



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111850037 A

(43)申请公布日 2020.10.30

(21)申请号 201910363046.2

(22)申请日 2019.04.30

(71)申请人 潘雨堃

地址 201100 上海市闵行区都市路2501弄  
148号

(72)发明人 潘雨堃

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253

代理人 冯子玲

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页  
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法

(57)摘要

本发明提供一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,包括步骤:1)构建PB[tet-on-SD]载体,包含piggyBac缺陷转座子、反式四环素调控激活因子rtTA表达框和受tetO操纵子调控启动的剪接供体;2)将PB[tet-on-SD]质粒和编码piggyBac转座酶的质粒同时转染体外培养细胞;3)在培养基中加入四环素衍生物doxycycline药物诱导内源基因过表达;4)对细胞表型进行分析,对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位,从而确定过表达后会引起特定表型的基因。本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,能够在体外培养细胞中高效便捷地进行全基因组过表达的高通量遗传筛选。



1. 一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于,包括:
  - 1) 构建PB[tet-on-SD]载体,包含piggyBac缺陷转座子、反式四环素调控激活因子rtTA表达框和受tetO操纵子调控启动的剪接供体;
  - 2) 将PB[tet-on-SD]质粒和编码piggyBac转座酶的质粒同时转染体外培养细胞,介导PB[tet-on-SD]载体随机插入体外培养细胞基因组;
  - 3) 在培养基中加入四环素衍生物doxycycline药物诱导内源基因过表达;
  - 4) 对细胞表型进行分析,对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位,从而确定过表达后会引入特定表型的基因。
2. 如权利要求1所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

其中,PB[tet-on-SD]载体所包含的元件从5'端到3'端依次是:

PBR:piggyBac转座子右臂;

UBC:人泛素C启动子;

rtTA:反式四环素调控激活因子;

IRES:内部核糖体进入位点序列;

puro:嘌呤霉素puromycin抗性基因;

WPRE:早瀨肝炎病毒转录后调控元件;

PA:兔 $\beta$ -球蛋白polyA;

Ins:绝缘子Insulator序列;

tetO:四环素操纵子序列;

SD:剪接供体序列;

PBL:piggyBac转座子左臂。
3. 如权利要求1所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤4)中,对细胞表型进行分析的步骤包括进行遗传筛选的步骤。
4. 如权利要求1所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

其中,步骤2)中,所述体外细胞采用遗传筛选获得PLX4032耐药的携带BRAF<sup>V600K</sup>突变的黑色素瘤细胞克隆。
5. 如权利要求1所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:

步骤1-1,合成LUN-SD序列,酶切插入缺陷piggyBac转座子AgeI和BglIII位点间,获得PB[SD]载体。
6. 如权利要求5所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:

步骤1-2,合成UBC-rtTA-IRES-puro-WPRE序列(SEQ ID No:2)酶切插入PB[SD]载体MluI和PstI位点间,获得PB[rtTA,SD]载体。
7. 如权利要求6所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:

步骤1-3,使用引物PAF和PAR,以pCAG-EGFP质粒为模板,扩增兔 $\beta$ -球蛋白polyA序列,PstI酶切插入PB[rtTA,tetO-SD]载体PstI位点,获得PB[rtTA-PA,tetO-SD]载体。
8. 如权利要求7所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:

步骤1-4,合成Ins序列(SEQ ID No:7)NotI酶切补平,插入经XbaI酶切补平后的PB[rtTA-PA,tetO-SD]载体,最终获得PB[tet-on-SD]载体。

9.如权利要求1所述的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于:

步骤4)中,对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位的步骤如下:

连有Splinkerette接头的基因组DNA文库经piggyBac转座子臂特异引物(左臂:PBLlink1,SEQ ID No:10)和接头特异引物(LinkAmp1,SEQ ID No:11)进行第一轮PCR扩增。扩增后得到的产物再经piggyBac转座子臂特异引物(左臂:PBLlink2,SEQ ID No:12)和接头特异引物(LinkAmp2,SEQ ID No:13)进行第二轮巢氏PCR扩增。巢氏PCR扩增产物被用于Sanger测序。测序得到的插入位点周旁基因组序列与基因组公开数据库中的序列进行比对,从而确定转座子的插入位点。

## 一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 高通量遗传筛选是通过大规模高效地突变个体或细胞的基因组,而后针对特定生物学表型对突变个体或细胞进行筛选,从而发现在该生物学过程中起作用的基因。高通量遗传筛选被广泛地用于功能基因组研究、药物靶点探索和耐药机理研究。

[0003] 基因突变能造成基因功能的缺失(loss-of-function)或者获得(gain-of-function)。基因过表达是获得型基因突变的一种。目前,高通量基因过表达遗传筛选主要采用在细胞中使用慢病毒导入cDNA文库的方法。该方法涉及cDNA文库建立、慢病毒包装等步骤,操作较为繁琐。cDNA文库的组织来源和质量直接限制了遗传筛选对基因组的覆盖度。

[0004] 迄今为止,在生物学领域还缺乏一种在体外培养细胞中高效便捷地进行全基因组过表达高通量遗传筛选的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于piggyBac转座子随机诱导内源基因过表达进行高通量遗传筛选的方法。以在体外培养细胞中高效便捷地进行过表达高通量遗传筛选。

