

## 双荧光素酶载体构建实验报告

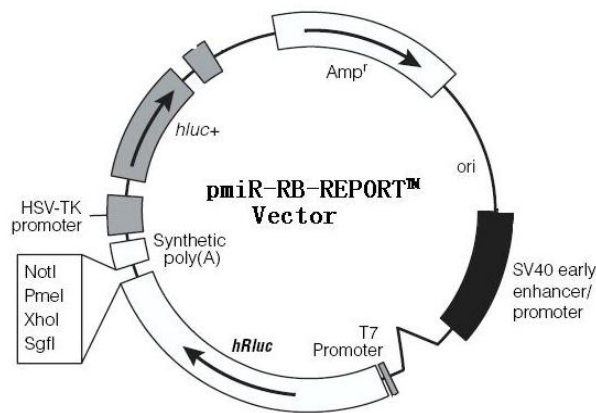
### 实验简介

利用 PCR 方法, 根据 KLF3 (*Ovis aries*) 3'UTR 序列信息设计其扩增引物, 以 *Ovis aries* 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 KLF3 基因的 3' UTR 序列, 将其克隆到 **pmiR-RB-REPORT™** 双荧光素酶报告载体中, 所用载体的报告荧光为 hRluc, 校正荧光为 hluc (做内参校正)。

### 实验步骤及结果:

#### 一、基因序列分析

对基因序列及载体序列分析, 可以利用 **XhoI**, **NotI** 两个限制性内切酶将目的基因片段克隆到载体中, 载体图谱如下:



设计扩增引物如下:

oar\_KLF3\_3UTR\_F: GGC**GGCTCGAG**AGTGTTGCACTAATGTGGA

oar\_KLF3\_3UTR\_R: AAT**GCGGCCGCG**GAGTAGAAACAGAGAAGGAAC

红色分别为 **XhoI**, **NotI** 酶切位点序列, 之前序列为保护碱基, 引物扩增总长度为 607bp。

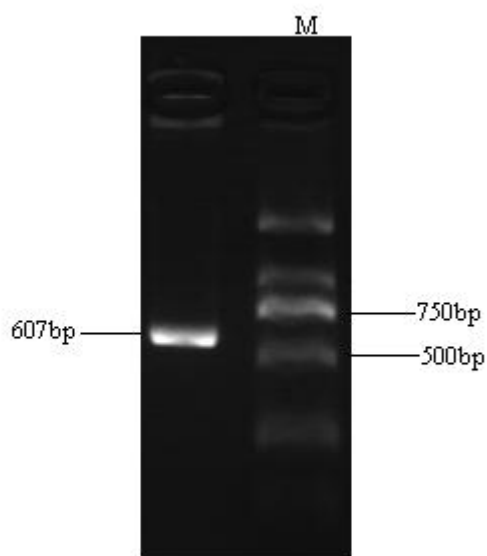
oar\_KLF3\_mut\_F: TATATTTTATTCGAAATAAGACTGAATGGGTA

oar\_KLF3\_mut\_R: GTCTATTTTCGAATAAAAATATATTACTTTA

#### 二、PCR

反应体系设计为 30  $\mu$ l 总体系, 具体是 5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l, 上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l, Phusion DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l, DNA 模板 1  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 30  $\mu$ l 体系。反应条件为 (降落 PCR): 98 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性, 循环内 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 从 65 $^{\circ}$ C 每个循环降 1 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 10 个循环; 再 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 60 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 进行 15 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 如下:



备注：M: D2000；扩增大小与理论大小相符。

### 三、PCR 产物的纯化

按照凝胶纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 四、酶切

用 *XhoI*, *NotI* 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10×H 缓冲液 4 μl，DNA 约 2 μg，内切酶(10 U/μl) 各 1 μl，灭菌去离子水补足到 40 μl。反应条件 37℃，4 小时。

### 五、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 六、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2 μl(约 150 ng)，载体 0.5 μl(约 50 ng)，solution I 快速连接液 5 μl，灭菌去离子水补足到 10 μl，16℃ 连接 30 分钟。

### 七、转化

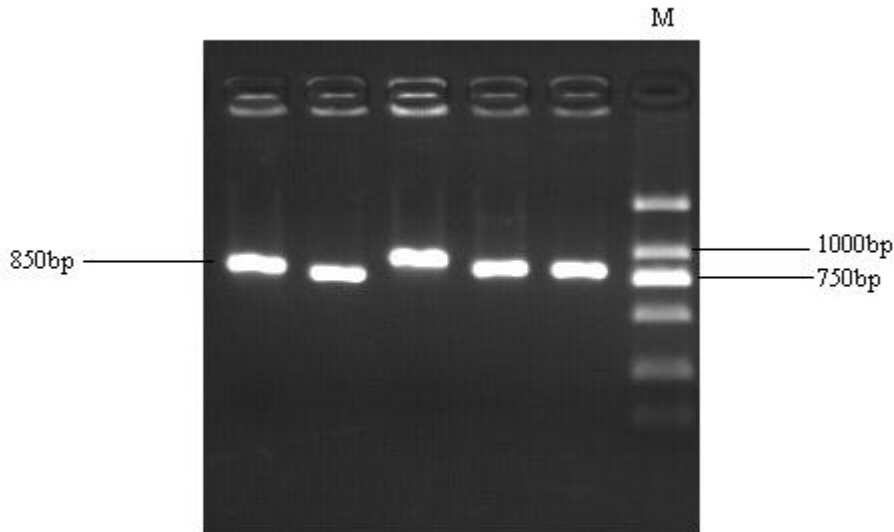
- 1、取连接产物加到 100 μl DH5α 感受态细胞中混匀，冰浴 30 分钟。
- 2、将上述转化液置于 42℃ 水浴 90 秒，取出后立即置于冰浴中放置 2-3 分钟。
- 3、向其中加入 900 μl 37℃ 预热的 LB（不含抗生素）培养基，150 rpm、37℃ 振荡培养 45 分钟。
- 4、2500 rpm 离心 5 分钟，将上清液吸走，留 100 μl 混匀菌液，加到含 Amp 抗生素 LB 固体琼脂培养基上（抗生素浓度 100 μg/ml），用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37℃ 培养 12-16 小时。

### 八、菌落 PCR 鉴定

挑取上述平板上的单菌落，溶到 3 μl 水中，取 0.5 μl 做模板，进行 PCR。反应体系设计为 10 μl 总体系，具体是 10×Taq buffer Buffer 1 μl，25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.6 μl，2.5 mM dNTP mix 1 μl，载体上下游引物（10 μM）各 0.5 μl，Taq DNA 聚合酶（2.5 U/μl）0.3 μl，

