体和感受态细胞购于 TaKaRa (日本)。其余用于分子克隆的试剂盒购于 Omega (美国)。内切酶 *Xcm* I 购于 NEB (美国)，其余所用的限制性内切酶和分子克隆所用到的相关的酶购于 Thermo (加拿大)。

1.2 菌株和质粒的构建

本研究所用的引物见表 1，用到的质粒见

表 2。

1.2.1 使用 pMD18-T 载体构建 Biobrick 标准质粒

以 pRL271^[17]为模板，Cm-F (含 *Bgl* II 酶切位点)/Cm-R (含 *Spe* I 酶切位点) 为引物 PCR 扩增得到约 1 kb 的氯霉素抗性基因 *cat* 片段，随后将该片段连接到 pMD18-T 载体中得到质粒 pXT170c 形成 *Xba* I 和 *Spe* I 同尾酶的 Biobrick 标准的质粒。随后用 *Dra* I 酶切 pRL57^[18]，得到的带有壮观霉素抗性编码基因的 Omega 片段

与用 *Bgl* II 和 *Nco* I 酶切并补平的 pXT170c 片段连接, 得到有 Biobrick 标准的质粒 pXT170s。用 QucikChange 方法消除壮观霉素抗性片段中的 *Xcm* I 位点 (用引物 Omega-qc-F/Omega-qc-R 进行突变) 得到质粒 pXT170'。

1.2.2 Biobrick-T 载体 pFL-XS 的构建

以 pRL271^[17] 为模板, X-F1/X-R1 为引物 PCR 扩增得到约 1 kb 的氯霉素抗性片段 *cat*, 后将该片段连接到 pMD18-T 载体中得到质粒 pXcm-XS。用 *Nde* I 酶切该质粒并用 T4 DNA

聚合酶补平, 自连接, 最终得到消除 *Nde* I 的质粒 pFL-XS。

1.2.3 利用 Biobrick 规则进行质粒构建

如图 2 所示, 使用 *Xba* I 和 *Pst* I 酶切质粒 BBa_E0240 得到绿色荧光报告基因片段 (eGFP), 使用 *Spe* I 和 *Pst* I 酶切 pFL-XS 得到载体片段, 将两个片段分别回收后连接得到质粒 pXT238。用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切 pXT238 得到的载体与用 *Sac* I 和 *Spe* I 酶切 pXT170' 得到的壮观霉素抗性片段连接得到质粒 pXT244'。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
Cm-F	TC <u>AGATCT</u> CGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCATC
Cm-R	TT <u>ACTAGT</u> TCTGCCATTCATCCGCTTATTATCAC
Omega-qc-F	CGTTCCATACAGAAGCTCCGCGAACAAACGATGCTCG
Omega-qc-R	CGAGCATCGTTTGTTCGCGGAGCTTCTGTATGGAACG
X-F1	TTCCCA <u>AGATTATCG</u> TGGCGAATAAATACCTGTGACGG
X-R1	TTCACTAGTCCA <u>AGATTATCG</u> TGGTCTGCCATTCATCCGCTTAT
LacI-R	AGCTTGCAATTCGCGCTAACT
PlacO-R	TGACTAGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTC

Underlined nucleotides represent the restriction enzyme sites

表 2 本研究中所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	References
pXT170c	Ap ^r , Cm ^r , <i>Bgl</i> II and <i>Spe</i> I flanked <i>cat</i> gene in pMD18-T	This study
pXT170s	Ap ^r , Sp ^r , Omega cassette in in pMD18-T	This study
pXT170s'	Ap ^r , Sp ^r , Omega cassette in in pMD18-T with eliminated <i>Xcm</i> I	This study
pXT181b	Ap ^r , lacI-Ptrc-lacO cloned in pMD18-T	Tan XM, Lu XF, unpublished
pXcm-XS	Ap ^r , Cm ^r , <i>Xcm</i> I flanked <i>cat</i> gene in pMD18-T	This study
pFL-XS	Ap ^r , Cm ^r , pXcm-XS with eliminated <i>Nde</i> I	This study
pXT238	Ap ^r , Cm ^r , eGFP gene cloned in pFL-XS	This study
pXT244'	Ap ^r , Cm ^r , Sp ^r , Omega cassette from pXT170s' cloned in pXT238	This study
pFL75	Ap ^r , Sp ^r , Ptac cloned in pXT244'-derived T-vector	This study
pFL76	Ap ^r , Sp ^r , Ptrc cloned in pXT244'-derived T-vector	This study
pFL77	Ap ^r , the pXT244'-derived T-vector blunted and self-ligated	This study

