

QR 分子克隆和诱变试剂盒使用手册

简介

QR 分子克隆试剂盒可用于 PCR 产物或 DNA 插入片段与限制酶切割的质粒骨架的环状重组质粒的快速生成。其基本工作原理如下：嵌合式引物（由 3'端基因特异性序列和 5'端载体特异性序列两部分构成）引导所得到的含目的基因的 PCR 产物与载体骨架经由 3'→5'外切酶的处理形成互补的 5'单链末端(又称连接点)。经过处理的插入片段和载体质粒骨架通过这部分 5'单链末端的退火互补形成并非完美的双链环状分子。这些连接点的单链部分将会在转化入大肠杆菌细胞后经由内源性 DNA 修复系统补齐断点并连接成共价闭合的分子。QR 分子克隆试剂盒还可用于 QR 诱变的操作。QR 诱变是 QuickChange™ 方法的改进型。整个质粒经由含突变的引物在高保真 DNA 聚合酶作用下生成线性 PCR 产物。PCR 产物然后经由纯化和 QR 外切酶作用产生互补的 5'单链末端，随后退火粘连。连接点的单链部分将会被内源性 DNA 修复系统在其转化后所修复。QR 克隆和诱变试剂盒非常可靠，如果和化学转染法结合起来尤其适宜于高通量克隆和诱变工作。

试剂盒成分列表

QR 克隆和诱变试剂盒				
	货号	QR-CM-10	QR-CM-50	QR-CM-100
组分	反应数	10	50	100
QR 酶	组分数量	10 微升	50 微升	100 微升
10 x QR 缓冲液		20 微升	100 微升	200 微升
线性对照质粒		5 微升	5 微升	5 微升

对照插入片段		10 微升	10 微升	10 微升
--------	--	-------	-------	-------

注意：操作中所需要的 Dpn I 限制性内切酶并未包括在本试剂盒中，需由用户从其他销售方购买。

QR 克隆步骤

1. 引物设计

***可使用 GZL 开发的辅助软件进行 QR 克隆的引物设计**

如图 1 所示，嵌合式引物(B)由 3'端插入基因 (A) 特异性序列 (蓝色) 和 5'端载体特异性序列 (红色) 两部分构成。由此扩增出的插入目的基因 (C) 和最终限制酶切割的载体 (D) 相互匹配，适用于克隆操作。

设计引物要考虑搭接序列长度，得使其具有不低于 42°C 的解链温度。热激转化是在 42°C 放置 45 秒钟，因此连接点要能在热激转化过程中仍然保持粘接状态而不断开。最简单的方法是依据 $G/C = 4^{\circ}\text{C}$ 和 $A/T = 2^{\circ}\text{C}$ 来估算解链温度。以图 1 为例，搭接序列为正向引物上的 TTAAGAAGGAGATATACAT 序列和反向引物上的 GGGAGCTCGAATT 序列。

对于两片段及多片段克隆来说，每个连接点的一对引物的搭接序列要符合解链温度的基本要求，进而保证正向引物和反向引物的搭接序列长度足以使两个片段牢牢粘接在一起。用来设计引物的序列可能是千差万别的，没有一个简单的规律来遵循，但若除去搭接序列后的引物的解链温度在 50-60°C 范围内的话一般没有问题。若要从有复杂序列的模板扩增，就可能需要设计更高的解链温度以确保扩增出想要的 DNA 片段。

2. 限制性内切酶制备载体 DNA

由于该方法只需要搭接片段共有有限的一段序列，连接点可以选择在载体的任何区域。如果有合适的酶切位点，最直接的方法是用单一限制性内切酶降解载体质粒 DNA 从而获得两个可以用来搭接的连接位点。单一酶切很容易完成对 DNA 的完全降解，所以用 PCR 纯化手段就可得到均一的线形载体 DNA。如果想插入区域无可供利用的限制酶位点，整个质粒骨架可以通过 PCR 反应获得，但前提是该载体 DNA 可以用高保真 DNA 聚合酶扩增。请参阅下面一段关于载体 PCR 扩增的详细介绍。

