

Subject:	看了就很容易成功的基于Cai Lab优化的相对标准化并兼容于大规模批量操作的分子克隆指南 (YZJ, ver1.3, 20181001)	
From:	"杨子杰" <kmyyfn@163.com>	Oct 1, 2018 1:52:59 PM
To:	"蔡亮" <cail@fudan.edu.cn>	

看了就很容易成功的基于Cai Lab优化的相对标准化并兼容于大规模批量操作的分子克隆指南 (YZJ, ver1.3, 20181001)

18 March 2018

16:21

前言

- 本指南以Cai Lab分子克隆Protocol为骨架，补充了相关内容
- 本指南是基于各种Cai Lab使用产品的说明书编写
- 开始每一个实验之前都请仔细阅读所用相关产品说明书
- 本指南旨在阐明实验中的一些关键点，平时不容易意到的要点，说明书中写的模棱两可会引发误解的内容，以及YZJ亲身实践以及道听途说来的一些经验
- 本指南列举了所有用到的耗材的公司-货号-货名，以便于大家查询
- 克隆策略：
 - 载体插入单片段——ClonExpress/酶切酶连
 - 载体插入两片段，无痕——ClonExpress/Gibson
 - 载体插入三片段，无痕（比如SynNotch）——ClonExpress/Gibson+OE
 - 重复片段克隆（比如SynPro的构建）——3A Assembly
 - 多个短片段，无痕——Golden Gate Assembly（还没有用过，但从原理上来看是适合的）
- 质粒设计相关请参看Cryopreservation页面

分子克隆使用较多种类的酶，请注意以下几点：

- 每次开启管子前，请短暂离心，确保酶液都在管底。
- 取酶时，由于甘油粘稠，很容易取多，请严格按照产品说明使用。请使用2微升的枪。请注意枪头外侧是否挂了酶滴。
- 反应没有成功，不要尝试加多酶再试；请和有经验的人讨论解决方法。酶促反应十分有效，不会因为你多加了酶，不成功的反应就成功；反而会因为过多的甘油，产生坏的影响

使用相关kit（胶回收，柱回收）请注意

- 建议小抽和胶回收kit使用的时候所有人都用公用的，并且用完一瓶溶液，再开新的（比如小抽里面有两瓶plasmid washing buffer。建议先拿出一瓶，剩下一瓶放在不容易拿到的桌子下面。第一瓶用完了再拿第二瓶，否则常见现象是桌子上的瓶子越来越多.....）。这样好处在于：一、如果一个人单独领了之后，用的很慢，放的时间长了之后就不好了；二、假设某瓶试剂出现问题，如果只是一个人用的话，很难发现问题，如果多人同时使用的话，多个人都会出问题，更容易查出bug在哪（在独立实验时常常考虑的是由于自己的某些操作而导致实验失败，很难想到是试剂问题；但如果多人出bug，就很容易怀疑其实是试剂问题，debug的周期更短）
- 需要添加RNase和乙醇的**一定不要忘了**。加了RNase的试剂用完要即使放4度；加了乙醇用完一定要拧紧盖子，防止挥发

复苏菌株

- 从4度拿出相关抗性的平板，放37°C培养箱预热，在板底先做好标记（复苏多的时候可以将平板分区，亲测5个及以下都是可以操作的）
- 取出-80度冻存的菌株，按顺序置于冷冻冰盒（不要放冰上，多的时候容易拿错。按顺序的原因时为了方便大量复苏时操作的连贯性。即没有必要拿起管子来一个个看到到底是哪个菌，从-80°C拿菌时，就记下摆放的顺序，然后一个接一个的划线即可）
- 用烧红灭菌了的接种环取上层微融的菌液一环，涂于平板上，划线（用三角形划线。三区划线没有必要，到第二区的时候基本已经看不到菌了，实际上浪费空间）；
- 操作迅速，使用完毕后立即放回-80度。反复冻融会导致细菌死亡。一次最多拿出5个菌来复苏）
- 复苏时，建议不要把T-Fast和其他菌株画在一个板上。原因在于，如果复苏的菌液取多，可能导致复苏菌落长得比较密。但由于T-Fast长得快，可能在较早的时候就可以观察到可以挑的克隆，此时非T-Fast菌株却还需要继续培养。这就可能导致，再培养一段时间后，非T-Fast菌株长到了合适大小，但T-Fast的菌落已经很大糊了...
- 37度倒置（避免冷凝水模糊菌落）培养过夜
- 大量复苏时，可以用一个新的平板留样。每种复苏菌，用镊子+S号枪头（白的那种）挑2个单克隆在平板上划线后37度培养长出菌线后，置于4度保存。之前的板子可以扔掉。此举可以方便保存，并节约空间
- 复苏后抽提的两个单克隆抽提质粒后要用酶切来验证
 - 酶切验证选择用酶的思路
 - 尽量选取一个位点在目的片段上，另外一个在载体上

- 如果当初是用无缝克隆连接的，目的片段上很有可能没有对应的酶切位点。这样可以选取两个载体上临近目的片段的位点
- 在多种搭配都可以时，根据下表，选择单位酶价格较便宜的

	目录号	units	目录价	酶单位价格
AgeI-HF	R3552S	300	709	2.36
Apal	R0114S	5000	689	0.14
BamHI-HF	R3136S	10000	469	0.05
BbsI	R0539S	300	679	2.26
Bgl II	R0144S	2000	589	0.29
Dpn I	R0176S	1000	699	0.70
EcoRI-HF	R3101S	10000	469	0.05
EcoRV-HF	R3195S	4000	589	0.15
HindIII-HF	R3104S	10000	469	0.05
Hpa I	R0105S	500	619	1.24
Mfe I-HF	R3589S	500	739	1.48
NcoI-HF	R3193S	1000	619	0.62
NdeI	R0111S	4000	699	0.17
NheI-HF	R3131S	1000	669	0.67
NocI-HF	R3193S	1000	619	0.62
NotI-HF	R3189S	500	719	1.44
PstI-HF	R3140S	10000	639	0.06
PvuII-HF	R3150S	500	709	1.42
Sall-HF	R3138S	2000	619	0.31
SbfI-HF	R3642S	500	739	1.48
SpeI-HF	R3133S	500	669	1.34
XbaI	R0145S	3000	689	0.23
XhoI	R0146S	5000	689	0.14