[0006] 本发明采用了如下技术方案:

[0007] 一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0008] 1) 构建PB[tet-on-SD]载体,包含piggyBac缺陷转座子、反式四环素调控激活因子rtTA表达框和受tetO操纵子调控启动的剪接供体;

[0009] 2) 将PB[tet-on-SD]质粒和编码piggyBac转座酶的质粒同时转染体外培养细胞,介导PB[tet-on-SD]载体随机插入体外培养细胞基因组;

[0010] 3) 在培养基中加入四环素衍生物doxycycline药物诱导内源基因过表达;

[0011] 4) 对细胞表型进行分析,对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位,从而确定过表达后会引起特定表型的基因。

[0012] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法, PB[tet-on-SD]载体所包含的元件从5'端到3'端依次是:

[0013] PBR: piggyBac转座子右臂;

[0014] UBC: 人泛素C启动子;

[0015] rtTA: 反式四环素调控激活因子;

[0016] IRES: 内部核糖体进入位点序列;

[0017] puro: 嘌呤霉素puromycin抗性基因;

[0018] WPRE: 旱瀨肝炎病毒转录后调控元件;

[0019] PA: 兔 $\beta$ -球蛋白polyA;

- [0020] Ins:绝缘子Insulator序列;
- [0021] tet0:四环素操纵子序列;
- [0022] SD:剪接供体序列;
- [0023] PBL:piggyBac转座子左臂。
- [0024] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:步骤4)中,对细胞表型进行分析的步骤包括进行遗传筛选的步骤。
- [0025] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:其中,步骤2)中,所述体外细胞采用遗传筛选获得PLX4032 耐药的携带BRAF<sup>V600K</sup>突变的黑色素瘤细胞克隆。
- [0026] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:
- [0027] 步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:
- [0028] 步骤1-1,合成LUN-SD序列,酶切插入缺陷piggyBac转座子AgeI 和BglIII位点间,获得PB[SD]载体。
- [0029] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:
- [0030] 步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:
- [0031] 步骤1-2,合成UBC-rtTA-IRES-puro-WPRE序列 (SEQ ID No:2) 酶切插入PB[SD]载体MluI和PstI位点间,获得PB[rtTA,SD]载体。
- [0032] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:
- [0033] 步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:
- [0034] 步骤1-3,使用引物PAF和PAR,以pCAG-EGFP质粒为模板,扩增兔β-球蛋白polyA序列,PstI酶切插入PB[rtTA,tet0-SD]载体PstI位点,获得PB[rtTA-PA,tet0-SD]载体。
- [0035] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:步骤1)中,构建PB[tet-on-SD]载体包括:
- [0036] 步骤1-4,合成Ins序列 (SEQ ID No:7)NotI酶切补平,插入经 XbaI酶切补平后的PB[rtTA-PA,tet0-SD]载体,最终获得PB[tet-on-SD] 载体。
- [0037] 进一步,本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,还具有这样的特征:
- [0038] 步骤4)中,对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位的步骤如下:
- [0039] 连有Splinkerette接头的基因组DNA文库经piggyBac转座子臂特异引物(左臂:PBLlink1,SEQ ID No:10)和接头特异引物(LinkAmp1, SEQ ID No:11)进行第一轮PCR扩增。扩增后得到的产物再经piggyBac 转座子臂特异引物(左臂:PBLlink2,SEQ ID No:12)和接头特异引物 (LinkAmp2,SEQ ID No:13)进行第二轮巢氏PCR扩增。巢氏PCR扩增产物被用于Sanger测序。测序得到的插入位点周旁基因组序列与基因组公开数据库中的序列进行比对,从而确定转座子的插入位点。
- [0040] 发明的有益效果
- [0041] 本发明的piggyBac转座子高通量遗传筛选方法,能够在体外培养细胞中高效便捷地进行全基因组过表达的高通量遗传筛选。

## 附图说明

- [0042] 图1是本发明PB[tet-on-SD]载体的示意图。

[0043] 图2是PB[tet-on-SD]载体介导体外培养细胞内源基因过表达的方案示意图。

[0044] 图3是本发明piggyBac转座子基因过表达高通量遗传筛选应用于耐药机理研究的一个实施例。

### 具体实施方式

[0045] 以下结合附图来说明本发明的具体实施方式。

[0046] 本发明在体外培养细胞中高效便捷地进行全基因组过表达高通量遗传筛选的一个实施例中,携带tet-on系统的piggyBac转座子被用于诱导转座子插入位点旁内源基因条件性过表达,从而进行耐药机理研究的遗传筛选。

[0047] 在制备本实施例中携带tet-on系统的piggyBac转座子载体的过程中,所涉及的质粒抽提,质粒转化,大肠杆菌培养,PCR,酶切,Klenow 酶补平,连接为本领域人员所熟知的实验。常规实验条件可参照M.R.格林和J.萨姆布鲁克编著的《分子克隆实验指南》第四版。

[0048] 携带tet-on系统的piggyBac转座子载体PB[tet-on-SD]的具体建立步骤是:

[0049] 合成LUN-SD序列,见SEQ ID No:1,酶切插入缺陷piggyBac转座子AgeI和BglIII位点间,获得PB[SD]载体。

[0050] 合成UBC-rtTA-IRES-puro-WPRE序列,见SEQ ID No:2,酶切插入 PB[SD]载体MluI和PstI位点间,获得PB[rtTA,SD]载体。

