

PCR 产物的 TA 克隆 (DNA 的胶回收和连接)

【实验原理】

1.DNA 片段回收方法: DNA 片段在适当浓度的琼脂糖凝胶中, 通上一定电压进行电泳, 不同大小的 DNA 分子由于迁移率的不同而分离开。切下带有所需 DNA 片段的凝胶, 用冻融法、玻璃奶回收法或商品化胶回收试剂盒将目的片段回收纯化。

2.利用 Taq 酶能够在 PCR 产物的 3' 末端加上一个非模板依赖的 A, 而 T 载体是一种带有 3' T 突出端的载体, 在连接酶作用下, 可以把 PCR 产物插入到质粒载体的多克隆位点, 可用于 PCR 产物的克隆和测序。

商品化的 T 载体有很多。本实验采用 TaKaRa 公司的 pMDTM18-T Simple Vector。这个载体以 pUC19 载体为基础, 消除了 pUC18 载体上的多克隆酶切位点, 经 EcoRV 酶切后在两侧的 3' 端添上 "T" 制备而成 (见附录 1)。由于本载体上消除了多克隆酶切位点, 克隆后的 PCR 产物将无法使用载体上的限制酶切下, 需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。

【试剂与器材】

(一) 试剂

1.pMDTM18-T Simple Vector Kit (Takara 公司)。

2.TAE 电泳缓冲液

3.琼脂糖 (Agarose)

4.6×电泳加样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40%(w/v) 蔗糖水溶液, 贮存于 4℃。

5.溴化乙锭(EB)溶液母液：配制成 10mg/mL，用铝箔或黑纸包裹容器，储于室温即可。

6.70%乙醇

7.胶回收试剂盒（Omega 公司）

（二）器材

水平式电泳装置,电泳仪,台式高速离心机, 恒温水浴锅, 微量移液枪, 微波炉或电炉,紫外透射仪, 凝胶成像系统或其它照相设备。

【操作方法】

（一）胶回收试剂盒回收 PCR 产物（以 Omega 公司 Gel Extraction Kit 为例）

- 1.当目的片段 DNA 完全分离时，转移凝胶至紫外灯上尽可能快地切下目的片段。
- 2.凝胶块转移至 1.5ml 离心管(离心管已经称重了)中，称重得出凝胶块的重量。近似地确定其体积（假设其密度为 1g/ml）。加入等体积的 Binding Buffer (XP2)，于 55-65°C 水浴中温浴 7min 或至凝胶完全融化，每 2-3 min 振荡混合物。（在凝胶完全溶解之后，注意凝胶-Binding buffer 混和物的 pH 值。如果其 pH 值大于 8 的话，DNA 的产量将大大减少。如果是橙色或红色，则要加入 5 μ l 浓度为 5 M，pH 为 5.2 的醋酸钠，以调低其 pH 值。该混合物的颜色将恢复为正常的浅黄色。）
- 3.取一个干净的 HiBind DNA Mini 柱子装在一个干净的 2ml 收集管内（已备好）。
- 4.将第三步获得的 DNA/熔胶液全部转移至柱子中。室温下 10,000 \times g 离心 1 分钟。弃收集管中的滤液，将柱子套回 2ml 收集管内收集管。
- 5.如果 DNA/凝胶熔液的体积超过 700 μ l，一次只能转移 700 μ l 至柱子中，余下的可继续重

复第 5 步至所有的溶液都经过柱子。每一个 Hibind DNA 回收纯化柱都有一个极限为 25μg DNA 的吸附能力。如果预期产量较大，则把样品分别加到合适数目的柱子中。

6.弃收集管中的滤液，将柱子套回 2ml 收集管内收集管。转移 300μl Binding Buffer (XP2) 至柱子中，室温下，10,000 x g 下离心 1min。

7.弃收集管中的滤液，将柱子套回 2ml 收集管内收集管。转移 700μl SPW Wash buffer (已用无水乙醇稀释的) 至柱子中。室温下 10,000xg 离心 1min。(浓缩的 SPW Wash Buffer 在使用之前必须按标签的提示用乙醇稀释。如果 DNA 洗涤缓冲液在使用之前是置于冰箱中的，须将其拿出置于室温下)。

