

质粒载体克隆方案

一、为什么要使用这个载体？

在开始克隆工作以前先问自己这个问题，为什么用这个载体？你了解这个载体吗？有没有更好的选择？对这些问题都有了正确的认识以后，进入下一步。

二、充分了解载体信息

当确定使用某一个载体后，需要了解这个载体的各种信息，这里推荐一个网站 <http://www.addgene.org>，里面 vector database 的搜索功能很好用，你可以通过它找到几乎所有的质粒的图谱和序列。你在开始克隆工作前必须认真研究这个载体质粒的图谱，对于克隆工作来说最为关键的信息包括两个方面：载体的抗生素抗性和多克隆位点。

1. 载体的抗性：常见的多为氨苄青霉素（Amp）和卡那霉素（Kana），必须使用含有正确抗生素的培养基培养含有该质粒的大肠杆菌。

2. 多克隆位点（MCS）：我们通常使用的商品化的表达载体往往含有一段富含限制内切酶位点的序列，位于启动子（和表达标签）后，我们可以选择合适的内切酶将载体切开，将我们需要表达的片段插入其中。

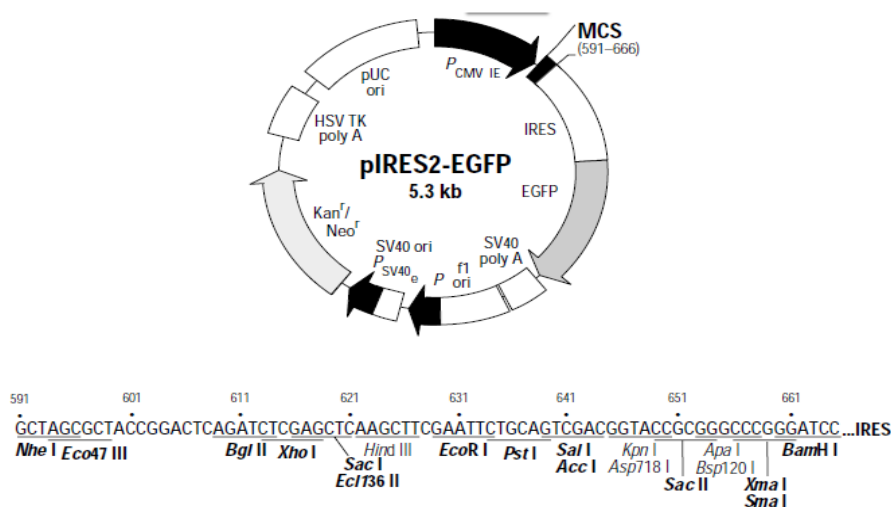
三、引物设计

引物设计是克隆试验成功与否最关键的步骤。在整个克隆过程中我们可能会用到多种引物，分别阐述如下。

如果你需要从基因组或者 cDNA 文库中扩增你的克隆插入的片段，你需要精心设计一对（甚至多对）引物把你想要的片段“钓”出来，这里推荐 Primer5 这个软件，引物长度在 20bp 或以上较为合适，但一般不要超过 30bp，保证引物有匹配的 Tm 值，合适的 GC 比例，保证引物间不容易形成二聚体，引物内部不容易形成发夹结构，不会引起错配等等（这些指标 Primer 软件都会帮你检测）。假如你需要“钓”的片段大于 1500bp，那我强烈建议你写信向已有这个片段的人索取该片段，只要态度诚恳他们一般愿意帮这个忙，这会节省你不少时间。

你已经得到了你需要插入的片段了，现在你要设计一对引物将它导入载体。设计这对引物请按以下步骤：

(1) 确定酶切位点。多克隆位点中会提供若干个可选的内切酶，我们使用内切酶必须满足的原则是你的片段内部必须没有该内切酶位点，并且你的载体上只有一个该内切酶位点。（下图 pIRES2-EGFP 载体图谱，下方显示的多克隆位点序列中，粗体字表示该位点是载体上唯一的，你可以使用；细体字则表示酶切位点不是唯一的，通常不能用。）



(2) 在上述原则的基础上，我们选择酶切位点的还需遵循以下几点：选择的两个酶切位点在载体上尽可能相距远一些；尽可能不要使用产生平末端的内切酶；尽可能不要使用两个同尾酶（切得的粘性末端相同的酶）；最后一点，尽可能使用实验室已有的酶。

(3) 读码框一定要正确！某些载体不自带起始密码子 ATG，需要你加入的 ATG 起始，那么如果你的序列不是以 atg 起始的请加上 atg。更多的载体，特别是许多 N 端带有标签的载体，它有自己的起始 ATG，那么你的插入片段读码框一定要与载体一致，否则将导致移码突变；这类载体给出的多克隆位点序列中会标明读码框，你可以在酶切位点与你的序列中间插入 0-2 个碱基以校正读码框。

(4) 有些载体 C 端也有标签（或是融合蛋白），这时如果你的插入片段末尾有终止子，请将终止子去除，并且同样需要严格核对读码框。但如果你的载体 C 没有别的东西，这个步骤就不是必须的了。

总结常规表达载体的引物序列应该这样串起来：

上游: NN-123321-H-ATG-FORWARD

下游: NN-456654-H-(TGA)-REVERSE

NN: 保护碱基, 可任意设定, **2-4 个碱基**

123321, 456654: 酶切位点

H: 调整读码框的碱基 (如果有必要)

ATG, -TGA: 加入启动子, 去掉 REVERSE 里的终止子 (如果有必要)

FORWARD: 插入片段上游序列, 一般需要 18-22 个碱基

REVERSE: 插入片段下游反向互补序列, 一般需要 18-22 个碱基

1、载体测序用的引物: 质粒图谱中一般会标明, 通常测序公司自己会准备, 不需要我们设计合成。

a、需要准备好以下物品: 1.5mLEp 管若干, 0.2mL 薄壁管若干, 10 μ l, 200 μ l, 1mL Tip 头若干, 均需灭菌后烘干备用。

b、准备好下列试剂:

LB 培养基: 固体, 液体培养基各准备一些, 通常使用 LB 液体培养基配方是每 1L 培养基加入 10g 蛋白胨, 5g 酵母提取物, 10g NaCl, 灭菌后使用。固体培养基还需额外加入 1.7% 的琼脂粉 Agar(注意: 不是琼脂糖 Agarose), 灭菌后冷却至约 45 度, 加入一定浓度的抗生素 (按后面的比例) 混匀后倒入平皿, 约每皿 20mL。我们实验室使用的天根公司的抗生素, 氨苄按 1: 1000 加入, 卡那按 1: 250 加入。

电泳缓冲液 TAE: 50 \times TAE 母液配方为 Tris 碱 242 g 加 ddH₂O 600 mL 充分溶解, 加冰乙酸 57.1 mL、0.5M EDTA (pH 8.0) 100 mL, 定容至 1 L。使用时以纯净水稀释至 1 \times 。

Agarose 胶: 称取适量 Agarose 粉末, 加入 1 \times TAE 溶液后微波炉加热至完全融化, 冷却至约 50 度 (不烫手) 倒入制胶模具中, 等其完全凝固后使用。Agarose 浓度根据目的 DNA 片段大小而定, 300bp 以下用 2%, 300-2000bp 用 1%, 更大的片段用 0.5%。注意 Agarose 胶极易失水, 需现制现用。

c、需要用到的试剂盒：使用前必须仔细阅读说明书。

PCR 体系：需要使用 Taq 酶、Taq 酶 buffer、dNTP，目前我们使用天根公司产品。注意 dNTP 极易降解需避免反复冻融，需按 50 μ l 每支分装使用。

T vector 试剂盒：目前我们使用 Takara 公司 PCR 产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒：均为天根公司产品。

2、用 PCR 法从基因组或 cDNA 文库“钓”所需片段。

A. 按照三-1 所述设计合成引物。

B. 引物离心后溶解成 100 μ M 储存液，并取少量稀释成 10 μ M 工作液，其余于-20 度保存。

C. PCR。反应体系：

上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
dNTP（浓度）	1 μ l
Taq 酶（浓度）	0.2 μ l
10*PCR BUFFER	2.5 μ l
模板	0.1-1 μ l（视具体情况）
ddH ₂ O	将总体积补足 25 μ l

PCR 条件：

温度	时间	循环数
94 $^{\circ}$ C	5min	1
94 $^{\circ}$ C	40s	35
T $^{\circ}$ C	40s	
72 $^{\circ}$ C	Xmin	
72 $^{\circ}$ C	10min	1

T $^{\circ}$ C：退火温度，根据引物模板具体情况而定，常需要做梯度 PCR 摸索。

Xmin：延伸时间，依据合成片段大小而定，每 1kb 片段需要 1min

- D. 取 4 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。产物大小在 200bp 以下用 2% Agarose 胶，大于 200bp 用 1% Agarose。如果有大小正确的片段则进入下一步，否则请改变 PCR 条件（主要调整对象为退火温度和引物序列）继续尝试。
 - E. 将剩余经鉴定大小正确 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收，具体流程参考试剂盒说明书。
- 3、将目的片段连入 T 载体，以方便测序鉴定。连接反应体系请参照 pMD18T 载体试剂盒说明书。
 - 4、连接产物转化 DH5 α 菌株，步骤如下：
 - A. 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出感受态细胞立即放冰上待其融化。
 - B. 加入 10 μ l 连接产物，轻轻搅动混合，置冰上 30min。（此期间做好两件准备工作：准备好 42 $^{\circ}$ C 水浴锅，并将含有氨苄的 LB 固体培养基放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱烘干。）
 - C. 混合物迅速放入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅，静置 90s 后立即放回冰上，放置 5min。
 - D. 加入 1mL 无抗生素的液体 LB 培养基，150rpm，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 45min。
 - E. 培养箱中取出固体 LB 培养基，表面加入 40 μ l 50mg/mL 的 IPTG，16 μ l 20mg/mL 的 X-gal 并涂布均匀。室温放置待其吸收
 - F. 摇床中取出菌液，以 5000rpm 离心 1min，弃大部分上清，留 100 μ l 左右涂布上述固体培养基。
 - G. 平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 14-16h 左右。
 - H. 挑取白色菌落接种于 3mL 含有氨苄的液体培养基中，37 $^{\circ}$ C，250rpm 摇床培养 14-16h，抽提质粒并取 10 μ l 送交测序。
 - 5、得到序列正确的克隆后，用前文所述带有酶切位点的引物 PCR 扩增片段，体系温度参照前文，但必须使用高保真的 Pfu 酶取代 Taq 酶。
 - 6、琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物，若大小正确，剩余 21 μ l（这个体积哪里来的？）产物加入 2.5 μ l Taq buffer，0.2 μ l Taq，0.5 μ l dNTP 并加入 ddH₂O 补足 25 μ l，72 $^{\circ}$ C 反应 15min 加 poly A 尾。
 - 7、片段连入 T 载体，转化 DH5 α 并挑白色克隆。

8、正确克隆接入 5mL 培养及 37°C 250rpm 培养 14-16 小时，提取质粒。具体步骤参照试剂盒说明书。

9、将上一步所获得的质粒与空载体进行双酶切，体系如下：

反应体系

质粒/ 载体	1 μ g
10 \times buffer	5 μ L
酶 I (10 U/ μ L)	5 U
酶 II (10 U/ μ L)	5 U
ddH ₂ O 补充至 50 μ L	

反应条件：37°C，5 小时

10、琼脂糖凝胶回收所需插入片段与切开的载体，并定量。

11、将酶切载体与片断进行连接：

连接体系：	酶切PCR产物	与载体等摩尔数
酶切载体		100 ng
10 \times T4 连接酶buffer		1.5 μ l
T4 连接酶 (3 U/ μ l)		1.0 μ l
ddH ₂ O 补充至		15.0 μ l

连接条件：16°C连接过夜

12、连接产物转化 DH5 α ，注意根据载体的抗性选择正确的抗生素。挑选 8 个左右克隆，转接到一块新的固体培养基平板上，并做好编号。待克隆长大后(约需要 5 个小时)挑取一点作为模板，以步骤 5 中的引物进行 PCR 鉴定（菌液 PCR 方法），选取能扩增得到正确大小片段的克隆进行测序。

13、测序结果分析：检验是否完成了正确的克隆。需要检测的项目如下：

A、你的目的插入片段序列必须完全正确，如果不幸有突变，必须是同义突变。否则请挑选其他克隆。

B、读码框必须完全正确。你可以检查序列 N 端酶切位点后是否正确加

入了你校正读码框的碱基。如果有必要 C 端也需要检查。

C、仔细检查测序引物与你的序列中的那一段序列，是否与载体图谱上的序列完全一致。这点往往容易被忽略，但是非常重要。

四、小 tip

- 1、尽量不要浪费时间在 PCR 钓取大于 1.5kb 的片段上，直接找作者要质粒吧。
- 2、充分利用 PCR 仪温度梯度功能，理论上的退火温度往往和实际有差距。
- 3、PCR 反应、酶切反应要保证冰上操作。
- 4、Amp 抗性的质粒转化后不能培养过长时间，会产生次生菌落。
- 5、别搞错抗生素。
- 6、用各种试剂盒回收用于酶切的 DNA 时最后请用水洗脱。
- 7、克隆构建是所有分子生物学实验室最基本也是必须掌握的技术，然而它并不简单。上文中只是叙述了最基本的流程，如果碰到解决不了的问题，要及时请教有经验的同学与老师。