[0051] 合成tet0序列,见SEQ ID No:3,酶切插入XbaI和AgeI位点间,获得PB[rtTA,tet0-SD]载体。

[0052] 使用引物PAF,见SEQ ID No:4,和PAR,见SEQ ID No:5,以pCAG-EGFP 质粒(购自Addgene)为模板,扩增兔 $\beta$ -球蛋白polyA序列,见SEQ ID No:5,PstI酶切插入PB[rtTA,tet0-SD]载体PstI位点,获得 PB[rtTA-PA,tet0-SD]载体。

[0053] 合成Ins序列,见SEQ ID No:7,NotI酶切补平,插入经XbaI酶切补平后的PB[rtTA-PA,tet0-SD]载体,最终获得PB[tet-on-SD]载体,如图1所示。

[0054] 图1为本发明PB[tet-on-SD]载体构建的示意图,该构建所包含的元件从5'端到3'端依次是:PBR:piggyBac转座子右臂;UBC:人泛素C启动子;rtTA:反式四环素调控激活因子;IRES:内部核糖体进入位点序列;puro:嘌呤霉素puromycin抗性基因;WPRE:早瀨肝炎病毒转录后调控元件;PA:兔 $\beta$ -球蛋白polyA;Ins:绝缘子Insulator序列;tet0:四环素操纵子序列;SD:剪接供体序列;PBL:piggyBac转座子左臂。PB[tet-on-SD]载体导入细胞后,随机插入细胞基因组,rtTA 读框表达rtTA蛋白,在Dox诱导下,激活tet0,介导内源基因过表达,如图2所示。

[0055] 在应用PB[tet-on-SD]载体在体外培养细胞中进行内源基因过表达高通量遗传筛选的一个实施例中,PB[tet-on-SD]载体被用于黑色素瘤靶向药物PLX4032的耐药机理研究。

[0056] 由患者分离获得的携带BRAF<sup>V600K</sup>突变的YUMAC黑色素瘤细胞单层贴壁培养于培养皿上,培养基的成分为:OptiMEM(购自Gibco),5%小牛血清(购自Gibco),1%的双抗。培养箱条件设定为37°C,5%CO<sub>2</sub>,90-95%湿度。

[0057] 将PB[tet-on-SD]转座子的核酸和编码piggyBac转座酶的核酸各1 $\mu$ g与10 $\mu$ L Lipofectamine 2000脂质体(购自Invitrogen)混合于500  $\mu$ L Opti-MEM培养基中。随后,滴

加至单层贴壁培养YUMAC细胞并含2mL 培养基的6孔板内。次日将6孔板一个孔的细胞转移至10cm培养皿中,并在培养基中加入2 $\mu$ g/ml puromycin(购自Invitrogen),200ng/mL doxycycline(购自sigma),1.5 $\mu$ M PLX4032(购自sigma),筛选两周,得到携带转座子并且PLX4032耐药的YUMAC细胞克隆。

[0058] 在对具有特定表型的细胞克隆进行插入突变定位的一个实施例中,Splinkerette-PCR被用于定位PLX4032耐药的YUMAC细胞克隆中 PB[tet-on-SD]转座子的插入位置。

[0059] 对PLX4032耐药的YUMAC细胞克隆进行细胞扩增并使用QIAGEN试剂盒提取基因组DNA。2 $\mu$ g细胞基因组DNA在30 $\mu$ L反应体系中经Sau3AI 酶酶切后,在DNA片段两端同时加上Splinkerette接头,具体步骤为:将SpLink1,如SEQ ID No:8所示,和SpLink2,如SEQ ID No:9所示,寡核苷酸分别溶解于5X 2号NEB缓冲液中至50 $\mu$ M,1:1混合SpLink1 和SpLink2接头引物溶液至每个引物终浓度25 $\mu$ M,混合液-20度冻存。在冰上溶解接头引物混合物,每300 $\mu$ g酶切后的基因组产物使用1 $\mu$ L 的接头混合物。在PCR仪上,接头引物先于95度5min变性,然后以每 15秒降低1度的速度,退火至室温,形成双链接头。最后在40 $\mu$ L反应体系中,用T4连接酶将接头连接至经Sau3AI酶切的基因组DNA片段上。

[0060] 连有Splinkerette接头的基因组DNA文库经piggyBac转座子臂特异引物,左臂:PBLlink1,如SEQ ID No:10所示,和接头特异引物LinkAmp1, 如SEQ ID No:11所示,进行第一轮PCR扩增。扩增后得到的产物再经piggyBac转座子臂特异引物,左臂:PBLlink2,如SEQ ID No:12所示,和接头特异引物LinkAmp2,如SEQ ID No:13所示,进行第二轮巢氏PCR 扩增。巢氏PCR扩增产物被用于Sanger测序。测序得到的插入位点周旁基因组序列与基因组公开数据库中的序列进行比对,从而确定转座子的插入位点。

[0061] 本实施例结果发现,其中一个耐药细胞克隆携带的转座子插入突变被定位于第10号内含子。在Dox药物诱导下,荧光定量PCR结果(检测引物为SEQ ID No:14和SEQ ID No:15,内参引物如SEQ ID No:16和 SEQ ID No:17所示,BRAF蛋白C端被过表达。