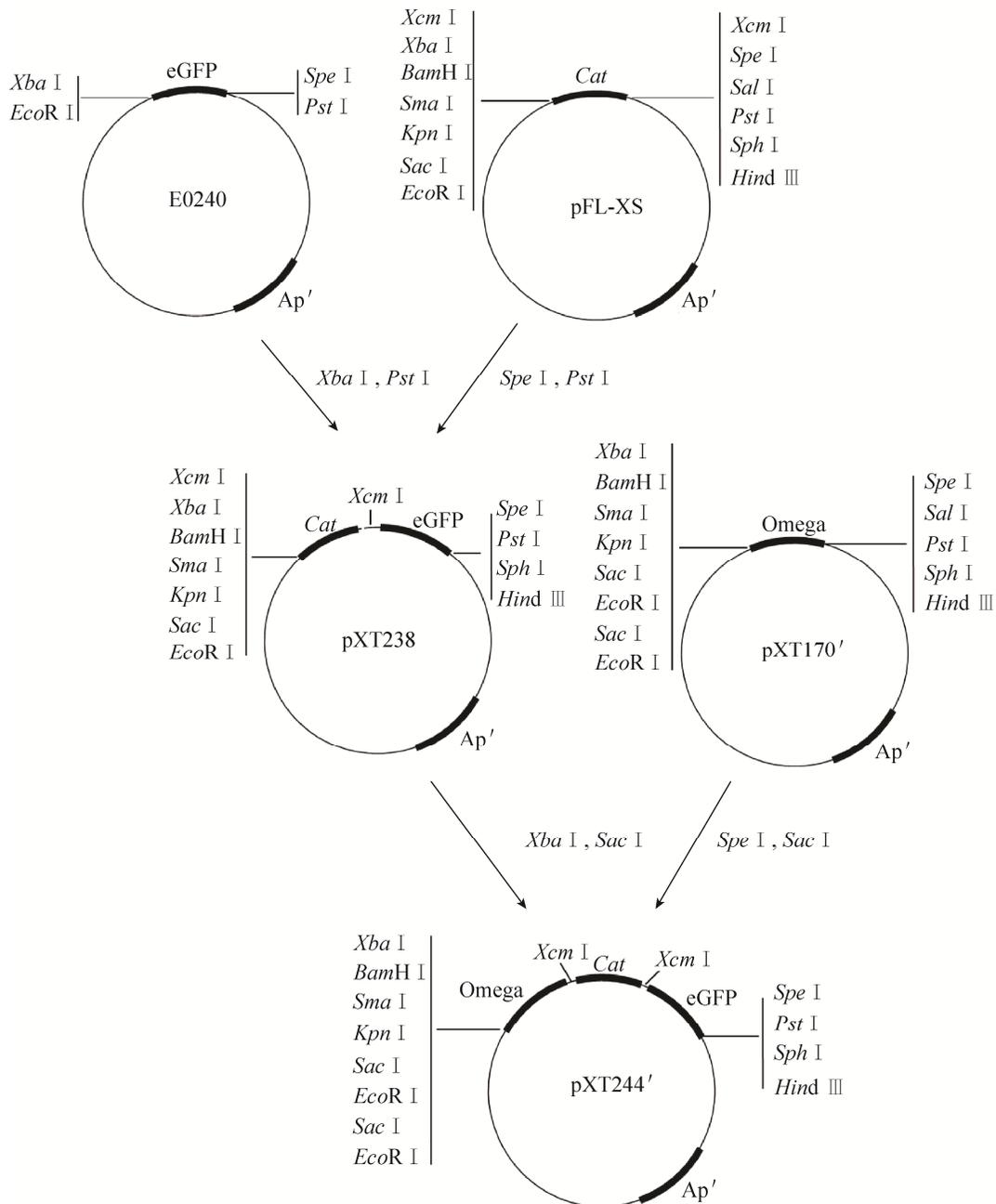


图 2 利用 Biobrick 规则构建质粒 pXT244'流程图

Fig. 2 The flowchart of the construction of the plasmid pXT244' based Biobrick standard.

