

分子克隆操作程序

操作程序

1 实验试剂及仪器

1.1 试剂：质粒 DNA 小量试剂盒

DNA 凝胶回收试剂盒

DNA 产物回收试剂盒

DNA 产物回收试剂盒

Pfu , DNA marker , 感受态 DH5 α

BamHI 酶 , XhoI 酶 , EcoRI 酶 , T4 DNA ligase

1.2 实验仪器：

PCR 仪

离心机

凝胶成像系统：Tanon 2500 , 天能公司

1.3 耗材：实验中所用到的 PCR 管，枪头

2 试验步骤

2.1 引物的稀释

2.1.1 引物一般以干粉形式保存于-20 $^{\circ}$ C , 临用前稀释。

2.1.2 由于引物呈很轻的干膜状附在管壁上，打开时极易散失，所以打开管子前请先离心 10,000rpm,1min,然后再慢慢打开管盖。然后在装有引物的管内根据引物说明书加入双蒸水稀释至 10uM，盖上管盖，充分上下振荡 30 秒，再次离心，小离心机 30 秒(管上标注好引物名称、浓度、稀释时间)

2.2 PCR 扩增反应体系

在 0.2ml 离心管中加入以下成分：

质粒 (25ng/μl)	1.0ul
Primer1 (10pmol/μl)	1.5ul
Primer2 (10pmol/μl)	1.5ul
10×Pfu Buffer	5.0ul
dNTP mixture (10mM)	1.0μl
Pfu 酶(2.5u/μl)	1.0μl
ddH ₂ O	?ul
总体积	50.0ul

(做多管的时候可以把除引物模板以外的组分混合后分装)

轻弹混匀，离心收集管壁上的液滴至管底，在 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应，反应参数如下

(不同基因的退火温度以及延伸时间略有差异,退火温度为引物 T_m 上下 5℃)

94℃	3 min	} 30cycles
94℃	30sec	
58℃	40sec	
72℃ (1kb/min)		

72°C

8min

4°C

∞

反应结束后，取 2ulPCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，并以 DNA Marker 6ul 做对照。120V 恒压条件下电泳 20min 后，于凝胶成像系统下观察并将电泳图贴到记录本中（扩增产物大约 30ng/μl）

2.3 PCR 产物的回收

2.3.1 如果扩增产物条带单一用 Axygen AP-PCR-250 纯化 PCR 产物，具体操作按试剂盒说明书进行（回收产物用 35ul ddH₂O 洗脱两遍）

2.3.2 如果出现非特异性扩增，目的产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收(AP-GX-250)，具体操作按试剂盒说明书进行（回收产物用 35ul ddH₂O 洗脱两遍）

2.4 目的产物及载体酶切

目的产物酶切（在 1.5ML 离心管中加入以下成分，以 BamHI 和 XhoI 为例）

PCR 回收产物 (20ng/μl)	30.0ul
10×Buffer	6.0 ul
BamHI (10 u/μl)	3.0 ul
XhoI (10 u/μl)	1.5ul
ddH ₂ O	? ul
总体积	50.0ul

振荡混匀，短暂离心；

载体酶切（载体使用中抽质粒试剂盒）

载体质粒 (30ng/μl)	6 0.0ul
10×Buffer	8.0 ul
BamHI (10 u/μl)	4.0 ul
XhoI (10 u/μl)	2.0ul
ddH ₂ O	? ul
总体积	100.0ul

37°C 温育 过夜 ; 80°C 水浴 20min 终止反应

2.5 酶切产物回收

酶切产物用 DNA 产物回收试剂盒回收 , 具体操作按试剂盒说明书进行(目的产物酶切用 35ul ddH₂O 洗脱两遍 , 载体酶切用 50ul ddH₂O 洗脱两遍) , 将电泳图贴到记录本中。

2.6 目的片段与载体连接

载体 DNA (20ng/μl)	1.0ul
目的片段 (15ng/μl)	5.0 ul
10×T4 Ligase Buffer	2.0 ul
T4 Ligase (5 u/μl)	1.0 ul
ddH ₂ O	?ul
总体积	10.0ul

振荡混匀 , 短暂离心。16°C连接过夜 ; 65°C 灭活 10min

$$\text{(加入载体的量 (ng) } \times \text{ 插入片段大小 (Kb)) / 载体大小 (Kb) } \times \text{ 插入片段和载体的摩尔比} \\ = \text{ 插入片段的量}$$

2.7 转化 (感受态 DH5α)

将 100ml 感受态 分为两管进行转化，具体步骤按照说明书进行。

2.8 挑菌鉴定阳性克隆

每个平板挑三个单克隆，分别培养在装有 2ml LB 培养基的试管中，150 rpm 培养过夜。
或培养在装有 1ml LB 培养基的试管中，180 rpm 培养 4~5 小时，进行 PCR 鉴定。

在 0.2ml 离心管中加入以下成分：

菌液 (过夜培养)	1.0ul
培养 4-5h	3.0ul
Primer 1 (10pmol/μl)	0.75 ul
Primer 2 (10pmol/μl)	0.75 ul
10×Buffer(含 2.5mM Mg ²⁺)	2.5 ul
dNTP mixture (10mM)	0.5 μl
Taq 聚合酶(5u/μL)	0.5 μl
ddH ₂ O	? ul
总体积	25.0ul

轻弹混匀，瞬时离心收集管壁上的液滴至管底，在 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应，反应参数

如下

	94°C	4 min		
	94°C	30sec	}	30cycles
	57°C	45sec		
	72°C	50sec		
	72°C	8 min		
		4°C	∞	

反应结束后，取 2ul PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，并以 DNA Marker 6ul 做对照。120V 恒压条件下电泳 20min 后，于凝胶成像系统下观察是否含有目的条带,保存图片并且贴于笔记本中。

选择一个阳性克隆菌液（200ul）送测序，其余的阳性克隆菌液保存于 4°C，待测序结果出来后处理（测序结果正确，菌液丢弃；不正确，补送其他样品测序）

如果插入片段大于 900，正反测序；小于 900，P3 载体反向测序（T7 ter 引物）；pGEX-4T 载体 插入片段离正向引物较近，选择反向测序（pGEX-R），对比测序结果，做好记录。