



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101210240 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200710060155. 4

(22) 申请日 2007. 12. 25

(73) 专利权人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路 92 号

(72) 发明人 赵广荣 祝琳琪 元英进 刘春杰
黄超

(74) 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司
12207

代理人 赵敬

(51) Int. Cl.

C12N 15/01 (2006. 01)

C12N 15/21 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6673610 B2, 2004. 01. 06, 全文.

CN 101024827 A, 2007. 08. 29, 全文.

何金生. 用大引物 PCR 法获得轮状病毒 VP4 基因的突变体. 安徽医科大学学报 37

1. 2002, 37(1), 8-10.

COLOSIMO A, ET AL, . SIMPLE VERSION OF "MEGAPRIMER" PCR FOR SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. BIOTECHNIQUES26

5. 1999, 26(5), 870-873.

审查员 吴汀晨

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

大引物 PCR 进行定点突变的方法

(57) 摘要

本发明提供一种大引物 PCR 进行定点突变的方法。首先由突变引物和相应的外侧引物进行第一步 PCR, 其产物即大引物不需纯化, 与加入另一外侧引物引发第二轮 PCR 扩增出目标片段。本发明克服了常规大引物和外侧引物退火温度 (T_m) 相差显著的要求, 并使突变效率达到 100%, 适合实验室分子生物学手段研究。

1. 一种大引物 PCR 进行定点突变的方法,其特征在于包括的步骤:

编码人干扰素 α 2b 氨基酸的原始序列 IFN- α 2b 为模板,498bp,根据该原序列模板设计的上、下游引物和 2 个突变引物:

上游引物:5' -CAT AAG CTT ATG TGT GAT CTG CCT CAA-3'

下游引物:5' -GTC GAA TTC TTC CTT ACT TCT TAA TCT-3'

突变引物 1:5' -TGT GTG ATA CAG GAG GTG GGG GTG GAG GAG ACT CCC CTG-3'

突变引物 2:5' CTC ATG GAG GAC GCT GAT GGC CTG AGC CTT TTG GAA-3'

1) 首先由突变引物和其对应的外侧引物引发第一轮 PCR 反应,扩增出含突变基因片段,即大引物;

PCR 反应体系:10 μ l Buffer 缓冲液,8 μ l dNTP,2 μ l 下游引物,2 μ l 突变引物 1,1 μ l 干扰素原始序列为模板,76 μ l 超纯水,1 μ l pfu 酶;

第一轮 PCR 反应条件:94°C 变性 4min,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 30s;

94°C 变性 40s,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 30s;24 个循环;

94°C 变性 40s,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 5min;

2) 产物不需纯化,直接在同一反应管中加入另一外侧引物、四种脱氧核糖核酸 dNTP 和 DNA 聚合酶 pfu 酶,引发第二轮 PCR 反应;

PCR 反应体系:10 μ l Buffer 缓冲液,8 μ l dNTP,2 μ l 上游引物,1 μ l pfu 酶;

第二轮 PCR 反应条件:94°C 变性 40s,68°C 下退火 25s,72°C 下延伸 1min;10 个循环;

94°C 变性 40s,55°C 下退火 25s,72°C 下延伸 1min;12 个循环;

最后 72°C 下延伸 5min。

大引物 PCR 进行定点突变的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及定点突变的聚合酶链式反应,特别是一种大引物 PCR 进行定点突变的方法。首先由突变引物和相应的外侧引物进行第一步 PCR,其产物即大引物不需纯化,与加入另一外侧引物引发第二轮 PCR 扩增出目标片段。本发明是克服了常规大引物和外侧引物退火温度 (T_m) 相差显著的要求,并使突变效率达到 100%。适合实验室分子生物学手段研究。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法,为最常用的分子生物学技术之一。典型的 PCR 由 (1) 高温变性模板;(2) 引物与模板退火;(3) 引物沿模板延伸三步反应组成一个循环,通过多次循环反应,使目的 DNA 得以迅速扩增。其主要步骤是:将待扩增的模板 DNA 置高温下(通常为 93°C - 94°C) 使其变性解成单链;人工合成的两个寡核苷酸引物在其合适的复性温度下分别与目的基因两侧的两条单链互补结合,两个引物在模板上结合的位置决定了扩增片段的长短;耐热的 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 在 72°C 将单核苷酸从引物的 3' 端开始掺入,以目的基因为模板从 $5' \rightarrow 3'$ 方向延伸,合成 DNA 的新互补链。

