

# 过表达载体构建手册

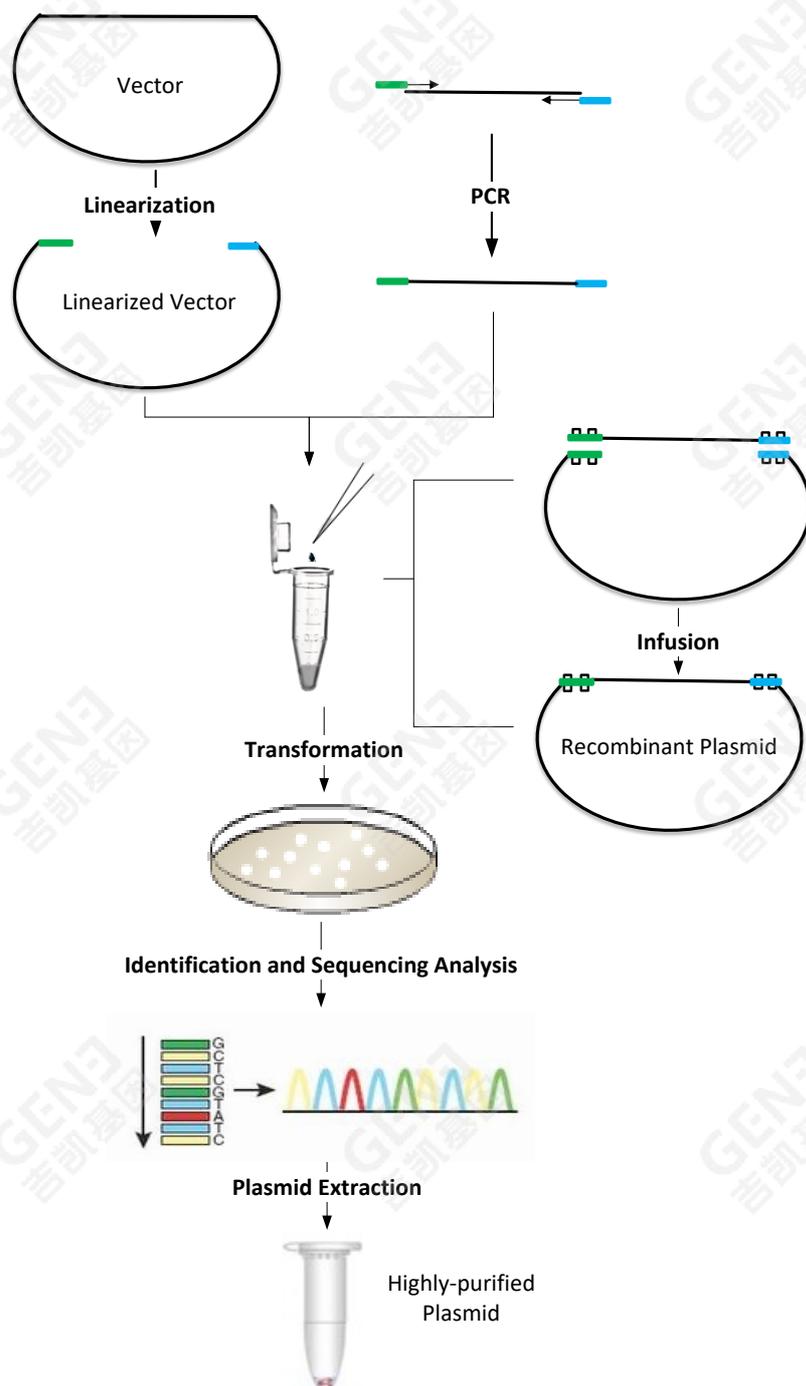
Version2.0

吉凯基因

# 目 录

<b>一、实验流程</b> .....	<b>3</b>
<b>二、实验材料</b> .....	<b>4</b>
1. 主要试剂 .....	4
2. 主要仪器 .....	4
<b>三、克隆构建实例</b> .....	<b>5</b>
1. 目的基因及工具载体信息 .....	5
2. 载体酶切 .....	5
3. 目的基因片段的获取 .....	7
4. PCR 产物与载体进行交换 .....	8
5. 转化 .....	8
6. 菌落 PCR 鉴定 .....	9
7. 测序 .....	10
<b>四、质粒抽提</b> .....	<b>11</b>
<b>五、参考文献</b> .....	<b>12</b>