3. PCR 扩增制备载体

如果载体骨架不是很大（比如 <10 kb）且无复杂 DNA 序列（比如含有两段甚至多段长的完全相同的 DNA 序列或多个二级结构序列）PCR 是短时间内获得大量载体 DNA 的最快的方法。PCR 产物需通过琼脂糖凝胶电泳检查以确定扩增产物为单一分子，否则必须通过凝胶将目的 DNA 分离纯化。

4. 插入片段制备

插入基因序列一般由 3' 段为基因特异序列而 5' 段是载体特异序列的嵌合式引物通过 PCR 扩增得到。引物设计原理如 (1) 中所述。PCR 产物需利用琼脂糖凝胶电泳查看其纯度。若 PCR 产物呈现单一条带, 其仅需 PCR 纯化方法提取。若出现多个条带 (多个 PCR 产物被扩增), 目的条带中的 DNA 需用凝胶分离纯化。

5. QR 反应

QR 反应一般需要加入 100 ng 固定量的载体 DNA, 插入基因的用量取决于载体和插入基因片段分子大小的比率。如果插入基因/载体比率在 1-1/5 之间, 可用载体: 插入基因=1:2 的混合比率加入基因 DNA。如果插入基因/载体大小比率小于 1/5, 则需加入更多的插入基因——1:3 甚至 1:5 的比率。

假设载体和插入基因分别是 5 kb 和 2 kb 则反应物量和其它成分可按以下方法混合:

线形载体 DNA (5 kb)	x μ l (100 ng)
插入基因 DNA (2 kb)	y μ l (80 ng)
10 x QR 缓冲液	2 μ l
QR 酶	1 μ l
水	<u>20-x-y-2-1 μl</u>
	20 μ l

如果载体 DNA 由未经酶切降解的质粒模板扩增而来, 反应中还应加入 1 μ l 的 Dpn I 限制性内切酶以去除环状模板 DNA 分子。反应在 37°C 中进行 1 小时, 随后在 80°C 的加热块中加热 10 分钟以使酶失活并使 QR 酶处理产生的单链末端伸展开来。反应产物随后连同加热

块一起置于室温慢慢冷却以便单链末端的退火粘连。降到室温的样品可以置于冰上稍后做转化或置于-20°C 保存备用。

QR 诱变步骤

1. 引物设计

图 2 示如何设计诱变引物。图中间的双链 DNA 部分是一个蛋白的 N 端编码序列，从蛋氨酸起始密码子 ATG 开始依次向后。图中设计的是第 15 个密码子 ATT (异亮氨酸 Ile) 向 GCG (丙氨酸 Ala) 的突变 (红色和下划线所示) 所需的一对引物。

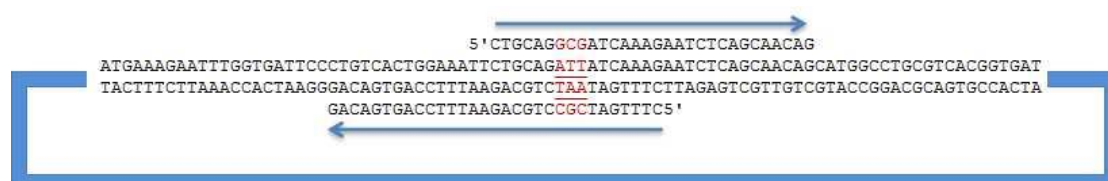


图 2. QR 诱变引物设计。部分蛋白编码序列由双链碱基对所示，其余蛋白序列和载体序列用蓝色实线标示。正向链上 ATT 诱变为 GCG 而反向链上 AAT 变为 CGC (蓝色箭头和长度示引物方向和长度)。最终设计出的引物长度分别为 30 和 31 个核苷酸，比 QuickChange™ 方法要求的引物长度短很多。这里重合序列为 16 个核苷酸长，解链温度为 54°C，而整个引物解链温度若除去重合序列的话是 64-67°C。二引物重合序列和引物同模板一致的序列之间的解链温度差异将会确保引物同模板 DNA 配对而非引物之间配对。

