

# 目的基因 PCR 扩增产物的克隆

## [实验原理]

### 1. PCR 产物回收

在高离子盐存在的情况下，DNA 片断选择性的吸附于离心柱内的硅基质膜上，再通过一系列快速的漂洗、离心的步骤去蛋白液和漂洗液，将引物、核苷酸、蛋白酶等杂质去除，最后用低盐，高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净 DNA 从硅基质膜上洗脱。

### 2. T 载体与 PCR 产物的连接

源 DNA 与载体分子的连接就是 DNA 重组，这样重新组合的 DNA 叫做重组体或重组子。重组的 DNA 分子是在 DNA 连接酶的作用下，有  $Mg^{2+}$ 、ATP 存在的连接缓冲系统中，将分别经酶切的载体分子与外源 DNA 分子进行连接。DNA 连接酶有两种：T4 噬菌体 DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶。两种 DNA 连接酶都有将两个带有相同粘性末端的 DNA 分子连在一起的功能，而且 T4 噬菌体 DNA 连接酶还有一种大肠杆菌 DNA 连接酶没有的特性，即能使两个平末端的双链 DNA 分子连接起来。但这种连接的效率比粘性末端的连接率低，一般可通过提高 T4 噬菌体 DNA 连接酶浓度或增加 DNA 浓度来提高平末端的连接效率。T4 噬菌体 DNA 连接酶催化 DNA 连接反应分为 3 步：首先，T4 DNA 连接酶与辅因子 ATP 形成酶-ATP 复合物；然后，酶-ATP 复合物再结合到具有 5' 磷酸基和 3' 羟基切口的 DNA 上，使 DNA 腺苷化；最后产生一个新的磷酸二酯键，把切口封起来。连接反应通常将两个不同大小的片断相连。因为 DNA 片断有两个端点，所以切割时出现两种可能，一种是单酶切，另一种是双酶切，这两种酶切方法在基因工程操作中都非常用到。对于单酶切来说，载体与供体的末端都相同，连接可以在任何末端之间进行，这样就导致了大量的自连接产物。为了减少自环的高本底，可对载体进行 5' 除磷酸处理，原理是连接酶只能连接 DNA 片断的 3' OH 末端与 5' 端，所以除磷后载体不会自环。一旦有外源片断插入时，由外源片断提供 5' 端就能与载体进行连接。通过这种方法可大大减少由载体的自身成环造成的高本底。对于双

酶切来说，无论载体与供体同一片段上都有不同的末端，这样就避免了载体与供体的自环，能使有效连接产物大大增加。双酶切的另一个特点是能将供体分子定向连接到载体上。

连接反应的温度在 37℃时有利于连接酶的活性。但是在这个温度下粘末端的氢键结合是不稳定的。因此采取折中的温度，即 12-16℃，连接 12-16h（过夜），这样既可最大限度地发挥连接酶的活性，又兼顾到短暂配对结构的稳定。Taq DNA 酶扩增的 PCR 产物，其 DNA 双链前后末端都有一个游离的 A 碱基，可以与 T-Vector 末端游离的 T 碱基互补形成环状重组 T 质粒。

### [实验材料、试剂和仪器]

PCR 扩增相关试剂、PCR 仪、移液枪、低温离心机、琼脂糖凝胶电泳系统、凝胶成像系统、PCR 产物回收试剂盒、pUCm-T 载体。

### [实验步骤]

#### 1. PCR 扩增

#### PCR 反应体系：

10×PCR Buffer	2.5 $\mu$ l
dNTPs	0.5 $\mu$ l
Taq	0.2 $\mu$ l
引物 1	1.5 $\mu$ l
引物 2	1.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	17.3 $\mu$ l
DNA 模板	1.5 $\mu$ l

注：每组做 5 管，其中 4 管用于 PCR 产物回收，1 管作电泳检测时的对照

#### PCR 反应程序：

1	94℃预变性	5min
2	94℃变性	45s
3	60℃退火	30s
4	72℃延伸	60s
2 - 4 步骤, 35 循环		
5	72℃延伸	10min
6	4℃	保存