## 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.
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0311
NormalRun™ 250 bp-II DNA Ladder	GeneRay	#DL2502
Restriction Endonuclease	NEB	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	Takara	#R010B
Taq Plus DNA polymerase	Vazyme	#P201-D3
ClonExpress™ II One Step Cloning Kit	Vazyme	#C122
Primer	GeneRay	
TOP10 competent cell	Genechem	
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、克隆构建实例

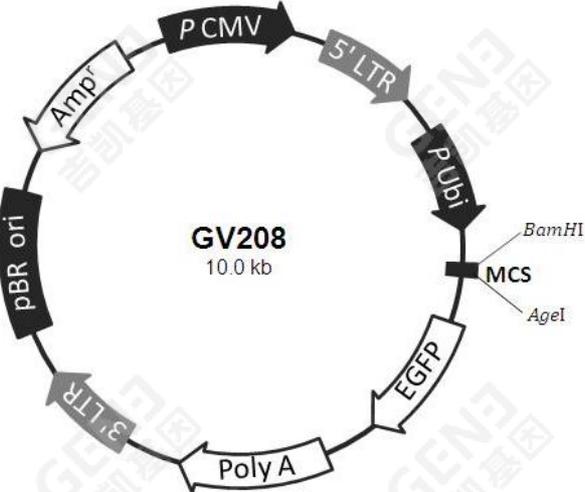
以 STK39 基因为例描述详细实验过程

#### 1. 目的基因及工具载体信息

##### 1.1 目的基因：

**Symbol :** STK39  
**Accession :** NM\_013233  
**Organism :** Human  
**CDS Length :** 1638 bp

##### 1.2 工具载体:

载体图谱	载体说明
 <p style="text-align: center;"><b>GV208</b> 10.0 kb</p>	<p><b>载体编号：</b>GV208</p> <p><b>元件顺序：</b>Ubi-MCS-EGFP</p> <p><b>荧光标记：</b>EGFP</p> <p><b>克隆位点：</b>Age I</p>

#### 2. 载体酶切

根据如下列表，配制 50  $\mu$ l 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°C<sup>1</sup> 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 <sub>2</sub> O	42
10×CutSmart Buffer <sup>2</sup>	5
纯化的质粒 DNA ( 1 μg/μL )	2
<i>Age</i> I ( 10 U/μl )	1
Total	50

- 1 大部分限制性内切酶的最适反应温度为 37°C，但也有一些不是 37°C，例如 *Apa* I 为 25°C，*Bsi* I 为 75°C。根据所需限制性内切酶确定相应的反应温度。
- 2 限制性内切酶在选定的 Buffer 下应该具有不低于 50%的反应活性。各种限制性内切酶在不同 Buffer 下的具体活性请参考其说明书。

**载体酶切结果：**

载体酶切电泳图谱	电泳图说明
<p>The image shows a gel electrophoresis result with three lanes labeled 1, 2, and 3. Lane 1 contains a 1kb DNA ladder with multiple horizontal bands of varying lengths. Lane 2 shows a single horizontal band at a high position, representing the digested GV208 Vector. Lane 3 shows a single horizontal band at the same high position as lane 2, representing the undigested GV208 Vector.</p>	<p><b>1#:</b> 1kb DNA Ladder (条带从上到下依次为： 10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、 2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、 250 bp)</p> <p><b>2#:</b> 经过 <i>Age</i>I 酶切的 GV208 Vector</p> <p><b>3#:</b> GV208 Vector</p>