[0062] 图3显示了在Dox药物诱导下,荧光定量PCR结果显示,BRAF蛋白被过表达的情况。遗传筛选获得PLX4032耐药的携带BRAF<sup>V600K</sup>突变的黑色素瘤细胞克隆,转座子插入突变被定位于第10号内含子。在Dox药物诱导下,荧光定量PCR结果显示,BRAF蛋白C端被过表达。

[0063] 在本发明的另一些实施例中,PB[tet-on-SD]转座子系统可以通过磷酸钙转染、聚乙二醇-聚乙烯亚胺共聚物转染、或电穿孔转染导入体外培养的动物细胞。

[0064] 在本发明的另一些实施方式中,PB[tet-on-SD]转座子系统可以被用于功能基因组研究、药物靶点探索和耐药机理研究。

## SEQUENCE LISTING

<110> 潘雨堃

<120> 一种 piggyBac 转座子高通量遗传筛选方法

<130> JSP11901818

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 191

<212> DNA

<213> artificial

<400> 1

accggtcgct acttgacca gaacgccgc gaggatctct caggtaataa agagcgccaa 60

ggctggctgc aagcggagcc tctgagagcc tctgagggcc agggctactg cacccttggt 120

[0065] cctcaacgct ggggtcttca gaactagaat gctgggggtg gggtagggat tcggttcct 180

attccagatc t 191

<210> 2

<211> 3834

<212> DNA

<213> artificial

<400> 2

acgcgtggcc tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg cgccccctc ctacggcga 60

gcgctgccac gtcagacgaa gggcgcagcg agcgtcctga tcctccgcc cggacgtca 120

ggacagcggc ccgtgctca taagactcgg ccttagaacc ccagtatcag cagaaggaca 180

tttaggacg ggacttgggt gactctaggg cactggtttt cttccagag agcggaacag 240

gcgaggaaaa gtagtcctt ctcggcgatt ctgcggagg atctccgtgg ggcggtgaac 300

gccgatgatt atataaggac gcgccgggtg tggcacagct agttccgtcg cagccgggat 360



	ttgggtcgcg gttcttgttt gtggatcgc tggatcgtca cttggtgagt agcgggctgc	420
	tgggctggcc ggggctttcg tggcccccgg gccgctcggg gggacggaag cgtgtggaga	480
	gaccgccaag ggctgtagtc tgggtccgcg agcaaggttg ccctgaactg ggggttgggg	540
	ggagcgcagc aaaatggcgg ctgttcccga gtcttgaatg gaagacgctt gtgaggcggg	600
	ctgtgaggtc gttgaaacaa ggtggggggc atggtgggcg gcaagaacct aagtccttga	660
	ggccttcgct aatgcgggaa agctcttatt cgggtgagat gggctggggc accatctggg	720
	gacctgacg tgaagtttgt cactgactgg agaactcggg ttgtcgtctg ttgcgggggc	780
	ggcagttatg gcggtgccgt tgggcagtgc acccgtacct ttgggagcgc gcgccctcgt	840
	cgtgtcgtga cgtcaccctg tctgttggt tataatgcag ggtggggcca cctgccgta	900
	ggtgtcggg aggcttttct ccgtcgcagg acgcagggtt cgggcctagg gtagctctc	960
	ctgaatcgac aggcgccgga cctctggtga ggggaggat aagtgaggcg tcagtttctt	1020
[0066]	tggtcggttt tatgtaccta tcttcttaag tagctgaagc tccggttttg aactatgcgc	1080
	tcggggttgg cgagtgtgtt ttgtgaagtt ttttaggcac cttttgaaat gtaatcattt	1140
	gggtcaatat gtaattttca gtgtagact agtaaattgt ccgctaaatt ctggccgttt	1200
	ttggcttttt tgtagacgc tagcggatcc ataacttcgt atagtataca ttatacgaag	1260
	ttatgccacc atgtctaggc tggacaagag caaagtcata aacggagctc tggaattact	1320
	caatggtgtc ggtatcgaag gcctgacgac aaggaaactc gctcaaaagc tgggagttga	1380
	gcagcctacc ctgtactggc acgtgaagaa caagcgggcc ctgctcgatg ccctgccaat	1440
	cgagatgctg gacaggcatc ataccactt ctgccccctg gaaggcgagt catggcaaga	1500
	ctttctgcgg aacaacgcca agtcataccg ctgtgctctc ctctcacatc gcgacggggc	1560
	taaagtgcac ctcggcaccc gcccaacaga gaaacagtac gaaaccctgg aaaatcagct	1620
	cgcgttcctg tgtagcaag gcttctccct ggagaacgca ctgtacgctc tgtccgccgt	1680

