

基因克隆及常见问题分析

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD.

内容概要

- DNA克隆技术简介
- DNA克隆实验流程
- DNA克隆的要素
- DNA克隆常见问题与应对策略

DNA 克隆的目的

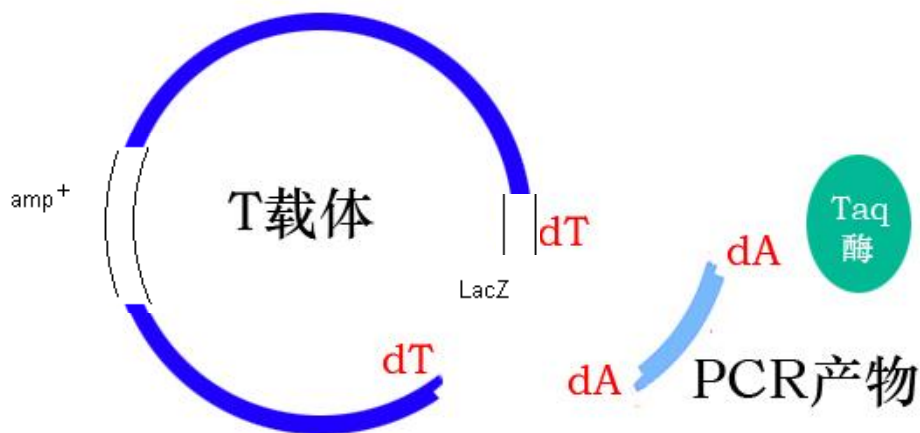
- ⊕ 目的基因的序列测定及筛选
- ⊕ 增加目的基因的拷贝，降低后续实验的难度
- ⊕ 研究基因表达
- ⊕ 其他（如点突变、SNP等）



克隆方法（以PCR产物克隆为例）

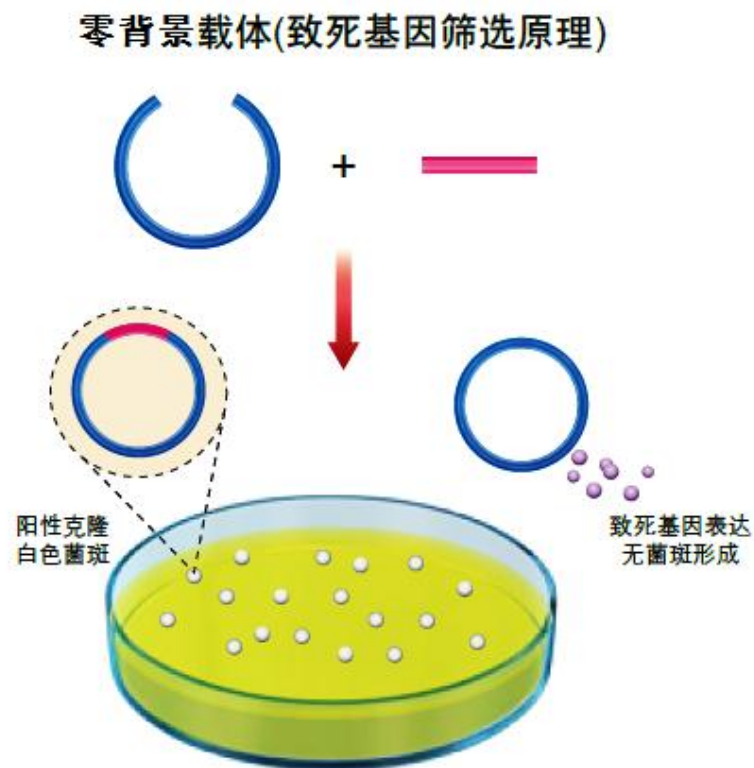
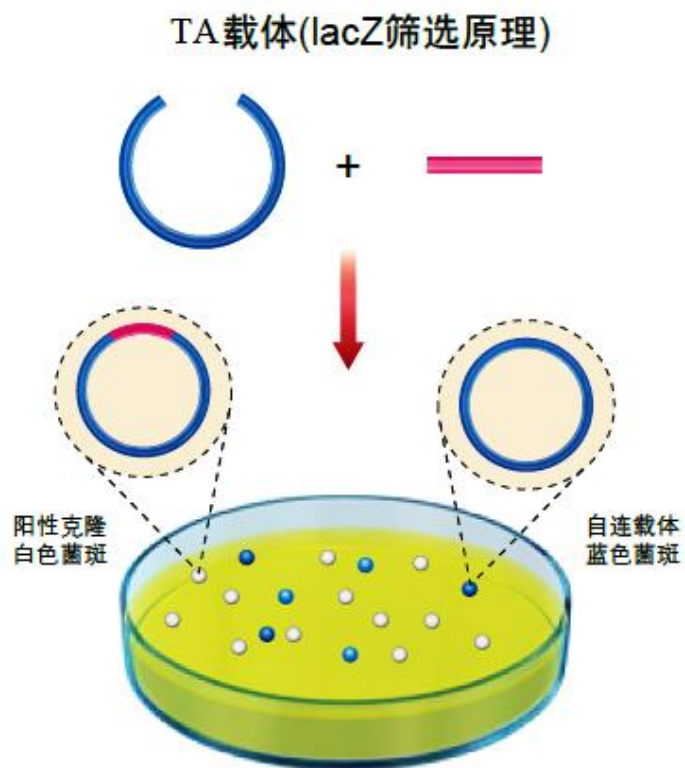
➤ TA克隆—蓝白斑筛选