[0003] PCR 能快速特异扩增任何已知目的基因或 DNA 片段,并能轻易在皮克 (pg) 水平起始 DNA 混合物中的目的基因扩增达到纳克、微克、毫克级的特异性 DNA 片段。因此,PCR 技术一经问世就被迅速而广泛地用于分子生物学的各个领域。它不仅可用于基因的分选、克隆和核苷酸序列分析,还可以用于突变体和重组体的构建,基因表达调控的研究,基因多态性的分析,遗传病和传染病的诊断,肿瘤机制的探索,法医鉴定等诸多方面。通常,PCR 在分子克隆和 DNA 分析中有着以下多种用途:

[0004] 1) 生成双链 DNA 中的特异序列作为探针;

[0005] 2) 由少量 mRNA 生成 cDNA 文库;

[0006] 3) 从 cDNA 中克隆某些基因;

[0007] 4) 生成大量 DNA 以进行序列测定;

[0008] 5) 突变体的分析;

[0009] 6) 染色体步移;

[0010] 7) RAPD、AFLP、RFLP 等 DNA 多态性分析等。

[0011] 经典的大引物 PCR 定点突变技术需要三个引物,两条外侧正向和反向引物以及内部突变引物。首先由突变引物和相应外侧引物进行第一轮 PCR 得到大引物,经纯化后与另一外侧引物引发第二轮 PCR 得到目标片段。近年来,国内外学者对大引物 PCR 方法进行了改进优化,使得第一步 PCR 产物不需纯化,可直接在一个反应管内进行第二步 PCR。但此方法要求引物的 T_m 有显著差异,第二轮 PCR 引物 T_m 高于第一轮 PCR 引物 T_m 值,才能排除低 T_m 值外侧引物的干扰,省略了第一步的纯化,进行特异性扩增。然而此方法的突变效率不能达到 100%。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种新的大引物 PCR 进行定点突变的方法。突破了现有大引物 PCR 方法对引物设计时退火温度差距显著的要求,同时解决了突变效率不高的缺点,使之更加简单、高效,并使突变效率达到 100%,适合实验室分子生物学手段研究。

[0013] 本发明提供的大引物 PCR 进行定点突变的方法的步骤包括:

[0014] 设计的正反向引物不受退火温度差距大的要求的限制,长度为 24-39bp,优选长度 27-34bp,5' 端根据原模板需要引入各种酶切位点,3' 端与模板互补,互补的碱基数为 9-14bp,优选碱基数为 9bp;

[0015] 根据要突变的碱基所处序列的位置设计突变引物,包括:

[0016] 要突变原始序列的后部分的碱基,则突变引物要与下游引物相对应,二者引发第一轮 PCR 反应;要突变原始序列前半部分的碱基,则应与上游引物相对应,二者引发第二轮 PCR 反应;将需要突变的碱基替换成期望突变后的碱基,并在其位点前后各延伸 12bp,实现定点突变;

[0017] 突变引物的退火温度要高于正反向引物,具体的步骤:

[0018] 1) 首先由突变引物和其对应的外侧引物引发第一轮 PCR 反应,扩增出含突变碱基的基因片段,实现大片段的合成,即大引物;

[0019] 2) 产物不需纯化,直接在同一反应管中加入另一外侧引物、四种脱氧核糖核苷酸和 DNA 聚合酶,引发第二轮 PCR 反应,实现目标片段的合成;

[0020] 两条外侧引物和突变引物的退火温度相差 10-16°C。

[0021] 一种大引物 PCR 进行定点突变的方法,包括的步骤:

[0022] 编码人干扰素 α 2b 的全长原始序列 (IFN- α 2b) 为模板,498bp,根据该原序列模板设计的上、下游引物和 2 个突变引物:

[0023] 上游引物:5' -CAT AAG CTT ATG TGT GAT CTG CCT CAA-3'