8.重复用 700μl SPW Wash buffer 洗涤柱子。室温下 10,000xg 离心 1min。

9.弃收集管中的滤液，将柱子套回 2ml 收集管内收集管。室温下,13,000 x g 离心 2 min 以甩干柱子基质残余的液体。

10.把柱子装在一个干净的 1.5ml 离心管上,加入 15~30μl(具体取决于预期的终产物浓度)的 Elution Buffer(或 TE 缓冲液)到柱基质上，室温放置 1min, 13,000xg 离心 1min 以洗脱 DNA。第一次洗脱可以洗出 70-80%的结合 DNA。如果再洗脱一次的话，可以把残余的 DNA 洗脱出来，不过那样的浓度就会较低。

(二) 连接反应 (以 Takara 公司 pMDTM18-T Simple Vector Kit 为例)

1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5 μl。

pMDTM18-T Simple Vector	1 μl
Insert DNA	0.1 pmol ~ 0.3 pmol
dH2O	up to 5 μl

- 2) 加入 5 μl (等量) 的 Solution I。
- 3) 16°C反应 30 分钟。(2 kbp 以上长片段 PCR 产物进行 DNA 克隆时, 连接反应时间请延长至数小时)。
- 4) 全量 (10 μl) 加入至 100 μl 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
- 5) 42°C加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。
- 6) 加入 890 μl LB 培养基, 37°C振荡培养 60 分钟。
- 7) 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。
- 8) 挑选白色菌落, 鉴定载体中插入片段的长度大小。

【注意事项与提示】

- 1.使用新鲜的电泳缓冲液 TAE Buffer。不要重复使用, 其 PH 的升高会减少产量。
- 2.不论采取何种方法回收 DNA, 在回收过程中, 要尽量减少洗脱体积, 以便提高收得率和浓度, 以方便后续操作。
- 3.从胶上回收 DNA 时, 应尽量缩短光照时间并采用长波长紫外灯(300-360nm), 以减少紫外光对 DNA 的切割。DNA 曝露在紫外灯下不能超过 30 秒。
- 4.连接反应时间是与温度密切相关, 因为反应速度随温度的提高而加快。通常可采用 16°C 连接 4 小时为宜, 如是平端连接需要适当延长反应时间以提高连接效率; 在选择反应的温度与时间关系时, 也要考虑在反应系统中其他因素的影响。
- 5.连接反应的整个过程应注意枪头的洁净以避免造成对酶的污染, 为防止酶活性降低, 取酶时应在冰上操作且动作迅速。7.

6.连接反应应在 25℃以下进行，温度升高较难形成环状 DNA，影响连接效率。长片段 PCR 产物（2kb 以上）进行连接时，连接反应时间应延长至数小时。

7.进行克隆时，Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比一般为 1:2~10。根据实验情况选择合适的摩尔数比。

8.用高效的感受态细胞（转化效率 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g pUC19），这样才可能得到比较理想的阳性克隆。

转化效率的计算：

取 0.1 ng 的 pUC19 Plasmid DNA 加入至 100 μ l 的感受态细胞中后，再加入 900 μ l 的 LB 培养基（0.1 ng DNA/ml），将上述培养液稀释 10 倍后（0.01 ng DNA/ml）取 100 μ l 涂布平板（0.001 ng DNA/100 μ l），记录菌落数。以得到 200 个克隆体为例计算转化效率，此时的转化效率=200 cfu/0.001 ng= 2×10^5 cfu/ng= 2×10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA。

