

载体构建操作手册(简略版)

20150506 JimmyMall@163.com checked By Junliang Wang, Linyan

接种含空质粒的 DH5a 菌到含抗生素的 3-6ml LB 液体培养基，过夜培养，提质粒备用。

一、PCR

1.1 PCR 体系

稀释引物到 10uM。

PCR 20ul 体系	1tube
2xTaq Mix	10ul
primerUp	1ul
primerDown	1ul
Template	1ul (根据载体浓度调整)
ddH2O	to 20ul

模板可以是构建好的质粒、cDNA、菌落等。

1.2 PCR 循环 条件

step1: 95 度	5min; (充分解链)
step2: 94 度	30s,
step3: 55 度	30s, (该温度为引物与模板配对区的 Tm 值-5 度)
step4: 72 度	1min, (目的片段长度/DNA 聚合酶的延伸速度 + 10s)
step5:	GoTo step2 for 30 times;
step6:72 度	10min; (最终延伸)
step7:16 度	保持; (尽快取出放 4 度或电泳)

1%琼脂糖电泳，切胶回收。

或 直接把 PCR 产物过 DNA 纯化试剂盒。

二、双酶切

双酶切体系： 20ul。注意冰上操作。

-20ul 体系	1tube
enzyme1	0.5ul
enzyme2	0.5ul
10xCutSmartBuffer	2ul
insertion/vector 1	6ul
ddH2O	7ul

封口，混匀，离心。

反应条件：37 度至少 3h;

1%琼脂糖电泳，切胶回收。

三、连接(T4 DNA 连接)

T4 连接体系：10ul (冰上操作。)

--10ul-----	1tube-----
10x T4 Buffer	1ul
T4 DNA ligase	0.5ul
vector	2ul
insertion	6.5ul

封口，混匀，离心。

反应条件：16 度过夜；或 20-25 度至少 1h；

以下是官方文档，可以参考。

Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (MO202)

Protocol

- Set up the following reaction in a microcentrifuge tube on ice.
(T4 DNA Ligase should be added last. Note that the table shows a ligation using a molar ratio of 1:3 vector to insert for the indicated DNA sizes.) Use [NEBioCalculator](#) to calculate molar ratios.

COMPONENT	20 µl REACTION
10X T4 DNA Ligase Buffer*	2 µl
Vector DNA (4 kb)	50 ng (0.020 pmol)
Insert DNA (1 kb)	37.5 ng (0.060 pmol)
Nuclease-free water	to 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

- * The T4 DNA Ligase Buffer should be thawed and resuspended at room temperature.
- Gently mix the reaction by pipetting up and down and microfuge briefly.
- For cohesive (sticky) ends, incubate at 16°C overnight or room temperature for 10 minutes.
- For blunt ends or single base overhangs, incubate at 16°C overnight or room temperature for 2 hours(Alternatively, high concentration T4 DNA Ligase can be used in a 10 minute ligation).
- Chill on ice and transform 1-5 µl of the reaction into 50 µl competent cells.

<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>

四、转化

连接产物直接用作转化。尽量冰上操作。

- 取 5ul 连接产物（如果是质粒，则 0.5ul~1ul 足够），加到一管（50~100ul）感受态中，手指轻弹甩到底部，冰上放 30min；
- 放到 42 度水浴锅 30~90s（推荐 60s）；

3. 放到冰上 2~10min (推荐 5min) ;
4. 加入无抗性 LB 培养基 500ul, 37 度摇 1h;
5. 取出 100~200ul (<=200ul) 涂布带抗性 LB 平板, 37 度过夜 (16~18h) 培养。

五、鉴定

挑取单菌落到 2~5ml 带抗生素的 LB 液体培养基中, 37 度 200rpm 培养至少 12h;

可以

(1) 做 10ul 体系菌落/菌液 PCR 鉴定是否有目的条带。

1) 挑单克隆到 10ul 无菌水中, 混匀, 作为模板 (Template);

2) 做 10ul PCR 反应:

- PCR 10ul 体系---1tube-

2xTaq Mix 5ul

primerUp 0.5ul

primerDown 0.5ul

Template 1ul

ddH2O 3ul

反应条件: -----

95 度 6min; (充分解链)

25 循环: 94 度 30s, 55 度 30s, 72 度 1min (目的片段长度/DNA 聚合酶的延伸速度 + 10s);

72 度 10min; (最终延伸)

16 度保持; (尽快取出放 4 度或电泳)

配制 1% agarose 电泳检测, 有明显条带且大小合适则为阳性;

丢弃阴性 tube, 把阳性的菌其余 9ul 菌液接种到含抗生素的 2ml LB 中, 过夜摇;

第二天, 保种, 测序, 提质粒。

或 (2) 提质粒、双酶切看是否有插入片段;

六、测序

初步鉴定的阳性克隆, 送 200ul 新鲜菌液测序。

以测序结果为准。