	gggccacttt acactgggct gcgtattgga ggaacaggag catcaagtag caaaagagga	1740
	aagagagaca cctaccaccg attctatgcc cccacttctg agacaagcaa ttgagctggt	1800
	cgaccggcag ggagccgaac ctgccttctt tttcggcctg gaactaatca tatgtggcct	1860
	ggagaaacag ctaaagtgcg aaagcggcgg gccgaccgac gcccttgacg attttgactt	1920
	agacatgctc ccagccgatg cccttgacga ttttgacctt gacatgctcc ccgggtaaat	1980
	aacttcgtat agtatacatt atacgaagtt atggatccgc ggccgcaaat tccgccctc	2040
	tcctcccc cccctaag ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt	2100
	tgtctatatg ttattttcca ccatattgcc gtcttttggc aatgtgaggg cccggaacc	2160
	tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggcttttcc cctctcgcca aaggaatgca	2220
	aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac	2280
	gtctgtagcg accctttgca ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg	2340
[0067]	ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccagtc gccacgttgt	2400
	gagttgata gttgtgaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct	2460
	gaaggatgcc cagaaggtac ccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg	2520
	ctttacatgt gtttagtga ggttaaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt	2580
	ggttttcctt tgaaaaacac gataatacca tggccaccga gtacaagccc acggtgcgcc	2640
	tcgccaccg cgacgacgc cccggggcgg tacgaccct cgccgccggt ttcgccgact	2700
	acccgccac gcgccacacc gtcgaccgg accgccacat cgagcgggtc accgagctgc	2760
	aagaactctt cctcacgcgc gtcgggctcg acatcgcaa ggtgtgggtc gcggacgacg	2820
	gcgccgcggt ggcggtctgg accacgccg agagcgtcga agcgggggcg gtgttcgccg	2880
	agatcggctc gcgcatggcc gagttgagcg gttcccggct ggccgcgag caacagatgg	2940
	aaggctcct ggcgccgac cggcccaagg agcccgcgtg gttcctggcc accgtcggcg	3000

tctcgcccga ccaccagggc aagggctctgg gcagcgccgt cgtgctcccc ggagtggagg 3060

cggccgagcg cgctgggggtg cccgccttcc tggagacctc cgcgccccgc aacctcccct 3120

tctacgagcg gctcggcttc accgtcaccg ccgacgtcga ggtgccccgaa ggaccgcgca 3180

cctgggtgcat gacccgcaag cccggtgcct gaggttcgcgt ctggaacaat caacctctgg 3240

attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct ttacgctat 3300

gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt 3360

tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagtgtggt cccgttgcca 3420

ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg 3480

ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg 3540

aactcatcgc cgcctgcctt gcccgtgct ggacaggggc tcggctgttg ggactgaca 3600

[0068] attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca 3660

cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc 3720

ttccttcccg cggcctgctg ccggtctgct ggccctcttc gcgtcttgc cttcgcctc 3780

agacgagtcg gatctcctt tggcgcctt ccccgctgg aattaattct gcag 3834

<210> 3

<211> 290

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

ctagacgagt ttactcccta tcagtgatag agaacgatgt cgagtttact ccctatcagt 60

gatagagaac gtatgtcgag ttactccct atcagtgata gagaacgtat gtcgagtta 120

ctccctatca gtgatagaga acgtatgtcg agtttatccc tatcagtgat agagaacgta 180

tgtcgagttt actccctatc agtgatagag aacgtatgtc gaggtaggcg tgtacggtgg 240

	gaggcctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcaccggt	290
	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 4	
	aaactgcaga attcactcct caggtgc	27
	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 5	
	ttaaaagctt gggtgcagg tcgagggatc	30
[0069]	<210> 6	
	<211> 544	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 6	
	gaattcactc ctcaggtgca gggctgccta tcagaaggtg gtggctggtg tggccaatgc	60
	cctggctcac aaataccact gagatctttt tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat	120
	gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt	180
	gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa	240
	acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc tggtgccat	300
	gaacaaaggt tggtataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc	360
	cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagatTTTT tttatatttt gttttgtgtt	420
	atTTTTtct ttaacatccc taaaattttc cttacatggt ttactagcca gatTTTTtct	480
	cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat ccctcgacct	540

gcag	544
<210> 7	
<211> 1229	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 7	
gcggccgcat ccccgggtac cgagttggcg gccttgagc tcacggggac agccccccc	60
caaagcccc agggatgtaa ttacgtccct cccccctag ggggcagcag cgagccgccc	120
ggggctccgc tccggtccgg cgctcccc ccatccccga gccggcagcg tgcggggaca	180
gcccgggcac ggggaaggtg gcacgggatc gctttcctct gaacgcttct cgctgctctt	240
tgagcctgca gacacctggg gggatacggg gaaaaagctt taggctgaaa gagagattta	300
gaatgacagg cgcgcctgga gtcacgggg acagcccc cccaaagccc ccagggatgt	360
[0070] aattacgtcc ctccccgct agggggcagc agcgagccgc ccggggctcc gctccggtcc	420
ggcgtcccc ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga cagcccgggc acggggaagg	480
tggcacggga tcgctttcct ctgaacgctt ctcgctgctc tttgagcctg cagacacctg	540
ggggatacag gggaaaaagc tttaggctga aagagagatt tagaatgaca ggcgcgccaa	600
ctcgaattac ggccggccgc atccccgggt accgagttgg cgcgcctgga gtcacgggg	660
acagcccc cccaaagccc ccagggatgt aattacgtcc ctccccgct agggggcagc	720
agcgagccgc ccggggctcc gctccggtcc ggcgtcccc ccgcatcccc gagccggcag	780
cgtgcgggga cagcccgggc acggggaagg tggcacggga tcgctttcct ctgaacgctt	840
ctcgtgctc tttgagcctg cagacacctg ggggatacag gggaaaaagc tttaggctga	900
aagagagatt tagaatgaca ggcgcgctg gagtcacgg ggacagcccc ccccaaagc	960
ccccagggat gtaattacgt ccctcccc ctagggggca gcagcgagcc gcccgggct	1020

ccgctccggt ccggcgctcc ccccgatcc ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg 1080  
 gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagcc 1140  
 tgcagacacc tggggggata cggggaaaaa gcttttagct gaaagagaga tttagaatga 1200  
 caggcgcgcc aactcgaatt agcggccgc 1229

