

---

版本号:190120

## pTOPO-D1 Directional Expression Kit pTOPO-D1 一步法定向原核表达试剂盒

目录号: PV02

### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	20 次(PV0201)
pTOPO-D1 Vector(30ng/μl)	20 μl
10 × Enhancer	20 μl

-20℃ 储存, 至少 6 个月内不影响使用效果。

### ❖ 产品介绍:

本载体采用了世界先进的Directional Topoisomerase Cloning (定向拓扑异构酶克隆技术)可以在5分钟内将待表达目的基因(高保真酶扩增的平末端片段)一步法定向克隆到高效pET增强型载体, 利用T7lac启动子进行严谨调控, 高效表达。

1. 简单快速, 加入待表达基因片段室温仅需5分钟便可完成原核表达载体构建。
2. 定向克隆技术, 超过90%插入为正确方向插入, 减少克隆筛选耗费的时间。
3. T7lac启动子严谨调控本底表达, 实现表达过程的可控和高效表达。
4. 氨苄抗性标记筛选, N端和C端6 × Histag标签方便表达后纯化。
5. 带肠激酶(EK)酶切位点, 可以方便将标签切除得到不带标签的蛋白。

测序可以采用 T7/T7 ter 通用引物测序(见后面图谱)

### ❖ 操作步骤:

#### 1. 待表达目的基因扩增引物设计原则:

(1) 为了达到定向克隆的目的, 上游引物 5' 端应该加上额外的 4 个碱基 CACC, 这样 PCR 产物的 5' 端可以和载体上突出的 GTGG 互补配对, 从而达到定向克隆的目的。

举例:

待表达序列: 5' -ATG GGA TCT GAT AAA ...

设计上游引物: 5' -CACC ATG GGA TCT GAT AAA ...

(2) 如仅需在 N 端加上 6 × Histag 标签, 则下游引物的起始端应该加上终止密码子(密码子序列应该为反向互补序列, 例如终止密码子是 TGA, 那么下游引物起始为 TCA)

(3) 如需在 N 端和 C 端同时加上 6 × Histag 标签, 则下游引物的起始端应该不包含终止密码子; 为达到定向克隆的目的, 下游引物 5' 起始应该不包含 CACC, 这样可以避免 PCR 产物的 3' 端也可以和载体上突出的 GTGG 互补配对而造成错误方向的插入。

## 2. 连接反应的准备:

**PCR引物不能磷酸化。**使用**扩增产物是平末端的高保真聚合酶**系列扩增（如Pfu、Vent、Phusion DNA Polymerase）。PCR产物（仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体）可直接进行连接反应，无需纯化，否则建议胶回收纯化（货号：DR01）。如果是以质粒为模板的PCR产物则最好进行纯化，因为模板质粒也可能长出菌落（但不是想构建的目的载体）。

## 3. 连接反应:

- 1) 室温（25℃-37℃）设立 10μl 连接体系（建议用 0.2ml PCR 管，PCR 仪器控温）：

纯化后的 PCR 产物	0.5-8μl
pTOPO-D1 Vector	1μl
10 × Enhancer	1μl
灭菌水	Xμl
总体积	10μl

加完试剂后，用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀，低速瞬时离心收集所有液体在离心管底，**注意此步骤不能在冰上进行，只能在室温（20℃-30℃）进行。**

### 不同大小插入片段的推荐用量:

插入片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	20-40
1000-2000	30-70
2000-5000	50-100

- 2) 室温（25℃-37℃）连接 5 分钟。

**本载体推荐室温 5 分钟完成连接。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 15 分钟，温度可选 37℃，可显著增加转化子数量。**

- 3) 连接产物可直接转化克隆感受态细胞（如 DH5a, TOP10 等）或贮存于-20℃。

**如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用。**

## 4. 转化:

- 1) 50-100μl 感受态细胞，置于室温解冻，完全解冻后（约 1 分钟左右）轻弹几次将细胞均匀悬浮。

- 2) 加入 5μl 连接液(最多可全部加入，只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10)，轻轻混匀，室温放置 5 分钟。