DNA 模板 0.5  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 10  $\mu$ l 体系。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 分钟预变性, 循环内 95 $^{\circ}$ C 30 秒变性, 56 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟; 20 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

实验共挑取 5 个菌落, 进行 PCR。PCR 反应完取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 用载体上游和载体下游引物扩增的条带理论大小为 850bp 左右, 其实际扩增条带如下:



备注: M: D2000 ; 菌 P 大小与理论大小相符。

#### 九、将阳性的克隆送测序公司测序进一步鉴定 (广州市锐博生物科技有限公司), 详细测序结果请参考附件

(加黑划线标注为插入序列, 两边为载体序列)

```
GGACGCTCCAGATGAAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGA
TCGCTCGAGAGTGTGACTAATGTGGAATTTGAAAACTATATTGCTGATACTGTATATCTGCACATCATTCCCTGATTAGATT
GTTTAAAAGACAATCTCAAAGGTCTAAGGTTTTAAAATAATTTGGTTGGTTTAAAATACACAGTCATCTTGAAGGAATCAC
TGTCATGCATGAAGTTGTTTCAGAGTGGTCTTATTCTCTTCTGGTCAAGGTTAACAATTTCTAAATGATTGCAAATTCACCTA
AATAATACATTTACAAAGCCATTTTACATGCATTAACGAGGGCTACAACAATACTATGTTTTACAAATACTAGCACATTTTTTT
TTGCTGTTATGTACTTAGTGTAGAGGGTCAAATAATCTTCTGCTTAGCATCTCTTAAACCATACCTGCAAATATAGCAGGA
TTATTACATTTACAGTACTTTAATACTTGTATAAACTATGCAGAAATTTTTAATAAAAGTGTAATATATTTTATAAGCTAATAAGAC
TGAATGGGTAAAGGTTTTTAGCATGCATTAAGTATACTTGCAAATACTGAAACATTTTGGTAATCTTCTTACTAAAGATGTGAA
TGTTAATGTTTCTTCTGTTTCTACTCGCGGCCGCTGGCCGCAATAAAATATCTTTAATTTTTTACTTACATCTGTGTGTTGGTT
TTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGG
```

#### 十、突变载体构建

利用 PCR 突变的方法, 在野生型载体基础上, 设计突变引物将靶序列 **ATAAGCT** 突变为 **TATTCGA**。

##### 1、突变分段 PCR

以野生型载体为模板, 分别扩增含突变序列的两段序列。反应体系设计为 30  $\mu$ l 总体系, 具体是 5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l, 上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l (上游引物与突变下游引物配对, 突变上游引物与下游引物配对), Phusion DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l, DNA 模板 1  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 30  $\mu$ l 体系。反应条件为 (降落 PCR): 98 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性, 循环内 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 从 65 $^{\circ}$ C 每个循环降 1 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒; 10 个循环; 再 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 60 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 进行 15 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 2、突变两段拼接

反应体系设计为10  $\mu$ l 总体系，具体是上述纯化产物各取1  $\mu$ l，5 $\times$ Phusion Buffer 2  $\mu$ l，2.5 mM dNTP mix 0.8  $\mu$ l。Phusion DNA 聚合酶（2 U/ $\mu$ l）0.1  $\mu$ l，用灭菌水补足10  $\mu$ l 体系。反应条件为（降落 PCR）：98 $^{\circ}$ C 2分钟预变性，循环内98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，从60 $^{\circ}$ C每个循环降1 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，7个循环；再98 $^{\circ}$ C 10秒变性，55 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，进行10个循环；PCR 反应循环后72 $^{\circ}$ C继续延伸3分钟，然后4 $^{\circ}$ C保存。

## 3、拼接后 PCR

反应体系设计为30  $\mu$ l 总体系，具体是5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l，2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l，上下游引物（10  $\mu$ M）各1  $\mu$ l，Phusion DNA 聚合酶（2 U/ $\mu$ l）0.3  $\mu$ l，DNA 模板1  $\mu$ l（约100 ng），用灭菌水补足30  $\mu$ l 体系。反应条件为（降落 PCR）：98 $^{\circ}$ C 2分钟预变性，循环内98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，从65 $^{\circ}$ C每个循环降1 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，10个循环；再98 $^{\circ}$ C 10秒变性，60 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，进行15个循环；PCR 反应循环后72 $^{\circ}$ C继续延伸3分钟，然后4 $^{\circ}$ C保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 4、酶切

用 *Xho*I，*Not*I 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10 $\times$ H 缓冲液 4  $\mu$ l，DNA 约2  $\mu$ g，内切酶(10 U/ $\mu$ l) 各1  $\mu$ l，灭菌去离子水补足到40  $\mu$ l。反应条件37 $^{\circ}$ C，4小时。

## 5、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 6、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2  $\mu$ l(约150ng)，载体0.5  $\mu$ l(约50ng)，solution I 快速连接液 5  $\mu$ l，灭菌去离子水补足到10  $\mu$ l，16 $^{\circ}$ C连接30分钟。

## 7、转化

- 1) 取连接产物10  $\mu$ l 加到100  $\mu$ l DH5 $\alpha$ 感受态细胞中，混匀，冰浴30分钟。
- 2) 将上述转化液置于42 $^{\circ}$ C水浴90秒，取出后立即置于冰浴中放置2-3分钟。
- 3) 向其中加入900  $\mu$ l 37 $^{\circ}$ C预热的LB(不含抗生素)培养基，150 rpm、37 $^{\circ}$ C振荡培养45分钟。
- 4) 2500 rpm离心5分钟，将上清液吸走，留100  $\mu$ l混匀菌液，加到含Amp抗生素LB固体琼脂培养基上(抗生素浓度100  $\mu$ g/ml)，用无菌的弯头玻棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}$ C培养12-16小时。

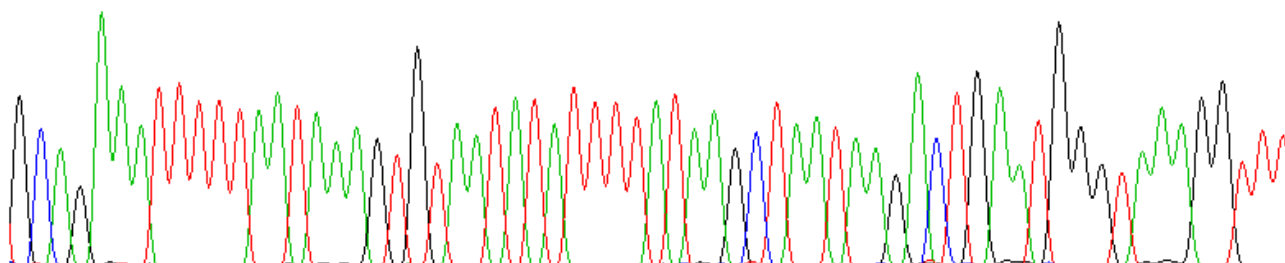
## 8、菌落扩大培养提取质粒

挑取上述平板上的单菌落，接种到含 Amp 抗生素（抗生素浓度100  $\mu$ g/ml）的4 ml LB 液体培养基中，于220 rpm 摇床培养12小时；然后提取质粒。

