



线性化载体插入片段的制备和引物设计指导

目录

1. 线性化载体制备.....	1
2. 插入片段获得.....	1
3. pUC57载体序列.....	2
4. pUC57载体图.....	3

线性化载体制备

- A. 选择合适的克隆位点,对载体进行线性化。推荐尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆。当载体克隆位点上下游 25 -40 bp 区域内 GC 含量均在 40% - 60% 之间时, 重组效率将达到最大。
- B. 载体线性化方式: 可以选择限制性内切酶酶切消化或反向 PCR 扩增。
- a. 酶切制备线性化载体时,推荐使用双酶切方法使载体线性化完全,降低转化背景(假阳性克隆);若使用单酶切线性化,请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留,降低转化背景。
- b. 反向 PCR 扩增制备线性化载体时,推荐使用高保真聚合酶。

插入片段获得

A. 引物设计

设计原则是通过在引物 5'端引入同源序列,使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列(25-40 bp,不包括酶切位点)。

克隆正向引物(5'-3'): 线性载体正向 25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+ 插入片段正向特异引物序列(18-25 nt)。

克隆反向引物(5'-3'): 线性载体反向 25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+ 插入片段反向特异引物序列(18-25 nt)。

注意: 重叠区的碱基数至少 25 bp,并且多段重叠区域之间的 Tm 值尽量保持一致,且 > 60°C (AT pair = 2°C and GC pair = 4°C),否则可延长碱基数目直到符合要求。

按照线性载体末端的结构(5'突出,3'突出,平末端),引物设计也分 3 种情况:

a. 载体酶切形成 5'突出末端

从 3'端开始计算,往回算 25-40 bp(本举例采用了 BamHI, pUC57 载体和 25 bp 末端重叠相同序列),加到目的片段特异引物序列前面即可,以上引物设计完成克隆连接后,酶切位点将会消失(不保留酶切位点),如果需要保留酶切位点,需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐 5'突出末端的序列,完成克隆连接后,酶切位点依然存在(保留酶切位点)。

5'..NNNNN GAATTCGAGCTCGGT **ACCTCGCGAATGCATCTAGATATCG** 3'目标序列(不保留酶切位点)

注: NNNNN: 基因特异性扩增序列

G: 酶切位点 3'残留碱基

ACCTCGCGAATGCATCTAGATATCG: 25 bp 同源臂

GAATTCGAGCTCGGT **ACCTCGCGAATGCATCTAGATATCG**: 40 bp 同源臂

5'..NNGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATC**GGATCC**3'目标序列(保留酶切位点)

注: GGATCC: BamHI 酶切位点

b. 载体酶切形成 3'突出末端

从 3'端开始计算,往回算 25-40 bp(本举例采用了 KpnI, pUC57 载体和 25 bp 末端重叠相同序列),加到目的片段特异引物序列前面即可,以上引物设计完成克隆连接后,酶切位点将会消失,如果需要保留酶切位点,需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点的缺失碱基(C),完成克隆连接后,酶切位点依然存在(保留酶切位点)。

5'.....NNGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTC**GGTACC**3'目标序列(不保留酶切位点)

注: GGTACC: 酶切位点 3'残留碱基

5'.....NNGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTC**GGTACC**3'目标序列(保留酶切位点)

注: GGTACC: KpnI 酶切位点



c. 载体酶切形成平末端

从 3'端开始计算, 往回算 25-40 bp (本举例采用了 EcoR V, pUC57 载体, 25 bp 末端重叠相同序列), 加到目的片段特异引物序列前面即可, 以上引物设计完成克隆连接后, 酶切位点将会消失, 如果需要保留酶切位点, 需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点缺失的序列 (ATC), 完成克隆连接后, 酶切位点依然存在 (保留酶切位点)。

5'... NNNCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGAT 3' 目标序列 (不保留酶切位点)

注: **GAT**: 酶切位点 3' 残留碱基

5'... NNCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATC 3' 目标序列 (保留酶切位点)

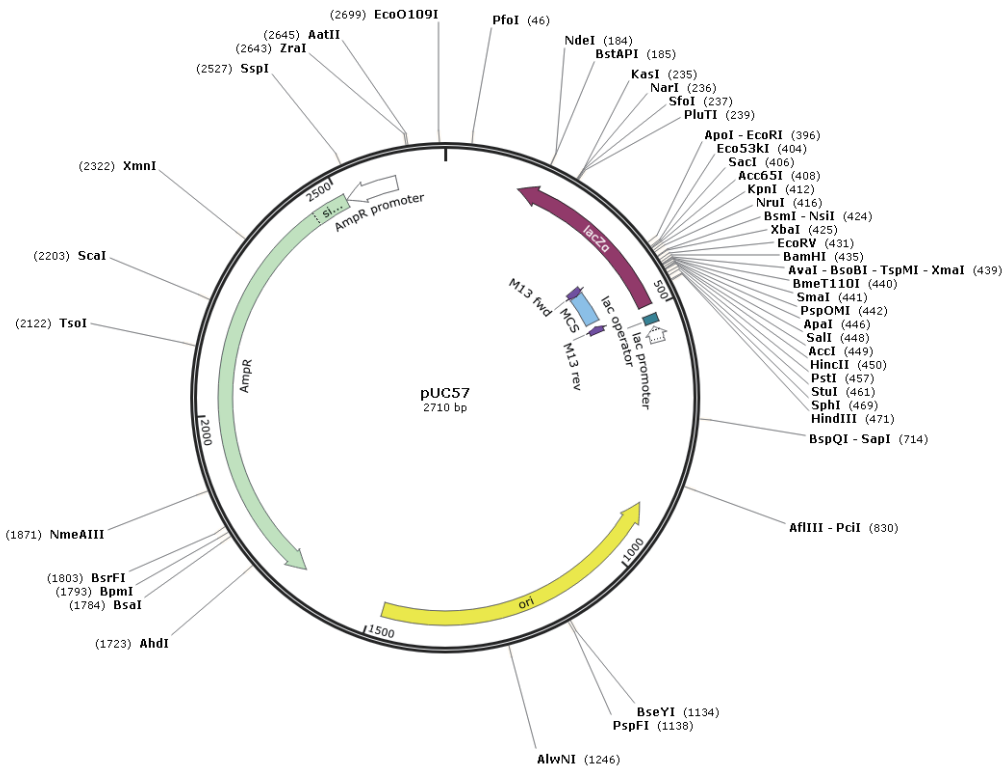
注: **GATATC**: EcoR V 酶切位点

pUC57载体序列

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
AGCAGACAAGCCCCTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAC
TGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGC
GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGT
TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGAT
ATCGGATCCCGGGCCCGTGCAGTGCAGAGGCCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTAT
CCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
CGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGG
TTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGTAATATCGTCTTGAGTCCAACCC
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT
GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACC
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
TAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCA
TTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATC
GTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATG
CTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGG
GATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAGTGTCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGC
TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAA
GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC



pUC57载体图



- B. 多个插入片段的克隆引物设计:** 与载体两端连接的插入片段引物设计方法与之前一样, 其他插入片断保证片段与片段之间有 25-40 bp 的重叠区即可。
- C. 插入片段 PCR 扩增。** 插入片段可用任意 PCR 酶 (Taq 酶或高保真酶) 扩增, 无需考虑产物末端有无 A 尾 (重组过程中将被去除, 在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入, 推荐使用高保真聚合酶。