非定向连接克隆，连接效率高，操作简单，易于长期保存。
可进行测序后对正确克隆扩大培养。



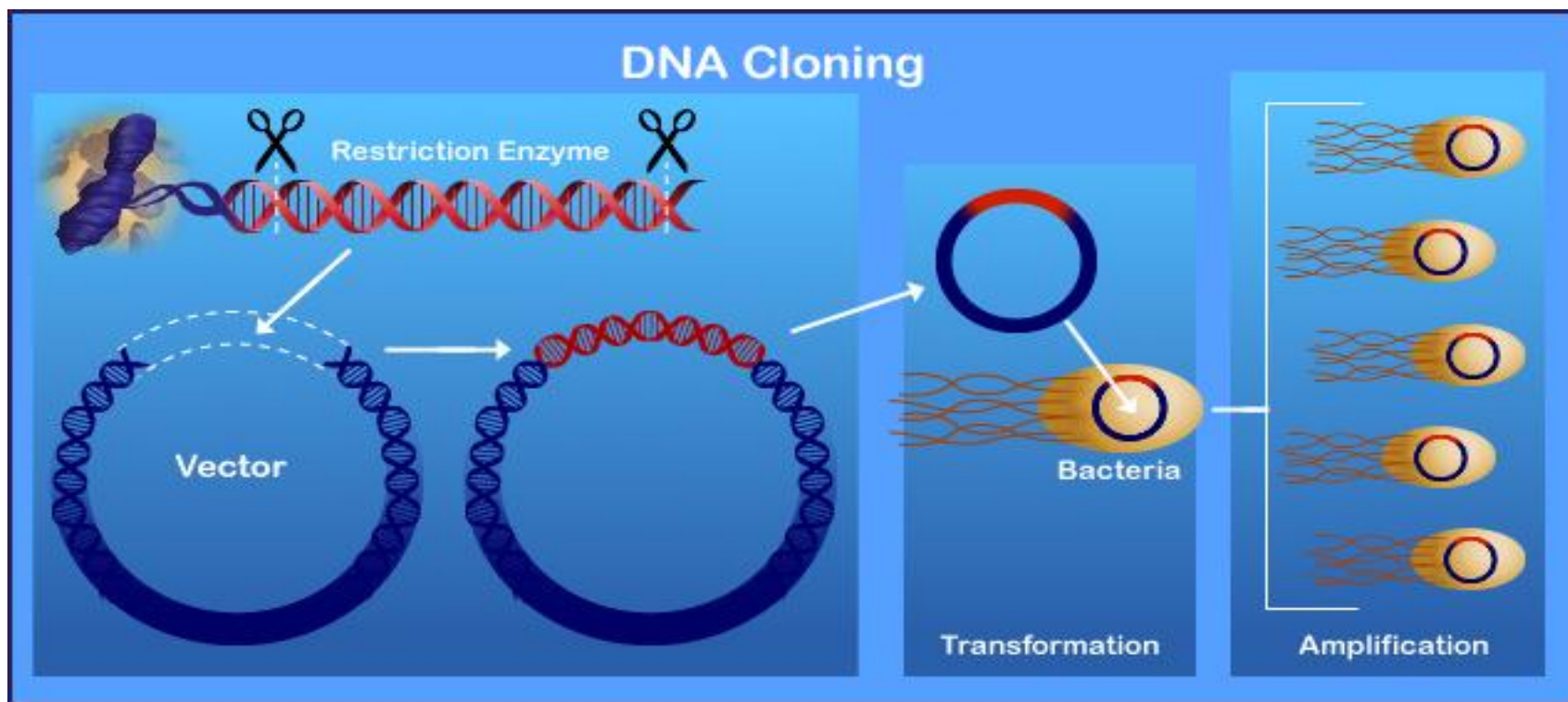
克隆方法（以PCR产物克隆为例）

➤ 零背景克隆—无需蓝白斑筛选



克隆方法（以PCR产物克隆为例）

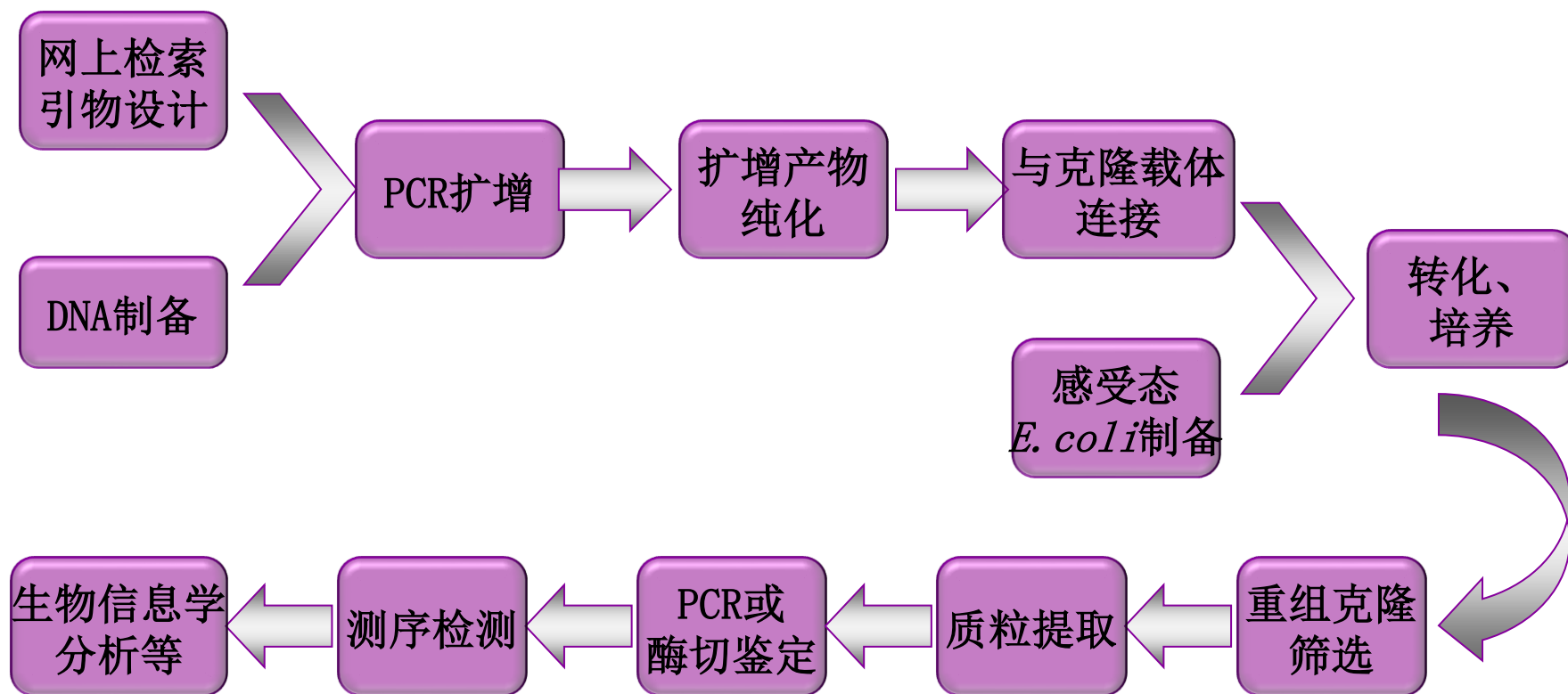
➤ 酶切连接克隆



内容概要

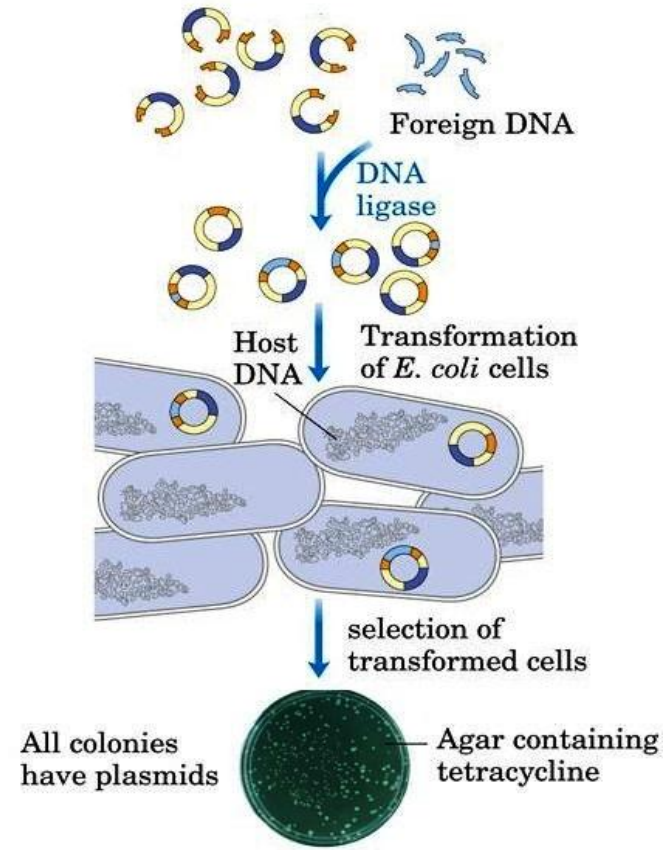
- DNA克隆技术简介
- DNA克隆实验流程
- DNA克隆的要素
- DNA克隆常见问题与应对策略