将质粒送测序公司测序鉴定，详细测序峰图结果请参考附件。

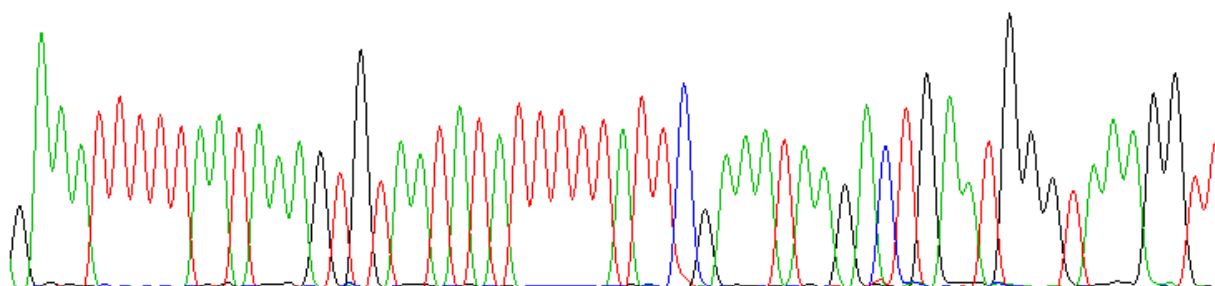
测序结果显示，成功将靶序列 **ATAAGCT 突变为 TATTCGA**。

G C A G A A A T T T T T A A T A A A G T G T A A T A T A T T T T A T A A G C T A A T A A G A C T G A A T G G G T A A A G G T T T



KLF3-WT

G A A A T T T T T A A T A A A G T G T A A T A T A T T T T A T T C G A A A T A A G A C T G A A T G G G T A A A G G T T



KLF3-MUT

### 主要试剂

LB 培养基: 蛋白胨 (tryptone), 酵母提取物 (yeast extract)	OXOID 公司 (英)
限制性内切酶	Fermentas 公司
TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
Phusion DNA 聚合酶	Fermentas 公司
琼脂糖	西班牙 BioWest 公司
Universal DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
连接反应液	Fermentas 公司
普通 DNA 聚合酶	Fermentas 公司
DH5 $\alpha$ 感受态细胞	天根生化科技 (北京) 有限公司

广州市锐博生物科技有限公司  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: www.sima.cn www.ribobio.com 邮箱: support@ribobio.com

**主要仪器**

PCR 仪器: Bio-RAD 公司  
引物合成: 苏州金唯智生物科技有限公司  
序列测定: 广州市锐博生物科技有限公司

如果有任何问题，请联系我们！

广州市锐博生物科技有限公司  
地 址: 广州开发区科学城科学大道 182 号创新大厦 C3 区 13 层  
电 话: (020) 32290075  
邮 箱: [service@ribobio.com](mailto:service@ribobio.com)

**广州市锐博生物科技有限公司**  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: [www.sima.cn](http://www.sima.cn) [www.ribobio.com](http://www.ribobio.com) 邮箱: [support@ribobio.com](mailto:support@ribobio.com)

## 双荧光素酶载体构建实验报告

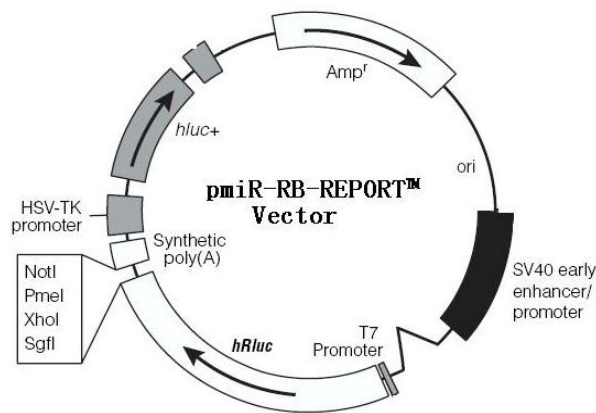
### 实验简介

利用 PCR 方法，根据 CNKSR2 (*Ovis aries*) 3'UTR 序列信息设计其扩增引物，以 *Ovis aries* 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 CNKSR2 基因的 3' UTR 序列，将其克隆到 **pmiR-RB-REPORT™** 双荧光素酶报告载体中，所用载体的报告荧光为 hRluc，校正荧光为 hluc（做内参校正）。

### 实验步骤及结果：

#### 一、基因序列分析

对基因序列及载体序列分析，可以利用 **XhoI**、**NotI** 两个限制性内切酶将目的基因片段克隆到载体中，载体图谱如下：



设计扩增引物如下：

oar\_CNKSR2\_3UTR\_F: GGC**GGCTCGAG**TACTACTGCGAGAGTTGGTAGA

oar\_CNKSR2\_3UTR\_R: AAT**GCGGCCG**CCAAGAAGTAAGGAGAAAAGTTAGG

红色分别为 **XhoI**、**NotI** 酶切位点序列，之前序列为保护碱基，引物扩增总长度为 759bp。

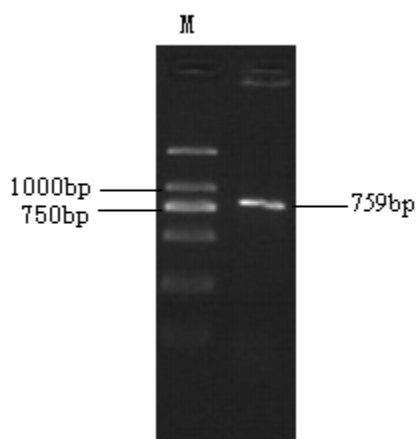
oar\_CNKSR2\_mut\_F: ACAGATTGTATT**CGAAATGTTT**AGAGAATTTAG

oar\_CNKSR2\_mut\_R: TAAACATTT**CGAATACAATCTGTG**AGTCCAATG

#### 二、PCR

反应体系设计为 30  $\mu$ l 总体系，具体是 5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l，2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l，上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l，Phusion DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l，DNA 模板 1  $\mu$ l (约 100 ng)，用灭菌水补足 30  $\mu$ l 体系。反应条件为 (降落 PCR)：98 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性，循环内 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，从 65 $^{\circ}$ C 每个循环降 1 $^{\circ}$ C 退火，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，10 个循环；再 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，60 $^{\circ}$ C 退火，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，进行 15 个循环；PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟，然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析，如下：