诱变引物设计规则如下：二引物重合序列(如图二中序列：请在这里写出图二中所指序列)必须具有高于 42°C 的解链温度，而除去重合序列外的基因特异性的序列(如图二中序列：请在这里写出图二中所指序列) 必须比重合序列高 10°C 左右。这种设计确保了引物同模板 DNA 之间的配对而非引物之间互相配对。诱变区域可以在二引物重合部分也可以单独分布于二引物上，具体取决于引物所能涉及的诱变范围大小(基于成本考虑引物的长度应设计在 60 个核苷酸内)。但是无论引物长短如何，二引物之间的重合序列长度不可太短，以保证 QR 反应和退火粘连顺利完成。

以该方案设计的引物较 QuickChange™ 方法要求的引物短很多，可大幅降低成本。

2 . PCR 扩增及纯化

DNA 扩增需在高保真 DNA 聚合酶参与的 PCR 反应中进行，以减少可能引入的错误碱基。扩增出的线形质粒构件将带有端部突变序列及重合序列。该 PCR 产物必须经由琼脂糖凝胶电泳检测，并通过 PCR 或凝胶分离法加以纯化。测量纯化的 PCR 产物浓度，再将其加入 QR 反应中（参见下面 3 中介绍）。经 QR 反应处理后，该线形质粒将携带长粘性单链末端以利于环化。

3 . QR 反应

反应依下法建立：

PCR 产物	x μ l (100-200 ng)
10 x QR 缓冲液	2 μ l
Dpn I 限制酶	1 μ l
QR 酶	1 μ l
水	20-x-2-1-1 μ l
	20 μ l

反应于 37°C 中进行 1 小时，随后在加热块中进行 80°C 加热（10 分钟）以使酶失活并使 QR 酶处理产生的单链末端伸展开来。反应产物随后连同加热块一起置于室温慢慢冷却。冷却后的样品可以置于冰上稍后做转化，或置于 -20°C 保存备用。

转化和正确克隆/突变体鉴定

QR 反应后的样品适用于电转化或化学法转化感受态大肠杆菌。如果采用电转，。由于只有 1-2 μ l PCR 产物可参与电转化，选用的细胞的感受态性能需达到至少 1×10^7 cfu/ μ g pUC19 质粒 DNA 。在热激化转时由于全部 20 μ l PCR 产物可用来做转化，因此细胞的感受态性能

即使低至 1×10^6 也可满足需要，转化后一般能得到 50-100 个菌落。用户自制的感受态细胞一般都在该感受态性能范围之内。但建议尽可能采用高感受态性能的细胞。

转化过程按照正常操作步骤进行，可将全部转化混合物涂于选择平板培养基上。对于克隆实验来说，平板上的菌落可以用载体特异性引物先做菌落 PCR 以确保插入基因片段大小符合预期，在进行测序分析。

点突变实验无需做菌落 PCR。可直接选取 2-3 个菌落作测序分析以确定是否含有突变体。

大量实验显示采用该试剂盒所得到的突变体正确率为 $\geq 1/2$ 菌落。**预期效果**

如果用户制备的 DNA 是高质量的并严格按操作规程做，该试剂盒可靠性非常高。就简单的二片段克隆（载体骨架+单个插入基因）为例，常规实验室制备的感受态细胞（一般在 1×10^6 - 10^7 cfu/ μ g pUC19 质粒 DNA 范围内）可以给出足够的菌落（50-100 菌落/反应）。多片段克隆则需要更高感受态性能的细胞以确保得到足够菌落进行下游分析。对于点突变来说 1×10^6 感受态细胞就足够了。