

## 基因克隆

### (1) 目的基因片断扩增

#### 1. 引物设计

利用 DNAMAN 等软件设计合适的引物, 并根据目的基因内切酶位点分析结果, 分别在正、反向引物的 5' 端加上相应酶切位点, 并分别加上内切酶保护碱基。

#### 2. 按照如下体系进行 PCR 扩增, 测试引物

ddH <sub>2</sub> O	16.0 ul
10×PCRbuffer (with 15uM Mg <sup>2+</sup> )	2.0ul
dNTP (10mM)	0.4ul
primer (F/R; 10uM)	0.4ul
Template DNA (100ng/ul)	1.0ul
Taq (5U/ul)	0.2ul

94°C 5min

94°C 30s

Tm-2°C 30s

72°C 1min/kb

72°C 10min

} 35-40 cycles

扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 3. 按照如下体系高保真扩增启动子 DNA

50ul 体系:

ddH <sub>2</sub> O	33.5 ul
KOD-plus 10×PCR buffer	5.0ul
MgSO <sub>4</sub> (25mM)	2.0ul
dNTP (2mM)	5.0ul
primer (F/R; 10uM)	1.5ul
Template DNA	2.0ul
KOD-plus (1U/ul)	1.0ul

94°C 5min

94°C 30s

Tm-5°C 30s

68°C 1min/k

68°C 10min

35-40 cycles

扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### (2) 目的基因片断回收 (离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒)

1. 配制 1%琼脂糖凝胶，然后将 PCR 产物全部点入胶孔，进行琼脂糖凝胶电泳。
2. 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体。
3. 用电子天平称量凝胶的重量，以 1 mg=100ul 换算凝胶体积。
4. 加入 3 倍胶体体积溶胶液，50°C水浴放置 10 分钟，其间不断上下翻转（温和的）至胶完全溶解，**放置至室温（这步很重要，因为高温不利于 DNA 吸附）。**
5. 将已经溶解的溶液加至吸附柱，并将吸附柱放入收集管中，8000rpm 离心 30s；将收集管中的液体重复加至吸附柱，8000rpm 离心 30s，将收集管中的废液倒掉。
6. 向吸附柱中加入 700ul 漂洗液（确认已加入乙醇），12000rpm 离心 30s，将收集管中的废液倒掉。向吸附柱中加入 500ul 漂洗液重复操作一次。
7. 12000rpm 离心 2min，尽量去除漂洗液，在 37 °C培养箱中晾 5 分钟。
8. 吸附柱放入一个干净的离心管，加入 30ul 65~ 70°C预热的 ddH<sub>2</sub>O，室温下静置 2min，13000rpm 离心 1min。将离心得到的溶液加入吸附柱中重复操作一次。
9. 1%琼脂糖凝胶电泳检测并根据 marker 的上样量估计回收产物的浓度。

### (3) 目的片断连入 pGEM-T easy 载体 (或直接进入 (4) 酶切)

## ① PCR 扩增产物末端加腺嘌呤核苷酸 (A)

1. 取用 KOD-plus 聚合酶扩增的 PCR 产物 1ul, 加至 10ul Taq PCR 体系。
2. 70°C 温育 15 到 30 分钟

## ② PCR 产物接入 pGEM-T easy 载体

## 连接体系

2×Rapid Ligation buffer	5ul
Vector (50ng/ul)	1ul
PCR product	Xul
T4 DNA Ligase (3weiss units/ul)	1ul

X 的值为:

$$\frac{\text{载体质量 (ng)} \times \text{插入片断大小 (Kb)} \times [ \text{插入片断: 载体的摩尔比 (3: 1)} ]}{\text{载体的大小 (Kb)}}$$

载体的大小 (Kb)

最后补水至 10ul

同时设立对照组:

2×Rapid Ligation buffer	5ul
-------------------------	-----

Vector (50ng/ul)	1ul
Control insert DNA (4ng/ul)	2 ul
T4 DNA Ligase (3weiss units/ul)	1 ul
ddH <sub>2</sub> O	1ul

#### (4) 对载体和回收得到的目的基因片断进行酶切

1. 在 Fermentas 网站上 (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>) 确认所用内切酶双切体系。一般酶用量为 10U/ug; 酶的体积不能超过酶切体系的十分之一; 体积允许的情况下用 30ul 酶切体系。以下以 *EcoR* I - *Vsp* I 双切为例。

