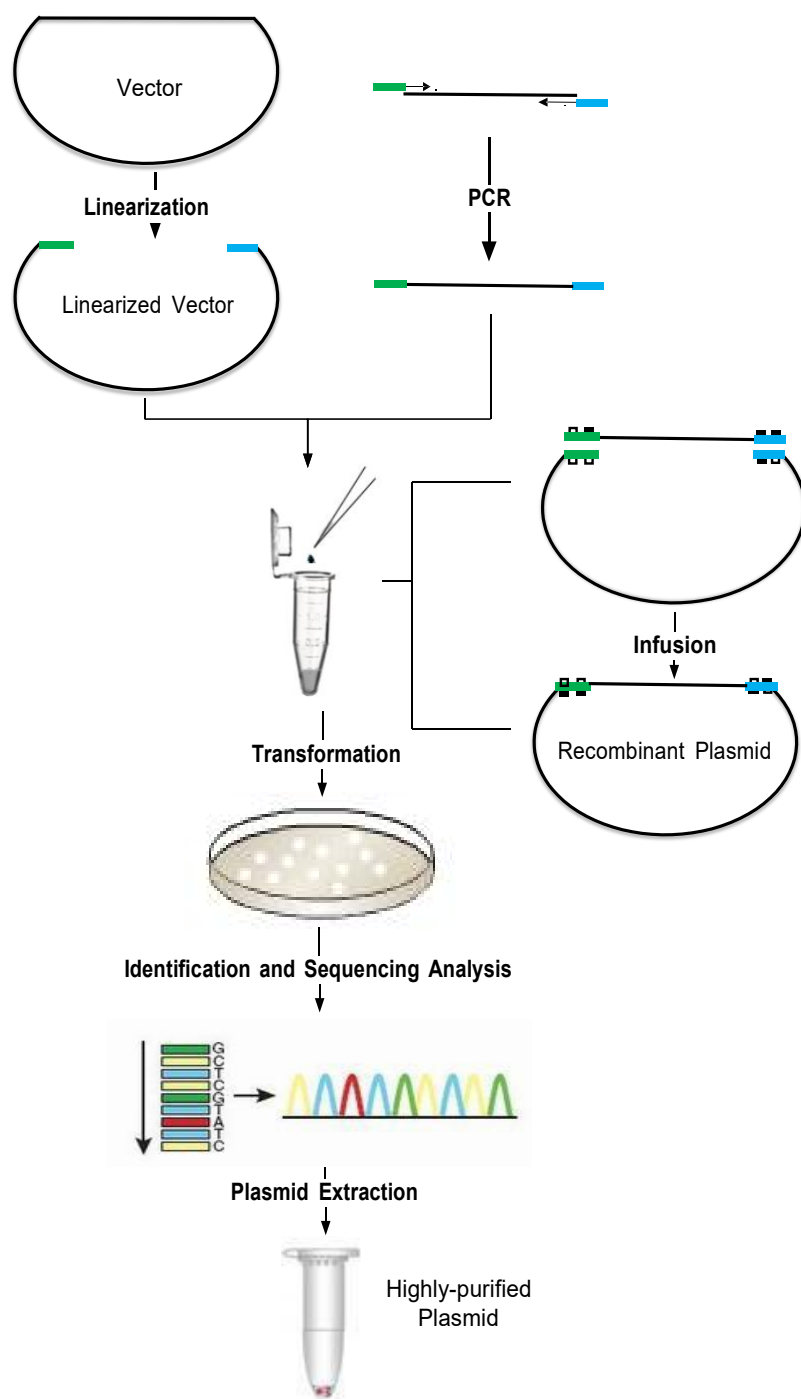

过表达质粒构建手册

目 录

一、实验流程	3
二、实验材料	4
1. 主要试剂.....	4
2. 主要仪器.....	4
三、克隆构建	5
1. 目的基因及工具载体信息.....	5
2. 载体酶切.....	6
3. 目的基因片段的获取.....	7
4. PCR 产物与载体进行重组克隆.....	8
5. 转化.....	8
6. 菌落 PCR 鉴定.....	9
7. 测序.....	10
四、质粒抽提.....	11