购买大包装M或L会稍微降低使用成本，如短期内有大量使用的预期请告诉管理员；大包装使用时，需要分装，需要避免交叉污染。

红色字和橙色字的酶，单价高，尽量避免在检验酶切时使用，尤其是红色字的酶。推荐使用黄底的酶进行检验酶切。

所有HF系列的酶的浓度都是20,000 unit/ml = 20 unit/ μ l

非HF系列的酶大多是10,000 unit/ml = 10 unit/ μ l

质粒抽提（小抽）

- 基于Axygen - AP-MN-P - AxyPrep（优先使用）或 Vazyme - DC201 - FastPure Plasmid Mini Kit

- 为保证质粒产量，细菌都需要从单克隆（留样的板子上的菌线，如果是用单克隆划线的，也可以）养起（T-Fast菌株直接从冻存菌复苏，多次尝试，小抽产量均很低）；细菌不要养过（20小时为限，因为届时相关抗生素都已失效）。
- 使用2xYT。对于DH5a，12小时可以小抽；T-Fast，6小时可以小抽（浓度没有10h高，但已经可以满足急用需求），10个小时更好（HJY测试）
- 小抽37度摇菌，摇好后若非立即使用，可置于4度冰箱临时保存，也可离心收集菌体，冻于-20度保存。仅小抽菌液可在四度暂存；纯蛋白菌液需要收集菌体冻存。
- 长玻管只能在试管架摇；短试管只能在弹簧区摇。
- 建议用短试管摇3 ml菌（1.5 ml EP管离心2次可以完全收集菌体）
- 摇菌千万不能摇过，平台期的细菌开始丢失质粒，结果就是菌体不少小抽结果很烂，而且平台期的细菌也会积累较多的突变
- 不同的细菌，生长速度不同，T-Fast > SURE2 > Stellar, XL10 > DH5a, TOP10
- 如果急着实验，等不及小抽，可以直接取单菌落菌落PCR
- 小抽的时候，这样子的事情不要做：abc三个克隆，摇了三个2 ml，都不浓，离心下来菌体很少，就混合到一起小抽吧（错！）；abc三个小抽，DNA拿到都很少，做个酶切都要用上10 μ l，就混到一起用吧（错！）。原因是：如果ab是正确的克隆，c是错误；上面的两种操作都会要你重新做一次实验。更致命的是，如果c的错误没法在酶切鉴定的时候发现：测序验证——还好，会发现测序结果是重叠的错误，如果没测序验证，后面转了细胞，发现奇怪的定位，以为新东西……小抽，确保要挑单克隆（平板不要过长，卫星克隆千万不要），要等菌液彻底长起来（也不要过长，2*YT里面细菌长得比在LB快），2 ml离心下来的菌体足够多（大概有50 μ l干体积），然后才开始
- 小抽后酶切，如果是鉴定插入片段是否成功，建议不要使用克隆用酶，而是选用别的内切酶；尤其是插入片段与去除片段大小差不多的时候
- 收集完菌体，弃掉培养液后，垫一张吸水纸后，将EP管倒置，将其中液体吸干，以便于重悬
- 加入细菌悬浮液（比如s1）后，如果菌体太多，悬浮起来很费力。建议高速涡旋片刻后，使菌块脱离管壁，再用L号（蓝色）枪头，吹吸悬浮（单纯涡旋没有办法使得细菌完全悬浮均匀）
- 细菌裂解液（比如s2）用完要拧紧，否则空气中CO2会和NaOH反应
- 若一次性抽提很多管质粒，可以用10 ml电动移液器，加液，但注意电动移液器很灵敏，放液的时候一定要慢，否则很容易放过
- 若一次性抽提很多管质粒，对于那些需要颠倒混匀的步骤。可以将EP管置于Rack上，用一个大一点的吸水纸/自封袋包住，固定好EP管，然后颠倒整个Rack。这样相当于同时颠倒了很多个EP管，省时省力
- 洗脱前，建议先室温/烘箱，开盖放置5 min确保乙醇被晾干
- 洗脱时，建议使用说明书建议的最大洗脱液体积，并用ddH2O洗脱，洗脱时预热洗脱液，并在指定温度，热洗脱5 min后再离心
- High-quality DNA is characterized as having an OD260/280 ratio between 1.88 and 1.92, an OD260/230 ratio of 2.1–2.2, and a concentration above

引物设计及相关（好的引物设计使得克隆已经成功了八成）

- 基于Snapgene辅助设计
- 引物3' 端最后一个碱基最好为G或者C
- 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算
- 引物的GC含量控制在40%-60%之间
- 引物避免使用GC或者AT含量高的区域
- Tm值调整至55°C-65°C为佳。一般设置为58°C \pm 1度左右即可
 - 一些需要Tm \leq 55°C的情况
 - 用引物延长片段，或者有时候引物上添加的附加序列太多时，为了能够缩减至59b，可以适当调低Tm值，但不建议低于50°C
 - 除特殊情况外很少建议用低Tm（ \leq 55°C）的引物，很容易使得扩增的特异性差
 - 一些需要Tm \geq 65°C的情况
 - 环P质粒时，推荐使用高Tm（甚至提高到72°C均可），以提高成功率
 - 高Tm的引物，对PCR影响不大，只要在设置程序时设置相应的Tm值即可。但不建议设计 \geq 72°C的引物，很容易发生非特异性结合
 - 测序引物请设计Tm = 58/59°C
- 正向引物和反向引物的Tm值相差不超过5°C为佳
- 确保引物在质粒上仅有1种结合可能（如果有两种及以上结合可能，Snapgene会提示）
 - 特殊情况：如果要P的片段中含有重复序列，但又必须获取该片段，可以强制增长引物的5'和3'端，增加其退火温度，使其目的结合的位点的退火温度高于其他非目的结合位点20°C以上，并在PCR时设置退火环节温度为高Tm+0/5度
- 引物3' 端最后8个碱基应避免出现连续错配（极少极少出现连续错配的需求）
- 常规引物设计不要超过59b（ \leq 59b，0.5元/b；大于59b，1.2元/b）
- 大多数限制性内切酶的识别位点上游需要6个保护碱基。如果引物能够添加6个保护碱基的，建议都用6个，不能的见下
 - 下面是pML2Y系列的参考

	1bp	2bp	3bp	4bp	5bp
--	-----	-----	-----	-----	-----

AgeI-HF	++	+++	+++	+++	+++
Bam-HF	+	+	+++	+++	+++
BbsI-HF	+++	+++	+++	+++	+++
EcoRI-HF	+	+	++	+++	+++
HindIII-HF	-	+	+++	+++	+++
MfeI-HF	+	++	+++	+++	+++
NotI-HF	++	++	++	++	++
Sall-HF	-	++	+++	+++	+++
SbfI-HF	++	+++	+++	+++	+++