克隆实验的流程

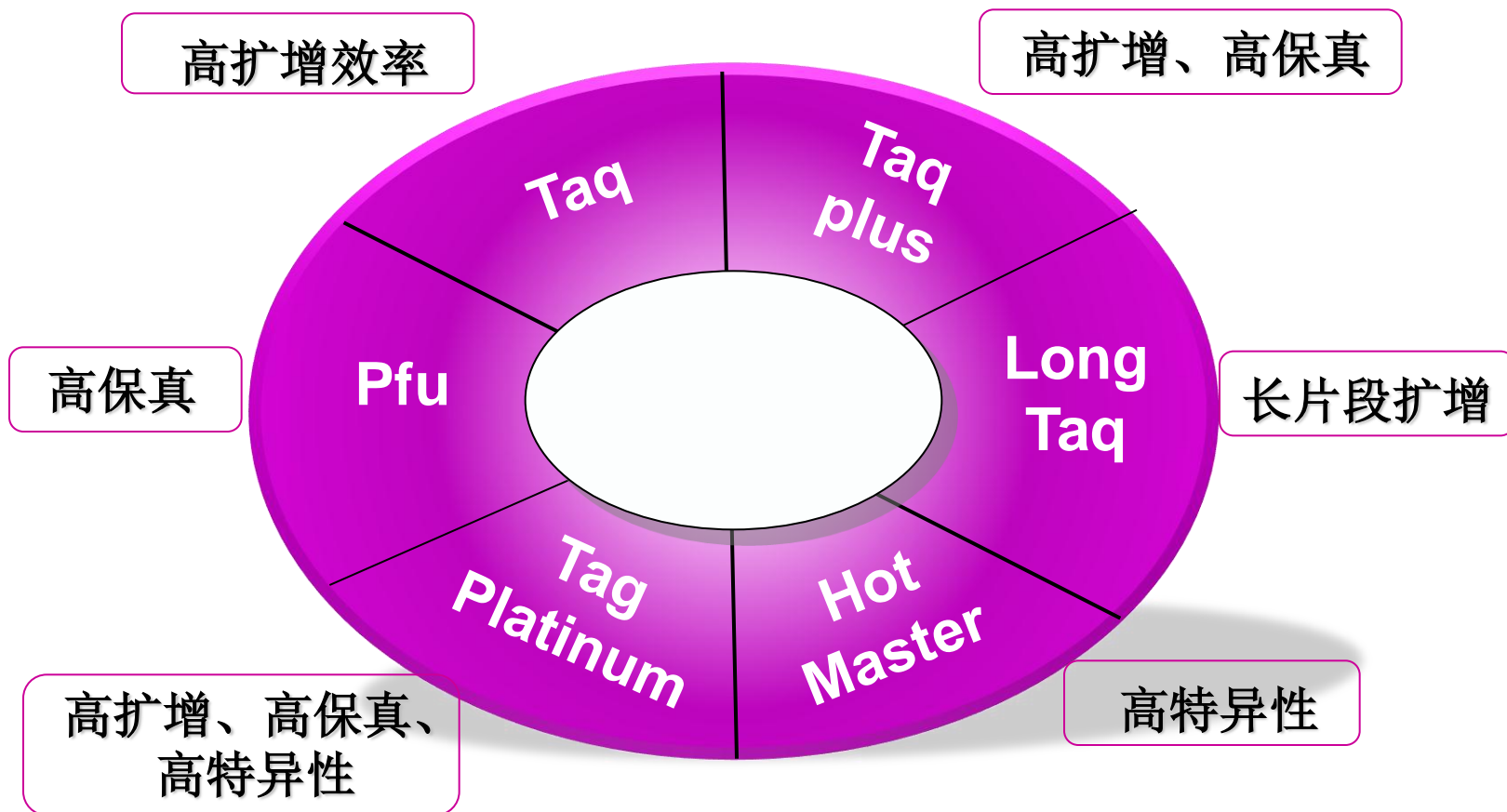


DNA 克隆的要素

- 目的DNA片段
- 连接酶
- 克隆载体
- 感受态细胞



TIANGEN六种PCR耐热聚合酶



不同DNA聚合酶PCR产物对比

DNA聚合酶	扩增片段末端	适合克隆类型	克隆前处理
Taq	粘末端	零背景克隆	平端化（平端化酶）
HotMaster Taq		TA克隆	无
Pfu	平末端	零背景克隆	无
		TA克隆	加A（加尾酶）
Taq Plus	粘末端+平末端	零背景克隆	平端化（平端化酶）
Long Taq	粘末端+平末端	TA克隆	加A（加尾酶）
Taq Platinum	粘末端+平末端		

目的DNA片段纯化

纯化原因：多余引物、多余dNTP、多余镁离子等，可能会影响后续连接反应，建议纯化。

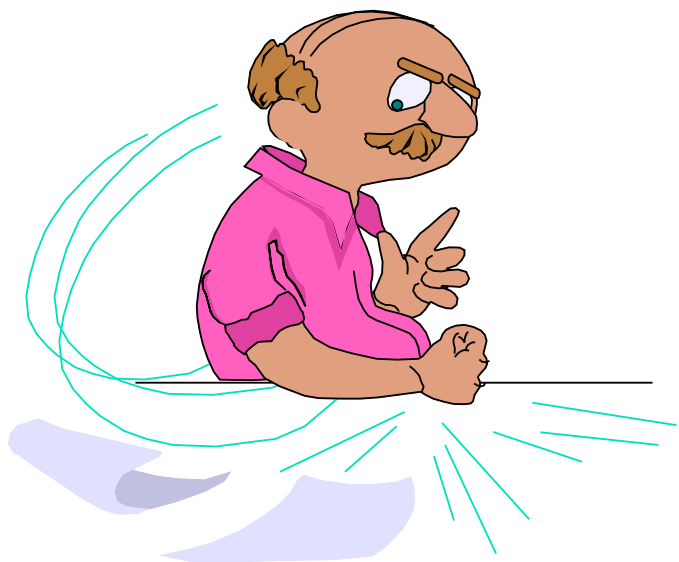
PCR特异性好（单带）

- 超薄/普通/大量DNA产物纯化试剂盒
- 寡核苷酸DNA产物纯化试剂盒
- N96 DNA产物纯化试剂盒
- 通用型DNA产物纯化试剂盒

PCR特异性差（多带）

- 超薄琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒
- 普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒
- 大量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒
- 通用型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒

DNA纯化常见问题及对策



- 凝胶回收无产物或者回收率低
- 回收**DNA**质量不好

DNA纯化常见问题及对策

凝胶无回收产物或回收率低

1、胶块太大 未全部溶解

2、起始量

3、电泳

升高

4、使用

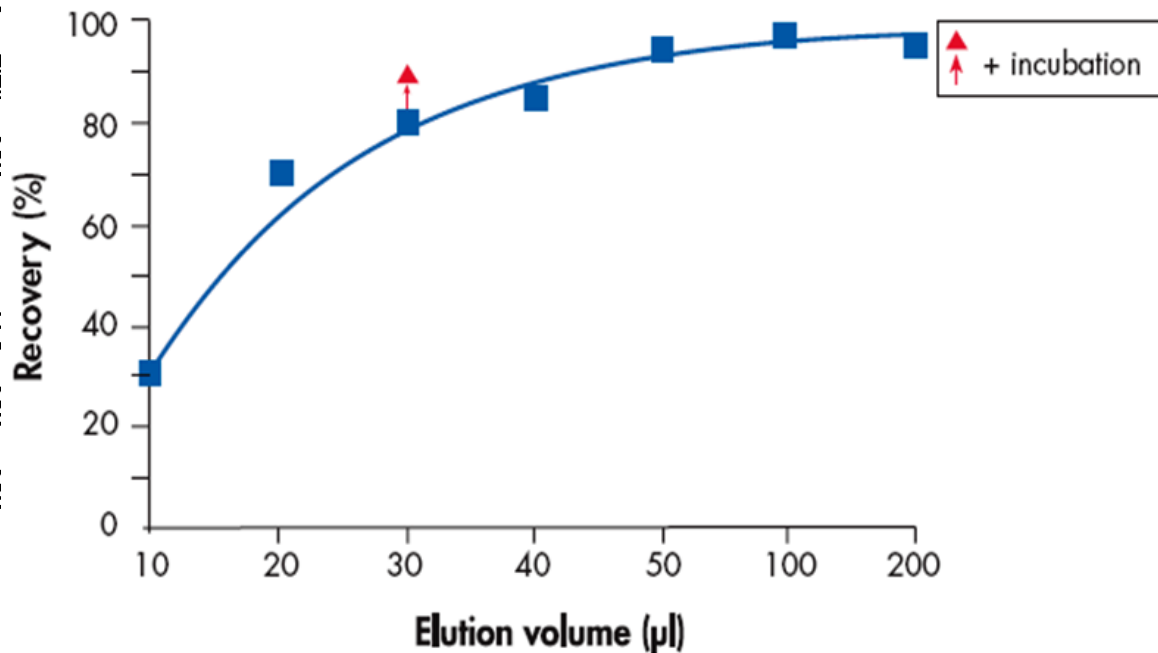
5、洗脱

6、洗脱

中心

1) 将胶块切小

增加溶胶时间或是溶胶



进行制胶和电泳
洗脱液进行洗脱
体积的洗脱液
，并放置1~2分

DNA纯化常见问题及对策

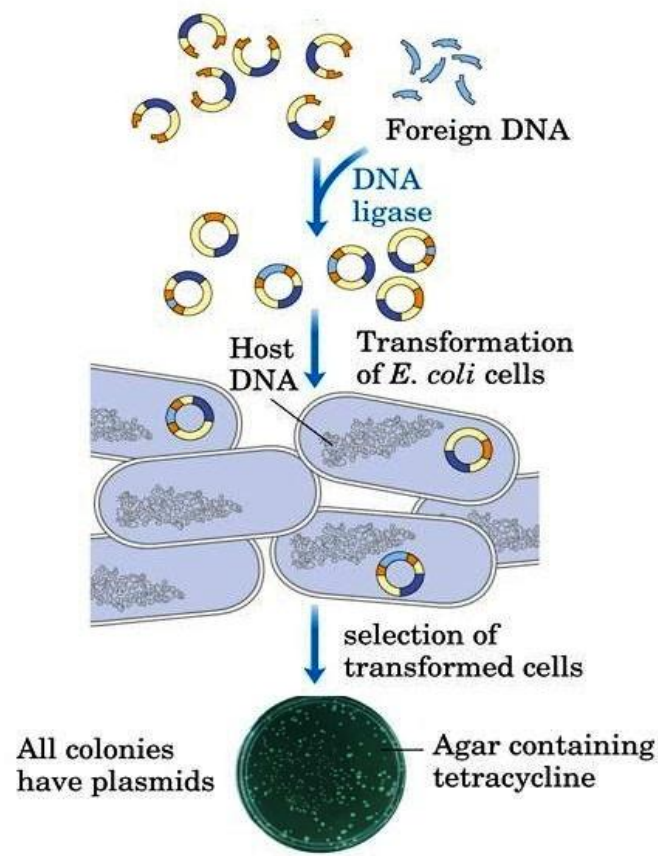
回收DNA质量不好

洗脱产物含有乙醇残留

洗脱时硅胶膜上有漂洗液残留，会使洗脱产物中含有乙醇，影响下游操作。在洗脱前可通过再次离心或置于50℃烤箱中5—10分钟，彻底去除漂洗液。

DNA 克隆的要素

- 目的DNA片段
- 连接酶
- 克隆载体
- 感受态细胞



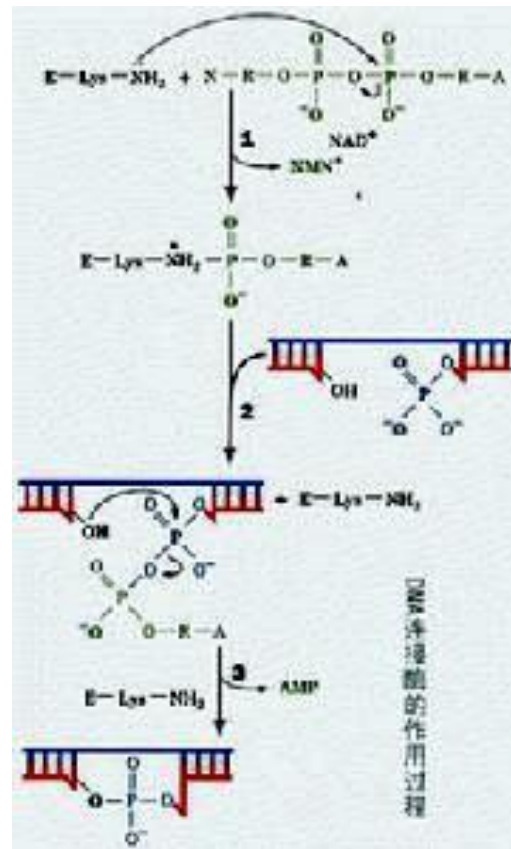
T4 DNA连接酶

➤ 作用机理

- 催化相邻DNA链的5'-P末端和3'-OH末端以磷酸二酯键结合的反应，需ATP作辅酶。
- 本酶不仅可以催化粘末端/平末端之间的DNA的连接，也可以催化DNA与RNA之间以及少数RNA之间的连接。

