

M5 pTOPO-D1 一步法定向原核 表达试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 pTOPO-D1 一步法定向原核表达试剂盒	20T	M667-01

【储存条件】

-20°C储存。

【产品简介】

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。

【产品组成】

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

【操作步骤】

测序可以采用 T7/T7 ter 通用引物测序 (见后面图谱)

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：MF029）。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（20°C-30°C）按照如下体系操作（10 μ l 体系）:

纯化后的 PCR 产物	0.5-8 μ l
pTOPO-D1 Vector	1 μ l
10 \times Enhancer	1 μ l
灭菌水	X μ l
总体积	10 μ l

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（20°C-30°C）连接 5 分钟。

本载体推荐室温 5 分钟完成连接，但在很多情况下连接 2-3 分钟已经可以得到足够多的转化子。

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。

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) 50-100 μ l 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 5 μ l 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 μ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37°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 μ 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 μ 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。

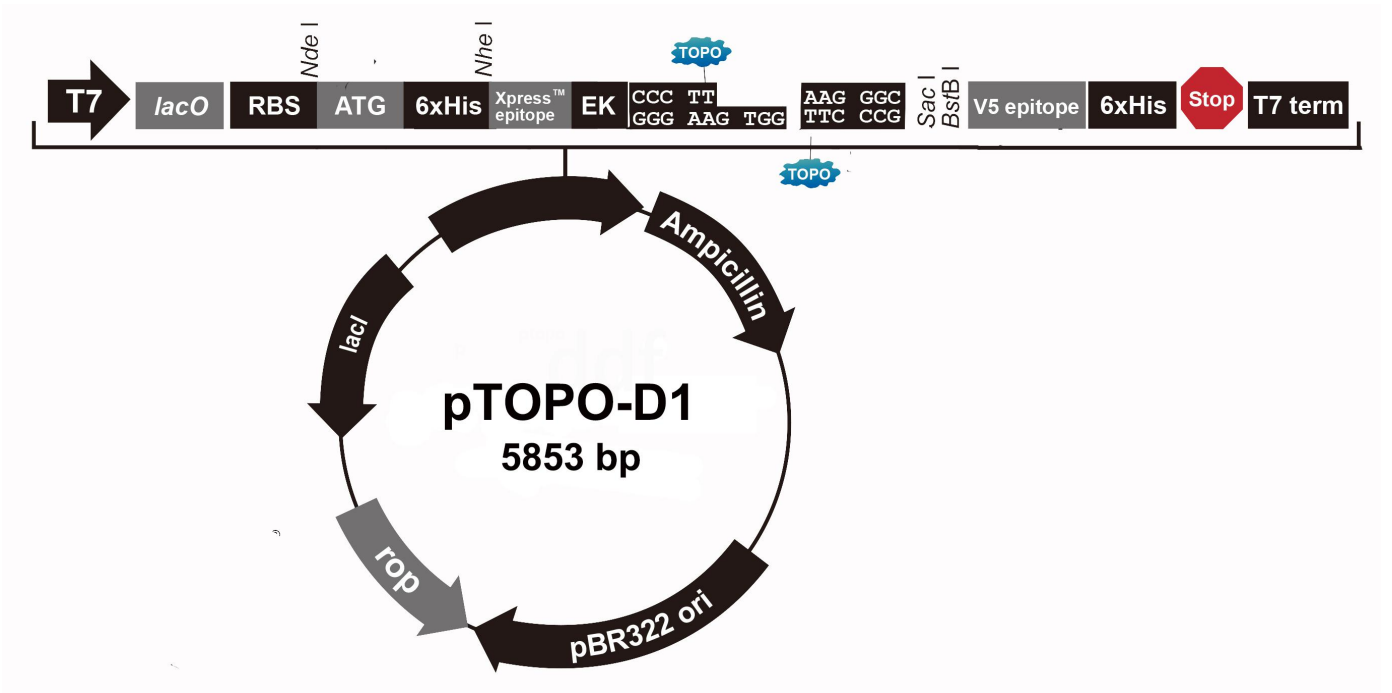
6. 目的基因表达:

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°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:

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

[ RBS ] [ Nde I ] [ Polyhistidine region ] [ Nhe I ]
AGAAAGAGAT ATACAT ATG CGG GGT TCT CAT 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

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
                                   Xpress™ epitope
                                   EK recognition site
                                   EK cleavage site
                                   V5 epitope

[ Sac I ] [ BstB I ]
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 TCCCGCTGCT AACAAAGCCC GAAAAGGAAGC
Thr Arg Thr Gly His His His His His His His His His His His His His His His His His His His

[ T7 reverse priming site ]
TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATATA CCCCTTTGGGG CCTCTAAACG
```

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。