-	0%
+	0-20%
++	20-50%
+++	50-100%

- 更多信息，参考

<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>

- 添加的酶切位点一般用6识别的。防止不熟练造成移码
 - 注：
 - EcoRI-HF和MfeI-HF的粘性末端一致
 - Sall-HF和HindIII-HF的粘性末端刚好完全相反
- 没有考虑到真核生物的Kozak序列
- 融合蛋白记得去掉前面蛋白的终止密码子
- 融合蛋白要看插入的酶切位点是否造成后续蛋白ORF的错位，如果ORF错位在设计引物的时候要添加相应的碱基来恢复ORF；添加碱基要考虑的因素较多，一般会添加翻译出来比较小的氨基酸比如Gly
- 有重复序列不容易扩增，而目标两侧有明显的酶切位点，所以不用PCR而是直接酶切获取insert
- 下面一些是设计时可以不容易注意，也很难注意到的点。这些可能会对PCR有影响，但碰到的机会很少，所以不用太在意。但如果PCR扩增跑胶后出现以下问题，需要检查
 - 和引物设计可能有关的问题
 - Smear（拖带）
 - 除了目的条带外，还有另外一条明显条带，且相较于目的条带更亮
 - 若目的条带>500bp，PCR后目的条带很浅，在100bp左右即以下的区域出现很明显的亮带
 - 可能源自于引物设计的原因
 - 引物特异性不好
 - 引物同二聚化/引物异二聚化
 - 需检查
 - 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀（引物设计时基本不用考虑此点。更多情况是在做密码子优化的时候需要考虑）
 - 引物3'端应避免出现发夹结构/正反引物避免出现引物二聚体（设计时极难检查出来，可以不用考虑。出现上面问题后用IDT OligoAnalyzer检查）
- ≤59, 0.5 ¥/b, 每天17:00前下单（生工）（如果需要别人检查的，最好下午一点半以前发送给检查者，确保具有时间来仔细看），第二天15:00左右可以送到
- 建议在15:00-17:00这个时间段内不要设计引物，因为在这个时间段设计引物就很希望着急把设计好的东西订出去。设计好的引物建议放上一会再下单（比如前一天晚上设计的，可以第二天早上再下单；早上设计的，可以放到下午再下单。但是不要忘了.....），因为或许你过一会就又想起来设计不合理的地方，这样还有时间改正。如果设计好了引物，但没有来得及订出去，那么下一天定就好了，不缺一天的时间
- 相似的片段在设计时使用相似的引物可以减少加样时的次数，并降低实验成本。下面是一些案例
 - EGFP/mCherry：N'/C'端相似
 - SynZF系列骨架相同，应该设计相似的引物

PCR

- 基于Vazyme - #P505 - Phanta® Max Super -Fidelity DNA Polymerase
- 普通PCR
 - 一般使用25 µl体系，胶孔用10孔梳的厚的那一面

ddH2O	To 25 µl
2* buffer	12.5 µl

dNTP	0.5 μ l
Phanta	0.5 μ l
template	Plasmid: 0.5 μ l PCR product: 1 μ l IDT: 1 μ l
PF/PR	1+1 μ l

o 操作Tip

- 如果一共有4个反应，请按照细节，把共用的成分先配成master mix，使用4.5x来计算（因为会有吸取的误差）
- 使用master mix可以避免漏加成分，可以减少污染common reagents的可能。Mix配好后要用吹匀，并短暂离心，确保液体体积正确
- 生物学实验要认真操作，但是少量的偏差不会对结果产生巨大影响。PCR的体系最后在25 μ l左右即可，所以在配置mix的时候，你完全可以假定所有的模板量都添加0.5/1 μ l来方便计算，之后再根据不同的模板类型来添加即可
- 如果没有现成的质粒作为模板，直接配好PCR体系后用小枪头挑一点冻存菌作为模板。（注意，冻存菌的所有操作都必须要用冰盒。反复冻融将导致菌死亡）

o 程序

复性温度	一般设置为Snapgene拖取序列时显示的Tm即可
延伸时间	1 kb / 40 s (Phanta极限延伸速度为1 kb / 30 s，但为了以防万一，增加10 s，40 cycles也仅增加400 s \approx 7 min)
循环数	40 cycles

- 注意
 - 为延长PCR仪的寿命，最后反应结束，请把hold温度设在16度

o 跑胶后问题和解决

- Phanta很好用，一般不会出现很大问题

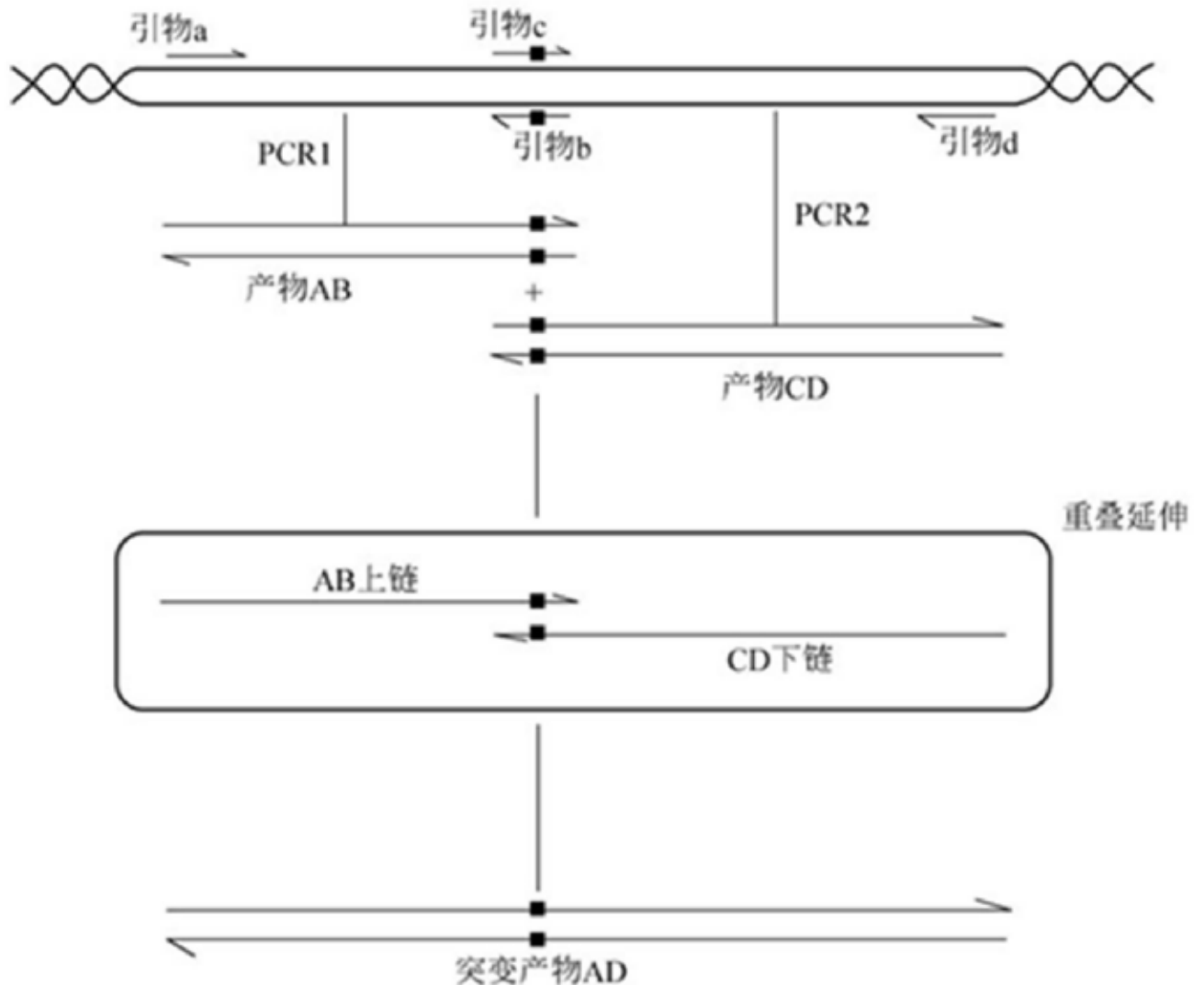
问题	解决
有目的条带，同时有杂带/引物二聚体，目的条带较亮，感觉是主要产物	目的条带切胶回收
有目的条带，同时有杂带/引物二聚体，目的条带较杂带暗，感觉不是主要产物	目的条带切胶回收 若回收后，浓度尚可，且有A260峰，可以继续使用 若回收后，浓度很低，且无A260峰，建议重新PCR，建立退火温度-3/+3/+6 P3管后，跑胶切下目的条带，放1管回收
只有杂带/引物二聚体	重新设计引物
什么都没有	极有可能是漏加了某样东西 加样的时候习惯加到管壁上，但加完后未离心→加完样后应该瞬时离心确保所有液体集中在管底 如果是先配置除了模板和引物的预混液，后加引物和模板。跑胶时同一批次的其他泳道P出来了，某几个没有，可能原因 <ul style="list-style-type: none"> • 这几个管子里的模板/引物漏加 • 模板不对 <ul style="list-style-type: none"> o 拿错了 o 如果是从质粒P的话，有可能质粒不对→使用可靠来源的质粒 • 引物用错→检查引物 • 引物放4°C存放时间过长，导致降解→重新从100 μM的Stock稀释