#### 2. 载体酶切体系

ddH <sub>2</sub> O	13.0 ul
10×tango buffer	4.0 ul
Vector(1ug/ul)	1.0 ul
<i>EcoR</i> I (10U/ul)	1.0 ul
<i>Vsp</i> I (10U/ul)	1.0ul

同时设立两个对照:

ddH<sub>2</sub>O 14.0 ul

10×tango buffer 4.0ul

Vector (1ug/ul) 1.0 ul

EcoR I (10U/ul) 1.0 ul

Vsp I (10U/ul) ---

ddH<sub>2</sub>O 14.0 ul

10×tango buffer 4.0 ul

Vector (1ug/ul) 1.0ul

EcoR I (10U/ul) ---

Vsp I (10U/ul) ---

37°C 酶切 3 个小时；1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

### 3. 目的基因片断酶切体系：

ddH <sub>2</sub> O	8.0ul
10× tango buffer	10.0 ul
hCN promoter (25ng/ul)	30.0 ul
EcoR I (10U/ul)	1.0 ul
Vsp I (10U/ul)	1.0 ul

37°C 酶切 2 个小时； 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

#### 4. 载体和目的基因片断回收

1. 方法如上述。

2. 回收电泳是对 insert 和 vector 进行定量，确定其相对质量比例。根据相对分子量换算为两者摩尔比。

#### (5) 回收产物酶切进行连接反应

连接反应体系：

10× ligase reaction buffer	2ul	(室温溶至无沉淀)
Vector	3ul	
Insert	14ul	

T4 ligase	1ul
ddH <sub>2</sub> O	添加到 20ul

同时设立自连对照：

10× ligase reaction buffer	2ul	(室温溶至无沉淀)
Vector	3ul	
T4 ligase	1ul	
ddH <sub>2</sub> O	14ul	

23℃连接 1 小时，或 16℃连接过夜。

注：对于大小在 500bp -1500bp 的片段，可以不定量按照上述标准体系连接。连接体系总的 DNA 量在 50-250ng。

#### (6) 连接产物转化感受态大肠杆菌 (E. coli)

1. 从-70℃冰箱中取出感受态 E. coli (100ul 一管)，立即放入冰中。
2. 5 分钟之后感受态 E. coli 开始溶化时分装为 50ul/tube，加入连接产物 10ul，冰上放置 20min。
3. 42℃水浴 60-90s；之后冰上放置 2 分钟（这一步注意动作尽量轻）。
4. 加入新鲜的无选择性 LB 培养基 450ul，37℃水浴 60 分钟。
5. 4000rpm 离心 5min，留 100ul 上清



6. 取 Kan/Amp 抗性 LB 平板，加入 100ul 转化后的感受态大肠杆菌 (E. coli) 涂板，37°C 培养箱培养 14-16 小时。

7. 第二天观察结果，从转化的细菌平板中挑取中等大小，饱满而且没有和其他克隆相接触的单克隆，接种到 3ml 卡那霉素选择性 LB 培养基中。置于 37°C 恒温摇床培养 14~16 个小时。准备质粒的小量抽提。

## (7) 阳性克隆鉴定

### ① 菌落 PCR 法

1. 配 Taq PCR 体系母液，按每个平板挑 8 管，20ul/管计算。
2. 取一 PCR 排管，每孔加入 ddH<sub>2</sub>O 10ul，做好相应编号；另外准备相应抗性的干净平板一块，做好编号标记。
3. 用小枪头从转化的细菌平板中挑取中等大小，饱满且没有和其他克隆相接触的单克隆，在平板上相应编号处轻点一下接种，然后放入相应编号的 ddH<sub>2</sub>O 管中。
4. 接种平板放入 37°C 培养；取 2ul 菌悬液进行 PCR，剩余 8ul 菌悬液保存在 4°C
5. 鉴定为阳性的克隆，将 8ul 菌悬液接种到 3ml Kan/Amp 选择性 LB 培养基中。置于 37°C 恒温摇床培养 14~16 个小时。若时间间隔过长未摇出菌，可第二天用保种平板接种摇菌。
5. 送测序。

### ② 快速抽提质粒法鉴定

1. 从转化的细菌平板中挑取中等大小，饱满而且没有和其他克隆相接触的单克隆，接种到 3ml Kan/Amp 选择性 LB 培养基中。置于 37°C 恒温摇床培养 8 小时以上。
2. 取 30ul 菌液（菌较少时可离心后重悬至 30ul）加入等体积酚/氯仿，Vortex 数次。
3. 加入 5ul Loading Buffer。
4. 12000rpm 离心 10min (4°C)
5. 取上清电泳，同阳性 Vector 比较大小。