备注：M: D2000；扩增大小与理论大小相符。

### 三、PCR 产物的纯化

按照凝胶纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 四、酶切

用 *Xho*I, *Not*I 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10×H 缓冲液 4 μl，DNA 约 2 μg，内切酶(10 U/μl) 各 1 μl，灭菌去离子水补足到 40 μl。反应条件 37℃，4 小时。

### 五、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 六、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2 μl(约 150 ng)，载体 0.5 μl(约 50 ng)，solution I 快速连接液 5 μl，灭菌去离子水补足到 10 μl，16℃ 连接 30 分钟。

### 七、转化

- 1、取连接产物加到 100 μl DH5α 感受态细胞中混匀，冰浴 30 分钟。
- 2、将上述转化液置于 42℃ 水浴 90 秒，取出后立即置于冰浴中放置 2-3 分钟。
- 3、向其中加入 900 μl 37℃ 预热的 LB（不含抗生素）培养基，150 rpm、37℃ 振荡培养 45 分钟。
- 4、2500 rpm 离心 5 分钟，将上清液吸走，留 100 μl 混匀菌液，加到含 Amp 抗生素 LB 固体琼脂培养基上（抗生素浓度 100 μg/ml），用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37℃ 培养 12-16 小时。

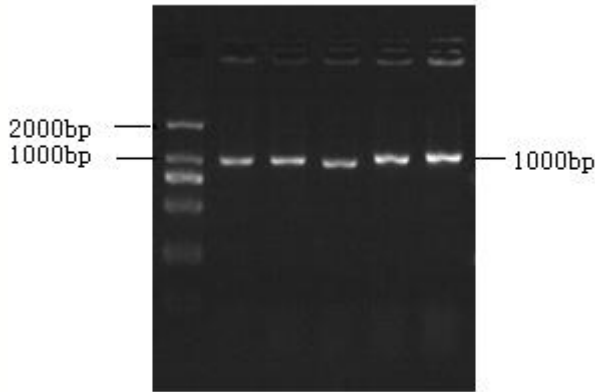
### 八、菌落 PCR 鉴定

挑取上述平板上的单菌落，溶到 3 μl 水中，取 0.5 μl 做模板，进行 PCR。反应体系设计为 10 μl 总体系，具体是 10×Taq buffer Buffer 1 μl，25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.6 μl，2.5 mM dNTP mix 1 μl，载体上下游引物（10 μM）各 0.5 μl，Taq DNA 聚合酶（2.5 U/μl）0.3 μl，DNA 模板 0.5 μl（约 100 ng），用灭菌水补足 10 μl 体系。反应条件为 95℃ 3 分钟预变性，循环内 95℃ 30 秒变性，56℃ 退火，72℃ 延伸 1 分钟；20 个循环；PCR 反应循环后 72℃ 继续延伸 3 分钟，然后 4℃ 保存。

实验共挑取 5 个菌落，进行 PCR。PCR 反应完取 5 μl PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析，用载体上游和载体下游引物扩增



的条带理论大小为1000bp左右，其实际扩增条带如下：



备注：M: D2000；菌P大小与理论大小相符。

## 九、将阳性的克隆送测序公司测序进一步鉴定（广州市锐博生物科技有限公司），详细测序结果请参考附件

（加黑划线标注为插入序列，两边为载体序列）

ATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCGAGTACACTGC  
 GAGAGTTGGTAGAACCTCTCCATGCCAAATCGGATCCACTTCTGTTGGCACTCAACCCATTGGACTCACAGATTGATAAGCT  
AATGTTTAGAGAATTTAGATCGGAGAGAGTCGGCACGACGCAGACTTAACATCAACCTCTTGCAAGCAACTAAAATGGCCT  
CGTCCTTGCTGTTTATAACAGAAAACAGACTTTTAAAAGCTTAGATCATCAAGTGTTTTGGATTGGGGGCCTCCCTAAAGGG  
ATATTAAGAGGGGCAGGCCACTCTTAAGAAGAATGCAAGCTTCTTCACTGGGACTAGCATAAGATCAAAGCCAATCAAGA  
TGGAGCACAGTGACAGAAAACCTGCTGTTTCTGTGGGTGAACAGAGGGAAAGGGCACTGACTGGGGAAGGGCTCAGTTGT  
GTTCTCCTGTACAGGAAAGGAGAGGGATCAGCTCCAATAACTAGAAAACCCTGGCTGTTCAATGGACTCTTAAGTGGCCT  
CTTGAAGCAAAGCAGAGAAAAGCAAATCTGTGTGTTAAGTGTATTTTCGCAATTTTAAAATTTGACGTGCTGTATTGTACTAC  
ATTAAGTGTAATCTTAAGGCAAGGTATCTACAACCTGCTCTGAAACTTACTATGTTTATTCTATTATAAAGTGTATTCAGGTGC  
AACACAGAGACTGCTTTCAGTGGCACTAATGAAGAAAATGCCACATGCCAGGCTTTAGTAGATTCCTCAGCTAAAATCCTAA  
CTTCTCCTTACTTCTTGGCGGCCGCTGGCCGCAATAAAAATATCTTTATTTCATTACATCTGT

## 十、突变载体构建

利用PCR突变的方法，在野生型载体基础上，设计突变引物将靶序列 **ATAAGCT** 突变为 **TATTCGA**。

### 1、突变分段PCR

以野生型载体为模板，分别扩增含突变序列的两段序列。反应体系设计为30 μl 总体系，具体是5×Phusion Buffer 6 μl，2.5 mM dNTP mix 2.4 μl，上下游引物（10 μM）各1 μl（上游引物与突变下游引物配对，突变上游引物与下游引物配对），Phusion DNA 聚合酶（2 U/μl）0.3 μl，DNA 模板 1 μl（约100 ng），用灭菌水补足30 μl 体系。反应条件为（降落PCR）：98℃ 2分钟预变性，循环内98℃ 10秒变性，从65℃每个循环降1℃退火，72℃延伸30秒；10个循环；再98℃ 10秒变性，60℃退火，72℃延伸30秒，进行15个循环；PCR 反应循环后72℃继续延伸3分钟，然后4℃保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 2、突变两段拼接