o 其他问题

模板中GC含量高	PCR时可加入适量的DMSO（没有亲自测试过，高GC的phanta也能够轻松扩增）
----------	---

- 多轮PCR延伸原片段5'/3'端
 - o 基本同正常PCR设置一样
 - o 区别在于
 - 初期的延长片段的PCR反应用10 μ l体系
 - 除最后一次延长反应，PCR设置9 cycles即可

- 每延长一次，取出0.5 μl作为下一轮反应的模板
- 当最后一次延长时，采用正常25 μl体系，40 cycles
- 质粒环P
 - 该部分内容详见“专题-单点、多点突变”
 - 由于环P容易积累突变，若要制备线性化载体，非迫不得已的情况，尽量不要环P质粒
- Overlap extension PCR (OE PCR)
 - 原理（具体请自行搜索）



- Overlap&引物的设计要点
 - 引物的GC含量控制在40%-60%之间
 - 无二级结构（用IDT Oligo Analyzer检查）
 - 退火温度在60°C以上
 - 引物A/B建议考虑兼容Gibson Assembly
- 步骤
 - 第一轮PCR：利用引物a和引物b，按照一般PCR体系，反应得到目的片段的5端片段，即产物AB；利用引物c和引物d，得到目的片段的3端片段，即产物CD；两个PCR可以同时进行。扩增时，如果可以用质粒作为模板，就不要用cDNA作为模板。
 - 将得到的产物AB、CD，通过跑胶的方式，分离纯化得到所需要的片段；这是为了防止原有模板干扰后续反应，或者因为引物的特异性不强而生成过多的干扰产物。
 - 测量纯化DNA的浓度，
 - 第二轮PCR环节1
 - 以AB:CD摩尔比=1:1作为连接模板，模板量建议50 μl体系，各加入0.08 pmol（即对于1000bp的片段，需要添加50ng。可以用Excel calculator for molecular biology by YZ辅助计算）
 - 配好后分装到4个PCR管里
 - 不加入引物a和d，进行一轮PCR
 - 12 cycles

- 复性温度：四管各设置为60/64/68/72°C，且-0.5°C/cycle（这样12个循环后，每管都降了6摄氏度，涵盖更多温度跨度，大大提高成功率）
- 第二轮PCR环节2
 - 加入引物引物A/B（先预混好，再加入到管壁上，注意加完后要离心）
 - 正常PCR 40 cycles
- 后记
 - 虽然CL, PYJ, HT都推荐OE为一种十分便捷且成功率高的方法，但本人亲测过一些后并不是特别推荐（建议使用ClonExpress或Gibson Assembly代替）
 - 原因
 - 有些片段（特别时那种同源序列很多的片段。比如一个scFv，VH和VL之间的序列就很相似）很难连上/换了多种条件试了最终还是无法连上。对于这种片段，很有可能是其本身的原因造成，但很容易被误以为是出于自己的实验操作失误，而对实验失去信心
 - 如果同时做1批质粒，其中的几个很容易连上，有几个很难连上，那么这样的结果是，为了这一批质粒中的某几个debug浪费很多时间，精力
 - 虽然不推荐，但OE还是一种广为使用，并且相对便捷的方法。其引物可以和Gibson通用，而Gibson对于3片段（一个载体+两个片段）以上的连接，效率会骤降。如果遇到需要在一个载体中插入3个片段-A/B/C的情况（比如SynNotch），可以尝试先用OE把AB或BC中的某个容易的连接起来，再转换为三片段Gibson，可以大大提高成功率
 - ClonExpress产品报道最多可以一次在一个载体里面插入5个片段（还未测试，可能是一个替代方案）
 - 一些信息
 - PYJ做过的所有OE基本都一次成功了，并且尝试过三片段OE也成功（如果要获取更多OE的秘诀，可以问问PYJ）

DNA的胶纯化和过柱纯化

- 基于Axygen - AP-GX - AxyPrep DNA Gel Extraction Kit（优先使用）/Vazyme - DC301 - FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit
- 一些实验技巧详见说明书修订
- 跑完胶后要紫外拍照记录
- 条带大小判断
 - 选择合适的DNA Marker
 - 根据DNA Marker判断条带大小区间
 - 不同DNA大小的条带的分布距离并不不同DNA大小呈正比例关系，遇到难以判断的建议询问有经验人
- 切胶：第一次切胶，请让有经验人示范