1.2.4 用于大肠杆菌中检测启动子活性的质粒构建

用 *Xcm* I 酶切 pXT244'得到有 3'-T 突出的

2.7 kb 的 DNA 片段, 该片段可作为 T 载体。lacI-R/PlacO-R 为引物, 质粒 pRL59EH^[19]为模板用 *Taq* DNA 聚合酶 PCR 得到 3'端带有碱基 A 的

lacI-Ptac 片段, lacI-R/PlacO-R 为引物, 质粒 pXT181b 为模板用 *Taq* DNA 聚合酶 PCR 得到 3' 端带有碱基 A 的 lacI-Ptrc 片段, 将两个启动子片段分别与 pXT244' 得到的载体进行 TA 克隆分别得到含有 Ptac 启动子的质粒 pFL75 和含有 Ptrc 启动子的质粒 pFL76。

1.3 pFL-XS-T 载体克隆效率及阳性率测定

pFL-XS 质粒用 *Xcm* I (NEB) 酶切并使用胶回收试剂盒 (OMEGA) 回收得到 2.7 kb 的 pFL-XS-T 载体 (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 实验中对照载体使用的是商业载体 pMD18-T (TaKaRa, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

首先, 实验使用插入片段 (pMD18-T 试剂盒内置对照片段, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 与两个载体分别进行连接。连接过夜, 转化到大肠杆菌 DH5 α , 分别随机挑取 20 个单克隆, 使用通用引物 RV-M 和 M13-47 对 20 个单克隆进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆。阳性克隆的标准是菌落 PCR 可以得到约 660 bp 的 PCR 产物。

其次, 为了验证 pFL-XS-T 对随机克隆的 PCR 产物的连接效率, PCR 扩增来源于集胞藻 PCC 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 328 bp 和来源于聚球藻 PCC 7942 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 2 199 bp 两段 DNA 片段。用胶回收试剂盒 (OMEGA) 回收, 分别与 pFL-XS-T 载体连接过夜随后转化到大肠杆菌 DH5 α 。分别随机挑取 24 个单克隆, 用上述通用引物对单克隆进行菌落 PCR。检验出阳性克隆的标准是菌落 PCR 可以分别得到约 500 bp 和 2 350 bp 的 PCR 产物。

1.4 大肠杆菌转化

将质粒 pFL75、pFL76 和 pFL77 转化大肠杆菌 DH5 α 中, 分别得到重组大肠杆菌 FL178、FL179 和 FL180。

1.5 荧光显微镜观察

将重组大肠杆菌 FL178、FL179 和 FL180 接种到 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至指数生长期时加入 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)。IPTG 诱导后 5 h, 对不同菌的培养液取样并进行荧光显微镜 (Olympus BX51, 日本) 观察^[20]。

2 结果与分析

2.1 T 尾 Biobrick 载体的获得

构建得到 pFL-XS 质粒经过内切酶 *Xcm* I 可以得到 Biobrick-T 载体。由图 3 可以清楚地看出, 内切酶 *Xcm* I 可以有效地将 pFL-XS 质粒酶切成一个 2 722 bp 的载体片段和一个 962 bp 的氯霉素抗性片段, 并且两个片段的大小可以确保在回收胶上得到有效分离 (图 3), 其中 2 722 bp 片段为 Biobrick-T 载体片段。该载体以 pMD18-T 载体为

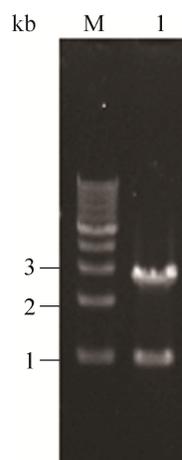


图 3 pFL-XS-T 载体的 *Xcm* I 限制性内切酶酶切检测结果

Fig. 3 Digestive pattern of pFL-XS-T vector with restriction endonuclease *Xcm* I. The DNA gel electrophoresis map of the *Xcm* I -digest product of pFL-XS. M: 1 kb ladder; I: the *Xcm* I -digest product of pFL-XS.