反应体系设计为10 μl 总体系，具体是上述纯化产物各取1 μl，5×Phusion Buffer 2 μl，2.5 mM dNTP mix 0.8 μl。Phusion DNA 聚合酶（2 U/μl）0.1 μl，用灭菌水补足10 μl 体系。反应条件为（降落PCR）：98℃ 2分钟预变性，循环内98℃ 10 秒变性，从60℃每个循环降1℃退火，72℃延伸30秒，7个循环；再98℃ 10秒变性，55℃退火，72℃延伸30秒，进行10个循环；PCR 反应循

环后72℃继续延伸3分钟，然后4℃保存。

### 3、拼接后 PCR

反应体系设计为30 μl 总体系，具体是5×Phusion Buffer 6 μl，2.5 mM dNTP mix 2.4 μl，上下游引物（10 μM）各1 μl，Phusion DNA 聚合酶（2 U/μl）0.3 μl，DNA 模板1 μl（约100 ng），用灭菌水补足30 μl 体系。反应条件为（降落 PCR）：98℃ 2分钟预变性，循环内98℃ 10 秒变性，从65℃每个循环降1℃退火，72℃延伸30秒，10个循环；再98℃ 10秒变性，60℃退火，72℃延伸30秒，进行15个循环；PCR 反应循环后72℃继续延伸3分钟，然后4℃保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 4、酶切

用 *XhoI*，*NotI* 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10×H 缓冲液 4 μl，DNA 约2 μg，内切酶(10 U/μl) 各1 μl，灭菌去离子水补足到40 μl。反应条件37℃，4小时。

### 5、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 6、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2 μl(约150ng)，载体0.5 μl(约50ng)，solution I 快速连接液 5 μl，灭菌去离子水补足到10 μl，16℃连接30分钟。

### 7、转化

1) 取连接产物10 μl 加到100 μl DH5α感受态细胞中，混匀，冰浴30分钟。

2) 将上述转化液置于42℃水浴90秒，取出后立即置于冰浴中放置2-3分钟。

3) 向其中加入900 μl 37℃预热的LB(不含抗生素)培养基，150 rpm、37℃振荡培养45分钟。

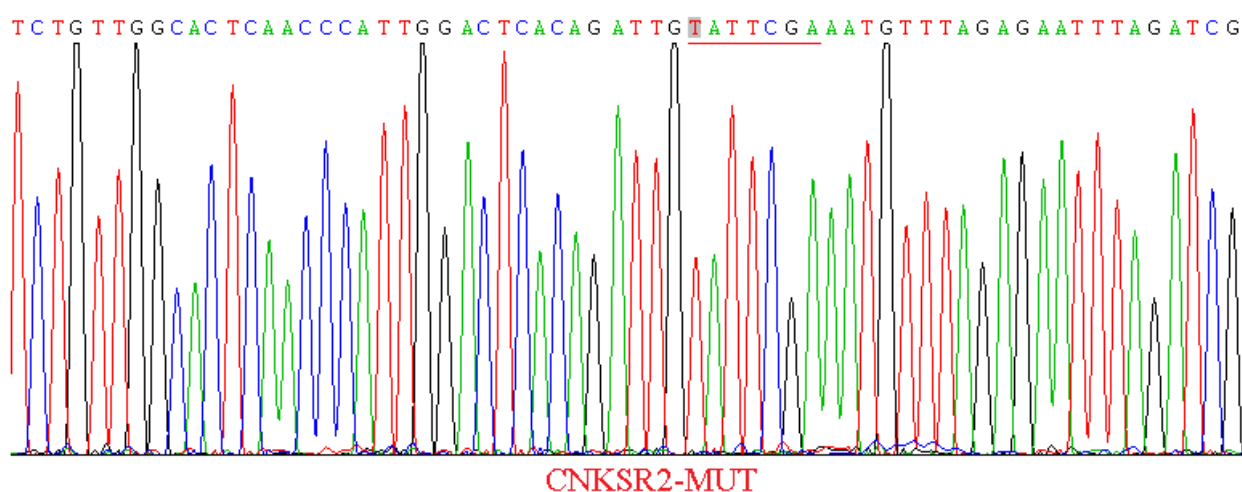
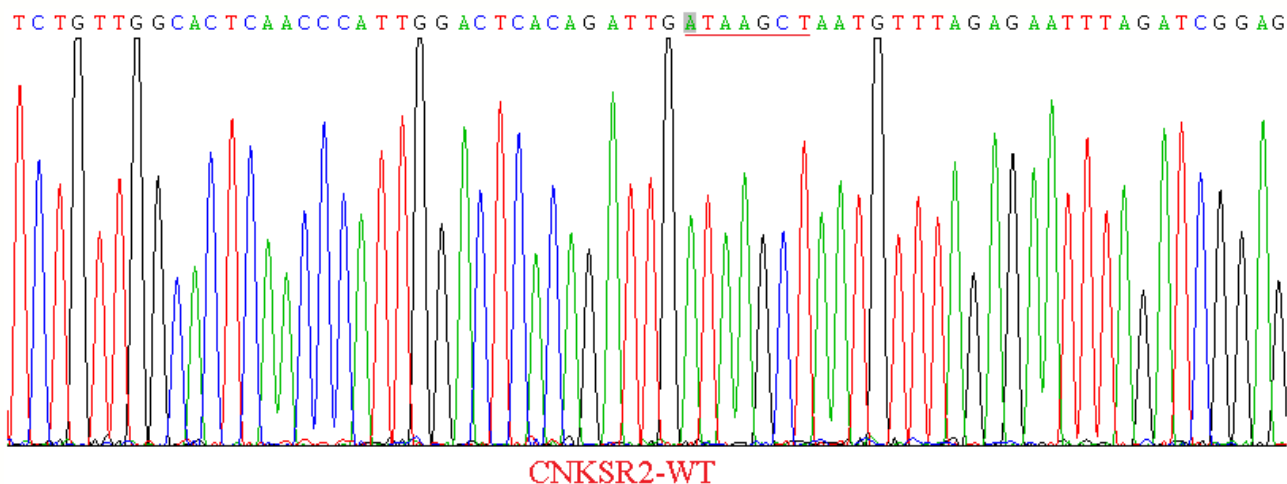
4) 2500 rpm离心5分钟，将上清液吸走，留100 μl混匀菌液，加到含Amp抗生素LB固体琼脂培养基上(抗生素浓度100 μg/ml)，用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37℃培养12-16小时。

### 8、菌落扩大培养提取质粒

挑取上述平板上的单菌落，接种到含 Amp 抗生素（抗生素浓度100 μg/ml）的4 ml LB 液体培养基中，于220 rpm 摇床培养12小时；然后提取质粒。

将质粒送测序公司测序鉴定，详细测序峰图结果请参考附件。

测序结果显示，成功将靶序列 **ATAAGCT** 突变为 **TATTCGA**。



### 主要试剂

LB 培养基: 蛋白胨 (tryptone), 酵母提取物 (yeast extract)	OXOID 公司 (英)
限制性内切酶	Fermentas 公司
TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
Phusion DNA 聚合酶	Fermentas 公司
琼脂糖	西班牙 BioWest 公司
Universal DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
连接反应液	Fermentas 公司
普通 DNA 聚合酶	Fermentas 公司
DH5α 感受态细胞	天根生化科技 (北京) 有限公司

### 主要仪器

## 广州市锐博生物科技有限公司

GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: www.sima.cn www.ribobio.com 邮箱: support@ribobio.com

PCR 仪器: Bio-RAD 公司  
引物合成: 苏州金唯智生物科技有限公司  
序列测定: 广州市锐博生物科技有限公司

如果有任何问题, 请联系我们!