酶切

- 基于NEB内切酶系列
- 酶切PCR产物
 - 推荐25 μl体系
 - 对于片段较长，酶切模板量大的反应体系，建议酶切完采用PCR回收（电话咨询NEB技术支持确认）
 - 批量操作时，由于操作误差被放大，建议酶切完后用PCR回收（个人曾试过用热失活做10个无一成功，故不推荐。但热失活方法受到HT推荐）（但特殊情况除外，比如小片段3A时，强烈推荐热失活）
 - 对于那些能直接从现成质粒上p下来的片段，回收时用25 μl洗脱后，测完浓度可以直接加入每种酶0.5 μl以及2.5 μl 10x 缓冲液，无须更换管子，全部切完（原因在于，留样的目的在于防止切错，但这样的情况，如果做好实验计划，则很少发生。全部切完可以获得更高浓度的回收样品。如果你担心，样品量太多导致切割不完全，那么无须担忧，因为没有被切下来的不会连到载体上，实际上没有太大影响）。加完后要离心，确保所有液体位于管底
 - 对于那些经过了一些操作之后，才能获得（比如PCR延长反应），而不能直接从现成质粒上p下来的片段，不能全部切，取出一些留样，失败后可以再次作为PCR样品扩增。否则重来
- 酶切线性化载体（好的线性化载体制备使得克隆已经成功了三成）
 - 和PCR回收产物酶切相比，载体**必须**被酶切完全，否则造成以下危害
 - 被切开的质粒少，连接时的有效浓度低，干扰正确片段插入
 - 假阳性（转化后长出许多克隆），以为克隆成功，挑了很多个菌菌P。浪费很多无意义时间和精力（配PCR，挑菌，做胶，PCR，点样，跑胶.....）
 - HF系列不同的内切酶存活时间有差异，下面是参考（p2Y内切酶体系）

AgeI-HF	++
BamHI-HF	+
BbsI-HF	-
EcoRI-HF	+++
HindIII-HF	+++

MfeI-HF	++
NotI-HF	+++
Sall-HF	+++
SbfI-HF	+++

o

+++	16 h 酶切 1 μg DNA 需要 1/8 单位酶量
++	16 h 酶切 1 μg DNA 需要 1/4 单位酶量
+	16 h 酶切 1 μg DNA 需要 1/2 单位酶量
-	不建议反应时间 > 1h

o 故建议以下载体酶切反应体系。连接时的载体浓度是连接的关键影响因素，酶切结束后跑胶用**商用试剂盒**回收，以保证回收效率

- 过夜（“过夜”指时间在8 h +）酶切

Endonuclease 1	20 units
Endonuclease 2	20 units
DNA	3 μg
10x buffer	5 μl
ddH2O	To 50 μl

- 注

- 2 μg 酶切后用商用试剂盒回收，20 μl 洗脱的浓度已足够满足一般的克隆需求，并能够保证酶切完全
- 如果想要获得更大浓度，且时间不紧急，除了 BbsI-HF 和 BamHI-HF 外，可以加入 4 μg DNA 酶切 16 h
- 若用到的载体上同时有 EcoRI 和 MfeI 位点的时候。建议用 MfeI-HF 切的时候，时间不要过长。这两个酶的识别位点非常像（EcoRI：GAATTC；MfeI：CAATTG），尝试 24h 酶切的时候似乎观察到了星号活性
- BbsI-HF, BamHI-HF 1 μg DNA 请使用 1 μl 内切酶
- 如果时间紧急，可以如下酶切 1 h 以上。回收时可以采用更少的 ddH2O 洗脱，并洗脱两次

Endonuclease 1	20 units
Endonuclease 2	20 units
DNA	1.5 μg
10x buffer	5 μl
ddH2O	To 50 μl

- 你也可以参考前面的酶单价表。对于那些单价较为便宜的内切酶，也可以适当加大酶用量，并扩大 DNA 量

- 线性化载体 Stock 的制备

o 对于预估未来可能会多次反复使用的载体，建议制备线性化载体 Stock

o 质量控制

- 3 μg DNA，酶 20 units + 20 units（不能增大 DNA：酶用量比，多了很有可能切不干净），50 μl 体系过夜酶切——保证完全切开
- 必须 80V，跑胶 40min+——即使可能还残存极少量超螺旋质粒，通过胶回收保证线性化载体纯净
- 商用试剂盒回收，30 μl 洗脱——保证浓度
- 一次可以切 2 管，分装 10 μl/管，冻 -20
- 一个批次的载体要取 1 μl 做转化，确认载体酶切干净

o 用的时候拿出一管，用不完放自己盒子里，不要放回公共区域

o 具体信息请参考 [Reagent](#)，该页面中列出了是 iGEM 目前可能会多次使用的载体

- 操作关键

o 混匀：用移液枪轻吹吸或轻弹管壁→**瞬时离心**

连接

- 基于 Novoprotein - M001 - T4 DNA 连接酶

- 单片段连接（近岸蛋白技术支持建议用 quick ligation，但我自己用的少，更推荐普通连接 rt. 1h）

o Normal ligation

10x buffer	0.5 μl
T4 ligase	0.5 μl
Vector	X μl
Fragment	4 - X μl

o Tips

- 对于用慢速连接的，若是晚上转化，可以取出5 μ l中的2 μ l转化，剩下的放16°C。第二天如果发现板上长出的单克隆少于8个。可以将剩余的再次转化
- 采用说明书上的V:F比可以提高成功率。但如果时间**特别**紧时，可以没有必要按照V:F = 1:3精确加样，取V/F = 1/3 μ l OR 2/2 μ l是一种方便的方法（可以参考Excel calculator for molecular biology by YZJ辅助计算）

• 附：Quick ligation

2x Quick ligation buffer	2.5 μ l
T4 ligase	0.5 μ l
Vector	X μ l
Fragment	2 - X μ l

Rt. 15 min（参考NEB T4相关，并电话咨询近岸蛋白技术支持确认）

• Tips

- 由于quick ligation buffer中含有PEG会干扰转化。不要延长反应时间超过30 min（15 min已经可以），这样反倒会降低反应效率
- 连接后若不及时转化，请及时冻存至-20度，以防止PEG变性
- 在配好连接体系后短暂离心后放室温后，可以去打冰，同时将平板放在37度培养箱预热，以节约时间
- 如果酶切是热失活的，或一个载体插入两个片段，**不要用快速连接**，用慢速室温1h+

• 推荐体系

- 0.02 pmol linearized vector for 5 μ l system

Gibson

- 基于实验室自配
- 详细内容待补充

ClonExpress

- 基于Vazyme - C115 - ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit
- 为2*Master Mix，分装了1 μ l/tube和2 μ l/tube两种
- 具体操作参考YZJ修订的protocol
- 操作流程：把载体，待插入片段按说明书的配比，在一个PCR管中配好一到冰箱里把分装的stock拿出来（速度要快，防止stock失活）→取1/2.5 μ l的混合液加入→50°C 30min
- 单片段插入用1 μ l分装stock，多片段插入用2 μ l分装stock
- 操作关键
 - 冰上操作
 - 使用高质量的片段
 - 按推荐比精确计算，精确加样，先预混样品，再加样
- 成功率极高

