

PCR 片段的克隆方案集锦

PCR 扩增后的产物往往要克隆到载体中，传统的克隆方法主要有限制性酶切与连接法和 TA 克隆法。由于在 PCR 片段的两端酶没有足够的空间和其结合，因此 PCR 片段的酶切比质粒酶切要困难的多。为了把 PCR 片段克隆到其他的另外的载体中，第一步是把 PCR 片段克隆到 T vector 或 pUC18 这样的 PCR 克隆载体中。但是 TA 克隆的缺点也很明显，诸如需要单独购买 T 载体，连接效率不高，需要进行亚克隆等。那么如何能更有效得进行 PCR 克隆呢，最近热门的同源重组方法很好得解决了以上各种难题，PCR 产物克隆不再成为科研者的头痛问题！

如何把 PCR 片段直接克隆到一个克隆载体中？

- 有时需要把 PCR 片段直接克隆到一个克隆载体中。PCR 片段和载体使用同样的酶进行酶切。把经过酶切的 PCR 片段和经过酶切的载体连接起来。要使这种酶切和连接的成功率更高，以下几点非常重要：
 - 设计引物时需要加保护碱基。
 - PCR 片段酶切需要的时间可能比质粒酶切时间长。
 - 如果直接克隆很困难，可以先 PCR 片段克隆到 T vector 或 pUC18 这样的 PCR 克隆载体中，然后再克隆到另外的载体。
 - 为了节省时间，明智的选择是克隆到 T vector 或 pUC18 这样的 PCR 克隆载体和克隆到另外的载体同时进行。
 - 片段与载体的量要足够

如何更换载体？

- 在做克隆之前，作酶切位点的分析很重要：
 - 用于克隆的酶在目的载体和基因片段都必须是唯一的。
 - 请检查要使用的酶切位点在目的载体的位置。如果两个酶切位点挨的很近，先进行一个酶切，再进行另一个酶切很必要。也就是说，先用第一个酶切质粒，进行完胶回收后再进行第二个酶切。
 - 酶切要使用足够量的质粒：有足够的质粒用于酶切和胶回收很重要。一个克隆培养 15mL 培养基，小量抽提质粒可以获得足够质粒。
 - 如果使用的酶对于目的质粒没有切开，可以用这个酶切一下 pUC18 以便检查

这个酶是否好用。如果这个酶能酶切 pUC18 而不能酶切你的目的质粒，解决办法是重新制备你的目的质粒。如果这个酶不能酶切 puc18，解决办法是从另外的公司重新订购这个酶。

如何观察阳性克隆？

- 在作克隆时，同时作一个阴性对照很重要。例如作连接时，载体自连作一个，插入片段自连作一个。理想的情况应该是这样的：
 - 如果在阴性对照的平板上长 10-20 个克隆。而在你连入片段的平板上长超过 40 个克隆。在这种情况下，挑选一些克隆作检测，就可以挑选出阳性克隆了。
 - 如果在阴性对照的平板上没有长克隆，就有些麻烦了，有可能酶切时间过长，导致酶切和连接失败。

酶切克隆：

- 保护碱基, 甲基化 (DpnI), 定向克隆: CIAP 以及引物合成的特性 (-OH)
- 尽量使用相同公司的酶, 先低盐后高盐, Buffer 控制在活力 50% 以上, 尽量考虑通用 Buffer, 如 BamHI+, Y+, 酶的含量不能超过总体积的 10%
- 所有的限制性内切酶切割 DNA 均产生含 5' 磷酸基和 3' 羟基基团的末端。有些酶能使其识别序列相对两链之间的数个碱基对 (base pairs) 分开, 形成 5' 末端突出的粘性末端。还有一些酶产生具有 3' 末端突出的粘性末端。如图所示



而另有一些酶切割 DNA 后产生平头或钝性末端 (blunt end), 如



- $3' \text{ -CAA} \blacktriangle \text{TTG -5'} \quad 3' \text{ -GGG} \blacktriangle \text{CCC -5'} \quad 3' \text{ -CTA} \blacktriangle \text{TAG -5'}$
- 有些限制性内切酶虽然识别序列不完全相同, 但切割 DNA 后产生相同类型的粘性末端, 称**配伍末端** (compatible end), 可进行相互连接; 产生平端的酶切割 DNA 后, 也可彼此连接。

TA 克隆

- 原理: 应用了 taq DNA polymerase 的扩增特性, 在扩增后的片段尾部自动加一个 A, 根据碱基配对原则, 人为设计出末端含有 T 的载体, AT 配对, 在 T4 DNA ligase 的作用下, 把片段和载体连接在一起。PCR 片段克隆到 T vector 克隆载体: T vector 在载体的两端各有一个突出的 T。如果扩增 PCR 片段使用的是 Taq 酶, 那么扩增出的 PCR 片段在其两端都有一个突出的 A。这样 T vector 和 PCR 片段的 TA 碱基配对就很容易克隆。每个人掌握 PCR 片段克隆到 T vector 克隆载体这个技术是很重要的。但是请记住如果扩增 PCR 片段使用的是 pfu 等具有外切酶活性的酶, 克隆到 T vector 不适用。