广州市锐博生物科技有限公司  
地 址: 广州开发区科学城科学大道 182 号创新大厦 C3 区 13 层  
电 话: (020) 32290075  
邮 箱: [service@ribobio.com](mailto:service@ribobio.com)

**广州市锐博生物科技有限公司**  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: [www.sima.cn](http://www.sima.cn) [www.ribobio.com](http://www.ribobio.com) 邮箱: [support@ribobio.com](mailto:support@ribobio.com)

## 双荧光素酶载体构建实验报告

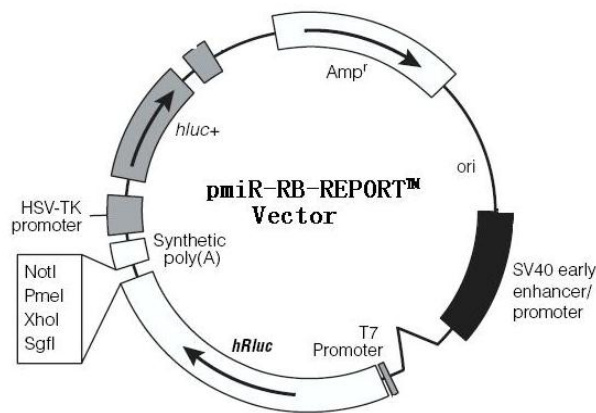
### 实验简介

利用 PCR 方法, 根据 KLF3 (*Ovis aries*) 3'UTR 序列信息设计其扩增引物, 以 *Ovis aries* 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 KLF3 基因的 3' UTR 序列, 将其克隆到 **pmiR-RB-REPORT™** 双荧光素酶报告载体中, 所用载体的报告荧光为 hRluc, 校正荧光为 hluc (做内参校正)。

### 实验步骤及结果:

#### 一、基因序列分析

对基因序列及载体序列分析, 可以利用 **XhoI**, **NotI** 两个限制性内切酶将目的基因片段克隆到载体中, 载体图谱如下:



设计扩增引物如下:

oar\_KLF3\_3UTR\_F: GGC**GGCTCGAG**AGTGTTGCACTAATGTGGA

oar\_KLF3\_3UTR\_R: AAT**GCGGCCGCG**GAGTAGAAACAGAGAAGGAAC

红色分别为 **XhoI**, **NotI** 酶切位点序列, 之前序列为保护碱基, 引物扩增总长度为 607bp。

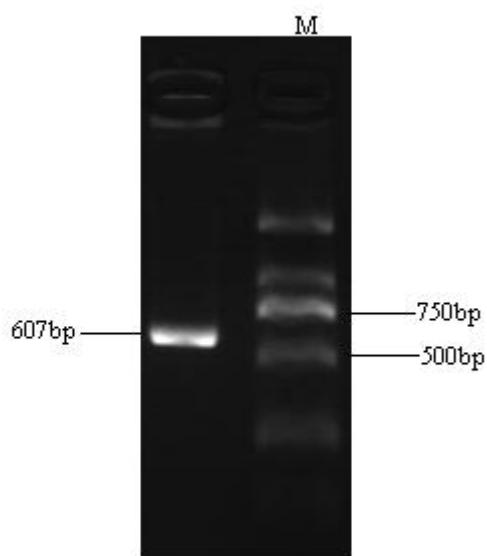
oar\_KLF3\_mut\_F: TATATTTTATTTCGAAATAAGACTGAATGGGTA

oar\_KLF3\_mut\_R: GTCTATTTTCGAATAAAAATATATTACTTTA

#### 二、PCR

反应体系设计为 30  $\mu$ l 总体系, 具体是 5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l, 上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l, Phusion DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l, DNA 模板 1  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 30  $\mu$ l 体系。反应条件为 (降落 PCR): 98 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性, 循环内 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 从 65 $^{\circ}$ C 每个循环降 1 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 10 个循环; 再 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 60 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 进行 15 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 如下:



备注：M: D2000；扩增大小与理论大小相符。

### 三、PCR 产物的纯化

按照凝胶纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 四、酶切

用 *XhoI*, *NotI* 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10×H 缓冲液 4  $\mu\text{l}$ ，DNA 约 2  $\mu\text{g}$ ，内切酶(10 U/ $\mu\text{l}$ ) 各 1  $\mu\text{l}$ ，灭菌去离子水补足到 40  $\mu\text{l}$ 。反应条件 37 $^{\circ}\text{C}$ ，4 小时。

### 五、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

### 六、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2  $\mu\text{l}$ (约 150 ng)，载体 0.5  $\mu\text{l}$ (约 50 ng)，solution I 快速连接液 5  $\mu\text{l}$ ，灭菌去离子水补足到 10  $\mu\text{l}$ ，16 $^{\circ}\text{C}$  连接 30 分钟。

