

质粒的连接与转化（无缝克隆）

实验原理

无缝克隆

无缝克隆是一种新型基因克隆技术，它可以同时将 1 到多个片段高效的插入到任何载体。目前应用较广泛的无缝克隆方法是 Gibson Assembly 和 In-Fusion Cloning。这两种方法的在原理上非常相似：都是通过外切酶产生黏性末端、然后利用体内或体外重组酶进行连接，得到重组片段；但两者用到的酶却完全不同

Gibson Assembly 要求目的片段与线性化载体首尾具有一段互补重叠的同源臂序列；利用 T5 exonuclease 的 5' → 3' 外切酶活性产生 3' 黏性末端，之后同源臂进行互补配对，再利用 DNA polymerase 延伸补齐片段上的缺口部分，最后通过 Taq DNA Ligase 连接 DNA 片段中的缺刻，完成克隆组装。

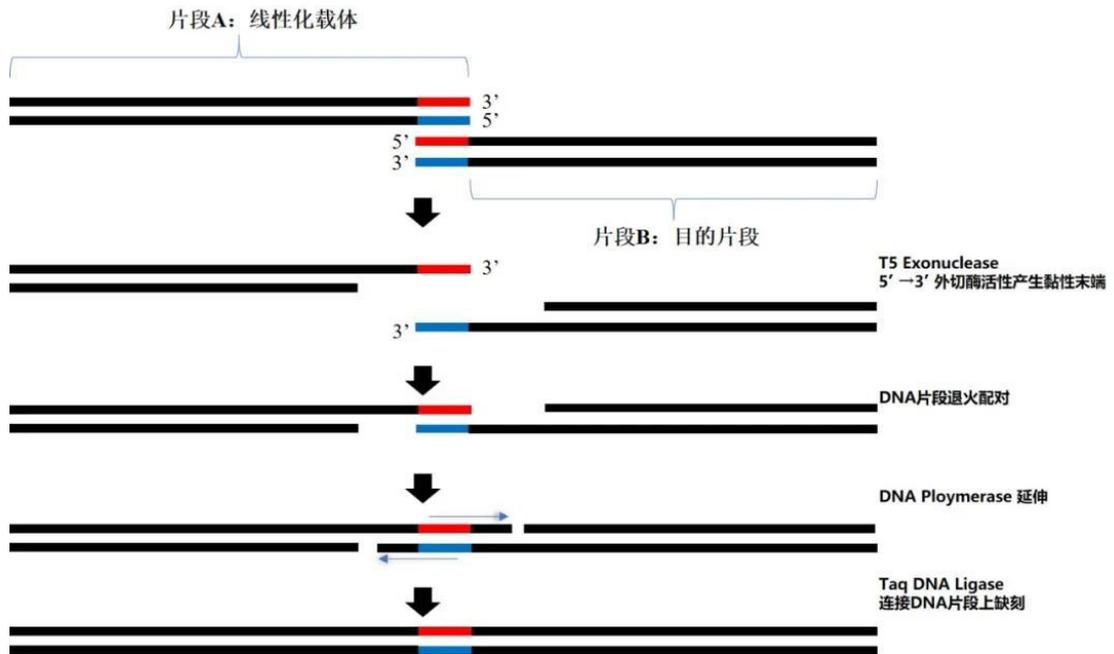


图 1.Gibson Assembly 原理

In-Fusion Cloning 利用了 In-Fusion 酶能够识别 3' 末端碱基，具有 3' → 5' 外切酶活性的特点。通过 In-Fusion 酶产生 5' 黏性末端，互补重叠片段退火配对；再将重组片段转化到感受态细胞内，重组片段序列中的缺刻在菌体内进行连

接，获得重组序列。

转化

电穿孔法是通过电场作用于细胞几微秒到几毫秒之后，在细胞膜上暂时形成小孔或开口，把大分子如 DNA 等导入细胞并最终进入细胞核的技术。其过程简述如下：首先在电击过程中，细胞膜上出现穿孔，质粒在电泳力的作用下与细胞膜接触，并在细胞膜上电穿孔的区域形成一种可转移的复合物。再次电击后，质粒脱离复合物并扩散至细胞质内，开始瞬转；同时小部分质粒进入核内与染色体整合，开始稳转。一旦 DNA 扩散至细胞，膜上小孔会关闭。

