

5. 重组反应

① 于冰水浴中配置以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
LightNing™ DNA Assembly Mix Plus	5 μ l	5 μ l	5 μ l
线性化载体 ^a	50~200 ng	50~100 ng	pUC 19 Control Plasmid, Linearized, 1 μ l
插入片段 ^b	10~200 ng	-	500 bp Control, Fragment, 1 μ l
ddH ₂ O	To 10 μ l		

a. 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

b. 插入单片段, 最适片段用量 (ng) = 0.04 × 片段碱基对数; 插入多片段, 每片段最适用量 (ng) = 0.02 × 片段碱基对数。

注 1: 若插入单片段的长度大于载体, 则应互换载体与插入片段用量;

注 2: 若插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量;

注 3: 若按上述公式计算得到的用量超过最低/最高值, 则建议直接按最低/最高用量使用;

注 4: 载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低。

重组反应体系配制完成后, 用移液枪轻轻吸打混匀各组分, 避免产生气泡, 切勿涡旋。

② 将反应体系置于 50°C, 反应 5~60 min。

注 1: 推荐使用 PCR 仪等温控比较精准的仪器进行反应, 反应时间不足或太长克隆效率均会降低;

注 2: 插入 1~2 个片段时, 推荐反应时间为 5~15 min; 插入 3~5 个片段时, 推荐反应时间为 15~30 min;

注 3: 当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段在 4 kb 以上时, 建议延长反应时间到 30~60 min;

注 4: 50°C 反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

③ 将反应液离心管置于冰上冷却, 之后进行转化或者储存于 -20°C。

注 1: -20°C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。

6. 重组产物转化

取 5~10 μ l 反应液, 加入到 100 μ l 感受态细胞中, 缓慢吸打混匀, 冰上放置 30 min。42°C 热激 45~60 sec, 冰浴 5 min。加 500 μ l SOC 或 LB 培养基, 37°C 振荡培养 40~60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上, 倒置于 37°C 过夜培养。

注 1: 不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别, 推荐使用转化效率 > 10⁸ CFU/ μ g 的感受态细胞;

注 2: 菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度;

注 3: 阳性对照平板通常生长大量白色单菌落, 阴性对照平板只生长很少的菌落。

7. 阳性克隆检测

挑取单菌落至 10 μ l ddH₂O 中混匀, 95°C 裂解 10 min 后, 取 1 μ l 裂解液作为模板, 进行菌落 PCR 鉴定, 或将单菌落接种至抗性培养基中培养过夜后, 提取质粒进行酶切鉴定。

阳性对照的阳性克隆检测, 菌落 PCR 引物使用通用引物 M13F 与 M13R, 酶切鉴定用 HindIII 与 EcoRI。

注 1: 菌落 PCR 时建议至少使用一条通用引物, 避免假阳性结果;

注 2: 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

注 3: M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

常见问题

问题描述	原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定: 若线性化载体与插入片段已经过纯化, 且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时, 可使用超微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定, 但只有当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信; 若线性化载体与插入片段未经过纯化, 也可使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应, 因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中, 切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中, 无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时, 提高快速内切酶的使用量, 延长反应时间, 使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时, 使用预线性化质粒作为扩增模板, 使用 DpnI 等甲基化敏感型内切酶对扩增产物进行处理, 或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素, 并使用新鲜制备的抗生素平板。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 体系, 提高扩增特异性, 或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。