转化

- 基于天根 - CB109 - T-Fast
- 1管商用感受态有100 μ l，根据每次转化的量，酌情分装即可。亲测，对于一次转化，20 μ l已经足够。如果当天转化的数量 \leq 5管，取出1管商用感受态分装即可。
- 对于Amp，快速转化流程完全满足需求（常规转化没有必要）
- CM，Kana，Tet抗性的需要用常规高效转化法
- f
- SOC加150 μ l即可，涂板时用200 μ l微升的枪调到最大量程，把所有转化的液体全部涂板（不要用950 μ l，既浪费SOC，又没有意义）
- 记得做标记，包括：质粒名字，菌株，转化人，转化日期，转化时间
- 使用2*YT配置的抗性平板。T-Fast：8-9个小时后可以挑菌（即使是前一天晚上23:00转化，第二天早上8:00钟到就已经可以挑了）；DH5 α ：12个小时后可以挑菌
- 提高效率关键
 - 预热平板（把平板分开来平放，不要擦起来放，这样夹在中间的板子还是冰的）
 - 冰上融化感受态，感受态刚融化的时候效率最高，不要在冰上放太长时间
 - 热激后快速将管子转移至冰上（如果没人使用，金属浴比水浴更好操作）

- 操作Tip
 - 对于同时转化多个质粒，需要涂板多个质粒时，以两个质粒为单位采取如下流程：把两个涂布棒过酒精灯灭菌后悬空放好→给两个平板做好标记→吸取菌液转移到平板上（这两个步骤操作的时间冷却了涂布棒）→涂布（涂布完后，涂布棒要浸入到酒精里再拿出来进行后面的操作）→涂布棒灭菌→.....

筛选

- 对于大多数情况，建议采用Colony PCR（使用Taq而不是Phanta酶）
- 菌P要使用测序引物
- 测序引物
 - 测序引物是在插入位点前/后~70bp（即是在骨架上）设计的 TM 值统一为58度（Taq 酶用55度）的引物。目的在于：一、统一退火温度使得在菌p的时候一个 PCR 仪可以放入尽可能多的 PCR 管，并保证每管 PCR 的退火温度都满足要求；二、防止假阳性；三、送测序的时候，防止前~50bp 测不准。
- 不建议用酶切验证。原因是，比如你一次性做了10个质粒，那么你得抽80管质粒出来.....over.....
- Colony PCR基于Vazyme - P101 - Taq DNA Polymerase
- 菌P的限制
 - 当插入片段的长度和骨架双酶切后切下的目的片段的长度相近时，菌P很容易发生假阳性
 - 案例：比如要构建p2Y-C-mCherry。我现在有两个骨架可以选择p2Y-C和p2Y-C-EGFP。那么应该优先选择p2Y-C。原因：要插入的片段时mCherry，其和EGFP的长度很相近，如果用p2Y-C-EGFP作为骨架，进行双酶切，那么如果切开的不够彻底，那么很有可能菌P的时候出现很多p2Y-C-EGFP的假阳性（因为菌P是依赖于看P出来的条带的大小判断是否插入）
 - **所以构建载体的时候要注意选择合适的质粒进行线性化。做实验的时候要做到全心一心，即你清楚的知道每个步骤的前面和后面应该是什么，这样才能debug。不然错在哪都不知道**

菌体系

ddH2O	7.8 μl
10* buffer	1 μl
dNTP	0.2 μl
Taq	0.2 μl
PF/PR	0.4 + 0.4 μl
Template	1 colony

程序

- 复性：Taq酶需要设置为Tm-3°C
- 延伸：1kb/60s
- 循环数：25 cycles即可
- 挑菌的数量参考
 - 一般挑8个
 - 急用的关键质粒，为了保证能够成功，可以挑16个菌提高成功的可能性
- 挑的菌落要划线留样（第一次实验请找有经验人示范。先标记后划线），以防止挑菌顺序错误带来的不必要麻烦。流程：轻挑一个单克隆→在留样平板对应位置轻轻划以下→在配好的PCR溶液中蘸一蘸
- 菌P挑菌留样的板子要注明以下信息：**质粒全名**（防止以后忘了）+质粒缩写（送测序的时候的短命，要在onenote对应位置注明，以便测序正确后方便找到）+谁做的+日期（比如如果有同样一个质粒做了两次，标明日期可以方便确认是第几个批次的，防止拿错）+菌株
- 要进行短期保存或准备长时间放在室温（艺术行为）的板子，**一定要用parafilm包起来，防止污染**
- 如果一个板上同时保藏了几个质粒，如果测序后发现，既有对的，又有错的。对的记得要标记好（比如圈圈，打勾之类），错的一定要打一个**大大的×**（防止之后再拿的时候误认为是对的）后再用parafilm包好放到冰箱短期保存。
- 所有正确的条带大小对应的菌的编号都要被记录。这是由于：假设你有一次菌P了八个菌，又1、2、5、6条带大小都是对的。你送了2、5，但发现他们都有微小突变（比如少了/多了/错了一个碱基）。那么这个时候，你就可以合理的把剩下的1/6再送一个，那么就很有可能是对的（原因在于，2/5仅有微小突变说明你连上了，很有可能是运气不好，送了两个错了一点点的质粒过去）
- 操作Tips
 - 先配mix再挑菌
 - 使用8连排PCR管
- 菌P跑胶可以用白色胶槽制备，用25孔梳子插4排（每排第一个孔加Marker，后面还可以跑3x8个样，所以理论上通过这样一块大胶可以鉴定12个质粒）。点样时8 μl即可。点样时一定要专心，防止串道（比如如果你不慎将一个样品加到了下一个孔里，那么这一排实际跑的样品的编号就不对了，这一排就全无效了）

