

载体构建实验报告单

订单号:

一: 背景资料

X 基因, 提取 RNA 并逆转录 cDNA, PCR 出其 cDNA, 将其重组于 pcdna3.1(-)-C-3xflag 载体上。

二: 要求服务内容

PCR, 引物设计合成及载体构建, 测序

三: 实验材料和仪器

1. 主要实验仪器

PCR 仪: TC-3000

2. 主要实验试剂

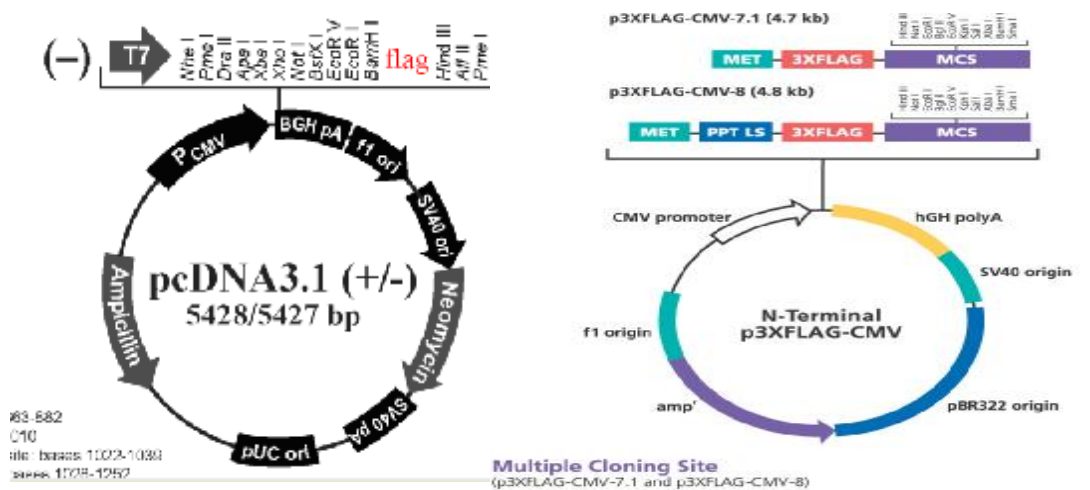
EcoRI, NotI, Sall, T4 DNA 连接酶: takara

PCR 试剂盒, 胶回收试剂盒: Omega

四: 实验操作

1. 基因序列分析

对您的基因序列分析结果, 均可以用 EcoRI、NotI、Sall 进行酶切, 选择 pcdna3.1(-)-C-3xflag 作为克隆表达载体, 其结构图普如下



根据以上信息设计 10 对引物:

X 一次 PCR 的 F 引物: 5 'CTG TGA AGA ACC GAG CCC 3'

X 一次 PCR 的 R 引物: 5'CTA GAG CCT GGT GAC ATCCC3'

X n 端标签 PCR 的 F 引物: 5 'ATAT GCGGCCGC GGG ACC TGC AGGA AGC

X n 端标签 PCR 的 R 引物: 5 'AATT GTC GAC CTA GAG CCTGG TGA CAT CC

X C 端标签 PCR 的 F 引物: 5 'ATAT GCGGCCGC ATG GGA CCT GCA GGAAGC

X C 端标签 PCR 的 R 引物: 5 'AATT GAA TTC GAG CCT GGT GAC ATC CCT

2. 各片断的 PCR

根据各片断的特征及引物的 GC 含量和计算出来的退火温度，设计 PCR 程序
最终各片断的跑琼脂糖胶检测如图 1：

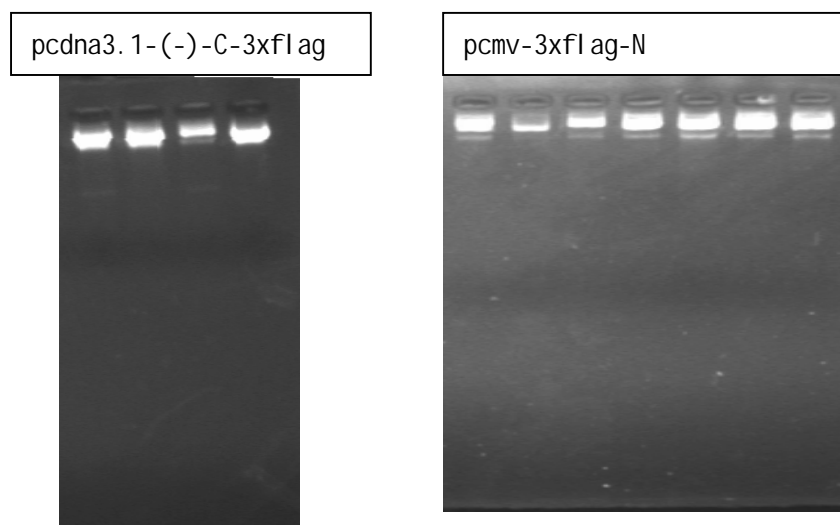


3. 片断的纯化

对 PCR 所得各片断进行纯化，由于做 PCR 过程中，尽管进行了退火温度的优化，但最后还是拖尾及杂带出现，因此选择凝胶回收纯化，纯化完再次进行凝胶检测。

4. 目的载体的获得

对含有 pcdna3.1(-)-C-3xfl ag 的菌液进行摇菌，抽质粒，检测质粒，如图 2：



5. 酶切

酶切用的是 EcoRI、NotI 和 Sal I、NotI 分别进行对获得的目的片断和载体进行双酶切，由于 NotI 的特殊性 (takara)，开始同时酶切，载体没有切动，后来，先用 EcoRI 切 1.5 个小时后，再加 NotI 切，方切动。反应体系如下表

所插入的基因简称	pcdna3.1- (-)-C-3xfl a	X-N	X-N	X-C	X-C
质粒或基因片段的量 (ul)	30	10	10	10	10
若标签在 N 端则是 Sal I 切; 在 C 端则为 EcoRI 切: (ul)	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7
H buffel(ul)	3.5	1.5	1.5	1.5	1.5
ddH ₂ O(ul)	0.5	2.8	2.8	2.8	2.8
在加好上述反应体系后, 在 37°C 的恒温金属浴上反应 1 个小时后, 加入以下溶液, 继续反应 5 个小时, 进行琼脂糖凝胶 (1.2%) 检测					
BSA	5.0	2.5	2.5	2.5	2.5
H buffel(ul)	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0
ddH ₂ O(ul)	7.3	5.8	5.8	5.8	5.8
Not I	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7

6. 酶切后切胶回收

切胶回收, 之后检测并定量

7. 连接

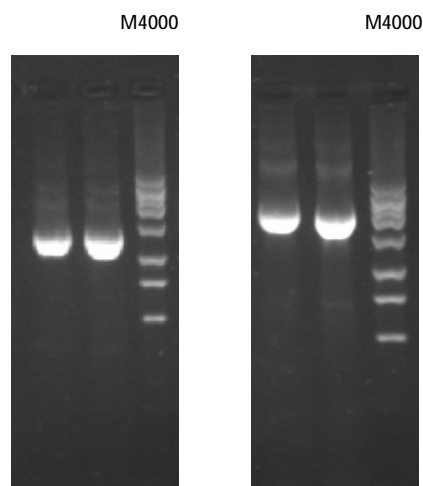
连接用的是 TakARA 的 T4 DNA 连接酶, 采用变温连, 3 小时后, 作热击转化。

8. 感受态制备。

感受态制备采用本实验特殊的制备方法, 用的菌种是 DH5 α 。

9. PCR 检测转化子

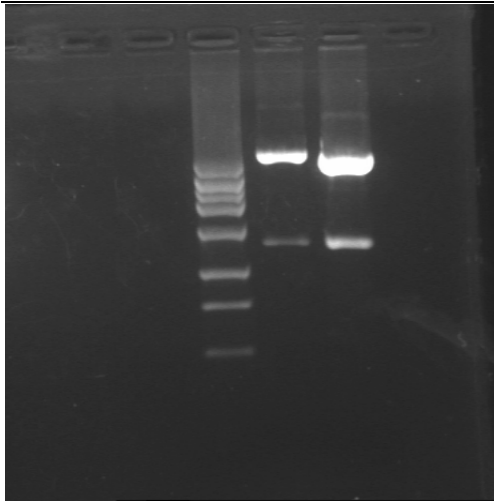
PCR 检测转化子, 结果如图 3



10. 抽取检测阳性的菌落摇菌, 抽质粒

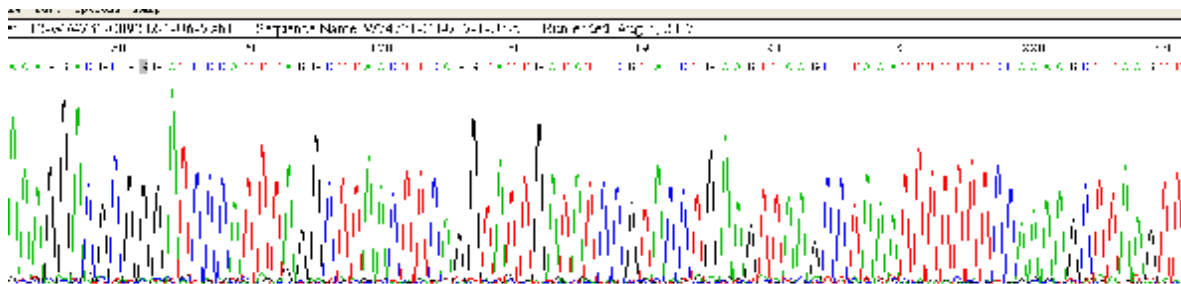
抽取检测阳性的菌落摇菌, 抽质粒, 采用试剂盒进行抽提。

11 酶切检测



X 基因的酶切结果,其中 1 是 4000 的 DNA marker, 2 是将该基因插入 pcdna3.1(-)-C-3xflag 结果;3 是将该基因插入 pcmv-3xflag-N 的酶切结果

12. 测序



原始结果另附，见测序报告

五：测序序列分析

序列符合理论序列(所用理论序列已经包括 3xflag 标签在内),f 分析结果请见相应的测序文献嘉 读取测序报告请用相应的专业软件，比对分析请先安装 DNASTar 软件，再阅读。

六：本次实验所附资料的清单

1. 载体构建实验报告单.doc 一份
2. 测序文件 一份
3. 实验相关图片.rar 一份
4. 测序文件浏览软件 一份

2008-5-27