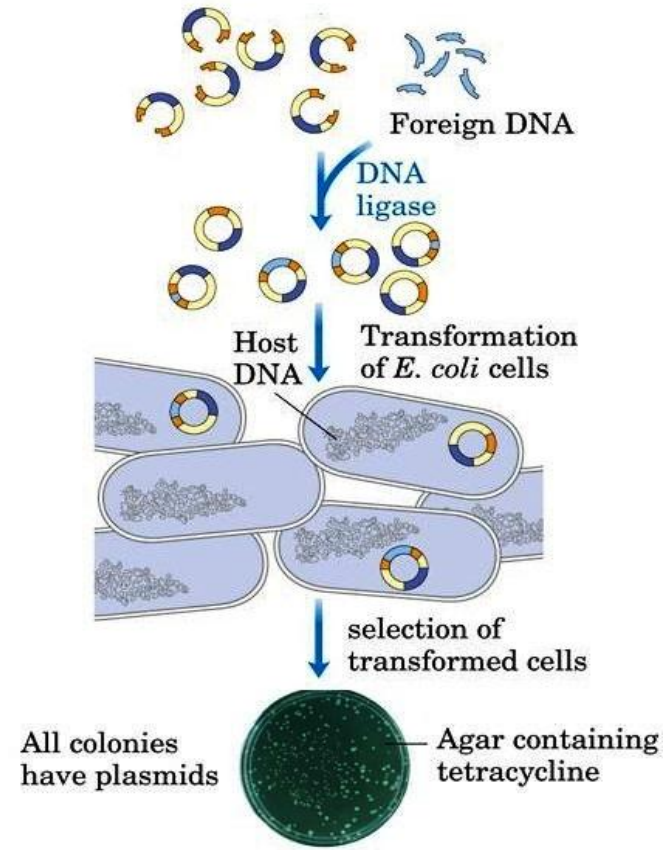
➤ 反应条件

4 °C/16°C过夜； 37 °C 1-2h



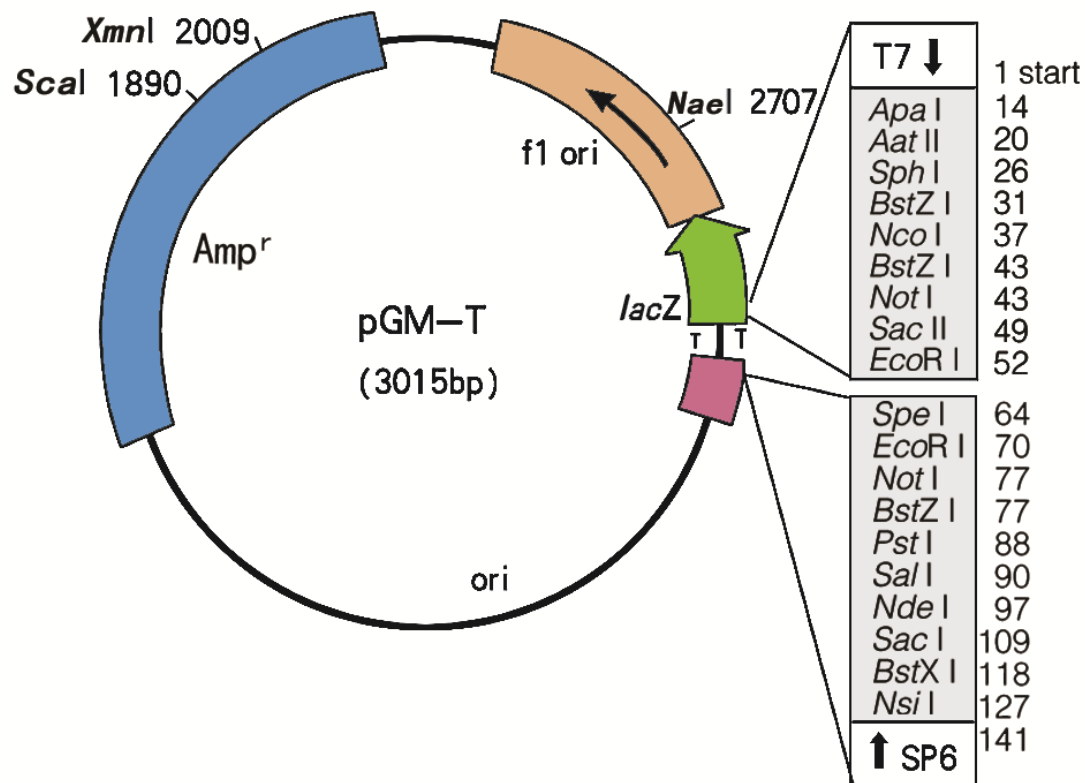
DNA 克隆的要素

- 目的DNA片段
- 连接酶
- **克隆载体**
- 感受态细胞



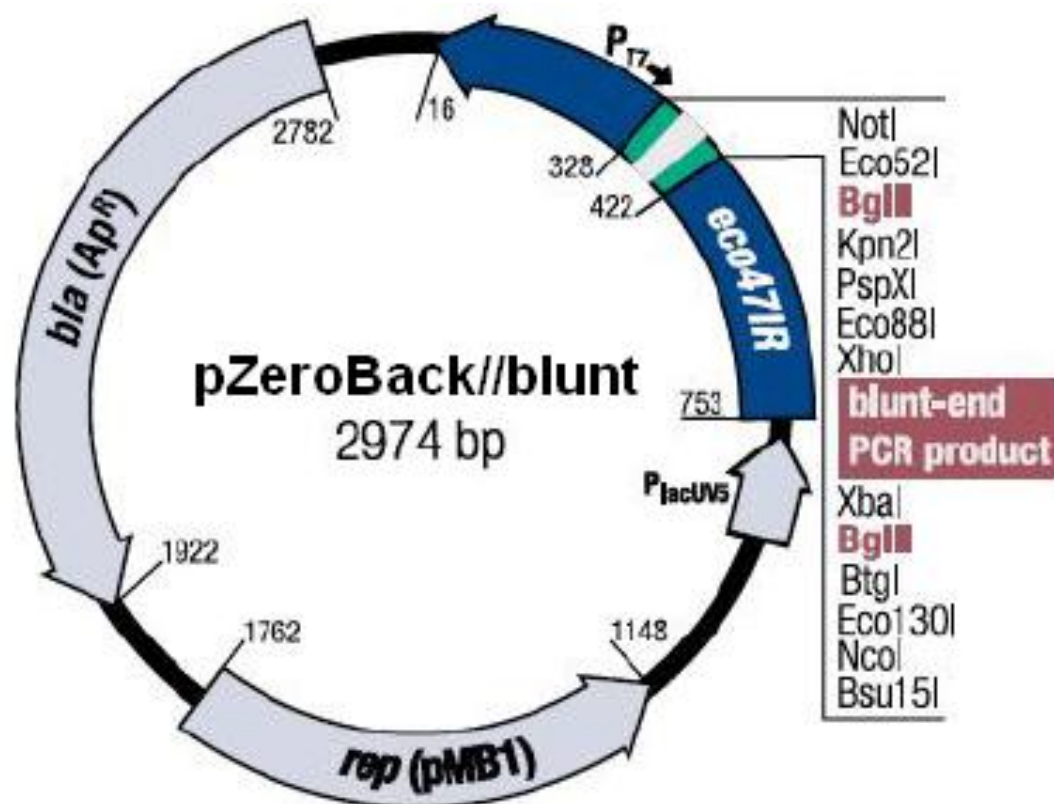
T载体

- Amp抗性
- 19个酶切位点
- 多种试剂盒满足您的实验需求



零背景载体

- 携带致死基因
(无需抗性筛选)
- 13个酶切位点

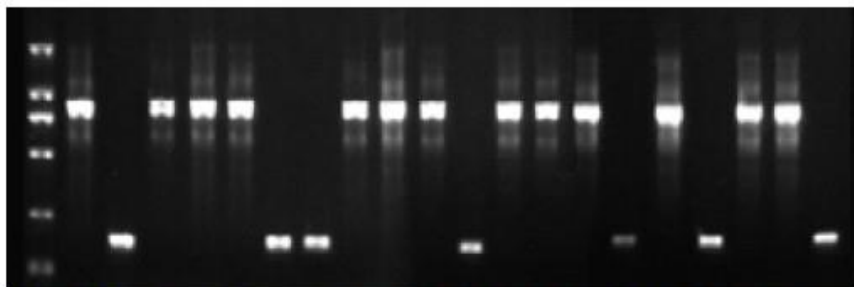


零背景载体—特点

- **零背景：** 使用携带致死限制酶基因，无需蓝白斑筛选
- **高效：** 高效连接酶，阳性率**>95%**
- **通用：** 适合平末端/粘末端**PCR**产物
- **快速：** 室温连接**5**分钟（平末端）/**10**分钟（粘末端）
- **耐受力强：** 可插入**6bp-10kb** 的片段

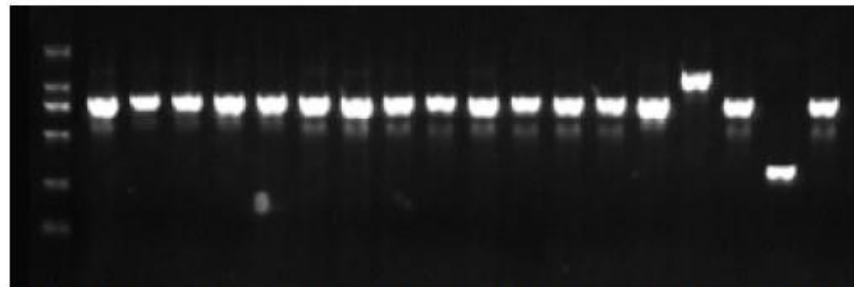
零背景载体—实验例

MII 700bp T载体阳性克隆鉴定



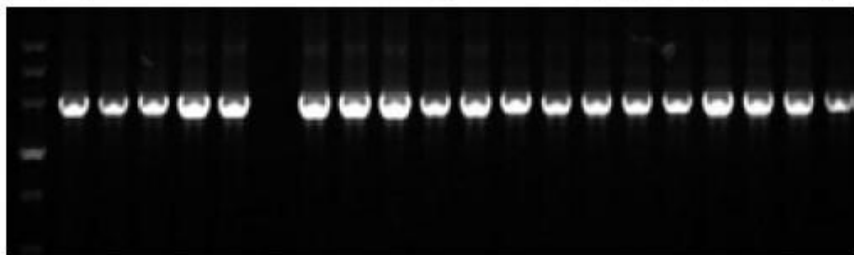
T载体试剂盒连入700bp片段后单菌落PCR鉴定结果共生长菌斑215个，阳性率65%

MII 700bp ZeroBack Fast Ligation Kit 阳性克隆鉴定



零背景快速连接试剂盒连入700bp片段后单菌落PCR鉴定结果共生长菌斑389个，阳性率95%

MIII 2kb ZeroBack Fast Ligation Kit 阳性克隆鉴定