### 七、转化

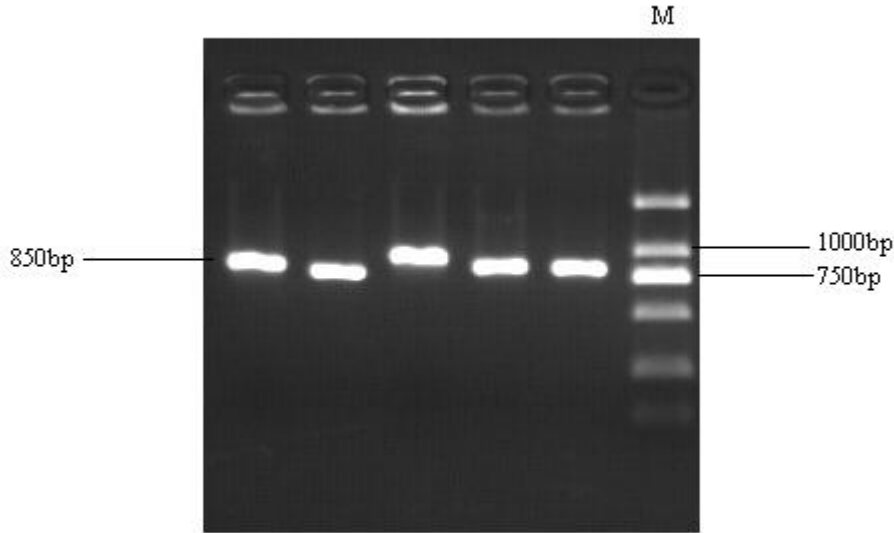
- 1、取连接产物加到 100  $\mu\text{l}$  DH5 $\alpha$  感受态细胞中混匀，冰浴 30 分钟。
- 2、将上述转化液置于 42 $^{\circ}\text{C}$  水浴 90 秒，取出后立即置于冰浴中放置 2-3 分钟。
- 3、向其中加入 900  $\mu\text{l}$  37 $^{\circ}\text{C}$  预热的 LB（不含抗生素）培养基，150 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 45 分钟。
- 4、2500 rpm 离心 5 分钟，将上清液吸走，留 100  $\mu\text{l}$  混匀菌液，加到含 Amp 抗生素 LB 固体琼脂培养基上（抗生素浓度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}\text{C}$  培养 12-16 小时。

### 八、菌落 PCR 鉴定

挑取上述平板上的单菌落，溶到 3  $\mu\text{l}$  水中，取 0.5  $\mu\text{l}$  做模板，进行 PCR。反应体系设计为 10  $\mu\text{l}$  总体系，具体是 10×Taq buffer Buffer 1  $\mu\text{l}$ ，25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu\text{l}$ ，2.5 mM dNTP mix 1  $\mu\text{l}$ ，载体上下游引物（10  $\mu\text{M}$ ）各 0.5  $\mu\text{l}$ ，Taq DNA 聚合酶（2.5 U/ $\mu\text{l}$ ）0.3  $\mu\text{l}$ ，

DNA 模板 0.5  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 10  $\mu$ l 体系。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 分钟预变性, 循环内 95 $^{\circ}$ C 30 秒变性, 56 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟; 20 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

实验共挑取 5 个菌落, 进行 PCR。PCR 反应完取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 用载体上游和载体下游引物扩增的条带理论大小为 850bp 左右, 其实际扩增条带如下:



备注: M: D2000 ; 菌 P 大小与理论大小相符。

#### 九、将阳性的克隆送测序公司测序进一步鉴定 (广州市锐博生物科技有限公司), 详细测序结果请参考附件

(加黑划线标注为插入序列, 两边为载体序列)

```
GGACGCTCCAGATGAAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGA
TCGCTCGAGAGTGTGACTAATGTGGAATTTGAAAACTATATTGCTGATACTGTATATCTGCACATCATTCCCTGATTAGATT
GTTTAAAAGACAATCTCAAAGGTCTAAGGTTTTAAAATAATTTGGTTGGTTTAAAATACACAGTCATCTTGAAGGAATCAC
TGTCATGCATGAAGTTGTTTCAGAGTGGTCTTATTCTCTTCTGGTCAAGGTTAACAATTTCTAAATGATTGCAAATTCACCTA
AATAATACATTTACAAAGCCATTTTACATGCATTAACGAGGGCTACAACAATACTATGTTTTACAAATACTAGCACTTTTTTT
TTGCTGTTATGTACTTAGTGTAGAGGGTCAAATAATCTTCTGCTTAGCATCTCTTAAACCATACCTGCAAATATAGCAGGA
TTATTACATTTACAGTACTTTAATACTTGTATAAACTATGCAGAAATTTTAAATAAAGTGTAATATATTTTATAAGCTAATAAGAC
TGAATGGGTAAAGGTTTTTAGCATGCATTAGTATACTTGCAAATACTGAAACATTTTGGTAATCTTCTTACTAAAGATGTGAA
TGTTAATGTTTCCTTCTCTGTTTCTACTCGCGGCCGCTGGCCGCAATAAAATATCTTTAATTTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTT
TTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGG
```

#### 十、突变载体构建

利用 PCR 突变的方法, 在野生型载体基础上, 设计突变引物将靶序列 **ATAAGCT** 突变为 **TATTCGA**。

##### 1、突变分段 PCR

以野生型载体为模板, 分别扩增含突变序列的两段序列。反应体系设计为 30  $\mu$ l 总体系, 具体是 5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l, 上下游引物 (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l (上游引物与突变下游引物配对, 突变上游引物与下游引物配对), Phusion DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l, DNA 模板 1  $\mu$ l (约 100 ng), 用灭菌水补足 30  $\mu$ l 体系。反应条件为 (降落 PCR): 98 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性, 循环内 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 从 65 $^{\circ}$ C 每个循环降 1 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒; 10 个循环; 再 98 $^{\circ}$ C 10 秒变性, 60 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 进行 15 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 3 分钟, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 2、突变两段拼接

反应体系设计为10  $\mu$ l 总体系，具体是上述纯化产物各取1  $\mu$ l，5 $\times$ Phusion Buffer 2  $\mu$ l，2.5 mM dNTP mix 0.8  $\mu$ l。Phusion DNA 聚合酶（2 U/ $\mu$ l）0.1  $\mu$ l，用灭菌水补足10  $\mu$ l 体系。反应条件为（降落 PCR）：98 $^{\circ}$ C 2分钟预变性，循环内98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，从60 $^{\circ}$ C每个循环降1 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，7个循环；再98 $^{\circ}$ C 10秒变性，55 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，进行10个循环；PCR 反应循环后72 $^{\circ}$ C继续延伸3分钟，然后4 $^{\circ}$ C保存。

## 3、拼接后 PCR

反应体系设计为30  $\mu$ l 总体系，具体是5 $\times$ Phusion Buffer 6  $\mu$ l，2.5 mM dNTP mix 2.4  $\mu$ l，上下游引物（10  $\mu$ M）各1  $\mu$ l，Phusion DNA 聚合酶（2 U/ $\mu$ l）0.3  $\mu$ l，DNA 模板1  $\mu$ l（约100 ng），用灭菌水补足30  $\mu$ l 体系。反应条件为（降落 PCR）：98 $^{\circ}$ C 2分钟预变性，循环内98 $^{\circ}$ C 10 秒变性，从65 $^{\circ}$ C每个循环降1 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，10个循环；再98 $^{\circ}$ C 10秒变性，60 $^{\circ}$ C退火，72 $^{\circ}$ C延伸30秒，进行15个循环；PCR 反应循环后72 $^{\circ}$ C继续延伸3分钟，然后4 $^{\circ}$ C保存。

PCR 反应完取 PCR 产物进行1.5%琼脂糖电泳分析并纯化回收。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 4、酶切

用 *XhoI*，*NotI* 对上述纯化产物和载体进行双酶切，酶切反应体系如下：10 $\times$ H 缓冲液 4  $\mu$ l，DNA 约2  $\mu$ g，内切酶(10 U/ $\mu$ l) 各1  $\mu$ l，灭菌去离子水补足到40  $\mu$ l。反应条件37 $^{\circ}$ C，4小时。

## 5、酶切回收纯化

酶切后回收纯化酶切产物。按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

## 6、连接

连接反应体系如下：

目的片段 DNA 2  $\mu$ l(约150ng)，载体0.5  $\mu$ l(约50ng)，solution I 快速连接液 5  $\mu$ l，灭菌去离子水补足到10  $\mu$ l，16 $^{\circ}$ C连接30分钟。

## 7、转化

- 1) 取连接产物10  $\mu$ l 加到100  $\mu$ l DH5 $\alpha$ 感受态细胞中，混匀，冰浴30分钟。
- 2) 将上述转化液置于42 $^{\circ}$ C水浴90秒，取出后立即置于冰浴中放置2-3分钟。
- 3) 向其中加入900  $\mu$ l 37 $^{\circ}$ C预热的LB(不含抗生素)培养基，150 rpm、37 $^{\circ}$ C振荡培养45分钟。
- 4) 2500 rpm离心5分钟，将上清液吸走，留100  $\mu$ l混匀菌液，加到含Amp抗生素LB固体琼脂培养基上(抗生素浓度100  $\mu$ g/ml)，用无菌的弯头玻棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}$ C培养12-16小时。

## 8、菌落扩大培养提取质粒

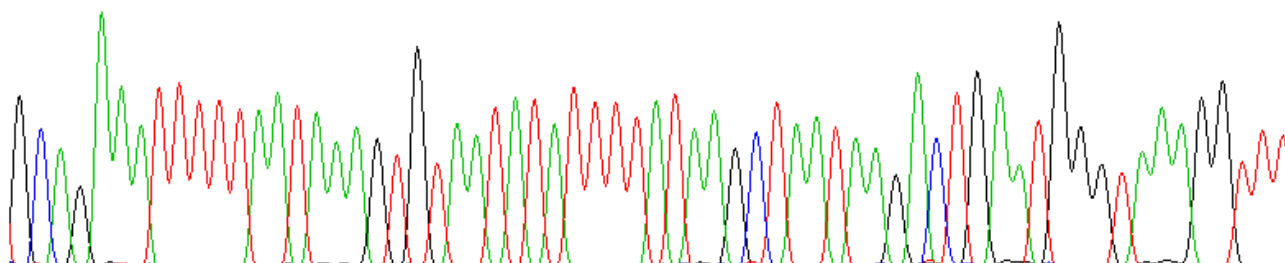
挑取上述平板上的单菌落，接种到含 Amp 抗生素（抗生素浓度100  $\mu$ g/ml）的4 ml LB 液体培养基中，于220 rpm 摇床培养12小时；然后提取质粒。

将质粒送测序公司测序鉴定，详细测序峰图结果请参考附件。

测序结果显示，成功将靶序列 **ATAAGCT 突变为 TATTCGA**。

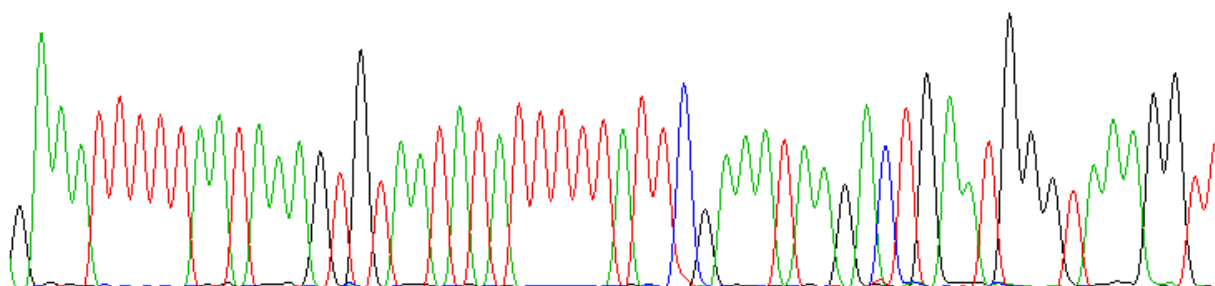


G C A G A A A T T T T T A A T A A A G T G T A A T A T A T T T T T A T A A G C T A A T A A G A C T G A A T G G G T A A A G G T T T



KLF3-WT

G A A A T T T T T A A T A A A G T G T A A T A T A T T T T T A T T C G A A A T A A G A C T G A A T G G G T A A A G G T T



KLF3-MUT

### 主要试剂

LB 培养基: 蛋白胨 (tryptone), 酵母提取物 (yeast extract)	OXOID 公司 (英)
限制性内切酶	Fermentas 公司
TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
Phusion DNA 聚合酶	Fermentas 公司
琼脂糖	西班牙 BioWest 公司
Universal DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
连接反应液	Fermentas 公司
普通 DNA 聚合酶	Fermentas 公司
DH5α 感受态细胞	天根生化科技 (北京) 有限公司

广州市锐博生物科技有限公司  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: www.sima.cn www.ribobio.com 邮箱: support@ribobio.com

**主要仪器**

PCR 仪器: Bio-RAD 公司  
引物合成: 苏州金唯智生物科技有限公司  
序列测定: 广州市锐博生物科技有限公司

如果有任何问题，请联系我们！

广州市锐博生物科技有限公司  
地 址: 广州开发区科学城科学大道 182 号创新大厦 C3 区 13 层  
电 话: (020) 32290075  
邮 箱: [service@ribobio.com](mailto:service@ribobio.com)

**广州市锐博生物科技有限公司**  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD

地址: 广州开发区科学城科学大道182号创新大厦C3区13层(510663) 电话: (020)32290075 传真: (020)32290137

13/F, Innovation Building C3, 182 kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663, PR of China

免费热线: 400 686 0075 企业QQ: 4006860075 网站: [www.sima.cn](http://www.sima.cn) [www.ribobio.com](http://www.ribobio.com) 邮箱: [support@ribobio.com](mailto:support@ribobio.com)