[0024] 下游引物:5' -GTC GAA TTC TTC CTT ACT TCT TAA TCT-3'

[0025] 突变引物 1:5' -TGT GTG ATA CAG GAG GTG GGG GTG GAG GAG ACT CCCCTG-3'

[0026] 突变引物 2:5' -CTC ATG GAG GAC GCT GAT GGC CTG AGC CTT TTG GAA-3'

[0027] 1) 首先由突变引物和其对应的外侧引物引发第一轮 PCR 反应,扩增出含突变基因片段,即大引物;

[0028] PCR 反应体系:10 μ l Buffer 缓冲液,8 μ l dNTP,2 μ l 下游引物,2 μ l 突变引物 1,1 μ l 干扰素原始序列为模板,76 μ l 超纯水,1 μ l pfu 酶;

[0029] 第一轮 PCR 反应条件:94°C 变性 4min,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 30s;

[0030] 94°C 变性 40s,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 30s;(24 个循环)

[0031] 94°C 变性 40s,60°C 下退火 30s,72°C 下延伸 5min;

[0032] (2) 产物不需纯化,直接在同一反应管中加入另一外侧引物、四种脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 和 DNA 聚合酶 (pfu 酶),引发第二轮 PCR 反应。

[0033] PCR 反应体系:10 μ l Buffer 缓冲液,8 μ l dNTP,2 μ l 上游引物,1 μ l pfu 酶;

[0034] 第二轮 PCR 反应条件:94°C 变性 40s,68°C 下退火 25s,72°C 下延伸 1min;(10 个循环)

- [0035] 94℃变性 40s, 55℃下退火 25s, 72℃下延伸 1min ;(12 个循环)
- [0036] 最后 72℃下延伸 5min。
- [0037] 所述的定点突变是多个位点的突变, 且多个突变位点间可以相邻或者间隔。
- [0038] 所述的两条外侧引物的长度为 27-30 碱基, 解链温度为 55-65℃。
- [0039] 所述的突变引物的长度为 36-39 碱基, 解链温度为 70-75℃。
- [0040] 在所设计的突变引物长度范围内, 突变点是 1-5 个多个位点突变, 最适多个位点突变数目为 3-4 个。
- [0041] 所述的方法得到的突变后的基因序列。
- [0042] 所述的方法得到的干扰素 α 2b 的突变后的基因序列。
- [0043] 含有权利要求 7 所述的 IFN- α 2b 突变后的基因序列的质粒 pET-IFN- α 2b1 和 pET-IFN- α 2b2 以及具有 Top10(rh-IFN- α 2b1) 和 Top10(rh-IFN- α 2b2) 的转化子, 分别由所述质粒 pET-IFN- α 2b1 和 pET-IFN- α 2b2 转化大肠杆菌感受态细胞而获得。
- [0044] 所述的原模板为干扰素 α 2b 原始基因序列。
- [0045] 所述的引物浓度为 20 μ M。
- [0046] 本发明的大引物 PCR 新方法, 不仅克服了常规大引物和外侧引物退火温度 (T_m) 相差显著的要求, 解决了突变效率不高的缺点, 使之更加简单、高效, 并使突变效率达到 100%。适合实验室分子生物学手段研究。

附图说明

- [0047] 图 1 是实施例 1 的两轮 PCR 产物电泳结果图。
- [0048] 图 2 是 实施例 2 的两轮 PCR 产物电泳结果图。
- [0049] 图 3 是实施例 1 的酶切产物电泳结果图。
- [0050] 图 4 是实施例 2 的酶切产物电泳结果图。
- [0051] 图 5 是质粒 pET-IFN- α 2b 构建示意图。

具体实施方式：

- [0052] 实施例 1：
- [0053] 实验步骤：
- [0054] (1) 通过 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库检索的人源干扰素 α 2b 原始序列, 运用 primer premier 5.0 软件设计出该序列的上、下游引物, 再根据要突变的碱基, 设计出含有突变碱基的突变引物 1。
- [0055] (2) 由突变引物 1 和其对应的外侧引物 (所述的引物浓度为 20 μ M) 引发第一轮 PCR 反应, 扩增出含突变基因片段, 即大引物。
- [0056] 设计上、下游引物和突变引物序列, 结果见表 1。
- [0057]