## 2. 目的基因 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳检测

### (1) 制备琼脂糖凝胶

称取 0.2g 琼脂糖，放入锥形瓶中，加入 20ml 1.0×TBE 缓冲液，置微波炉或水浴加热至完全溶化，取出摇匀，则为 1%琼脂糖凝胶液。

(2) 取有机玻璃内槽，洗净，晾干，用橡皮膏将有机玻璃内槽的两端边缘封好（一定封严，不能留缝隙）。

(3) 将有机玻璃内槽放置于一水平位置，并放好样品梳子。

(4) 将冷到 60℃左右的琼脂糖凝胶液，缓缓倒入有机玻璃内槽，直至有机玻璃板上形成一层均匀的胶面（注意不要形成气泡）。

(5) 待胶凝固后，取出梳子，取下橡皮膏，放在电泳槽内。

(6) 加入电泳缓冲液至电泳槽中。

(7) 用移液枪将已加入上样缓冲液的 DNA 样品加入加样孔中（记录点样顺序及点样量）。

(8) 接通电泳槽与电泳仪的电源（注意正负极，DNA 片段从负极向正极移动）。DNA 的迁移速度与电压成正比，最高电压不超过 5V/cm。当溴酚蓝染料移动到距凝胶前沿 1~2cm 处，停止电泳。

### 3. 产物回收

(1) 在紫外光下将琼脂糖凝胶上的目的片段切下，放入 1.5 mL Eppendorf 离心管中；加入 500 $\mu$ l 溶胶/结合液 DB，充分混匀。

(2) 将上一步所得溶液加入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)，室温放置 1 min，12000rpm 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液。

(3) 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB，12000rpm 离心 1min，弃掉废液。

(4) 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB，12000rpm 离心 1 min，弃掉废液。

(5) 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12000rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

(6) 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，12000rpm 离心 1 min。如果需要较多量 DNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱，离心 1 min。

### 4. PCR 产物与 T 载体的连接

对于常规的 DNA ligase 连接反应，请参考下面的连接反应体系，或按 DNA ligase 的说明书进行操作。每个连接反应使用 1 $\mu$ l pMD 18-T 载体，约 0.2pmol PCR 产物，在 10 $\mu$ l 连接体系中 4 $^{\circ}$ C 连接过夜或室温连接 1h。

T4 DNA Ligase Buffer(2X)	5 $\mu$ l
Purified PCR Product	1 $\mu$ l
pMD 18-T Vector	1 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5-10U/微升)	1 $\mu$ l

ddH<sub>2</sub>O

up to 10μl

## 5. 大肠杆菌感受态细胞的制备(氯化钙法)

① 挑取新鲜的 E.coli.DH5α 单菌落接种于一个含有 10 ml LB 液体培养基（不含抗生素）的试管中，于 37℃ 恒温振荡（200 rpm）培养约 4h(OD=0.2~0.4)，取出后立即将其冰浴 10min。

② 在无菌条件下将冰浴后的菌液吸取 1ml 到冰冷的 1.5ml 无菌离心管中，于 4℃ 下 10000g 离心 1min，回收细菌。

③ 每管中加入 500 μl 于 4℃ 下预冷的 CaCl<sub>2</sub> 重悬沉淀，冰浴 30min，于 4℃ 下 10000g 离心 1min，回收细菌沉淀物。

④ 每管加入 200 μl 冰预冷的 CaCl<sub>2</sub>，混匀即为感受态细胞，置 4℃ 冰箱备用。

## 6. 重组质粒转化大肠杆菌

① 取 10 μl 连接产物，加入内装 100 μl 感受态细胞的离心管中，轻弹管壁混匀，冰浴 30 min。

② 42℃ 热击 90s 后，迅速将离心管冰浴 3~5min。

③ 加入 1 ml 不含抗生素的 LB 液体培养基，混匀，于 37 °C 下振荡培养（180 rpm）45 min。

④ 4℃ 下，10000 g，离心 1 min，吸出 500 μl 上清液弃去，再混匀，取 200 μl 涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基平板上（事先涂布 4μl 浓度为 200 mg/mg IPTG 和 20μl 浓度为 40 mg/ml X-gal），待菌液被培养基完全吸收后，倒置平板于 37℃ 培养 12~16h，直至出现单菌落。再将培养皿置于 4℃，使其完全显色（即出现蓝、白斑）。

⑤ 连接产物转化实验的同时，以等体积的 ddH<sub>2</sub>O 代替连接产物，其操作同上，分别涂布于含抗生素和不含抗生素的 LB 平板上，分别作为阴性对照和阳性对照。

## 7. 重组子克隆的鉴定（本部分视实验进程而定）

挑取可能含有目的片段的白斑，接种到 5 ml LB/Amp 液体培养基中，37℃ 220 rpm 摇床培养过夜。采用碱裂解法小量提取菌液质粒 DNA，进行 PCR 扩增，检测 PCR 产物是否连接到载体中。

附：TBE 电泳缓冲液的配制

5×TBE (5 倍体积的 TBE 贮存液)

配 1000ml 5×TBE:

Tris	54g
------	-----

硼酸	27.5g
----	-------

0.5mol/l EDTA	20ml (pH 8.0)
---------------	---------------