

## 跨膜蛋白基因克隆载体pMBL的构建及验证

余旭平<sup>①</sup>, 朱军莉, 姚学萍, 何世成, 金俊杰, 牛冬, 阮辉

浙江大学动物科学学院, 杭州 310029

收稿日期 修回日期 网络版发布日期 接受日期

**摘要** 摘要: 自行设计一对引物, 从质粒pUC18上扩增一段无启动子和信号肽的 $\beta$ -内酰胺酶基因 ( $\Delta P\Delta SP$  Amp), 以作为最终构建的载体克隆到带跨膜信号基因片段的报告基因。所设计的上游引物中依次带有分别处于3个不同阅读框架、且形成匹配粘性末端的3个酶切位点Bgl II、Bcl I、BamH I, 以便最终构建的载体捕获基因时的对位融合和表达。pET-28经Bgl I、Bst1107 I双酶切, 去除约2.5 kb的lac I等基因的冗余片段, 保留Kan抗性基因、复制原点、多克隆位点等结构, 并消除Bgl II位点, 获得作为最终构建载体的抗性基因和基本骨架的过渡质粒pKan。 $\Delta P\Delta SP$  Amp基因经pGEM-T-EASY载体, 克隆到pKan的EcoR I和Xba I间, 得到在Kan平板中生长而在Amp和Kan双抗平板中不能生长的转化子pMBL-E质粒; 经部分酶切补平自连, 筛选得到消除HindIII位点端EcoR I位点的质粒, 即得到用于跨膜蛋白信号基因片段捕获克隆的目的载体pMBL, 大小为3.46 kb。经酶切鉴定和测序, 证明构建的载体与预期设计的一致。应用四环素抗性基因 (Tet) 片段对构建的跨膜蛋白基因克隆载体pMBL的有效性进行了验证, 在克隆入EcoR I和Bgl II双酶切(0位)的载体中, Kan和Amp双抗平板筛选到阳性克隆子, 经酶切和测序均显示Tet基因已对位插入, 并启动了 $\beta$ -内酰胺酶的表达和跨膜分泌。由此证明: 构建的跨膜蛋白克隆载体pMBL能有效捕获含启动子和信号肽序列的跨膜蛋白基因。

**关键词** [细菌](#) [跨膜蛋白编码基因](#) [信号肽](#) [克隆载体](#)

分类号

### 扩展功能

#### 本文信息

- ▶ [Supporting info](#)
- ▶ [PDF\(370KB\)](#)
- ▶ [\[HTML全文\]\(0KB\)](#)
- ▶ [参考文献](#)

#### 服务与反馈

- ▶ [把本文推荐给朋友](#)
- ▶ [加入我的书架](#)
- ▶ [加入引用管理器](#)
- ▶ [复制索引](#)
- ▶ [Email Alert](#)
- ▶ [文章反馈](#)
- ▶ [浏览反馈信息](#)

#### 相关信息

- ▶ [本刊中 包含“细菌”的 相关文章](#)
- ▶ 本文作者相关文章

- [余旭平](#)
- [朱军莉](#)
- [姚学萍](#)
- [何世成](#)
- [金俊杰](#)
- [牛冬](#)
- [阮辉](#)

#### Abstract

#### Key words

DOI:

通讯作者