	突变引物 1	上游引物	下游引物
长度 (bp)	39	27	27

序列 (5' -3')	TGT GTG ATA CAG <u>GAG</u> GTG GGG GTG <u>GAG</u> GAG ACT CCC CTG	CAT AAG GTT ATG TGT GAT CTG CCT CAA	GTC GAA TTC TTG CTT ACT TCT TAA ACT
退火温度 T _m (°C)	74.3°C	60.3°C	58.4°C

[0058] 表 1 中下划线部分是突变后的碱基。上游引物中 CAT 是保护碱基, AAG CTT 是酶切位点; 下游引物中 GTC 是保护碱基, GAA TTC 是酶切位点。

[0059] 由突变引物 1 和下游引物引发第一轮 PCR 反应, 反应结束后再加入上游引物, 它和上一轮 PCR 形成的大引物引发第二轮 PCR 反应。由表中退火温度可知, 突变引物和上、下游引物的退火温度相差在 10-16°C 之间, 上、下游引物之间退火温度相差在 0-5°C 之间。

[0060] PCR 反应体系: 10 μl Buffer 缓冲液 (200mM Tris-HCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 100mMKCl, 1% Triton X-100, 20mM MgCl₂, pH 8.8), 8 μl dNTP, 2 μl 下游引物, 2 μl 突变引物 1, 1 μl 干扰素 α 2b 原始序列为模板, 76 μl 超纯水, 1 μl pfu 酶 (北京鼎果生物技术有限公司)。

[0061] 第一轮 PCR 反应条件: 94°C 变性 4min, 60°C 下退火 30s, 72°C 下延伸 30s;

[0062] 94°C 变性 40s, 60°C 下退火 30s, 72°C 下延伸 30s; (24 个循环)

[0063] 94°C 变性 40s, 60°C 下退火 30s, 72°C 下延伸 5min。

[0064] 取出 5 μl 产物跑 EB (Ethidium bromide, 溴化乙锭) 电泳, 根据其条带位置与 marker (DNA 标准条带) 比较验证合成的大引物碱基数目是否正确。如果正确, 可进行下一步; 不正确的话, 适当改变反应条件重新进行 PCR 反应。

[0065] (3) 产物不需纯化, 直接在同一反应管中加入另一外侧引物、四种脱氧核糖核酸 (dNTP) 和 DNA 聚合酶 (pfu 酶), 引发第二轮 PCR 反应。

[0066] PCR 反应体系: 6 μl dNTP, 2 μl 上游引物, 1 μl pfu 酶 (同上)。

[0067] 第二轮 PCR 反应条件: 94°C 变性 40s, 68°C 下退火 25s, 72°C 下延伸 1min; (10 个循环)

[0068] 94°C 变性 40s, 55°C 下退火 25s, 72°C 下延伸 1min; (12 个循环)

[0069] 最后 72°C 下延伸 5min。

[0070] (4) 反应结束后, 取出 5 μl 产物跑 EB 电泳, 根据其条带位置与 marker 比较验证合成的含突变位点的干扰素 α 2b 片段的碱基数目是否正确。条带位置正确, 将 PCR 产物纯化 (采用 EZ Spin Column PCR Product Purification Kit (BBI) 试剂盒纯化)。

[0071] (5) 用下面结果检验方法验证突变的位点。

[0072] 结果检验和对比:

[0073] 将突变后的干扰素 α 2b 片断和 pET28C 载体质粒分别用 HindIII、EcoR I 双酶切, 按插入的突变后的干扰素 α 2b 片段: 载体 = 3 : 1 的比例混合上述酶切纯化后的产物, 用同体积的连接缓冲液 (DNA Ligation Kit Ver 2.0 (TakaRa 宝生物大连有限公司) 试剂盒的 Solution I (酶溶液)), 在 16°C 下连接 1h, 将合成的突变基因片段插入到质粒 pET-28C 的 HindIII 和 EcoR I 酶切位点之间, 即可得到含有突变后的干扰素 α 2b 基因序列的质粒 pET-IFN-α 2b1。将连接产物在 42°C 热击条件下转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中, 加入