零背景快速连接试剂盒连入2kb片段后单菌落PCR鉴定结果共生长菌斑407个，阳性率95%

MIV 8kb ZeroBack Fast Ligation Kit阳性克隆鉴定



零背景快速连接试剂盒连入8kb片段后单菌落PCR鉴定结果共生长菌斑121个，阳性率22%

零背景载体—平末端连接

连接体系中的成分	反应体系
目的 PCR 片段	X μl
pZeroBack 载体 (约 25 ng/ μl)	1 μl
2×Reaction Buffer	5 μl
T4 DNA Ligase (5 U/ μl)	0.5 μl
无菌去离子水	补足到 10 μl

混匀内容物，离心3-5秒



室温反应5分钟

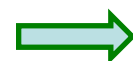


将离心管置于冰上，进行后续的转化反应

零背景载体—粘末端连接

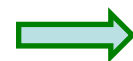
A

平端化体系中的成分	反应体系
目的 PCR 片段	X μl
2×Reaction Buffer	5 μl
DNA Blunting Enzyme	0.5 μl
无菌去离子水	补足到 8.5 μl



70°C反应5分钟
冰上短暂冷却

+



室温反应5分钟
冰上短暂冷却

||

共10分钟

B

成分	反应体系
pZeroBack 载体 (约 25 ng/ μl)	1 μl
T4 DNA Ligase (5 U/ μl)	0.5 μl

载体与片段的最佳比例

➤ 载体与插入片段最佳摩尔比1:3-1:8

$$\text{插入片段的量 (ng)} = \frac{\text{加入载体的量 (ng)} \times \text{插入DNA片段长度 (kb)}}{\text{载体DNA片段长度 (kb)}} \times \text{插入片段和载体的摩尔比}$$