<210> 8  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<400> 8  
 cgaagagtaa ccgttgctag gagagaccgt ggctgaatga gactggtgtc gacactagtg 60  
 g 61

[0071]

<210> 9  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> aritificia

<400> 9  
 gatcccacta gtgtcgacac cagtctctaa tttttttttt caaaaaaa 48

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<400> 10  
 cagtgacact taccgattg acaagcacgc 30

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<400> 11

	cgaagagtaa ccgttgctag gagagacc	28
	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 12	
	gagagagcaa tatttcaaga atgcatgcgt	30
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> aritfficia	
	<400> 13	
	gtggctgaat gagactggtg tcgac	25
[0072]	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 14	
	gctccagctt gtatcaccat c	21
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 15	
	ggatgattga cttggcgtgt	20
	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> artificial	

---

	<400> 16	
	accgagcgcg gctacag	17
	<210> 17	
[0073]	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<400> 17	
	cttaatgtca cgcacgattt cc	22



## 序列表

&lt;110&gt; 潘雨堃

&lt;120&gt; 一种piggyBac转座子高通量遗传筛选方法

&lt;130&gt; JSP11901818

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 1

accggtcgct acttgcacca gaacgcccgc gaggatctct caghtaataa agagcgccaa 60

ggctggctgc aagcggagcc tctgagagcc tctgagggcc agggctactg cacccttggt 120

cctcaacgct ggggtcttca gaactagaat gctgggggtg ggggtgggat tcggttcct 180

attccagatc t 191

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3834

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 2

acgcgtggcc tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg cgccccctc ctcacggcga 60