一、实验流程



利用限制性内切酶消化获得线性化载体。PCR 扩增制备目的基因片段。所用扩增引物在设计时需在其 5' 端添加同源重组序列 (图中以绿色和蓝色标记), 使用该引物扩增目的基因片段, 扩增产物 5' 和 3' 最末端的序列分别与线性化克隆载体两末端序列完全一致。以线性化载体和目的基因扩增产物配制反应体

系，进行重组反应，实现线性化载体和目的基因片段的体外环化。重组产物直接进行转化，挑取平板上的单克隆进行 PCR 鉴定，对阳性克隆进行测序及结果分析。将正确克隆菌液扩大培养、抽提，获得高纯度质粒，用于后续实验。

二、实验材料

1. 主要试剂

试剂名称	试剂来源	Cat. No.
Trans2K® Plus II DNA Marker	TransGen	# BM121-02
Restriction Endonuclease	NEB	
KOD Plus Neo DNA polymerase	Toyobo	#KOD-401
Taq Plus DNA polymerase	Vazyme	#P201-D3
ClonExpress™ II One Step Cloning Kit	Vazyme	#C122
Primer	Tsingke	
TOP10 competent cell	Youbio	
EndoFree midi Plasmid Kit	TIANGEN	#DP118-2

2. 主要仪器

仪器名称	仪器来源	Cat. No.
PCR 仪	Applied Biosystems 公司	2720 Thermal Cycler
测序仪	美季生物公司	ABI3730
数显式稳压稳流电泳仪	天能公司	EPS 200
凝胶成像仪	天能公司	Tanon-2500
细菌摇床	华利达实验设备公司	HZ-9211K
Blue Pard 隔水式恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	GHP-9080
移液器	吉尔森公司	
超净工作台	苏州佳宝净化工程设备有限公司	JB-CJ-2FX
高速离心机	Thermo Scientific	Legend Micro 17

三、克隆构建

1. 插入片段及工具载体信息

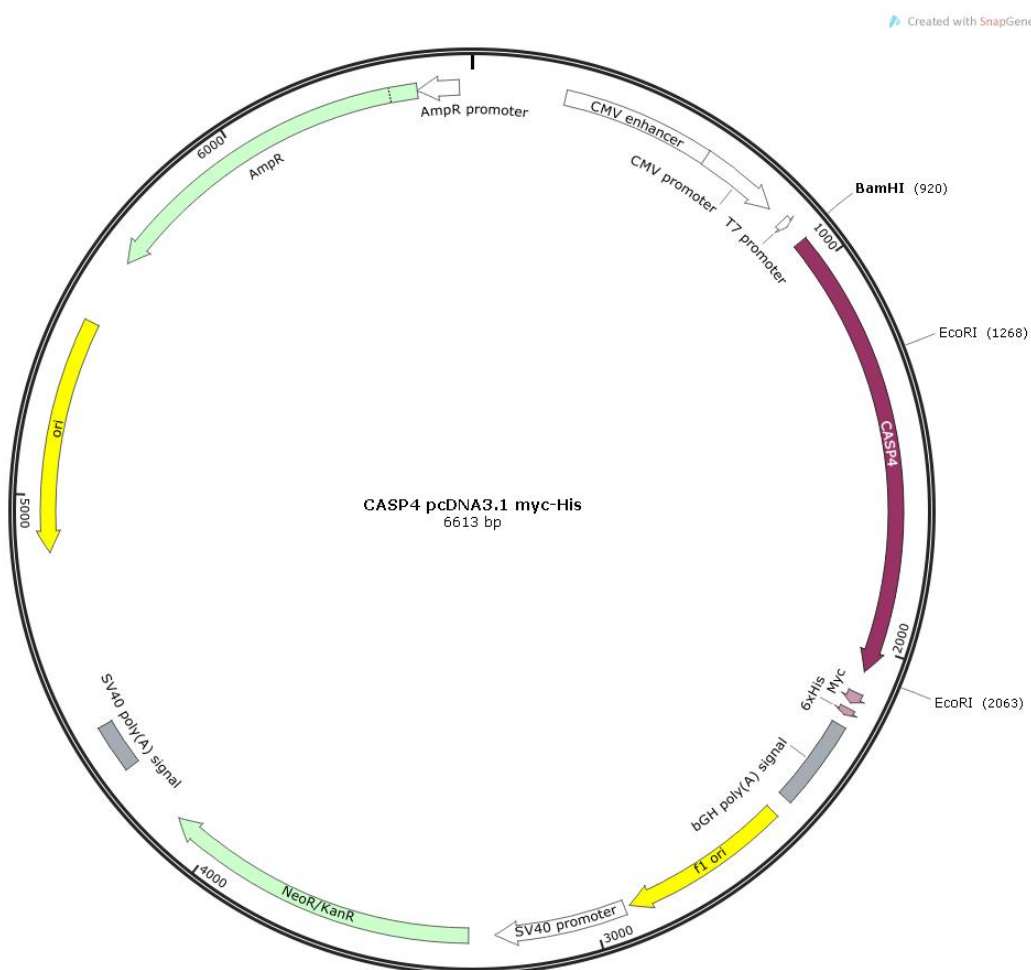
1.1 插入片段:

片段名称	CASP4
片段大小:	1134 bp

1.2 工具载体:

载体名称: pcDNA3.1(+)/Myc-HIS

克隆位点: BamHI+ EcoRI



2. 载体酶切

根据如下列表，配制 20 μl 酶切体系。按列表顺序依次加入各种试剂，用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心，置于 37°C¹ 反应 3 h 或过夜。对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带。

试剂	体积(μl)
ddH ₂ O	41
10×CutSmart Buffer ²	5
纯化的质粒 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2
BamHI (10 U/ μl)	1
EcoRI (10 U/ μl)	1
Total	50

3. 目的基因片段的获取

3.1 引物

ID	Seq (5' → 3')
CASP4-F	cttggtaccgagctcggatccGCCACCATGGCAGAAGGCAACCAC
CASP4-R	tgctggatatctgcagaattcATTGCCAGGAAAGAGGTAG

3.2 PCR 扩增目的基因片段

配制如下反应体系，轻轻吹打混匀，短暂离心，置于 PCR 仪中进行反应。

反应体系：

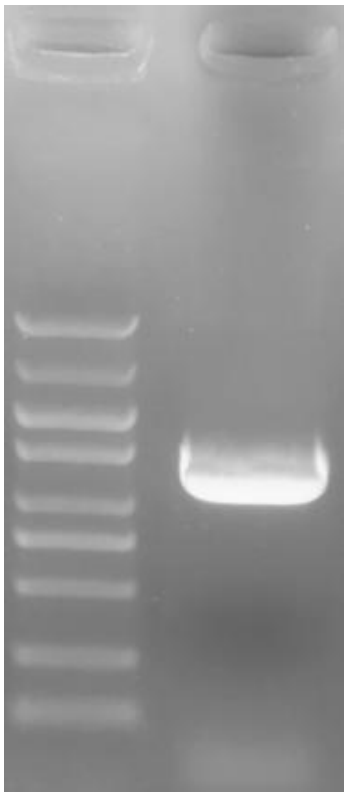
试剂	体积 (μL)
ddH ₂ O	32
10×PCR Buffer	5
dNTP Mix(2.5 mM each)	5
MgSO ₄ (25 mM)	3
上游扩增引物 (10 μM)	1.5
下游扩增引物 (10 μM)	1.5

模板 ¹ (10 ng/μL)	1
KOD-Plus-Neo(1 U/ul)	1
Total	50

反应条件:

1 Cycle	30 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94°C	98°C	60°C	68°C	72°C	4°C
2 min	10 s	30 s	45 s	3 min	∞

3.3 PCR 扩增结果

PCR 产物电泳图	电泳图说明
1 2 	1#: 250bp DNA Ladder (条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、15Kb、1 Kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp) 2#: PCR 产物

4. PCR 产物与载体进行重组克隆

于冰水浴中配制如下反应体系。用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心，避免产生气泡。于 37°C 反应 30 min，随后置于冰水浴中冷却 5 min 后立即转化。

