

M5 HiPer GST 标签融合表达 T 载体试剂盒 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer GST 标签融合表达 T 载体试剂盒	5ul	MFK06003AS

产品保存: -20°C保存

产品组成:

pBET-3 (70ng/μl)	5μl
Ligation Mixture	30μl
T7t primer (10pmol/μl)	30μl

注意: 使用时请于冰水浴中溶解

产品简介:

pBET-3 载体是高效表达 T 载体, 线性化载体 3' -末端含有突出的碱基“T”, 可以将 3' -末端含有“A”的 PCR 扩增产物高效率的连接至 pBET-3 载体上。同时该载体含有完整的表达元件, 如 T7 启动子、RBS、转录终止子等。此外, 在表达框内 N-末端含有 GST 标签序列, C-末端含有 His6 标签, 双标签都可以与外源基因融合表达, 得到 N-末端融合有 GST 标签和 C-末端有 His6 标签的蛋白, 该融合蛋白可以用 GST 亲和层析纯化, 也可以用 His6 标签进行亲和纯化。本试剂盒中含有的 Ligation Mixture 高效连接液可以方便的将载体和外源片段进行高效连接, 反应产物可以直接用于转化。

产品说明:

- 感受态细胞的选择: 转化时请使用高效的感受态细胞, 热激感受态细胞转化效率应 $\geq 1 \times 10^7$ cfu/ug pUC18, 这样才可能得到比较理想的阳性克隆。
- 插入 DNA 片段的选择: PCR 片段扩增过程中, 应该尽量采用能得到单一条带的扩增条件。在片段扩增的过程中, 循环数可以控制在 15~25 循环之间, 并且要进行胶回收, 避免引物等杂质的存在。
- 插入 DNA 片段使用量的计算方法: 进行克隆时, 载体: 片段的摩尔比一般为 1: 3~1: 10, 一般根据实验需要选择合适的载体和片段的摩尔比。

使用方法:

- 在微量离心管中配制以下 DNA 溶液, 全量为 5 μl。

pBET-3	1 μl (70ng)
PCR 片段	适量
水	补足至 5μl

- 加入 5 μl 的 Ligation Mixture。
- 4°C 反应过夜或者 16°C 连接 2 小时至 4 小时。将 10 μl 连接混合液加入 100 μl 感受态细胞中, 冰水浴放置 30 分钟。
- 迅速置于 42°C 水浴热激 2 分钟, 迅速在冰水浴放 2 分钟。
- 加入 900 μl 2YT (或 LB) 培养基, 37°C, 180rpm 振荡培养 45 分钟。高速离心收集菌体, 去掉 800ul 上清, 留 200 μl 重悬细胞。

注意事项:

- Ligation Mixture 溶液请于冰水浴中溶解, 混匀后再使用。
- 连接反应请在 16°C 以下进行, 温度升高较难形成环状 DNA。连接时间控制在 4°C 反应过夜或者 16°C 反应 2 小时至 4 小时。对于较难连接的反应, 可以 4°C 过夜和 16°C 连接 2 小时交替连接。反应时间过短或者温度高较难筛选得到阳性克隆。
- 为提高克隆鉴定的效率, 尽量减少假阳性, 保证鉴定克隆为正向插入克隆, 在用 PCR 方法进行阳性克隆鉴定时, 应采用载体上游

引物和扩增片段的下游引物进行鉴定或者采用载体下游引物和扩增片段的上游引物进行鉴定。

附：鉴定与测序引物：

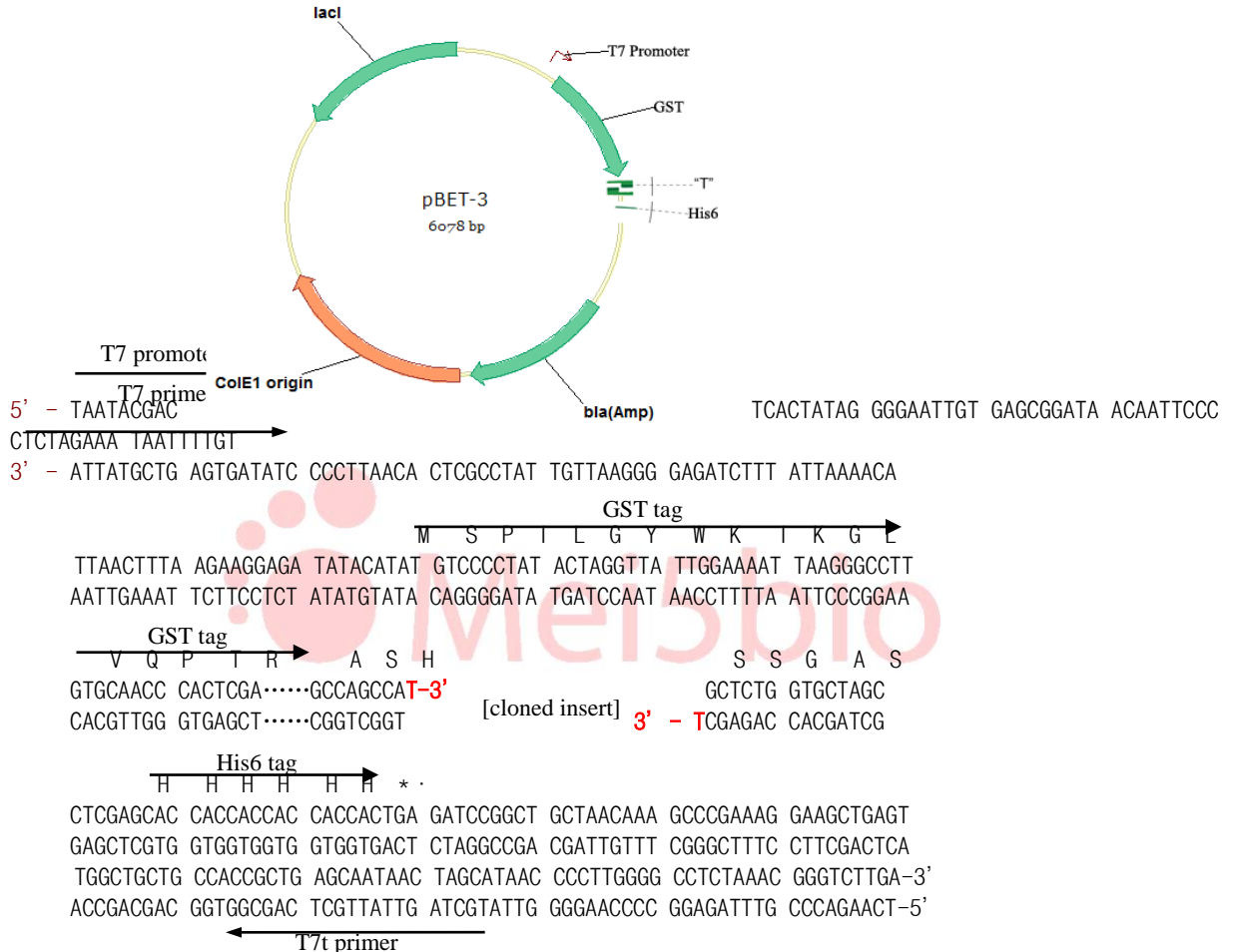
载体上游引物 PGEXF primer（通用引物）：

5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

载体下游引物 T7t primer（通用引物）：

5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

pBET-3 载体结构



附：外源基因扩增引物设计：

上游引物：5' -NNN.....NNN-3'

下游引物：5' -NNN.....NNN-3'

NNN：表示对框的外源基因编码序列，可以参照如上所示的载体序列确定。

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"