### 3. 目的基因片段的获取

#### 3.1 引物

ID	Seq (5' → 3')
STK39-F	GAGGATCCCCGGGT <u>ACCGGTCGCCACCATGGCGGAGCCGAGCGGC</u>
STK39-R	TCACCATGGTGGCG <u>ACCGGGCTGACACTCAACTGAGCA</u>

**扩增引物说明：**扩增引物包含交换配对碱基、酶切位点(下划线标记)、表达增强序列(双下划线记)以及目的基因 5' 端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。

#### 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 <sub>2</sub> O	32.5
5×PS Buffer	10
dNTP Mix(2.5 mM each)	4
上游扩增引物 (10 μM)	1
下游扩增引物 (10 μM)	1
模板 <sup>1</sup> (10 ng/μL)	1
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5
Total	50

<sup>1</sup> 模板来源为质粒或者菌液。质粒模板用量一般小于 200 ng，菌液模板用量一般为 1 μL，最佳用量请参考 PrimeSTAR HS DNA polymerase 使用说明书。

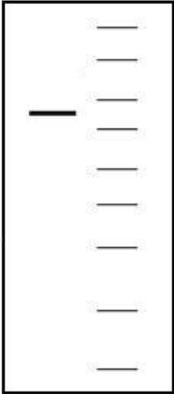
**反应条件：**

1 Cycle	30 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
98°C	98°C	55°C <sup>1</sup>	72°C	72°C	4°C
5 min	10 s	10 s	90 s <sup>2</sup>	8 min	∞

<sup>1</sup> 退火温度依据引物或基因 GC 含量而定，退火温度一般设定比引物的 T<sub>m</sub> 低 5°C。

<sup>2</sup> 延伸时间依据 PCR 产物的长度而定。PrimeStar HS DNA 聚合酶延伸时间按 1Kb/min 计算。

### 3.3 PCR 扩增结果

PCR 产物电泳图	电泳图说明
 <p>1    2</p>	<p><b>1#:</b> PCR 产物</p> <p><b>2#:</b> 250bp DNA Ladder ( 条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 Kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp )</p>

### 4. PCR 产物与载体进行交换

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	阳性对照(μL)	自连对照(μL)	实验组(μL)
ddH <sub>2</sub> O	2.5	4.5	3.5
5×CE II Buffer	2	2	2
酶切后的载体 DNA	2.5	2.5	2.5
纯化后的 PCR 产物片段	2	0	1
Exnase™ II	1	1	1
Total	10	10	10

说明：

- 加入的线性化载体 DNA 和纯化的 PCR 产物的最适摩尔比为 1 : 2
- 阳性对照加入的纯化的 PCR 产物为 GAPDH 基因 ( 带有同样的交换臂 )

### 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' )
鉴定引物-F	CCACCCAATGCTAATGAAG
鉴定引物-R	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

**鉴定引物说明：**本对引物一个位于目的基因中，一个位于载体上，用于菌落 PCR 鉴定转化子。

### 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  $\mu$ 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：**