反应体系：

反应体系	体积(μL)
ddH ₂ O	5
5×CE II Buffer	2
酶切后的载体 DNA	1
纯化后的 PCR 产物片段	1
Exnase™ II	1
Total	10

5. 转化

将 10 μL 交换反应产物加入到 100 μL 感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 30 min。42°C 热激 90 s，冰水浴孵育 2 min。加入 500 μL LB 培养基，置于 37°C 摇床振荡培养 1 h。取适量菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上，在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

6. 菌落 PCR 鉴定

6.1 引物

ID	Seq (5' → 3')
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG

6.2 PCR 鉴定

配制如下反应体系，震荡混匀，短暂离心。在超净工作台中，用无菌的枪头挑取单个菌落至 20 μ L 鉴定体系中，吹打混匀，置于 PCR 仪中进行反应。

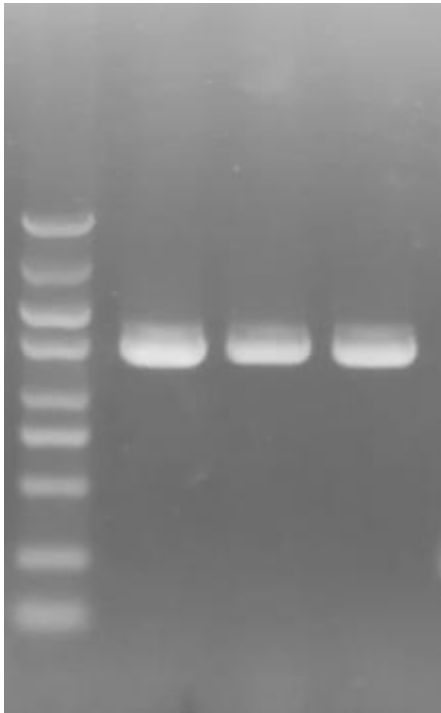
鉴定反应体系：

试剂	体积 (μ L)
ddH ₂ O	9.2
2× Taq Plus Master Mix	10
上游引物 (10 μ M)	0.4
下游引物 (10 μ M)	0.4
单菌落	-
Total	20

PCR 反应条件：

1 Cycle	25 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94°C	94°C	57°C ¹	72°C	72°C	4°C
3 min	30 s	30s	90s	5 min	∞

6.3 鉴定结果

PCR 产物电泳图	电泳图说明
	1#: 250bp DNA Ladder (条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1 Kb、15Kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp) 2-4#: Dp71a -1 ~ 3号转化子

四、质粒抽提

将测序正确的菌液转接于 10 ml 含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37°C 培养过夜, 用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒进行质粒抽提, 抽提合格的质粒进入下游流程。详细操作步骤如下:

1. 收集过夜培养的菌液于标记好的 5 ml 离心管, 12000 rpm, 离心 2 min 收菌;
2. 弃上清, 加入 250 μ l 细胞重悬液, 充分振荡, 使菌块悬浮均匀;
3. 加入 250 μ l 细胞裂解液, 再加入 10 μ l 蛋白酶 K, 上下颠倒 5-6 次, 轻轻混匀; 静置 1-2 min, 致使菌体裂解澄清;
4. 加入 350 μ l 中和液, 上下颠倒混匀, 使蛋白完全析出, 冰浴静置 5 min;
5. 10000 rpm 离心 10 min, 弃蛋白, 收集上清于另一干净无菌的 1.5 ml EP 管;

-
6. 12000 rpm离心5 min, 同时准备标记好的回收柱, 将上清转移至回收柱中, 12000 rpm离心1 min, 弃下层废液;
 7. 加入600 μ l预先配置好的漂洗液, 12000 rpm离心1 min, 弃下层废液, 重复一次, 12000 rpm空离2 min, 进一步除去残留的漂洗液;
 8. 在超净台中将回收柱转移至新的1.5 ml EP管中, 静置10-20 min, 自然晾干;
 9. 往回收柱中加入95 μ l Nuclease-Free Water, 静置2 min, 12000 rpm离心2 min, 收集样品做好编号, 电泳、测定浓度, 进行质检。