

pTOPO-D1 一步法定向原核表达试剂盒

pTOPO-D1 Directional Expression Kit

使用说明

货号: CV203

试剂盒组成:

试剂盒组成	20 次 (PV203-01)
pTOPO-D1 Vector(30ng/μL)	20μL
10× Enhancer	20μL

产品储存: -20°C 储存, 至少 6 个月内不影响使用效果。

产品介绍:

本载体采用了世界最先进的 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, 否则建议琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收(货号: DR201)。如果是质粒为模板的 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°C-37°C)设立 10μL 连接体系(建议用 0.2mL PCR 管, PCR 仪器控温):

Components	Volume
纯化后的 PCR 产物	0.5-5μL
pTOPO-D1 Vector	1μL
10× Enhancer	1μL
灭菌水	X μL
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°C-30°C)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°C-37°C)连接 5 分钟。

注 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°C，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°C。

注：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，在冰浴中放置 30 分钟。

3) 将离心管置于 42°C 水浴中放置 60-90 秒，然后快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却 2-3 分钟，该过程不要摇动

4) 加 500μL LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37°C 180rpm 振荡培养 60 分钟。

注：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 1.5mL 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。

5) 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，4000rpm 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。

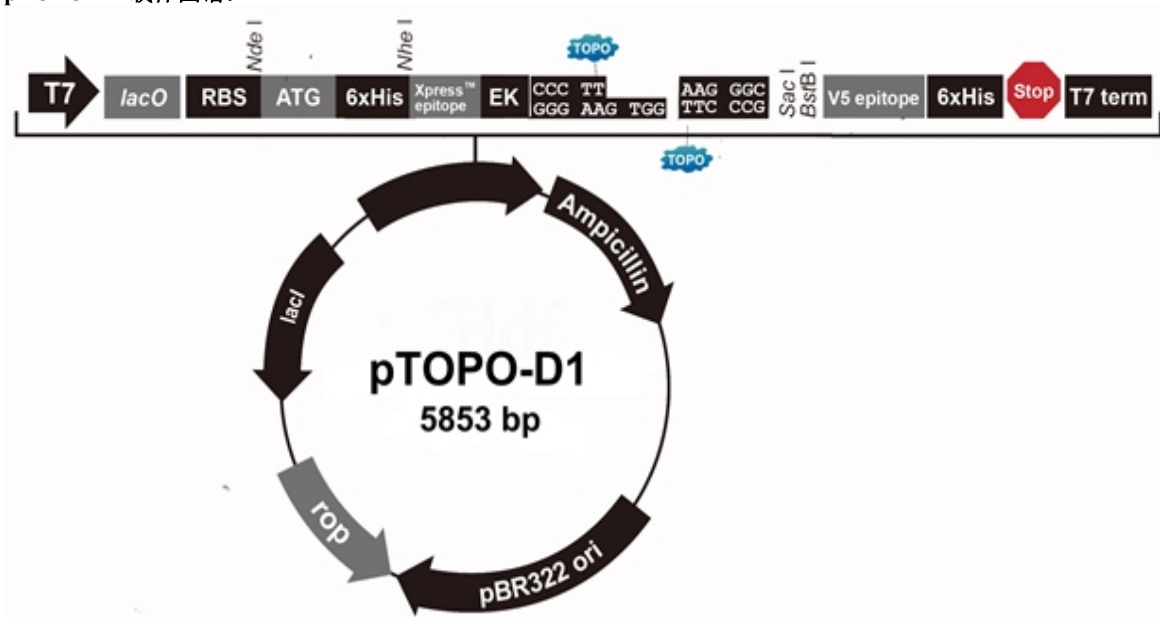
6. 目的基因表达：

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°C 250rpm 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:

```

ATAGGCGCCA GCAACCGCAC CTGTGGCGCC GGTGATGCCG GCCACGATGC GTCCGGCGTA GAGGATCGAG ATCTCGATCC
      T7 promoter/priming site
      T7 promoter          lac operator
CGCGAAATTA ATACGACTCA CTATAGGGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCCTCTAGA AATAATTTTG TTTAACTTTA

      RBS          Nde I          Polyhistidine region          Nhe I
AGAAGGAGAT ATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA
      Met Arg Gly Ser His His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly

      Xpress™ epitope
CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CAT CCC TTC ACC ... ..
Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp His Pro Phe Thr ... ..
      EK recognition site          EK cleavage site

      Sac I          BstBI          V5 epitope
AAG GGC GAG CTC AAT TCG AAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT
Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser

      Age I          Polyhistidine region
ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC
Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***

      T7 reverse priming site
TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG
=====

```