gcgctgccac gtcagacgaa gggcgcagcg agcgtcctga tccttcgcc cggacgctca 120

ggacagcggc ccgctgctca taagactcgg ccttagaacc ccagtatcag cagaaggaca 180

ttttaggacg ggacttgggt gactctaggg cactggtttt cttccagag agcggaacag 240

gcgaggaaaa gtagtccctt ctccggcatt ctgcggaggg atctccgtgg ggcggtgaac 300

gccgatgatt atataaggac gcgcccgggtg tggcacagct agttccgtcg cagccgggat 360

ttgggtcgcg gttcttgttt gtggatcgct gtgatcgta cttggtgagt agcgggctgc 420

tgggctggcc ggggctttcg tggccgccgg gccgctcggg gggacggaag cgtgtggaga 480

gaccgccaag ggctgtagtc tgggtccgcg agcaaggtt cctgaactg ggggttgggg 540

ggagcgcagc aaaaatggcgg ctgttcccga gtcttgaatg gaagacgctt gtgaggcggg 600

ctgtgaggtc gttgaaacaa ggtggggggc atggtgggcg gcaagaacc aaggtcttga 660

ggccttcgct aatgcgggaa agctcttatt cgggtgagat gggctggggc accatctggg 720

gaccctgacg tgaagtttgt cactgactgg agaactcggg ttgtcgtctg ttgcgggggc 780

ggcagttatg gcggtgccgt tgggcagtgc acccgtacct ttgggagcgc gcgccctcgt 840

cgtgtcgtga cgtcaccgct tctgttggct tataatgcag ggtggggcca cctgccggt 900

gggtgtcggt aggttttct ccgtcgcagg acgcagggtt cgggcctagg gtaggctctc 960

ctgaatcgac aggcgccgga cctctggtga ggggaggat aagtgaggcg tcagtttctt 1020

tggtcggttt tatgtaccta tcttcttaag tagctgaagc tccggttttg aactatgcgc 1080

tcggggttgg cgagtgtgtt ttgtgaagtt ttttaggcac cttttgaaat gtaatcattt 1140  
gggtcaatat gtaattttca gtgtagact agtaaattgt ccgctaaatt ctggccgttt 1200  
ttggcttttt tgtagacgc tagcggatcc ataacttctg atagtataca ttatacgaag 1260  
ttatgccacc atgtctaggc tggacaagag caaagtcata aacggagctc tgggaattact 1320  
caatgggtgtc ggtatcgaag gcctgacgac aaggaaactc gctcaaaagc tgggagttga 1380  
gcagcctacc ctgtactggc acgtgaagaa caagcgggcc ctgctcgatg ccctgccaat 1440  
cgagatgctg gacaggcatc ataccactt ctgccccctg gaaggcgagt catggcaaga 1500  
ctttctgcgg aacaacgcca agtcataaccg ctgtgctctc ctctcacatc gcgacggggc 1560  
taaagtgcac ctccggcacc gcccaacaga gaaacagtac gaaaccctgg aaaatcagct 1620  
cgcgttcctg tgtcagcaag gcttctcctt ggagaacgca ctgtacgctc tgtccgccgt 1680  
gggccacttt aactggggtt gcgtattgga ggaacaggag catcaagtag caaaagagga 1740  
aagagagaca cctaccaccg attctatgcc cccacttctg agacaagcaa ttgagctggt 1800  
cgaccggcag ggagccgaac ctgccttctt tttcggcctg gaactaatca tatgtggcct 1860  
ggagaaacag ctaaagtgcg aaagcggcgg gccgaccgac gcccttgacg attttgactt 1920  
agacatgctc ccagccgatg cccttgacga ttttgacctt gacatgctcc ccgggtaaat 1980  
aacttcgtat agtatacatt atacgaagtt atggatccgc ggccgcaaat tccgccctc 2040  
tccctcccc ccccctaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt 2100  
tgtctatatg ttattttcca ccatattgcc gtcttttggc aatgtgaggg cccggaaacc 2160  
tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggcttttcc cctctcgcca aaggaatgca 2220  
aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac 2280  
gtctgtagcg accctttgca ggacgggaa cccccacct ggccgacaggt gcctctgcgg 2340  
ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaagcggca caacccagct gccacgttgt 2400  
gagttggata gttgtggaaa gagtcaaatg gctctctca agcgtattca acaaggggt 2460  
gaaggatgcc cagaaggtac cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg 2520  
ctttacatgt gtttagtcga ggttaaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt 2580  
ggttttcctt tgaaaaacac gataatacca tggccaccga gtacaagccc acggtgcgcc 2640  
tcgccaccgc cgacgacgtc cccggggccg tacgcacct cgcgcccgcg ttcgccgact 2700  
accccgccac gcgccacacc gtcgaccgg accgccat cgagcgggtc accgagctgc 2760  
aagaactctt cctcacgcgc gtcgggctcg acatcggcaa ggtgtgggtc gcggacgacg 2820  
gcgcccggtt ggccgtctgg accacgccgg agagcgtcga agcggggcg gtgttcgccg 2880  
agatcggctc gcgcatggcc gagttgagcg gttcccggct ggccgcgag caacagatgg 2940  
aaggcctcct ggcccgcac cggcccaagg agcccgtg gttctggcc accgtcggcg 3000  
tctcgcccga ccaccagggc aagggtctgg gcagcgcgt cgtgctccc ggagtggagg 3060  
cggccgagcg cgtggggtg cccgccttc tggagacct cgcgccccgc aacctccct 3120  
tctacgagcg gctcggttc accgtaccg ccgacgtcga ggtgcccga ggaccgcga 3180  
cctggtgcat gaccgcaag cccggtgctt gagttcgtt ctggaacaat caacctctgg 3240  
attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggtt ttcttaacta tgttctctt tttacgtat 3300  
gtggatacgc tgctttaatg cttttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt 3360  
tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca 3420

ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt tggggcattg 3480  
 ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tegettcc cctccctatt gccacggcgg 3540  
 aactcatcgc cgcctgcctt gcccgtgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca 3600  
 attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt ctttccatg gctgctgcc tgtgttgcca 3660  
 cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc 3720  
 ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggctcttcc gcgtcttgc cttgcacctc 3780  
 agacgagtcg gatctccctt tgggccgct ccccgctgg aattaattct gcag 3834

<210> 3

<211> 290

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

ctagacgagt ttactcccta tcagtgatag agaacgatgt cgagtttact ccctatcagt 60  
 gatagagAAC gtatgtcgag tttactccct atcagtgata gagaacgtat gtcgagttta 120  
 ctccctatca gtgatagaga acgtatgtcg agtttatccc tatcagtgat agagaacgta 180  
 tgtcgagttt actccctatc agtgatagag aacgtatgtc gaggtaggcg tgtacggtgg 240  
 gaggcctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcaccggt 290

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<400> 4

aaactgcaga attcactcct caggtgc 27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

ttaaaagctt gggctgcagg tcgagggatc 30

<210> 6

<211> 544

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6

gaattcactc ctcaggtgca gggctgccta tcagaaggtg gtggctggtg tggccaatgc 60  
 cctggctcac aaatacact gagatctttt tcctctgcc aaaaattatg gggacatcat 120  
 gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttatcttca ttgcaatagt 180  
 gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa 240  
 acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc tggctgccat 300

gaacaaaggt tggctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc 360  
 cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagatTTTT tttatatttt gttttgtgtt 420  
 atttttttct ttaacatccc taaaattttc cttacatggt ttactagcca gatttttctc 480  
 cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat ccctcgacct 540  
 gcag 544