基本框架, 不仅具备各种多克隆位点, 而且在载体两端分别带有 *EcoR* I-*Xba* I 和 *Pst* I-*Spe* I Biobrick 酶切位点, 使得与该载体进行 TA 克隆后的 DNA 片段获得 Biobrick 特征 (图 1)。

2.2 pFL-XS-T 载体克隆效率及阳性率

商业载体 pMD18-T 转化平板上的单克隆数量 (大于 200 个) 远高于 pFL-XS-T 载体转化平板上的单克隆数量 (32 个), 但是自制 pFL-XS-T 浓度略低于商用载体浓度 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 如果提高 pFL-XS-T 载体的浓度, 转化后的单克隆数目有再增多的可能。但是在该浓度下, pFL-XS-T 为载体的转化平板上的单克隆数目足够应用于实验室条件下目的克隆的获得。

本研究以菌落 PCR 检测转化子插入片段的方法来验证阳性克隆并计算阳性率, 分别选用 pMD18-T 载体的商用插入片段和蓝藻基因组随机片段作为待测片段。在插入商用片段的实验中, 随机挑取 20 个单克隆 PCR 鉴定, pMD18-T 载体重组质粒的阳性率为 100% (图 4A), 即所有单克隆中都成功得到了含有插入商业片段的重组质粒; pFL-XS-T 载体重组质粒的阳性率为 90% (20 个单克隆中 18 个为阳性), 即有 10% 的单克隆中没有成功得到含有插入商业片段的重组质粒 (图 4B)。假阳性的出现是因为 pFL-XS 质粒在 DNA 琼脂胶上条带的位置与 pFL-XS-T 线性载体的条带基本重合 (数据未列出), 与之前文献报道类似^[21-22], 受 *Xcm* I 酶切效率的限制, 有少量的没有受到 *Xcm* I 酶切的质粒混入了载体片段中, 该质粒含有氯霉素和氨苄青霉素的抗性, 因此转化得到的克隆可以在氨苄青霉素的抗性板上生长, 因此推测影响重组阳性率的主要因素是 pFL-XS 质粒的酶切完全程度。这个问题可以通过增加填充片段(本研究为氯霉

素 *cat*) 的长度, 使得载体片段和未被酶切的质粒在电泳胶上易于分开回收以及引入蓝白斑筛选来提高连接效率^[21,23-25]。

T 载体的广泛应用是因为能够直接与实验室条件下用 *Taq* DNA 聚合酶 PCR 得到的产物连接并进行后续的亚克隆和测序工作。为了验证 pFL-XS-T 对随机克隆的 PCR 产物的连接效率, 用 *Taq* DNA 聚合酶分别 PCR 克隆了来源于蓝藻基因组的 328 bp 和 2.2 kb 的基因片段, 纯化后直接与 pFL-XS-T 载体连接过夜, 转化。各随机挑取 24 个单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 发现两者的阳性率都高于 75% (图 5)。

以上结果说明该载体可以有效地通过 TA 克隆的方式连接 DNA 片段, 这些片段连接以后形成的质粒即为 Biobrick 标准的质粒, 这样可以省去 PCR 扩增中为了加入 Biobrick 所需要的酶切位点而增加的引物长度。因此通过该方法可以很便捷的建立 Biobrick 元件库。

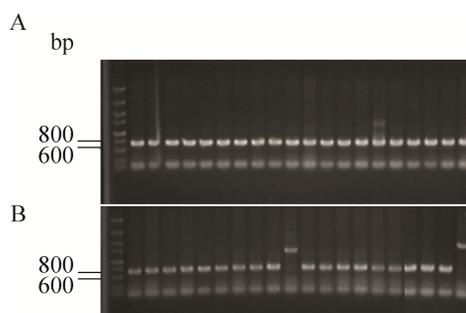


图 4 商用插入片段与 pFL-XS-T 载体的 TA 克隆效率及阳性率检测

Fig. 4 Evaluation of TA cloning efficiency and positive rates of pFL-XS-T ligation system with the commercial insert fragment. The templates are single clones from the pFLXS-T vector (A) or the commercial pMD18-T vector (B) ligated with control inserts separately. DNA marker is DL 5000 (TaKaRa).

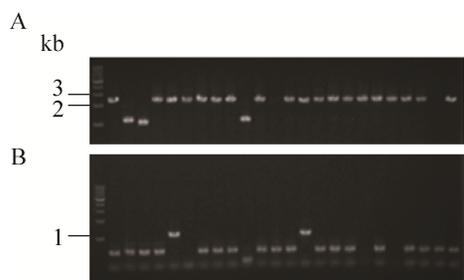


图5 随机插入片段与 pFL-XS-T 载体的 TA 克隆效率及阳性率检测

Fig. 5 TA cloning efficiency and positive rates evaluations of pFL-XS-T ligation system with randomly amplified fragments. The positive fragments are about 2.35 kb (A) and 500 bp (B), respectively. The templates are single clones by transformed with the ligation products of two fragments from cyanobacteria with pFLXS-T vector. DNA marker is 1 kb (TaKaRa).