5. 大小正确的送测序或进一步酶切鉴定。

### ③ 抽提质粒酶切鉴定

(1) 质粒的小量抽提 (采用 QIAGEN 质粒纯化试剂盒进行质粒的小量抽提)

1. 取 1.5 ml 菌液, 14000 rpm 离心 2 分钟, 然后弃去上清。
2. 悬浮: 加入 P1 溶液 200  $\mu$ l, 然后使沉淀的菌体悬浮。
3. 裂解: 加入 P2 溶液 200  $\mu$ l, 然后颠倒 4~6 次。
4. 中和: 加入 P3 溶液 200  $\mu$ l, 然后颠倒 4~6 次。
5. 12000 rpm 冷冻离心 10 分钟, 然后小心吸取上清液于另一洁净离心管内。
6. 加入 420  $\mu$ l 异丙醇, 混匀, 12000 rpm 冷冻离心 15 分钟, 然后弃去上清。
7. 加入 70%乙醇 200  $\mu$ l, 冷冻离心 5 分钟。
8. 取出晾干, 大约 5 分钟左右。
9. 加入 20  $\mu$ l TE 缓冲溶液, 反复吹吸 50 次左右, 使质粒 DNA 溶于 TE 缓冲溶液之中。取少量样品进行琼脂糖凝胶电泳。

(2) 小量抽提质粒内切酶酶切鉴定

选取插入片段上和载体上都有的酶切位点, 取相应量质粒进行酶切, 看是否符合预计片段大小。

(8) 质粒的大量抽提 (采用 QIAGEN 质粒纯化试剂盒进行质粒的大量抽提)

1. 从转化的细菌平板中挑取中等大小, 饱满而且没有和其他克隆相接触的单克隆, 接种到 3ml Kan 选择性 LB 培养基中。37°C 恒温摇床培养 14~16 个小时。
2. 从小量培养物中取 1 ml 用作小量抽提, 然后作酶切鉴定, 选取阳性克隆的培养物, 以 1: 500 的比例接种到 200 ml 选择性 LB 培养基中。37°C 恒温摇床培养 14~16 个小时。
3. 从大量培养物中取 700  $\mu$ l 菌液, 再加入 300 $\mu$ l 甘油冻存。

4. 把 200 ml 菌液倒入 250 ml 离心管中，4°C，8500rpm 离心 15 分钟。
5. 弃去上清，然后倒扣于吸水纸上片刻。然后加入 5 ml 4°C 预冷的细胞重悬液 buffer P1（确认已经加了 Rnase），反复吹打沉淀至没有悬浮的菌块为止。然后将悬浮液转移到 50 ml 的离心管中。
6. 加入 5 ml 细胞裂解液 buffer P2，彻底且轻柔地颠倒 4~6 次，在室温下孵育不要超过 5 分钟（从加入 buffer P2 开始计时，时间过长会使质粒 DNA 断裂）。注意：样品不要涡旋，否则会有基因组污染。buffer P2 用完后也要及时地盖好盖子，以免被空气中的二氧化碳酸化。
7. 加入 5 ml 4°C 预冷的 pH 值调节液 buffer P3，及时且轻柔地颠倒混匀 4~6 次，在冰上孵育 15 分钟。然后再混匀一次样品。4°C，17500rpm，冷冻离心 30 分钟。如果上清不够清需再离心 1 分钟。
8. 用 4 ml buffer QBT 来平衡层析柱。让液体自由留下。
9. 然后步骤 7 中的上清小心的吸到层析柱中，让液体自由流下。
10. 用 5 ml buffer QC 清洗层析柱一次，然后再加 5ml buffer QC 清洗层析柱。
11. 用 5 ml buffer QF 清洗层析柱洗脱 DNA，用一支 50 ml 离心管收集。
12. 在两管洗脱液中各加入 0.7 倍（3.5 ml）体积的室温异丙醇沉淀 DNA，并在沉淀会出现的位置作标记。离心前一定要涡旋。然后 4°C，15000g，离心 30 分钟。取出时保持离心管平行移动，小心倒去上清。
13. 用 2 ml 室温的 70%乙醇清洗沉淀。然后 4°C，15000g，离心 10 分钟。取出时保持离心管平行移动，小心倒去上清。
14. 在空气中干燥沉淀 5~10 分钟，用 400 ul TE 缓冲溶液溶解沉淀。
15. 测定质粒 DNA 的 260/280 值和浓度。