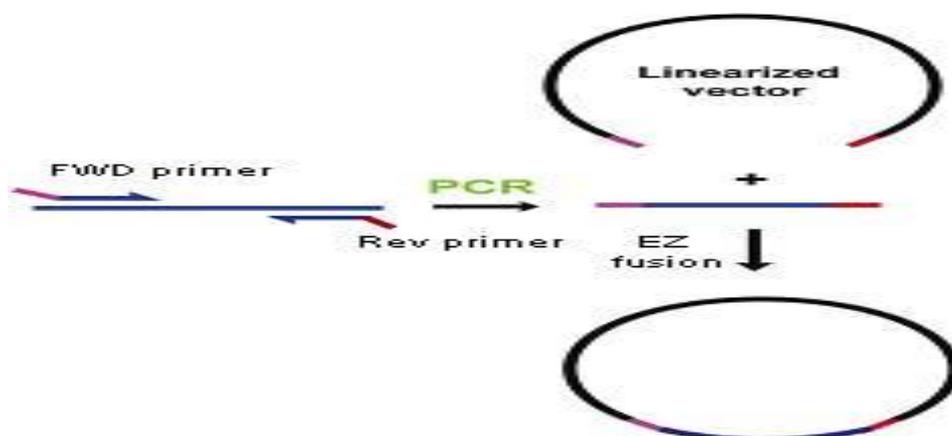
平末端克隆

首先将载体线性化, 然后 CIAP 去磷酸化处理。连入片段。克隆方向和载体自连问题比较突出。

同源重组克隆

以上是常见克隆中常用的一些方法和手段, 但需要考虑的因素太多, 成功率相对较低, 对一个人的实验功底考量比较严格。上海捷瑞生物工程有限公司最新推出的**同源重组酶**从根本上解决了这个问题:

上海捷瑞生物工程有限公司 EZfusion Enzyme 专门为把 PCR 产物快速, 定向, 有效的克隆到任何目标载体而设计。有效的避免了在克隆过程中遇到的合适内切酶的选择, 磷酸化, 补平, 加 A, 使用中间载体等等一系列复杂步骤。无需连接酶, 只需要把目标载体线性化(平末端, 粘性末端都可以), PCR 产物无需任何酶促处理, 直接和目标载体混合, 20 分钟一站式解决所有问题。无需蓝白斑筛选, 无需担心克隆方向, 无须担心阳性克隆比率, 随意挑取克隆, 阳性率>99%。使用本试剂盒, 可以定向克隆 12kb 的片段。该酶的作用原理示意图见下:

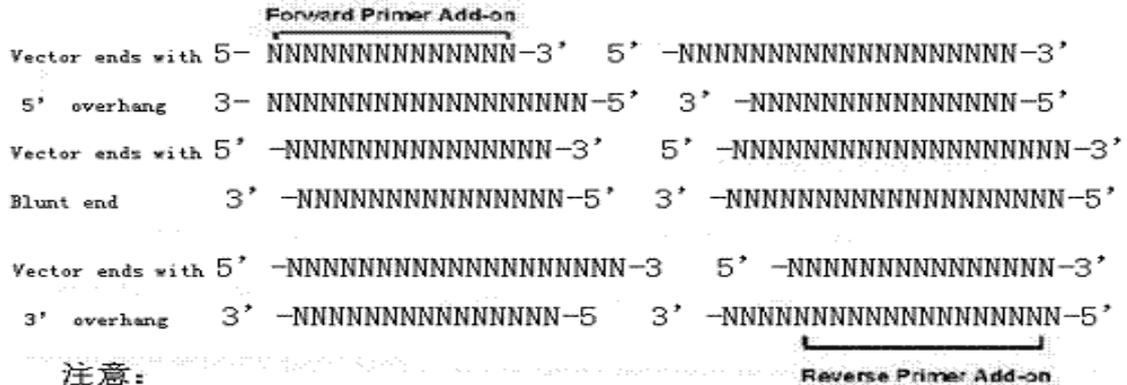


EZfusion 技术的关键步骤

操作步骤:

A. PCR 引物设计以及片段的准备:

用该试剂盒克隆目的基因或者目标 DNA 片段到指定的线性化载体, PCR 扩增所用的引物的最外侧必须有 8-30 个碱基与线性载体最外侧完全配对。现就 15 个碱基配对举例如下:



注意:

可以采用任何聚合酶未得到 PCR 产物, 但是, 引物和引物二聚体会对 EZfusion 有一定的抑制作用。如果 PCR 反应得到单一的目的条带, PCR 产物可以用 PCR 纯化试剂盒回收, 比如捷瑞公司的 PCR 产物回收试剂盒 (GK2051); 如果 PCR 产生很多非特异性条带, 应该用凝胶回收纯化目的条带, 比如捷瑞公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (GK2041) 去除掉多余条带。

B. 线性化载体的制备

载体的完全线性化对于重组实验至关重要, 没有线性化的载体会产生非常高的背景。线性化后的载体需要过柱纯化或者凝胶回收纯化。

EZfusion 技术的优势

1. 适用于各种自备载体、插入片断、或者酶切位点
2. 只要线性化载体就行 (平末端, 粘性末端均可), 不用酶切 PCR 产物, 不用补平末端
3. 不用去磷酸化载体, 不用加 A 处理
4. 适用于各种 PCR 酶 (常规 Taq、各种高保真酶均可) 的扩增产物
5. PCR 产物无需酶促处理, 和载体混合温育 20-30 分钟即可转化
6. 重组效率高、转化率高
7. 重复性高、可靠性好——可用于高通量操作, 批量克隆