400 μ l LB 液体培养基预培养 50min 后,取 200 μ l 涂布在加有卡纳霉素的平板上,37 $^{\circ}$ C 培养,即可获得命名为 Top10(rh-IFN- α 2b1) 的转化子。用牙签挑取转化子加入有 5ml LB 液体培养基的试管中摇床培养 12h 后,提取质粒,用 HindIII、EcoR I 双酶切,酶切产物用 1% 的 EB 电泳验证,结果如图 3 所示,在 500bp 有片断。将菌液测序(北京三博远志生物技术有限责任公司),测序结果进行比对,突变位点正确,准确率 100%。

[0074] 实施例 2:

[0075] 实验步骤:

[0076] (1) 同实例 1,运用 primer premier 5.0 软件设计出干扰素 α 2b 原始序列的上、下游引物,再根据要突变的碱基,设计出含有突变碱基的突变引物 2。

[0077] (2) 首先由突变引物和其对应的外侧引物引发第一轮 PCR 反应,扩增出含突变基因片段,即大引物。

[0078] 设计上、下游引物和突变引物序列,结果见表 2。

[0079] 表 2

[0080]

	突变引物 2	上游引物	下游引物
长度 (bp)	36	27	27
序列 (5' -3')	CTC ATG GAG GAC <u>GCT GAT GGC CTG</u> AGC CTT TTG GAA	CAT AAG CTT ATG TGT GAT CTG CCT CAA	GTC GAA TTC TTC CTT ACT TCT TAA ACT
退火温度 T_m ($^{\circ}$ C)	74.6 $^{\circ}$ C	60.3 $^{\circ}$ C	58.4 $^{\circ}$ C

[0081] 表 2 中下划线部分是突变后的碱基。上游引物中 CAT 是保护碱基, AAG CTT 是酶切位点;下游引物中 GTC 是保护碱基, GAA TTC 是酶切位点。

[0082] 由突变引物 2 和上游引物引发第一轮 PCR 反应,反应结束后再加入下游引物,它和上一轮 PCR 形成的大引物引发第二轮 PCR 反应。由表中退火温度可知,突变引物和上、下游引物的退火温度相差在 10-16 $^{\circ}$ C 之间,上、下游引物之间退火温度相差在 0-5 $^{\circ}$ C 之间。

[0083] PCR 反应体系:10 μ l Buffer 缓冲液(同上),8 μ l dNTP,2 μ l 上游引物,2 μ l 突变引物 2,1 μ l 干扰素 α 2b 原始序列为模板,76 μ l 超纯水,1 μ l pfu 酶(同上)。

[0084] 第一轮 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 4min,60 $^{\circ}$ C 下退火 30s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 30s;

[0085] 94 $^{\circ}$ C 变性 40s,60 $^{\circ}$ C 下退火 30s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 30s;(24 个循环)

[0086] 94 $^{\circ}$ C 变性 40s,60 $^{\circ}$ C 下退火 30s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 5min。

[0087] 取出 5 μ l 产物跑 EB 电泳,根据其条带位置与 marker 比较验证合成的大引物碱基数目是否正确。如果正确,可进行下一步;不正确的话,适当改变反应条件重新进行 PCR 反应。

[0088] (3) 产物不需纯化,直接在同一反应管中加入另一外侧引物、四种脱氧核糖核酸(dNTP)和 DNA 聚合酶(pfu 酶),引发第二轮 PCR 反应。

[0089] PCR 反应体系:6 μ l dNTP,2 μ l 下游引物,1 μ l pfu 酶(同上)。

[0090] 第二轮 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 40s,68 $^{\circ}$ C 下退火 25s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 1min;(10 个循

环)

[0091] 94℃变性 40s, 55℃下退火 25s, 72℃下延伸 1min ; (12 个循环)

[0092] 最后 72℃下延伸 5min。

[0093] (4) 反应结束后, 取出 5 μ l 产物跑 EB 电泳, 根据其条带位置与 marker 比较验证合成的含突变位点的干扰素序列的碱基数目是否正确。条带位置正确, 将 PCR 产物纯化 (同上), 即得到含有突变位点的干扰素基因序列。