2.3 不同方式获得的符合 Biobrick 标准的基因元件的组装和应用验证

为了验证得到的 pFL-XS 在实际应用中是否可以与符合 Biobrick 标准的元件有效拼接。我们先将质粒 pFL-XS 与 Biobrick 标准质粒库中的质粒 BBa_E0240 进行 Biobrick 规则组装 (详见材料与amp;方法 1.2.3), 得到了含有报告基因的质粒 pXT238, 该质粒仍然具有 Biobrick 特征。随后我们又将 pXT238 与之前构建的具有 Biobrick 特征的质粒 pXT170'再次进行了 Biobrick 规则组装, 最终得到了带有报告基因且仍然具有 Biobrick 特征的质粒 pXT244'。质粒 pXT244'构建过程不仅证明了本研究得到的 pFL-XS 载体质粒不仅具有 Biobrick 特征并且可以与其余 Biobrick 规则的片段及质粒进行连续的 Biobrick 规则组装。

另外, 之前有研究将 T 载体用于高通量筛选^[26], 由于本研究得到的 pFL-XS-T 载体也具有 T 载体的特点, 前面我们已经验证了该载体连接的有效性, 为了进一步验证该载体应用的有效性, 我们将该载体可进行 TA 克隆的特性用于启动子筛选。质粒 pXT244'源于质粒 pFL-XS, 是以 pFL-XS 为

载体, 利用 Biobrick 规则与其余片段组装获得, 该质粒经过 *Xcm* I 酶切后可以得到含有报告基因的 T 载体, 因此需要筛选的启动子片段只需要经过 PCR 和 TA 克隆便可以得到启动子筛选质粒。我们分别构建了含有 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子的筛选质粒及对照质粒 (见材料与方法) 并将得到的质粒转化到大肠杆菌中。培养的重组大肠杆菌在加入 IPTG 诱导以后, 在日光中就可以看到含有 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子的菌株有荧光出现 (图 6C)。在荧光显微镜下观察, 很明显可以看出含有 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子的菌株可以发出绿色荧光 (图 6A 和图 6B)。

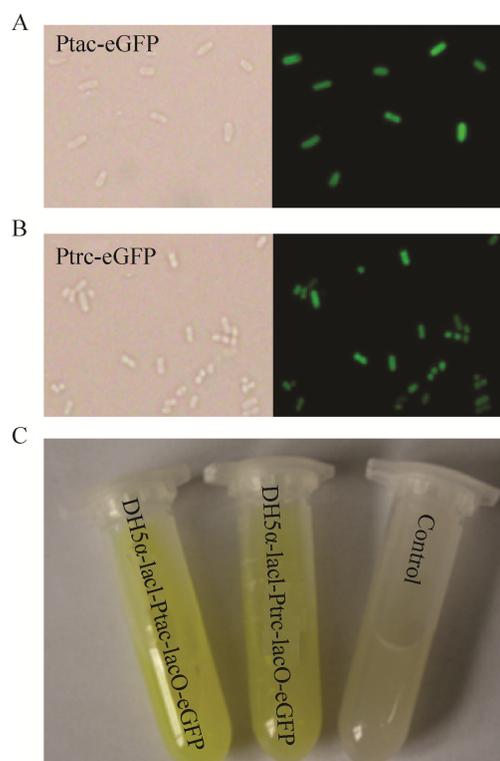


图6 重组大肠杆菌 FL178、FL179 和 FL180 的表型分析

Fig. 6 Phenotypic analysis of recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) FL178, FL179 and FL180. (A) The fluorescent image of the recombinant *E. coli* FL178. (B) The fluorescent image of the recombinant *E. coli* FL179. (C) The image of the recombinant *E. coli* under the normal condition.

