

1. pBlueScriptII 的提取

1. 取 1ul 商品的 pBlueScriptII, 转化入大肠杆菌宿主菌中, 取 5ul 转化产物均匀涂布在含 AMP 的 LB 平板上, 37°C 培养过夜。
2. 第二天取一只无菌的 50ml 离心管, 加入 10ml AMP 抗性的 LB 液体培养基, 挑单克隆于离心管中, 37°C, 250rpm, 培养过夜。
3. 第三天取 200μl 小摇后的菌液接种于 250ml 含 AMP 的 LB 液体培养基中, 37°C, 250rpm 培养 6 hr 左右, 使 OD 值达到 0.6-0.8。
4. 将菌液移入 250ml 离心管中, 4°C, 3000rpm, 离心 15min。取出离心管, 菌团朝上倒掉上清, 将离心管倒置于吸水纸上使上清充分滤干。(注意离心前需配平)
5. 加入 10ml 溶液 I (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0), 加入 RNase 至终浓度 100μg/ml, 晃动摇菌, 使菌体充分悬浮, 静置 10min。
6. 按 NaOH (0.4N) : SDS (2%) --1: 1 的比例新鲜配制溶液 II, 加入 20ml 溶液 II, 静置 3-5min。

注: 静置时间勿超过 5min, 提前将溶液 III 置于冰盒中。

7. 加入 15ml 冰浴的溶液 III, 冰浴 15-30min。
8. 4°C, 5000rpm, 离心 15min。
9. 取上清于两个 50ml 离心管中, 弃去原离心管中的沉淀。
10. 每管加入 0.6 倍体积的异丙醇, 充分混匀, 室温下放置 10min。
11. 20°C, 12000g, 离心 20min 回收质粒沉淀。
12. 弃上清, 用 70% 的乙醇洗 2 次。
13. 弃上清, 倒扣于吸水纸上, 尽量空干液体。
14. 用 3ml TE (pH8.0) 溶解沉淀, 移入 1.5ml Eppendorf 离心管中。
15. 电泳检查 DNA 质量并定量。(必要的话, 可以用胶回收的方法先纯化一下质粒再进行双酶切。)

2. pBlueScriptII 的双酶切消化

12. 轻弹管壁或用枪头轻轻吹打混匀，在离心机上甩一下
13. 37℃，水浴 1.5hr。
14. 加入 200ul 1:1 的酚/氯仿，混匀。
15. 4℃，13000rpm，离心 15min。
16. 取上清，加入等体积的氯仿，4℃，13000rpm，离心 10min。
17. 取上清，加入 0.1 倍体积的 NaAC 和 2.5 倍体积的无水乙醇，-20℃，沉淀 30min。
18. 4℃，13000rpm，离心 10min，弃上清，取沉淀。
19. 加入 200ul 70%的乙醇洗沉淀。
20. 4℃，13000rpm，离心 10min，弃上清，取沉淀。
21. 自然风干沉淀至无乙醇味，加入 40ul ddH₂O 充分溶解沉淀，得到双酶切载体。

3. 载体去磷酸化

1. 在 40ul 双酶切载体中加入以下试剂：

6ul	10×buffer
6ul	CIAP (0.01U/ul)
8ul	ddH ₂ O

总体积 60ul。

2. 轻弹管壁或用枪头轻轻吹打混匀，在离心机上甩一下。
3. 37℃，水浴 1hr。
4. 70℃，15min，灭活酶。
5. 电泳分离，胶回收双酶切载体，定量。

4. 载体效率检测

1. 按以下所示作 4 个连接反应：

	DNA	连接酶	
1	pBlueScriptII/E/X /CIAP	-	检测酶切效率
2	pBlueScriptII/E/X /CIAP	+	检测脱磷效率，载体自连效率
3	商品 Vector 加标准 Insert	+	对照
4	自制 Vector 加标准 Insert	+	检测载体效率

14℃连接过夜。

2. 各取 1ul 连接产物作电转化（具体流程见电转化）
3. 计算克隆数，计算载体相对脱磷效率及连接效率。