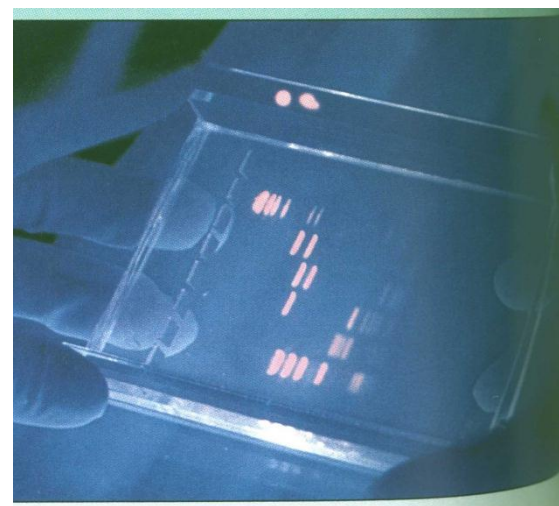
DNA定量方法

➤ 分光光度法

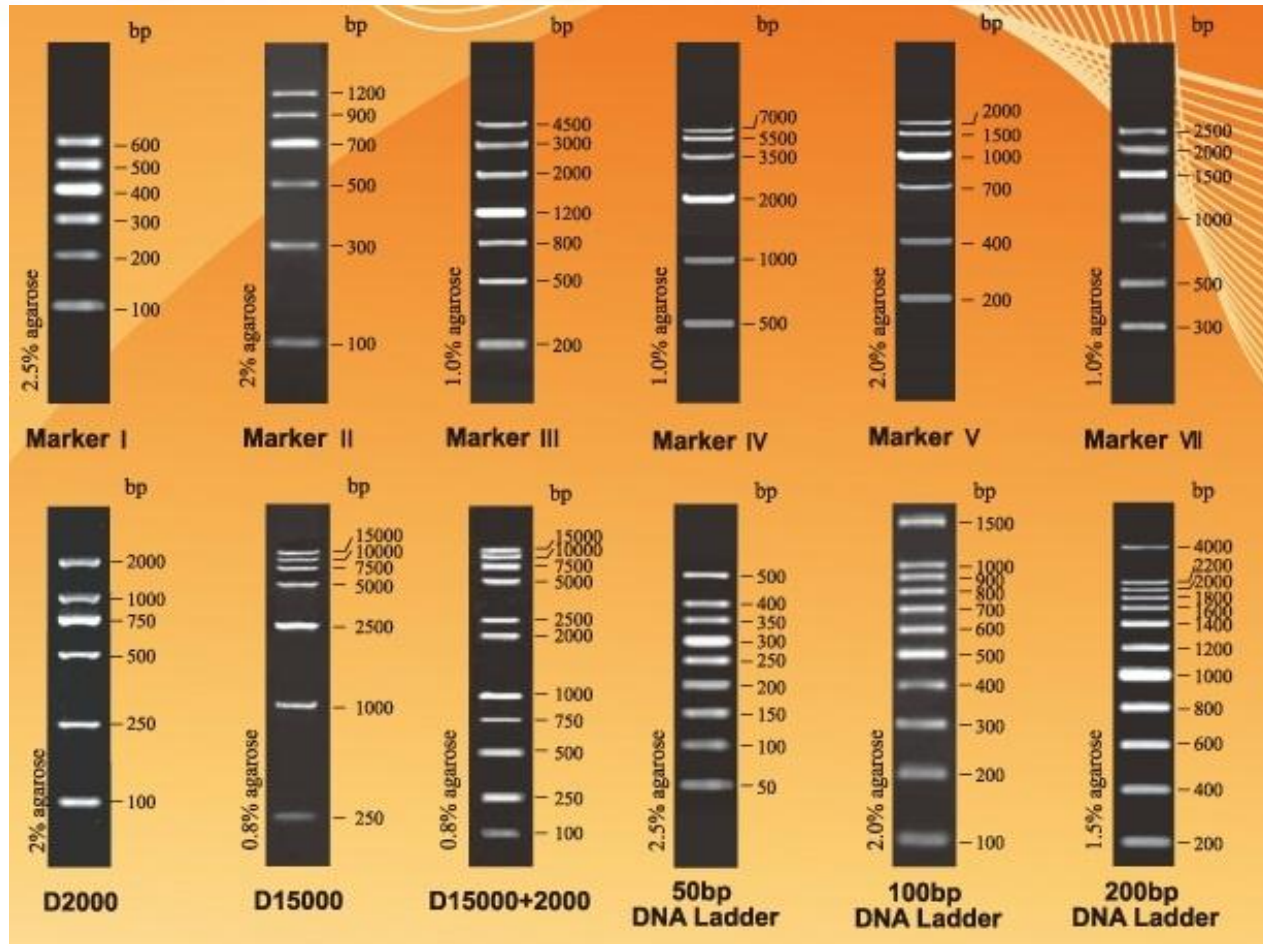
受缓冲体系、样品稀释度、
核酸二级结构、仪器本身等影
响

➤ DNA marker 定量法

EB分子插入DNA分子碱基间，
50ngDNA即可显现清晰条带，
定量方便直观

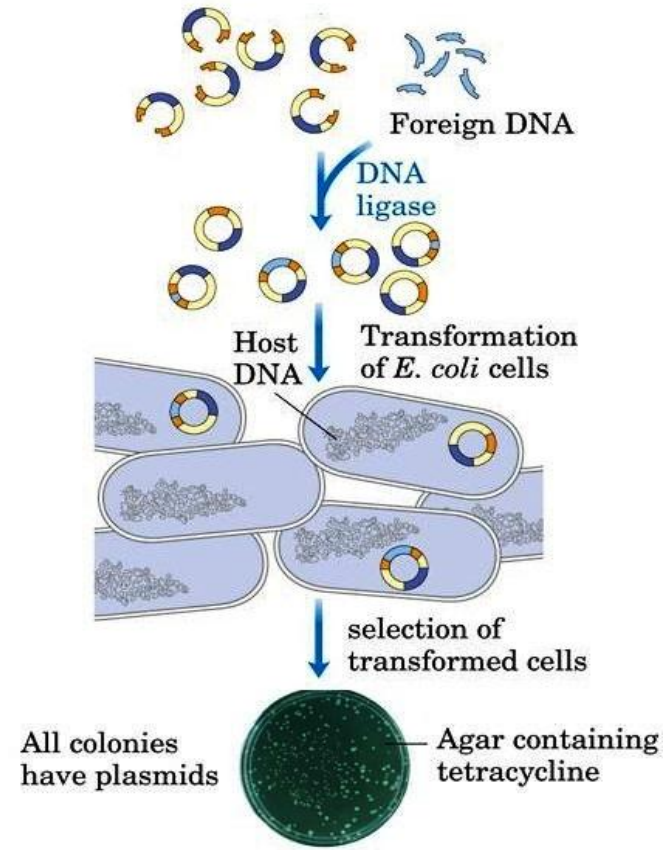


TIANGEN公司的Marker



DNA 克隆的要素

- 目的DNA片段
- 连接酶
- 克隆载体
- 感受态细胞



感受态细胞

感受态细胞的种类：野生型、化学转化型、电转化型

感受态效率的测定：

$$\text{转化效率} = \frac{\text{产生菌落的总数}}{\text{铺板DNA的总量}}$$

保存：-70℃冻存，避免反复冻融



TIANGEN感受态细胞

克隆感受态细胞

DH5a

转化效率高达 10^8 ，适用于
高效DNA克隆和质粒扩增

Top10

转化效率高达 10^8 ，适用于
高效DNA克隆和质粒扩增

表达感受态细胞

BL21 (DE3)

适合含T7启动子的载体中目的
基因的表达

BL21 (DE3) pLysS

适合毒性蛋白和非毒性蛋白
的表达

转化操作流程

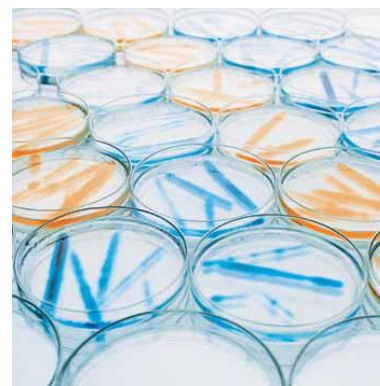
连接产物混合

冰浴30 min

42度 1-2 min

37度复苏培养

37度过夜培养



设计实验

- 1) 未转化的感受态细胞 + 非抗性平板 → 检查感受态细胞活性
- 2) 未转化的感受态细胞 + 抗性平板 → 检查是否有杂菌
- 3) 转有PUC19的感受态细胞 + 抗性平板 → 检查细胞转化效率
- 4) 转有700bp片段的感受态细胞 + 抗性平板 → 检查载体效果
- 5) 转有目的片段的感受态细胞 + 抗性平板

