

## Clonaggio del cDNA di un gene umano in pET22-b

→ Preparare le seguenti reazioni di taglio enzimatico:

12 µl pET22-b (vettore)  
2.0 µl Nde I  
2.0 µl Xho I  
2.5 µl Universal Buffer 10X  
6.5 µl H<sub>2</sub>O

---

25 µl

12 µl PCR (inserto)  
1.0 µl NdeI  
1.0 µl Xho I  
2.5 µl Universal Buffer 10X  
8.5 µl H<sub>2</sub>O

---

25µl

→ Lasciare a 37°C per 2,5ore.

→ Preparazione di un gel di agarosio, 1 ogni 2 gruppi

Successivamente:

→ Defosforilare il vettore aggiungendo

1 µl Fosfatasi Alcalina Termosensibile

Lasciare a 37°C per 30 minuti.

→ Inattivare la reazione di taglio enzimatico dell'inserto e del vettore per 20 minuti a 65°C.

→ Nel gel di agarosio precedentemente preparato caricare per la quantificazione.

- 2 µl di inserto (diluito con 5 µl di TAE buffer e con l'aggiunta di 1µl di loading buffer 6X).
- 2 µl di plasmide pET22-b (diluito con 5 µl di TAE buffer e con l'aggiunta di 1µl di loading buffer 6X).
- 5 µl di DNA ladder.