**根据我们的经验，本公司载体使用商品化的感受态细胞不需要冰浴和热休克、室温放置 5 分钟便可获得足够多转化子，如果实验室自制感受态细胞或者效率较低时，可以按照标准程序进行。**

- 3) 加 300-500 $\mu$ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180 rpm 振荡培养 60 分钟。  
根据我们的经验, 一般可以直接将培养基(事先平衡至室温) 加入感受态细胞的 1.5 ml 离心管, 盖上离心管盖, 水平固定在振荡培养箱中振荡培养复苏即可, 不需要转移到试管培养复苏。
- 4) 取 200 $\mu$ l 菌液涂板, 培养过夜(如果预计转化子少, 为得到较多克隆, 4000 rpm 离心 1 min, 吸弃掉部分上清, 保留 100-150 $\mu$ l, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板)

### 5. 转化子的筛选鉴定:

- 1). 菌落 PCR 检测/提取质粒内切酶切鉴定阳性克隆。
- 2). 用 T7 Promoter /T7 Terminator 通用引物测序, 来确定是否含有目的克隆。

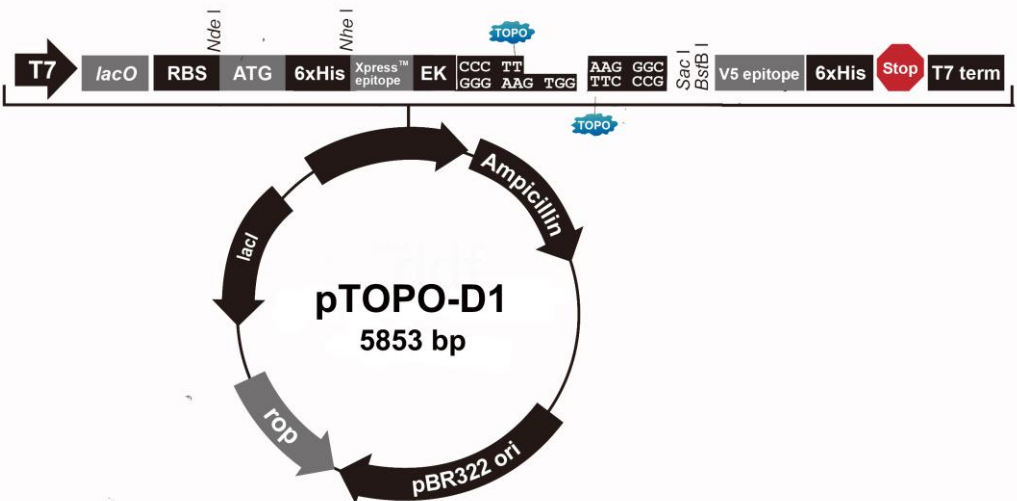
### 6. 目的基因表达:

**感受态细胞:** BL21(DE3) 表达感受态细胞系列均可用于表达。转化阳性克隆质粒于 BL21(DE3)感受态细胞系列进行表达。如果表达毒性基因, 建议选择 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞。

**诱导:** 挑选单克隆, 接种于 5ml LB/Amp<sup>+</sup>培养基中, 37 $^{\circ}$ C 250rpm 培养, 当 OD<sub>600</sub>=0.5 至 0.8 时(首选 0.6), 加入终浓度为 0.5-1mM 的 IPTG 诱导表达。为了得到最大量表达, 建议试验不同的诱导时间。

**验证纯化:** 表达结束后, 收集菌体沉淀, 经过 SDS-PAGE 跑胶染色检测蛋白的表达情况, HIS 标签蛋白可用镍柱亲和层析纯化。

### ❖ pTOPO-D1 载体图谱:



❖ pTOPO-D1 载体多克隆位点序列:

