

如何构建载体

目的基因和工具载体确定和选择

载体酶切

依据对应的酶切体系进行酶切，琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带。

获取目的基因片段

- 1) 引物设计和合成
- 2) PCR 扩增目的基因片段

配置相对应的反应体系，轻轻混合均匀后置于 PCR 仪中进行反应，反应条件依据产物而定。琼脂糖凝胶验证 PCR 结构并回收产物。

PCR 产物与载体进行交换

使用 T4 DNA Lignase 完成连接，根据反应体系（20 μ L 体系，见下表 1）进行混合配制，20-25 $^{\circ}$ C 下孵育 1-2 hrs，或 16 $^{\circ}$ C 连接过夜，随后冰水浴中冷却 5 min 后立即转化。

表 1 反应体系

| 添加物 | 反应体系 |
|-----------------------------|--------------------|
| ddH ₂ O | to 20 μ L |
| 10 \times Ligation Buffer | 2 μ L |
| 酶切后的载体 DNA | 50 ng (0.025 pmol) |
| 纯化后的 PCR 产物 | 50 ng (0.076 pmol) |
| T4 DNA Lignase | 1 μ L |
| Total | 20 L |

注：加入的线性载体 DNA 和纯化的 PCR 产物的最适摩尔比为 1:3。

转化

将交换反应产物加入 100 μ L 感受态细胞中，轻弹管壁混匀内容物，冰浴 30 min。42 $^{\circ}$ C 热激 90 s，冰浴 2 min。

加入 500 μ L 的 LB 培养基，37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 1 hrs。取适量菌液均匀涂布在含抗生素的平板上，恒温倒置培养 12-16 hrs。

菌落 PCR 鉴定

- 1) 根据目的基因设计鉴定上下游引物并合成

2) PCR 鉴定

根据配制反应体系（20 μL 体系，见表 2）加样，置于 PCR 仪中进行反应。随后根据电泳结果判断是否转化成功。

表 2 PCR 鉴定反应体系

| 反应体系 | 体积 (μL) |
|--------------------------|----------------------|
| ddH ₂ O | 9.2 |
| 2×Taq Plus Master Mix | 10 |
| 上游引物 (10 μM) | 0.4 |
| 下游引物 (10 μM) | 0.4 |
| 单菌落 | - |
| Total | 20 |

注：PCR 反应条件根据引物 GC 含量而定，一般退火温度比引物 T_m 低 5°C。延伸时间根据鉴定 PCR 产物长度而定，Taq Plus DNA 聚合酶延伸时间按 1 Kb/min 计算。

测序

将鉴定出的阳性克隆转化子转接至含抗生素的 LB 培养基中，37 °C 下培养 12-16 hrs，取适量培养好的菌液进行测序。将测序结果与目的基因序列进行比较分析。

质粒抽提

将测序结果正确的菌液转接至含抗生素的 LB 培养基中，37 °C 培养过夜，用质粒抽提试剂盒抽提质粒，电泳检测完成后进入下游实验。