测序

- 菌落PCR后选取2个条带正确的送测序（有的时候条带大小可能会大小一点，这个需要经验判断。但是条带大小一看就不对的就不要强行测序了，肯定是错的，浪费）
- 做点突变的由于无法菌P，直接在转化的板子上挑3个菌送测序
- 测序的时候正确的质粒一定要求公司返还质粒，防止冻存菌失效的情况下还有可能补救。
- 返样的时候让测序公司返还那些正确的质粒就可以了，虽然写邮件时要多一些工作，但在收到质粒后，就不需要再花很多时间来分辨到底哪几个编号时正确的了，提高效率
- 储存返还质粒的时候要标注好质粒的**完整名字**（不要C1，A2这样别人看不懂的。同时有些质粒名字可能比较长，因此统一写在侧壁上）+**iGEM质粒编号**（写在盖子上，好找）。**测序正确的质粒要及时冻存！十分重要！**
- 一个测序反应一般可以测1000 bp，但只有800 bp前是可信的
- 大于1000 bp的测序，一般选用初测+补测的策略。即，先选择一个合适的测序引物，测序是否成功插入且无突变后，再选择初测正确的进行补测，这样可以节约成本（特别在批量构建质粒的时候）。但对于急需的质粒，建议一起测（即初测的时候就要求多个反应）。对于那些需要补测的质粒，初测送样时，就把补测所需要的引物同时一起送，这样在初测正确后，可以直接要求公司进行补测（省去送样员回来再取补测引物，省1天时间）
- 对于融合蛋白
 - 如果采用环P的方法制备载体，要测通整个ORF。原因是环P的时候即使使用高保真酶，也很容易积累突变，一个ORF上面的任何一个氨基酸突变/插入/缺失
 - 如：要在一个带有A和B片段的载体（Vector-A-B）后面插入C获得Vector-A-B-C。菌P验证正确后的测序策略应该是，先从C的C端测，如果C测序成功，再补测AB。
 - 如果采用酶切的方法制备载体，可以仅考虑更改的片段
 - 如：要在一个带有A和B片段的载体（Vector-A-B）后面插入C获得Vector-A-B-C。菌P验证正确后的测序策略应该是，先从C的C端测，如果C测序成功，可以认为该质粒正确，而无需再补测AB
- 所有质粒都需要测序正确了之后再上细胞实验。即使初测正确也不要尝试边送测序，边上细胞，这样假如测序后发现补测错了，细胞实验的结果无效，浪费精力
- 测序文件也是重要的实验data，请务必储存好，以防用到（方便方法是，比对测序结果时使用Snappene Align功能，可以直接将测序文件插入到Snappene的质粒文件中，需要的时候调出来即可）

附：常用分子克隆方法的特点/费用成本/时间成本分析

- 这里主要对比单片段连接
- 按照实验室实际购入价计算，取0.5精度

	ClonExpress	酶切酶连
操作流程和分步成本（以1个质粒为例）【费用】{时间}	假设线性化载体预先制备【L】 Day 0 引物订购（添加酶切位点外，需添加15bp同源臂）【O+15】 Day 1 ↓ PCR【P】{~2h，包括加样、PCR} ↓ 胶回收【G】{~1h，包括加loading buffer、上样、跑胶、切胶、回收} ↓ 2μl体系重组反应【R】{30min} ↓ 快速转化，涂板【T】{10min} Day 2 ↓ 菌落PCR筛选【C】{3h} ↓ 测序【S】{2day}	假设线性化载体预先制备【L】 Day 0 引物订购（添加酶切位点外，需添加6bp保护碱基）【O+6】 Day 1 ↓ PCR【P】{~2h} ↓ 胶回收【G】{~1h} ↓ PCR酶切【D】{30min} ↓ PCR回收【E】{~30min} ↓ 连接【L】{1h+###} Day 1/2### ↓ 快速转化，涂板【T】{10min} Day 2/3### ↓ 菌落PCR筛选【C】{3h} ↓ 测序【S】{2day}
假设1次成功总费用	L+O+15+P+G+R+T+C+S L, O: variable P (Phanta, 0.5 μl): 1.5 G: 1.5 R (ClonExpress 1 μl): 4.5 T (T-fast, 20 μl): 3 C (Taq, pick 8 clones, 8*0.2 μl): 1 S (2 clones): 2*12=24 L+O+26.5+24	L+O+9+P+G+D+E+L+T+C+S L, O: variable P (Phanta, 0.5 μl): 1.5 G: 1.5 D: 1-28 (depend on restriction enzyme) E: 1.5 L (novoprotein): 1 T (T-fast, 50 μl): 3 C (Taq, pick 8 clones, 8*0.2 μl): 1 S (2 clones): 2*12=24

		L+O+(19.5~46.5)+24
实验失败重复一次的费用成本 (暂不考虑测序)	R+T+C=9.5	P+G+D+E+L+T+C=10.5(minimal)
实验失败重复一次的时间成本 (截至转化)	R+T=40min	4h+1night
总时长(计算至转化)	~3h+40min (can be done in an afternoon or an evening)	~5h/4h+1night (depending on chose 1h rt. ligation or overnight 16°C ligation)
操作便捷	++++ (实验室的极限)	++ (常规克隆, 操作上没有太大难度)
成功率(self-estimation)	95%	70% (1h ligation) 90% (overnight ligation)
用酶切制备的线性化载体自选	(不使用连接酶) 平末端线性化载体: - 粘性末端线性化载体: -	(使用连接酶) 平末端线性化载体: + 粘性末端线性化载体: ++
无缝连接	√	×
引物兼容性	可以兼容酶切连接	
综合推荐	+++	++

• 总结

- 从费用成本而言, ClonExpress和酶切酶连相比, 酶切酶连便宜一些, 但没有显著的差异(但如果你用到了比如Agel-HF这样单价很高的酶, 那么.....)。但是从时间成本和操作便利性而言, ClonExpress有明显优势
- 批量操作降低成本的关键
 - 认真实验, 一次成功(大节约)
 - 减少耗材使用量(小节约)。能省的地方应该省, 但是如果因为心急导致实验失误的话, 耗材的损耗是小, 更重要的是时间成本)

• 注

- 一次克隆里面最贵的部分其实是引物设计和转化
- 虽然对于同种酶, HF系列NEB说相比非HF系列不仅提高了品质, 还没有单价(单位酶价格)的差异。但是! HF的酶浓度是20,000 unit/ml, 非HF是10,000 unit/ml。并且NEB推荐的反应体系均是50 μl取1 μl的酶。所以! 在你不知不觉的时候, 实际提高了2倍的成本!(其实NEB的各种快酶都用了相同的思路。比如其Quick ligation kit和普通T4 ligation kit相比, 酶用的都是一样的, 只不过Quick ligation kit的T4 ligase的浓度是普通的5倍, 2,000,000 unit/ml与400,000 unit/ml)
- 支持好的国产品牌, 好用又便宜

冻存

- 测序正确的质粒都需要冻存两管(实验室一管, iGEM一管), 并抽出一管以备之后用途(比如细胞实验, 或作为PCR模板)
- 如果要摇5ml菌(3ml小抽, 2x1ml冻存), 用长试管, 放在摇床有倾角的架子上摇。用短试管垂直放在弹簧线里摇效果不佳, 容易导致菌死了之后沉淀在试管底部。但由于长试管比较长, 摇好后用1ml移液枪不容易取出液体。故冻存时先在2个冻存管里面加好适量的甘油后, 用10ml玻璃移液管+移液器取2ml出来分到2个管子里。小抽的时候采用倾倒法倒出菌液
- 冻存的时候一定要用新鲜的菌, 千万不要摇过。T-Fast长的快, 切忌不要前一天晚上较早的时间摇上菌之后, 第二天中午以后再晃悠悠的来实验室冻存