化学感受态细胞转化的第一步，加入 DNA 后，轻弹管壁混匀，冰上静置，使 Ca^{2+} 与 DNA 结合中和 DNA 的负电荷， Ca^{2+} 与细菌细胞膜结合中和电荷，克服了外来 DNA 和细菌细胞膜之间的负电荷排斥作用。 Ca^{2+} 与 DNA 和细菌细胞膜脂多糖的磷酸盐形成配位络合物， Ca^{2+} 促进了 DNA 和脂多糖的结合。

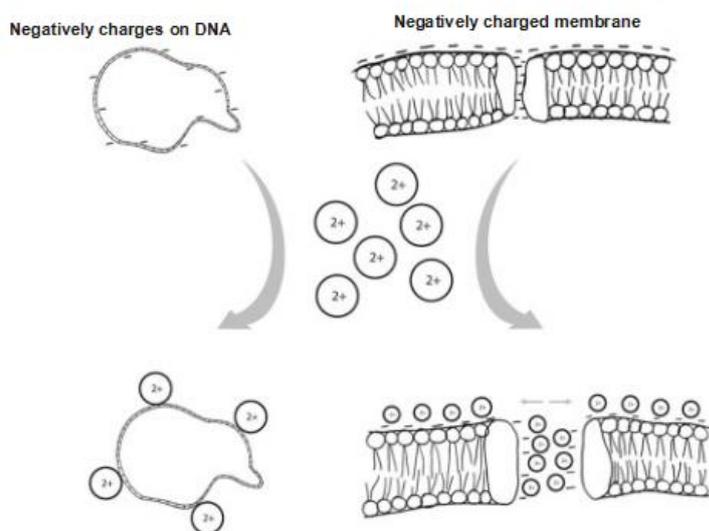


图 2. Ca^{2+} 克服了外来 DNA 和细菌细胞膜之间的负电荷排斥

化学感受态细胞转化的第二步是热激。热激使温度升高，细胞膜的脂质释放（图 3-A），在细胞膜上形成孔隙（图 4-E），DNA 进入细菌内部。热激后在冰上冷却 2min，温度降低，细胞膜的蛋白质释放（图 3-B），脂质占比增高，细胞膜的流动性升高，细胞膜上的孔隙消失（图 4-F）。

