

Order: 010-82796972 Tech: 13691030050

Tech QQ: 328153626

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
$10 \times Enhancer$	1μl
灭菌水	Xμl
台 休和	10u1

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)轻掸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 300-500μl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素),37℃ 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 200μl 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 100-150μl,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。

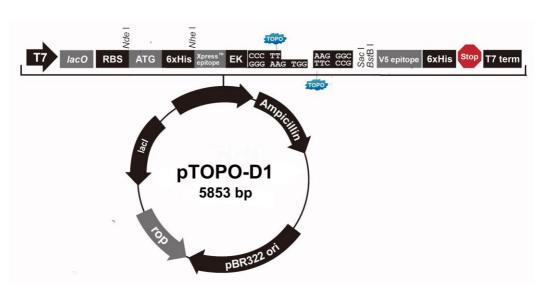
6. 目的基因表达:

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[†]培养基中,37 $^{\circ}$ C250rpm 培养,当 OD600=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: *

AAG CAG TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG AGAAGGAGAT ATACAT CGCGAAATTA ATACGACTCA Gly CGT GGC Gln ACC Thr Glu GAG ATG GGT Leu CTC Gly GGT Sac | His CAT AAT Arg Asn CGG 17 promoter/priming site ATG Met Asp CAT TCG Ser BsfB I His GAT 17 reverse priming site Arg CGG CTATAGGGGA Polyhistidine region CAC His Lys AAG Leu CIG Gly GGT CAT His Leu CTT TAC Tyr Asp TCT Xpress[™] epitope Ser CAC His Glu GAA GAC GAT ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCCTCTAGA AATAATTTTG His CAT Gly GGT His CAT Asp EK recognition site His CAT lac operator Lys AAG GAC TGA Asp Polyhistidine region His CAT Pro Asp GAT CCT GTTTGA His CAT ATC Ile AAGLys Asp His CAT TCCGGCTGCT EK cleavage site Pro GAT CCT CAT Asn CAT AAC V5 epitope GGT GLY Pro CCC GGG Pro CCT ATG AACAAAGCCC Met Leu CTC TT<mark>C</mark> AAG Phe Ala GCT Nhe I Th Leu CIC AGC Ser Gly GGT GAAAGGAAGC ATG Met Leu CTC TTTAACTTTA ACT Asp GAT Gly GGT Ser TCT GGA

ATAGGCGCCA GCAACCGCAC CTGTGGCGCC

GGTGATGCCG GCCACGATGC GTCCGGCGTA GAGGATCGAG ATCTCGATCC