重组子的鉴定方法



内容概要

- DNA克隆技术简介
- DNA克隆实验流程
- DNA克隆的要素
- DNA克隆常见问题与应对策略

DNA克隆常见问题之一

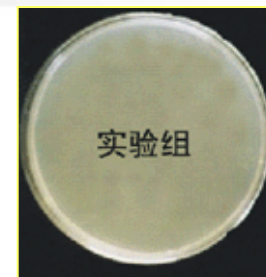
转化后无克隆产生

原因

1. 感受态细胞低效
2. 抗生素使用错误
3. 转化后立即涂板忘记温浴

对策

1. 使用高效率的感受态细胞 (10^6 以上)
2. 复查质粒抗性, 使用正确的抗生素
3. 转化后温浴45min左右, 让抗性基因得以表达



DNA克隆常见问题之二

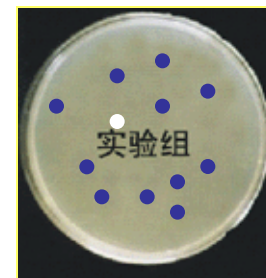
白斑少

原因

1. A或T突出端丢失
2. 插入片段与载体比例不适
3. PCR 产物中含有抑制连接的成分
4. 连接时间不够；温度太高
5. PCR 产物已经插入，但未破坏 *lacZ* 基因的翻译框

对策

1. 使用新扩增的PCR产物，避免引入核酸外切酶
2. 与片段载体的比例：1:3-1:8
3. 再次纯化PCR产物进行连接
4. 适当延长连接时间；连接温度过高（>28℃）可使背景增加
室温连接时勿超过26℃



DNA克隆常见问题之三

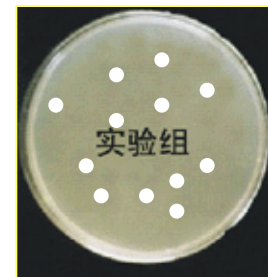
只有白色菌落

原因

1. 未加IPTG/X-Gal或其失效
2. 抗生素失活，敏感菌亦能生长
3. 用于制备感受态的菌株退化，丢失了某些重要因子

对策

1. 检查平板是否含IPTG/X-Gal以及平板是否新鲜制备
2. 复查抗生素的抗性
3. 用于制备感受态的菌株，传代次数不能太多（20代以内为佳）



DNA克隆常见问题之四

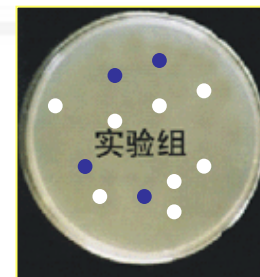
阳性克隆率低

原因

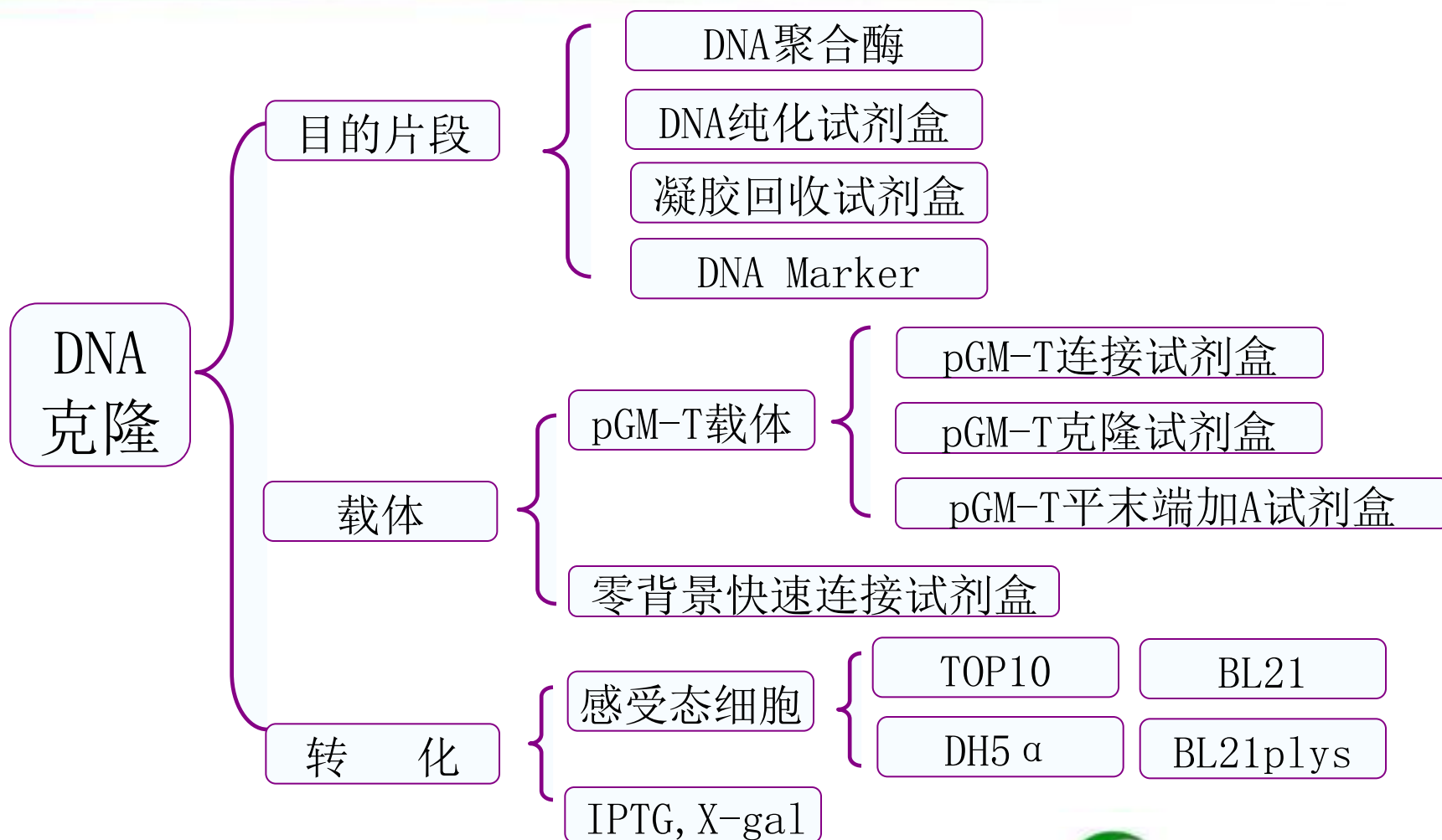
1. PCR产物不纯，非目的条带亦被克隆
2. PCR部分产物发生A尾丢失
3. PCR所用酶不在产物3'端加A或只是部分加A
4. 片段与载体比例不适

对策

1. 重新纯化PCR产物
2. PCR扩增后，尽量少放置，直接进行后续的回收连接，以防A尾丢失
3. 除Taq酶外，使用其它酶扩增的产物在用于TA克隆时都建议先加A，再连接
4. 调整片段与载体的比例，控制在1:3-1:8之间



DNA克隆相关产品



质量为天，我们永远坚持
服务为根，我们不断追求

“质量为天，服务为根”