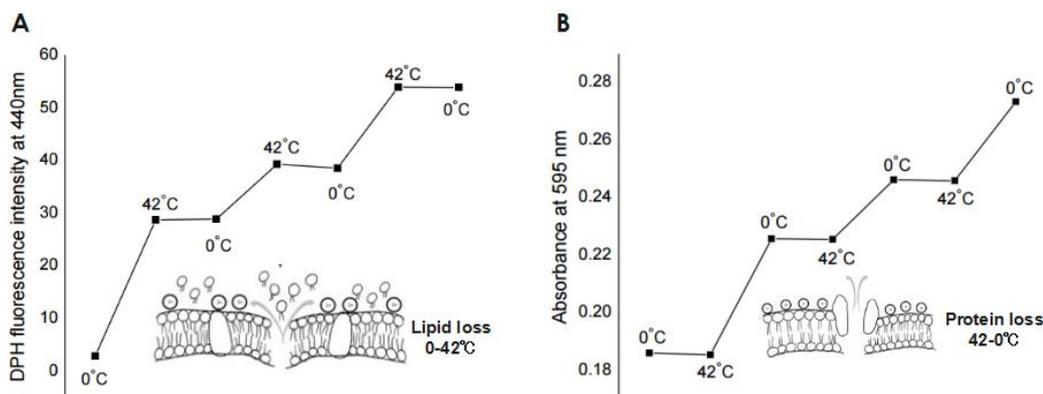


图 3.A: 脂质释放曲线, B: 蛋白质释放曲线

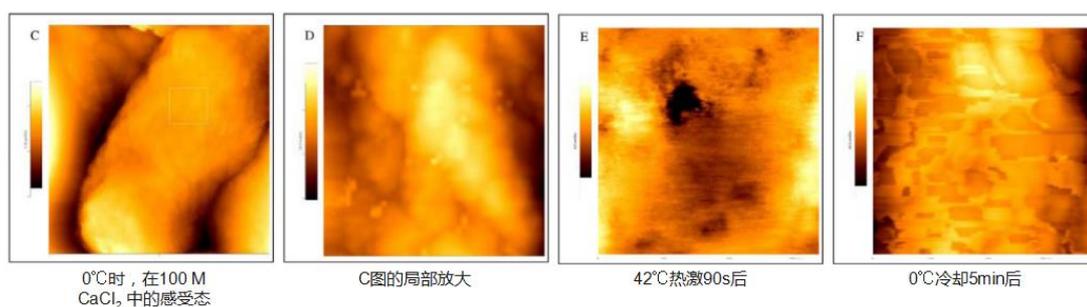


图 4.感受态细胞在转化过程中表面形态的变化

化学感受态细胞转化的第三步，加入 LB 培养基，37°C 复苏，该步骤的主要作用是使感受态细胞恢复生长，使感受态细胞中的质粒表达抗性基因，这样在涂板后带有目标质粒的大肠杆菌在相应抗性的平板上才能正常生长。

综上，化学感受态细胞在转化过程中进行冰上放置是为了使 DNA 吸附到感受态细胞表面；热激步骤使感受态细胞表面形成孔洞，DNA 进入感受态细胞内；冰上孵育使感受态细胞的孔洞消失；37°C 复苏是为了是细胞恢复生长并表达抗性基因。

实验用具及材料

1. Linear Plasmid
2. Insert DNA
3. sosoo 酶（无缝连接产品）
4. 感受态细胞

实验步骤

1. 制备线性化载体

- 1) 选择合适的克隆位点请选择无重复序列且克隆位点上下游 25bp 区域内 GC 含量在 40%–60%之间的位点进行克隆。
- 2) 载体线性化方式：可使用限制性内切酶酶切消化或者反向 PCR 扩增得到线性化载体。
- 3) 载体纯化：线性化的克隆载体务必进行凝胶纯化并电泳检测其质量和浓度。

2. 连接

组分	用量
线性化载体	X μ L
插入片段1	Y1 μ L
.....
插入片段n	Yn μ L
2×SoSoo Mix Ver.2	5 μ L
ddH ₂ O	Up to 10 μ L

- 1) 用移液器轻轻吹打混匀，低速瞬时离心所有液体至离心管底部。载体用量 10–100ng。载体与插入片段的摩尔比为 1:2–1:10。多片段连接时各片段之间摩尔比为 1:1。
- 2) 体系配置完成后，50℃反应 15min。对于多片段或长片段克隆，可延长反应时间，但最长不要超过 60min。

3. 转化

- 1) 取 100 μ L 冰浴上融化的感受态细胞，加入目的 DNA（质粒或重组产物），轻轻混匀，冰上静置 25min。
- 1) 2) 42℃水浴热激 45–60s，迅速转移至冰浴中，静置 2min（晃动会降低转化效率）。
- 2) 向离心管中加入 700 μ L 不含抗生素的无菌液体培养基（SOB 或 LB），混匀后

37°C，200rpm 复苏 1h。

- 3) 根据实验需要，吸取不同体积的复苏液均匀涂布到含相应抗生素的 SOB 或 LB 培养基上，将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

4. 阳性克隆鉴定

- 1) PCR 鉴定
- 2) 酶切鉴定
- 3) 测序

五、注意事项

- 1) 重叠区域的 T_m 值尽量一致且 $>60^\circ\text{C}$ ；
- 2) 线性化载体和片段 PCR 产物必须凝胶纯化，常用的分光光度法极易受 DNA 纯度、DNA 稀释液 pH 等因素影响，测定值和 DNA 实际浓度往往偏差较大，推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度；
- 3) 控制好载体和片段的用量及摩尔比，线性化载体用量在 10–100 ng 之间，载体和插入片段摩尔比 1:2–1:10 均可，多片段连接时各片段摩尔比为 1:1；
- 4) 加样完成后，吹打混匀，低速瞬时离心使所有溶液至离心管底部，重组产物即连即转；
- 5) 建议每次实验，做阳性片段和阳性质粒的对照。