9.试剂盒配有 Control DNA。通过对照实验判断试剂盒的保存效果。

【实验安排】

第一天下午：配制 6×电泳加样缓冲液、TAE 等缓冲液，将各种耗材灭菌。

第二天上午：制备琼脂糖凝（1%），电泳检测，切胶回收 DNA 片段

第二天下午：大肠杆菌制备感受态细胞；DNA 与 T 载体连接转化大肠杆菌。

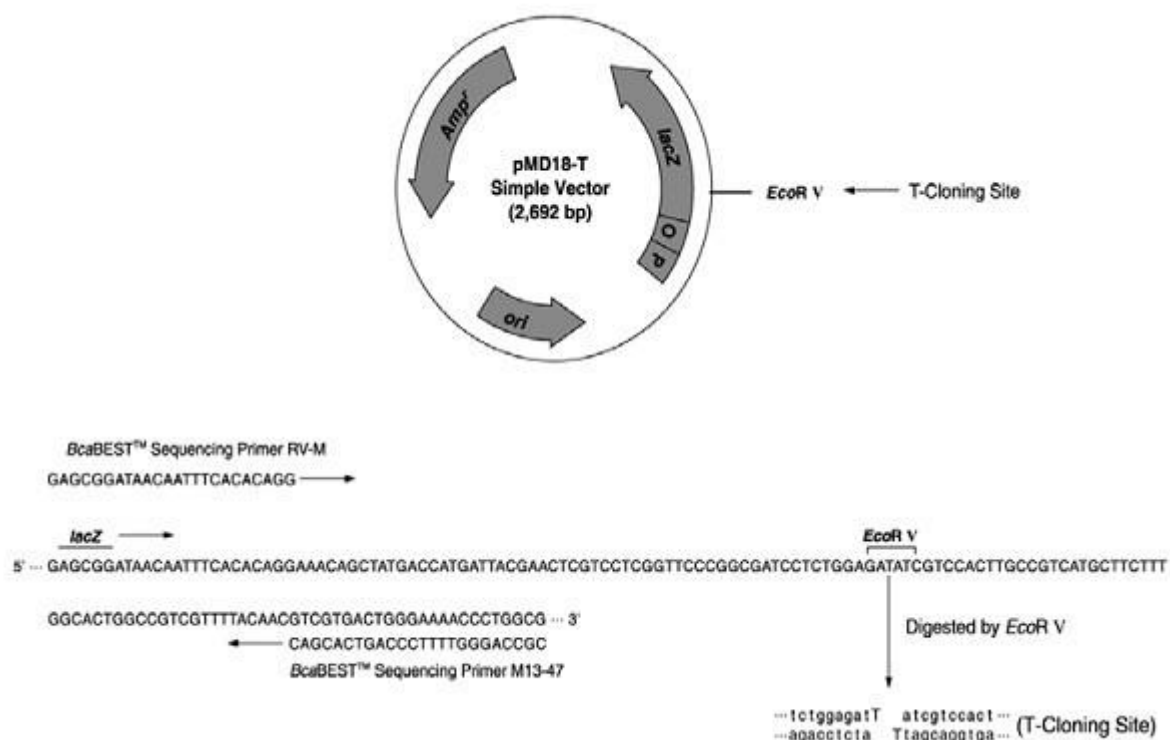
第三天上午：观察转化结果（蓝白斑情况），计算重组率。

【实验报告要求与思考题】

1. PCR 产物的 T-vector 克隆方法，应注意哪些操作环节？

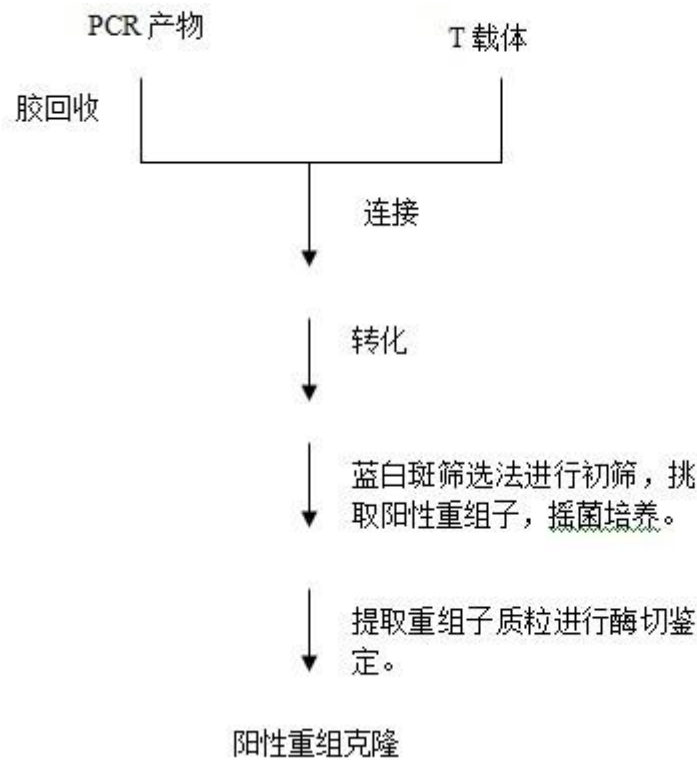
2. 和其他组结果比较，对本组实验结果进行分析。
3. 对于用高保真 Taq DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物，如何进行克隆？

附录 1：



附录 2：

本实验流程：



第一天上午：电泳回收

第一天下午：连接转化

第二天：观察实验结果
质粒提取和酶切鉴定