[0094] (5) 结果检验和对比方法同实施例 1。由于突变位点不同, 获得的干扰素 α 2b 突变片断不同, 我们将实例 2 中获得的转化子命名为 Top10 (rh-IFN-α 2b2)。将菌液测序 (北京三博远志生物技术有限责任公司), 测序结果进行比对, 突变位点正确, 准确率 100%。

[0095] 序列表 SEQUENCE LISTING

[0096] <110> 天津大学

[0097] <120> 大引物 PCR 进行多位点定点突变的方法

[0098] <130> 200707

[0099] <160> 7

[0100] <170> PatentIn version 3.4

[0101] <210> 1

[0102] <211> 27

[0103] <212> DNA

[0104] <213> 干扰素 (IFN-α 2b)

[0105] <400> 1

[0106] cataagctta tgtgtgatct gcctcaa 27

[0107] <210> 2

[0108] <211> 27

[0109] <212> DNA

[0110] <213> 干扰素 (IFN-α 2b)

[0111] <400> 2

[0112] gtcgaattct tccttacttc ttaatct 27

[0113] <210> 3

[0114] <211> 39

[0115] <212> DNA

[0116] <213> 干扰素 (IFN-α 2b)

[0117] <400> 3

[0118] tgtgtgatac aggaggtggg ggtggaggag actcccctg 39

[0119] <210> 4

[0120] <211> 36

[0121] <212> DNA

[0122] <213> 干扰素 (IFN-α 2b)

[0123] <400> 4

[0124] ctcatggagg acgctgatgg cctgagcctt ttggaa 36

[0125]	<210>5		
[0126]	<211>498		
[0127]	<212>DNA		
[0128]	<213> 干扰素 (IFN- α 2b)		
[0129]	<400>5		
[0130]	tgtgatctgc ctcaaacca cagcctgggt agcaggagga ccttgatgct cctggcacag	60	
[0131]	atgaggagaa tctctctttt ctcttgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag	120	
[0132]	gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgate	180	
[0133]	cagcagatct tcaatctctt cagcacaaag gactcatctg ctgcttggga tgagaccctc	240	
[0134]	ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata	300	
[0135]	cagggggtgg gggtgacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg	360	
[0136]	aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg	420	
[0137]	gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt	480	
[0138]	ttaagaagta aggaatga	498	
[0139]	<210>6		
[0140]	<211>516		
[0141]	<212>DNA		
[0142]	<213> 重组干扰素 (rh-IFN- α 2b)		
[0143]	<400>6		
[0144]	cataagctta tgtgtgatct gcctcaaacc cacagcctgg gtagcaggag gaccttgate	60	
[0145]	ctcctggcac agatgaggag aatctctctt ttctctgct tgaaggacag acatgacttt	120	
[0146]	ggatttcccc aggaggagt tggcaaccag ttccaaaagg ctgaaaccat ccctgtcctc	180	
[0147]	catgagatga tccagcagat cttcaatctc ttcagcacia aggactcacc tgctgcttgg	240	
[0148]	gatgagacce tctagacaaa attctacact gaactctacc agcagctgaa tgacctgaa	300	
[0149]	gcctgtgtga tacaggagg gggggtggag gagactcccc tgatgaagga ggactccatt	360	
[0150]	ctggctgtga gaaaatactt ccaaagaatc actctctatc taaaagagaa gaaatacagc	420	
[0151]	ccttgtgcct gggaggttgt cagagcagaa atcatgatg ctttttcttt gtcaacaaac	480	
[0152]	ttgcaagaaa gtttaagaag taaggaagaa ttcgac	516	
[0153]	<210>7		
[0154]	<211>516		
[0155]	<212>DNA		
[0156]	<213> 重组干扰素 (rh-IFN- α 2b)		
[0157]	<400>7		
[0158]	cataagctta tgtgtgatct gcctcaaacc cacagcctgg gtagcaggag gaccttgate	60	
[0159]	ctcctggcac agatgaggag aatctctctt ttctctgct tgaaggacag acatgacttt	120	
[0160]	ggatttcccc aggaggagt tggcaaccag ttccaaaagg ctgagccat cagcgtcctc	180	
[0161]	catgagatga tccagcagat cttcaatctc ttcagcacia aggactcacc tgctgcttgg	240	
[0162]	gatgagacce tctagacaaa attctacact gaactctacc agcagctgaa tgacctgaa	300	
[0163]	gcctgtgtga tacaggggt gggggtgaca gagactcccc tgatgaagga ggactccatt	360	