因此,基于 pFL-XS-T 载体构建的质粒不仅可以实现与其他来源的 Biobrick 元件进行拼装,而且还可以作为 T 载体,通过 TA 克隆的方式对其中的元件进行建库及高通量筛选。

3 结果与讨论

标准化生物学元件可以大大简化生物基因工程过程。本研究通过利用 *Xcm* I 对商业化载体 pMD18-T 的改造获得了具有 Biobrick 标准的 pFL-XS-T 载体,经实验验证,该载体与片段的连接及重组效率均可以满足实验需求。另外本研究获得的载体同时具备了 Biobrick 标准元件和 T 载体的功能,不仅可以与其他的 Biobrick 标准元件进行装配还可以作为 T 载体用于功能 DNA 元件的筛选,简化了传统 Biobrick 方法,减少了引物合成成本,为以后合成生物学研究提供了一种可选择的平台工具。

REFERENCES

- [1] Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, et al. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2624–2636.
- [2] Knight T. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *Dspace @ MIT*, 2003.
- [3] Lee TS, Krupa RA, Hajimorad M, et al. Biobrick vectors and datasheets: a synthetic biology platform for metabolic engineering. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2010, 239.
- [4] Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA-polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20): 9677–9686.
- [5] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(5): 1154.
- [6] Ichihara Y, Kurosawa Y. Construction of new T-vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*, 1993, 130(1): 153–154.
- [7] Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(5): 1156.
- [8] Mead DA, Pey NK, Herrmstadt C, et al. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology*, 1991, 9(7): 657–663.
- [9] Wang BL, Liang H, Liu R, et al. Construction of a restriction-endonuclease-*Eam*1105 I -generated T-vector for high-throughput cloning and expression. *Biotechnol Appl Bioc*, 2007, 48(1): 29–33.
- [10] Zhao YF, Liu ZC, Yu SY, et al. Construction of a high efficiency PCR products cloning T vector using pGEM-5zf (+). *Avicenna J Med Biotechnol*, 2009, 1(1): 37–39.
- [11] Dimov SG. pSDTV vector: a modification of the pBluescript SK + plus plasmid in order to perform PCR-fragments TA-cloning using *Eam*1105 I restriction endonuclease. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6133–6139.
- [12] Harrison J, Molloy PL, Clark SJ. Direct cloning of polymerase chain reaction products in an *Xcm* I T-vector. *Anal Biochem*, 1994, 216(1): 235–236.
- [13] Borovkov AY, Rivkin MI. *Xcm* I-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques*, 1997, 22(5): 812–814.
- [14] De Vries E. pUCPCR1-A vector for direct cloning of PCR products in a double *Xcm* I restriction site offering compatible single 3'-overhanging T residues. *Mol Biotechnol*, 1998, 10(3): 273–274.
- [15] Arashi-Heese N, Miwa M, Shibata H. *Xcm* I site-containing vector for direct cloning and *in vitro* transcription of PCR product. *Mol Biotechnol*, 1999, 12(3): 281–283.
- [16] Park HK, Zeng CY. Construction of an *Xcm* I -generated T vector bearing green fluorescent protein marker for direct cloning of PCR products. *Anal Biochem*, 2007, 360(1): 144–145.
- [17] Black TA, Cai YP, Wolk CP. Spatial expression and

- autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol Microbiol*, 1993, 9(1): 77–84.
- [18] Elhai J, Wolk CP. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*, 1988, 68(1): 119–138.
- [19] Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, et al. Molecular cloning of the plasmid Rp4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*, 1986, 48(1): 119–131.
- [20] Wu W, Zhang L, Yao L, et al. Genetically assembled fluorescent biosensor for *in situ* detection of bio-synthesized alkanes. *Scientific Reports* 10907 2015.
- [21] Jo C, Jo SA. A simple method to construct T-vectors using *Xcm* I cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid*, 2001, 45(1): 37–40.
- [22] Jun SY, Yoon SJ, Kang SH. One-step preparation of a TA-cloning vector from a specially designed parent plasmid containing a dual *lacZ* gene system. *Mol Biotechnol*, 2010, 45(1): 9–14.
- [23] Gu JS, Ye CJ. pYEMF, a pUC18-derived *Xcm* I T-vector for efficient cloning of PCR products. *Mol Biotechnol*, 2011, 47(3): 229–233.
- [24] Janner CR, Brito ALP, Moraes LMP, et al. pPCV, a versatile vector for cloning PCR products. *Springerplus*, 2013, 2(1): 441.
- [25] Hong SG, Choi JY, Pryor BM, et al. An efficient method to prepare PCR cloning vectors. *Mycobiology*, 2009, 37(3): 240–242.
- [26] Berlec A, Štrukelj B. Generating a custom TA-cloning expression plasmid for *Lactococcus lactis*. *Biotechniques*, 2012, 52(1): 51–53.

(本文责编 郝丽芳)