<210> 7

<211> 1229

<212> DNA

<213> artificial

<400> 7

gcggccgcat cccccgggtac cgagttggcg cgcttgagc tcacggggac agcccccccc 60  
 caaagcccc agggatgtaa ttacgtccct cccccctag ggggcagcag cgagccgccc 120  
 ggggctccgc tccggtccgg cgtcccccc gcateccccga gccggcagcg tgcggggaca 180  
 gcccggggcac ggggaaggtg gcacgggatc gtttctctt gaacgcttct cgtgtctctt 240  
 tgagcctgca gacacctggg gggatacggg gaaaaagctt taggctgaaa gagagattta 300  
 gaatgacagg cgcgcctgga gctcacgggg acagcccccc cccaaagccc ccagggatgt 360  
 aattacgtcc ctccccgct agggggcagc agcgagccgc ccggggctcc gctccggtcc 420  
 ggcgctcccc ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga cagcccgggc acggggaagg 480  
 tggcacggga tcgctttcct ctgaacgctt ctcgctgctc tttgagcctg cagacacctg 540  
 gggggatac gggaaaaagc tttaggctga aagagagatt tagaatgaca ggcgcgcca 600  
 ctgcaattac ggccggccgc atccccgggt accgagttgg cgcgcctgga gctcacgggg 660  
 acagcccccc cccaaagccc ccagggatgt aattacgtcc ctccccgct agggggcagc 720  
 agcgagccgc ccggggctcc gctccggtcc ggcgctcccc ccgcatcccc gagccggcag 780  
 cgtgcgggga cagcccgggc acggggaagg tggcacggga tcgctttcct ctgaacgctt 840  
 ctcgctgctc tttgagcctg cagacacctg gggggatac gggaaaaagc tttaggctga 900  
 aagagagatt tagaatgaca ggcgcgctg gagctcacgg ggacagcccc ccccaaaagc 960  
 ccccagggat gtaattacgt ccctccccg ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct 1020  
 ccgctccggt ccggcgctcc ccccgatcc ccgagccgc agcgtgcggg gacagcccgg 1080  
 gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagcc 1140  
 tgcagacacc tggggggata cggggaaaaa gctttaggct gaaagagaga tttagaatga 1200  
 caggcgcgcc aactcgaatt agcggccgc 1229

<210> 8

<211> 61

<212> DNA

<213> artificial

<400> 8

cgaagagtaa ccgttgctag gagagaccgt ggctgaatga gactggtgtc gacactagt 60  
 g 61

<210> 9

<211> 48  
<212> DNA  
<213> aritificia  
<400> 9  
gatcccacta gtgtcgacac cagtctctaa tttttttttt caaaaaaa 48  
<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 10  
cagtgacact taccgcattg acaagcacgc 30  
<210> 11  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 11  
cgaagagtaa ccgttgctag gagagacc 28  
<210> 12  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 12  
gagagagcaa tatttcaaga atgcatgcgt 30  
<210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> aritficia  
<400> 13  
gtggctgaat gagactggtg tcgac 25  
<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 14  
gctccagctt gtatcaccat c 21  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<400> 15  
ggatgattga cttggcgtgt 20  
<210> 16  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 16  
accgagcgcg gctacag 17  
<210> 17  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 17  
cttaatgtca cgcacgattt cc 22



图1

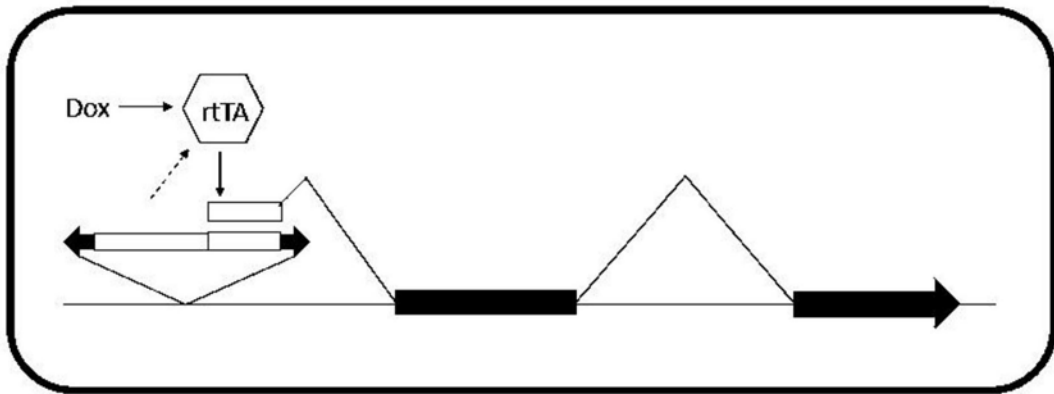


图2

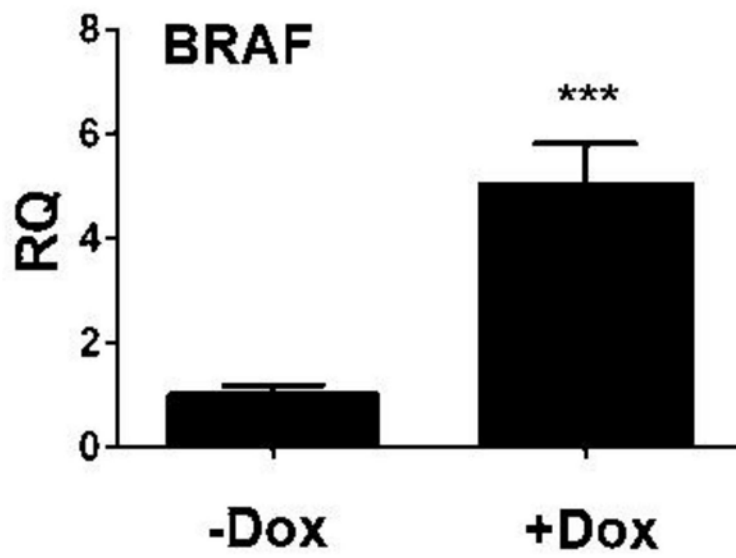


图3