[0164]	ctggctgtga ggaaatactt ccaaagaatc actctctatc tgaagagaa gaaatacagc	420
[0165]	ccttgtgcct gggaggttgt cagagcagaa atcatgagat ctttttcttt gtcaacaaac	480
[0166]	ttgcaagaaa gttaagaag taaggaagaa ttcgac	516

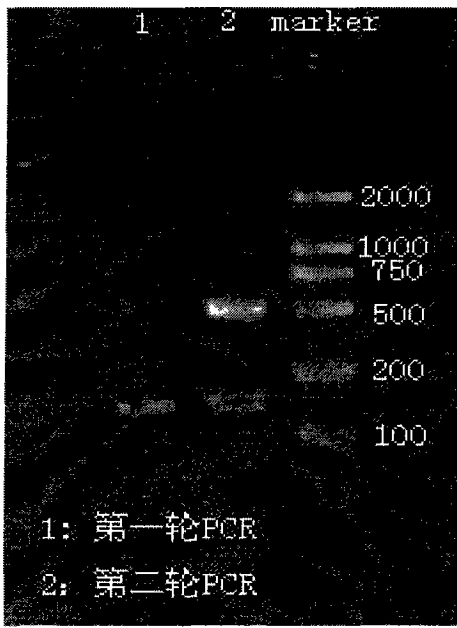


图 1

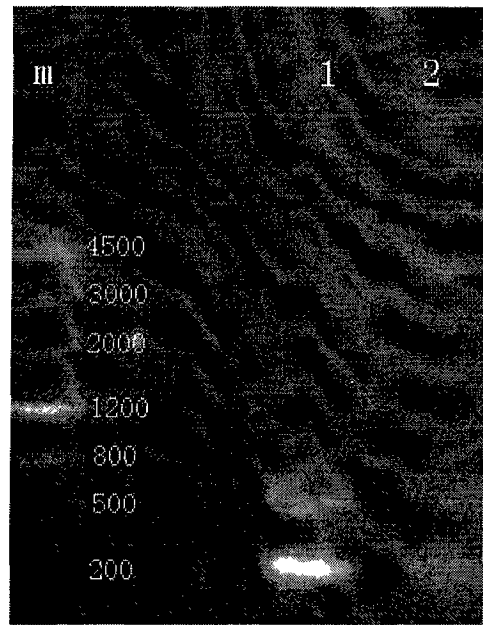


图 2

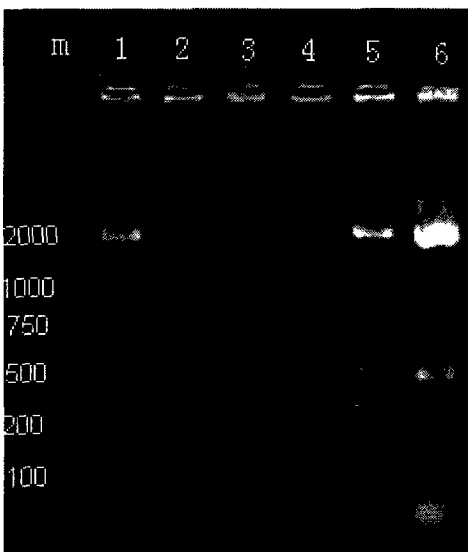


图 3

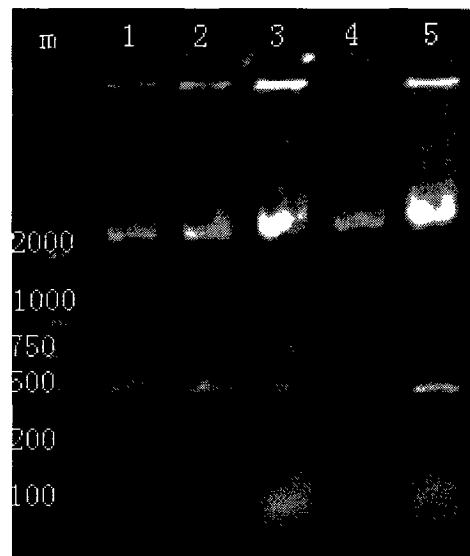


图 4

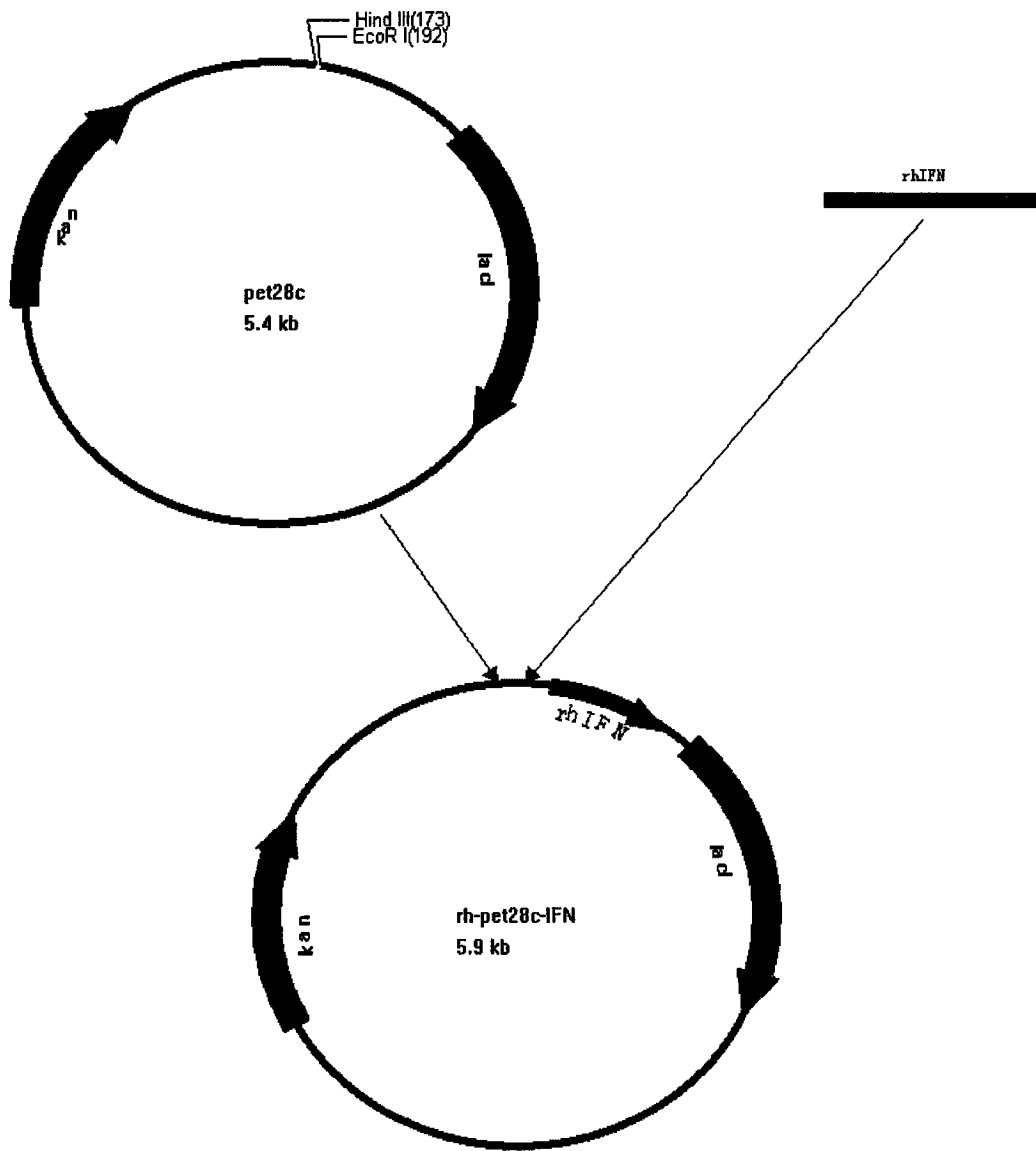


图 5