后记

- 分子克隆是合成生物学最基础实验的也是最重要的实验(某种程度上可以说, 合成生物学的实验都是基于质粒), 撰写本指南旨在帮助大家尽可能的加快分子克隆的速度和成功率。当然, 其中也使用到了一些单价较高的kit, 比如ClonExpress。但如果能够在合理成本内, 最大限度加快基础实验, 让大家获得更多节约下来的时间和精力, 关注质粒构建好后的诸多测试环节, 关注科学问题, 那么还是值得的(蔡老师的良苦用心)
- 请大家合理节约, 不要浪费

专题

• 基于CE的单点/多点突变

- 单点突变也可以使用KOD, 但从操作和成功率上看, 个人更喜欢CE
- 环P推荐使用25 μl体系
- 环P质粒时, 推荐使用65°C左右引物, 以提高成功率(65°C最好。但并不需要严格控制在65°C, 在设计引物时, 可以根据情况适当下调为64、63°C均可。不建议上调, 原因是上调之后并不可以有效的提高成功率, 但需要合成更长的引物)
- 环P难度较大, 设计质粒的时候不要在重复序列区域设计, 可以使用巧妙的方法避免。同时不要尝试通过环P对序列进行加长, 用长引物环P很容易导致失败。加长几个碱基还是没有问题的, 但是十几个碱基就要十分慎重了
- 使用phanta Max高保真酶(不要用Taq!)
- 环P 30 cycles已足够(不要擅自增加循环数, 循环数过多导致突变积累)
- PCR延伸时一定要保证时长。虽然phanta推荐1kb/30s, 但是在扩增长片段时一定要使用1kb/1min的设置。比如如果你要环P 7.5kb的质粒, 设置8min的延伸时间是合适的。在最后一步彻底延伸应该设置10min而非常规的5min

- 为防止模板干扰转化：质粒模板用量要少，0.1-0.5 ng (25 μl体系) → DpnI 消化 (用NEB产品，可直接取0.5 μl加入25 μl体系，37°C消化30 min) → 胶回收

- 实际操作中

- 为方便操作，不同浓度的模板均可以直接但只能取0.2 μl，目的是确保使用尽可能少的模板
- 胶回收的时候一定要110V跑≥20 min (20min已经可以了，不放心或对切胶没有信心的多跑一下更好)，以确保模板和产物分开
- 切胶的时候必须观察到清晰的条带，如果拖带，说明环P失败，就不要尝试切胶了。如果看到了清晰的条带，在下刀时第一刀必须紧贴条带下缘，不能切的过宽 (原因是，即使你在胶上只看到了一条清晰的目的条带，但实际上胶上还是有残留模板的，只不过量很少看不到。由于模板是超螺旋状态，跑的比较快的产物快，下刀太远会导致把模板也切进去，干扰后面实验)
- 保证上述操作无误基础上，后续可以无需进行DpnI消化

- 若多点突变，中间插入的片段PCR后也必须通过胶回收

- 如果使用CE做单点或多点突变，由于没有办法通过菌P验证是否突变成功，可以直接挑3个克隆进行测序 (该方法已经在mouse Notch1 core的S1、S2、S3突变中测试过。在正确进行：环P引物设计、骨架环P、割胶、回收 (没有用DpnI消化) 等操作的情况下，无一失败。即送的3个克隆总会有1个是对的)

- 后记

- 单点、多点突变的关键是一定要防止环P使用的PCR模板污染，导致转化的时候产生大量的假阳性菌落。所以使用最少量的模板以及正确的割胶是成功的关键
- 环P长质粒 (7、8kb的样子) 往往需要4 h以上，需要安排好时间，早点开始。不然如果想要当天做到转化的步骤，可能拖到很晚

3A克隆及类似 (一个载体酶切酶连插入两个片段)

- 对于短片段 (就100bp) 左右的片段，为保证回收浓度PCR时可以用50 μl的体系，需要跑胶 (或两个25 μl的体系，跑胶后切到一管里回收)。注意如果是要获得短片段的东西，设计引物时尽量设计的短一点，不然跑胶的时候长引物容易形成引物二聚体，干扰跑胶结果。
 - 还有一个获得短片段的方法：再预计所需要获得的片段两端的远端设计引物，使得PCR后获得一个相对大的片段 (>200 bp)，这样回收后通过双酶切+热失活获得所需要片段。
- 短片段3A可以采用热失活 (80°C 20 min)，注意酶组合需要是：EcoRI-HF, XbaI, SpeI-HF, PstI (**注意不能用PstI-HF，这个酶不能够被热失活**)
- 酶连使用5 μl体系；载体:每一种片段 = 1:1 (可以使用Excell计算，不要偷懒不计算，这样做不出来很正常)，使用尽可能多的载体和片段用量 (意思就是除了ligation buffer和ligase外，其他的体积全部加入载体和片段)；不要使用quick ligation酶和buffer，强烈建议16°C连接过夜保证成功率。

CE

- CE用的液体很少，加完样后一定要把CE液和片段液混匀后**离心！离心！离心！**后再上PCR进行50度反应 (离心十分重要，CE效率很高，对于单片段插入成功率近乎100%，如果保证CE前操作都正确，但最终做不出来极有可能是液体没有混合。注意再转化的时候也极易犯这个错误，故分装感受态之前一定要离心确保所有感受态在管底。分装后要把EP管拿起来检查一下，有没有在分装时在管底产生气泡，如果有的话，用移液枪吸走。在加入质粒的步骤时，一定要把质粒加入菌液页面下之后，轻轻吹打混匀)

Protocol参考

- Snapgene official cite.

Can I configure SnapGene to show primer T_m values suitable for PCR polymerases such as Phusion®, Phire®, and Q5®?

For most PCR polymerases, the optimal annealing temperature for the PCR reaction is about 0–5°C below the T_m for the primers.

For some PCR polymerases such as Phusion®, Phire®, and Q5®, the optimal annealing temperature is about 6–12°C above the primer T_m. The reason is that these polymerases are fused to a processivity-enhancing dsDNA-binding domain that stabilizes the primer-template complex.

The approach recommended by NEB and Thermo Scientific is to use older thermodynamic parameters to calculate the T_m for polymerases such as Phusion®. Those older parameters are less accurate, and they tend to give T_m values about 6–9°C higher than the newer parameters. NEB then recommends using an annealing temperature 0–3°C above the inaccurately high T_m values, or about 6–12°C above the actual T_m.

The SnapGene team has decided not to provide inaccurate T_m values. Instead, we recommend that when a polymerase such as Phusion® or Phire® or Q5® is used, the annealing temperature should be about 6–12°C above the primer T_m as calculated by our software.

- NEB official website.
- Kit manuals.
- Longo P A, Kavran J M, Kim M S, et al. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)[M]//Methods in enzymology. Academic Press, 2013, 529: 227-240.