

单子叶植物转基因载体构建试剂盒 (Catalog. No. VK011-03)

产品组成

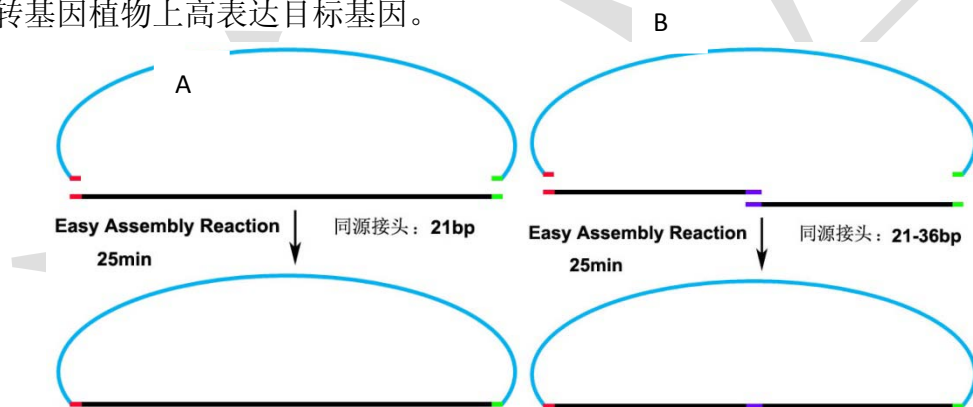
组成	VK011-03s	VK011-03L
PlantTransgenicVector	10T	20T
Easy Assembly Mix (Cat.No.VK009)	10 vial	20 vial
Positive control(PC)	10 μ L	10 μ L

注意：收到试剂盒后，使用前请离心，避免液体滞留在离心管盖、管壁上。

保存条件：-80℃保存一年；或-20℃保存两个月。请将产品于-80℃保存，避免反复冻融

产品说明

本试剂盒通过 **Easy Assembly** 的体外重组方法一步完成转基因植物双元载体构建。该方法不需要传统酶切连接的克隆方式，只需在目标基因的 PCR 产物上加 21bp 同源接头，就能高效、方便地把目标基因构建到植物双元载体上，实现在转基因植物上高表达目标基因。



构建原理：

- A. 一步 PCR 法构建转基因植物双元载体；B. 分步 PCR 法构建超长转基因植物双元载体

试剂盒的优势：

1. 采用零背景克隆技术，目标基因阳性克隆率特别高；
2. 操作简单，克服了双元载体大片段分子构建的酶切连接困难，只需做 PCR，就可以完成质粒的构建；
3. 反应时间短，PCR 产物+质粒+ Easy Assembly Mix 反应 25 分钟就可以进行转化；
4. 超长基因的构建一步完成，简单省力；
5. 多种表达载体的选择；

6. 基因片段最长可达 12kbp 以上;

注意事项: 若目标序列上有过多的重复序列, 则可能会在错误的位置发生同源重组, 产生错误的拼接产物混在正确的目标质粒中。

试剂盒的特性:

1. 玉米 Ubi 启动子高效表达目标蛋白;
2. 单子叶的5'UTR提高目标蛋白表达水平;
3. 35S启动子表达潮霉素抗性;

试剂盒的使用方法:

试剂盒使用前引物的设计与合成

请按照如下格式设计引物 oligo:

Gene-FP: 5' -CTTTGAAAAAGAGGGGGATTAATG-目的基因正向 PCR 扩增引物序列

Gene-RP: 5' -TGATTCAGCGTACCGAATTGTTA-目的基因反向 PCR 扩增引物序列 (TTA 为终止密码子, 可换为其他终止密码子, 如 TCA, CTA)

使用方法:

注意: 收到试剂盒后, 使用前请离心试管, 避免溶液残留管帽、管壁上。

步骤一: 目标基因的 PCR

用上述带有同源接头的引物, PCR 扩增目标基因的 DNA 片段。PCR 结束后, 跑琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目标 PCR 产物, 定量 PCR 产物浓度, 并将其按照如下规则稀释 (如目的 PCR 产物大小为 1kb, 则稀释终浓度为 10ng/μL, 若目的 PCR 产物大小为 2kb, 则稀释终浓度为 20ng/μL, 以此类推)

步骤二: 重组连接反应

1. 取一支 EasyAssemblymix, 离心, 避免液体残留在管盖、管壁上, 放置在冰上;
2. 取 0.5μL 步骤一中的稀释过的 PCR 产物与 2μL 的 Plant Transgenic Vector 于 EP 管中混合后, 将 2.5μL 混合液加入到一支 Easy Assembly mix 管中, 轻匀混合;
3. 立即置于 50°C (建议在 PCR 仪上进行), 反应 25 min 后, 进行后续的 E.coli 转化。

步骤三：转化

取步骤二的最终产物10 μ L加入到刚解冻的50 μ L DH5 α 感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴30分钟，42 $^{\circ}$ C热激90秒，冰上静置2分钟，然后加入500 μ L无抗LB，置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床中，170转，复苏一小时后涂卡纳抗性（Kan $^{+}$ ）的平板。

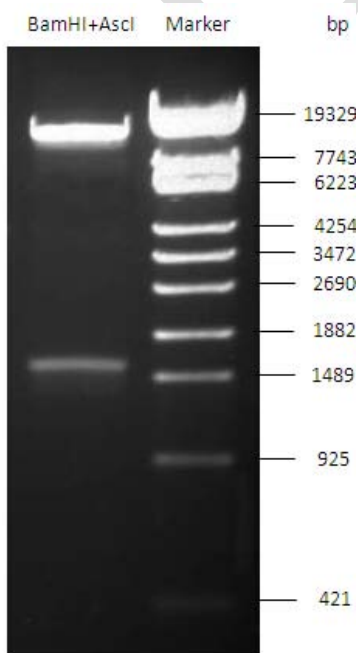
阳性克隆的鉴定：

1. 菌落PCR方法鉴定阳性克隆

- 挑选克隆至10 μ L无菌水中，涡旋混合；
- 取1 μ L混合液于25 μ L PCR体系中，用目的基因特异性引物（客户自备）鉴定阳性克隆；

2. 酶切鉴定阳性克隆：

挑选克隆接种于LB/Kan $^{+}$ 的液体培养基中，请注意这个质粒为低拷贝，建议收集4mL或大于4mL菌液抽提质粒，否则提取出的质粒量会很少。使用BamHI和AscI双酶切提取的质粒DNA，跑琼脂糖凝胶电泳，将分离大小两条带：大带（10.9Kb）和小带（目标基因大小+800bp）。若目标基因上有BamHI或AscI位点，则将产生相应的DNA酶切片段，下图为目标基因大小为700bp（该目的基因序列上不含BamHI或AscI位点）的阳性克隆酶切鉴定结果，如图所示使用BamHI和AscI酶切出10.9Kb的大带和1500bp的小带。



图：BamHI+AscI酶切鉴定图

3. 提取质粒测序:

挑3至5个阳性克隆进行测序。如果第一次测序得不到正确结果，请加送5个测序样品，进行测序。

测序引物如下:

Sqprimer1 (正向测序引物): TAGCCCTGCCTTCATACGCTAT, 测目的基因的N端

Sqprimer2 (反向测序引物): ATAAGAACCCTAATTTCCCTTATCG, 测目的基因的C端

测序结果示例如下 (NNNNNNNNNNNNNN代表插入的目的基因序列)。

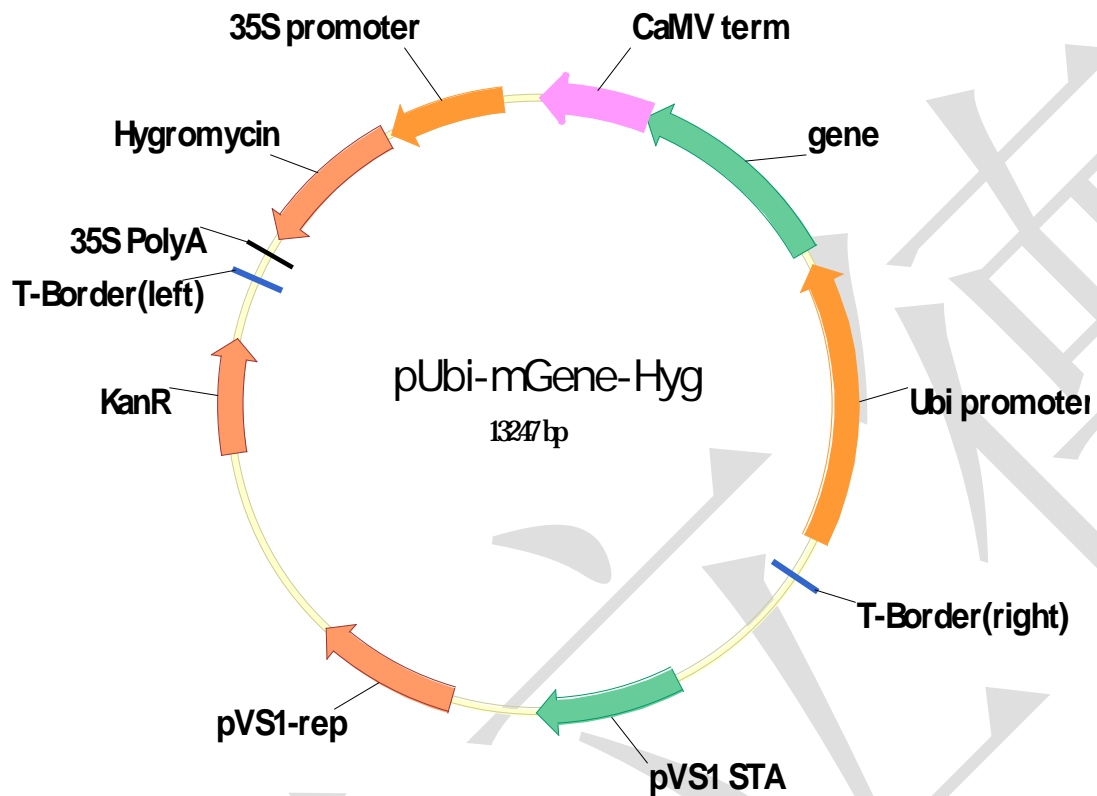
```
TAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTGGATCCGAATTCCAAGCAAC
GAACTGCGAGTGATTCAAGAAAAAAGAAAACCTGAGCTTTCGATCTCTAC
GGAGTGGTTTCTTGTTCTTTGAAAAAGAGGGGGATTANNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CAATT
CGGTACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTT
CTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTT
AT
```

附加说明:

1. 超长基因的构建方法:

若目标基因DNA片段过长,无法一次PCR得到全长,可以采用分段PCR方法,扩增DNA片段,每个PCR片段有21-36bp的重叠区域,将各个PCR产物与试剂盒的载体等摩尔混合,一步构建出超长目标基因的植物转基因载体。

质粒图谱:



其他转基因植物相关试剂盒:

VK011-03: Ubi 启动子高效表达目标蛋白, 适用于单子叶植物, 潮霉素抗性



VK011-04: Ubi 启动子高效表达目标蛋白, 适用于单子叶植物, 草铵膦抗性



VK011-05: 35S 启动子高效表达目标蛋白, 适用于双子叶植物, 特别用于水稻, 潮霉素抗性



VK011-06: 35S 启动子高效表达目标蛋白, 适用于双子叶植物, 特别用于水稻, 草铵膦抗性