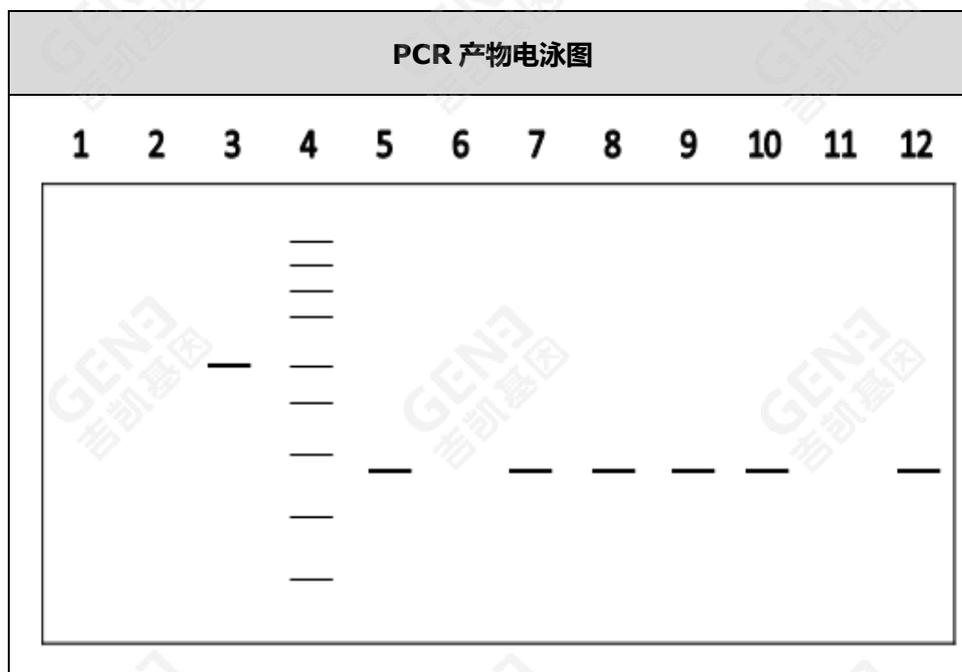
试剂	体积 ( $\mu$ L )
ddH <sub>2</sub> O	9.2
2 $\times$ Taq Plus Master Mix	10
上游引物 ( 10 $\mu$ M )	0.4
下游引物 ( 10 $\mu$ M )	0.4
单菌落	-
Total	20

**PCR 反应条件：**

1 Cycle	22 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94°C	94°C	55°C <sup>1</sup>	72°C	72°C	4°C
3 min	30 s	30 s	30 s <sup>2</sup>	5 min	$\infty$

- 1 退火温度依据引物或基因 GC 含量而定，退火温度一般设定比引物的 T<sub>m</sub> 低 5°C。
- 2 延伸时间依据鉴定 PCR 产物的长度而定。Taq Plus DNA 聚合酶延伸时间按 1 Kb/min 计算。

### 6.3 鉴定结果



#### 样品说明：

泳道	样品编号
1#	空白对照 <sup>1</sup>
2#	阴性对照 <sup>2</sup>
3#	阳性对照 <sup>3</sup>
4#	250bp DNA Ladder (条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb, 750 bp、500 bp、250 bp、100 bp)
5# ~ 12 #	Stk39-1 ~ 8 号转化子

- 空白对照以 ddH<sub>2</sub>O 为模板，用于检测鉴定体系是否存在污染。
- 阴性对照以未插入目的基因的空载体为模板，用于证明扩增过程中无假阳性现象。
- 阳性对照以含有 GAPDH 基因的 DNA 为模板，用于验证鉴定工作体系是否正常。阳性对照也可以用含有目的片段的 DNA 作为模板及有效的引物进行扩增，扩增片段大小视具体情况而定。

## 7. 测序

将鉴定出的阳性克隆转化子接种于适量含相应抗生素的 LB 液体培养基中，37°C 培养 12-16 h，取适量菌液进行测序。对测序结果与目的基因序列进行比对分析。比对结果如下：

TTTGTTAGACGAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGGTCGC  
CACCATGGCGGAGCCGAGCGGCTCGCCCGTGCACGTCCAGCTTCCCCAGCAGGCGGCC  
CCGGTGACAGCGGCGGCGGCGGCCCGGCGGCCGCGACAGCAGCGCCGGCCCC  
GGCAGCTCCCGCGGCCCGGCCCGGCCCGGCCCGGCGGCACAGGCTGTCGGCTG  
GCCCATCTGCAGGGACGCGTACGAGCTGCAGGAGTTATCGGCAGTGGAGCTACTGCTG  
TGGTTCAGGCAGCCCTATGCAAACCCAGGCAAGAACGTGTAGCAATAAAACGGATCAACT  
TGGAAAAATGCCAGACCAGTATGGATGAACTATTAAGAAATTCAAGCCATGAGTCAGTG  
CAGCCATCCCAACGTAGTGACCTATTACACCTCTTTTGTGGTCAAAGATGAACTTTGGCTG  
GTCATGAAATTAAGTGGAGGTTCAATGTTGGATATCATAAAATACATTGTCAACCGAGG  
AGAACACAAGAATGGAGTTCTGGAAGAGGCAATAATAGCAACAATTCTTAAAGAGGTTTTG  
GAAGGCTTAGACTATCTACACAGAAACGGTCAGATTCACAGGGATTTGAAAGCTGGTAATA  
TTCTTCTGGGTGAGGATGGTTCAGTACAAATAGCAGATTTTGGGGTAAGTGCCTTCTAGC  
AACAGGGGGTGATGTTACCCGAAATAAAGTAAGAAAAACATTTCGTTGGCACCCCATGTTG  
GATGGCTCCTGAAGTCATGGAACAGGTGAGAGGCTATGACTTCAAGGCTGACATGTGGA  
GTTTTGGAATAACTGCCATTGAATTAGCAACAGGAGCAGCGCCTTATCACAATATCCTCC  
CATGAAAGTGTTAATGTTGACTTTGCAAATGATCCACCCACTTTGAAACAGGGGTAGAG  
GATAAAGAAATGATGAAAAAGTACGGCAAGTCCTTTAGAAAATTACTTTCACTGTGTCTTCA  
GAAAGATCCTTCCAAAAGGCCACAGCAGCAGAACTTTTAAATGCAAATCTTCCAGAAA  
GCCAAGAACAGAGAGTACCTGATTGAGAAGCTGCTTACAAGAACACCAGACATAGCCCAA  
AGAGCCAAAAGGTAAGAAGAGTTCCTGGGTCAAGTGGTCACCTTCATAAAACCGAAGA  
CGGGGACTGGGAGTGGAGTGACGACGAGATGGATGAGAAGAGCGAAGAAGGGAAAGC  
AGCTTTTTCTCAGGAAAAGTCACGAAGAGTAAAAGAAGAAAATCCAGAGATTGCAGTGAG  
TGCCAGCACCATCCCCGAACAAATACAGTCCCTCTCTGTGCACGACTCTCAGGGCCCACC  
CAATGCTAATGAAGACTACAGAGAAGCTTCTTCTGTGCCGTGAACCTCGTTTTGAGATTA  
AGAACTCCAGAAAGGAACTTAATGACATACGATTTGAGTTTACTCCAGGAAGAGATACAG  
CAGATGGTGTATCTCAGGAGCTTCTCTGCTGGCTTGGTGGATGGTCACGATGTAGTTAT  
AGTGGCTGCTAATTTACAGAAGATTGTAGATGATCCCAAAGCTTTAAAACATTGACATTTA  
AGTTGGCTTCTGGCTGTGATGGGTGCGGAGATTCCTGATGAAGTGAAGCTGATTGGGTTG  
CTCAGTTGAGTGTGAGCCCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGG

比对结果说明：测序结果与目标序列完全一致

#### 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  $\mu$ l 细胞重悬液，充分振荡，使菌块悬浮均匀；
3. 加入 250  $\mu$ l 细胞裂解液，再加入 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## 五、参考文献

1. Theophilus S. Vijaykumar, Avindra Nath, and Ashok Chauhan, "Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection," *Virology*. 2008 November 10; 381 (1): 1-5.
2. Cherie T Ng et al., "Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques," *Nat Med*. 2010 October; 16(10): 1117-1119.
3. 天根无内毒素质粒小提中量试剂盒说明书 (<http://www.tiangen.com/?productShow/t1/1/id/305.html>).