**分子克隆方案**

马留银 20160822

**STEP1: RNA提取及完整度检测**

1. 使用TIANGEN多糖多酚试剂盒提取总RNA

*\*必须经过DNase-I柱中处理，若RNA提取效果不佳，可使用更高标准的PINETREE RNA提取总RNA*

1. 分光光度计测核酸浓度，管壁标注样本名称、浓度、260/280、260/230(简称S)、提取日期、提取人简称（英文）

*Concentration(C),默认单位ng/ul, 260/280(P),260/230(S),姓名（首字母缩写）*

*例如bamboo leaf total RNA C: 105.7 /P:2.071 /S:2.205/20150807/LMA*

*\*满足260/280≈2.0且260/230 >2的RNA纯度最佳*

1. 1%琼脂糖凝胶电泳（150V,10-15分钟）跑胶检测RNA完整度，以28S/18S=2为完整度最佳。

**STEP2: 逆转录**

1. 混匀：

RNA（1-3 ug） 14 µL

RT primer（LMA31原始引物 100pmol/ µL） 1 µL

*\*65°C可破坏RNA自身的二级结构，易于后续逆转录酶结合，*

*RT及3’末端接头引物：ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN*

1. 65°C 5分钟，立即置冰>2分钟
2. （冰上）：

5X 1st strand buffer 5 µL

10 mM dNTPs 2.5 µL

100 mM DTT 1 µL

RNase Inhibitor 0.5 µL

M-MuLV Reverse transcriptase (Clontech) 1 µL

\**所有buffer使用前需震荡混匀,新开酶第一次使用前需瞬离，反转录酶极易热失活*

1. 枪头上下吸打混匀，@ 42°C反应60 min
2. 加入1 µL LMA29，@ 42°C继续反应60 min

*\*5’SMART 接头引物: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG*

1. 70°C 10分钟

*\*热失活逆转录酶*

1. 加入1 µL RNase H与1 µL RNase A/T @ 37°C for 45 min

*\*RNase H 特异水解DNA：RNA杂合链中的RNA链，不能水解ssRNA; RNaseA/T特异水解ssRNA，RNase A在C与位置水解ssRNA，RNase T1特异在G位置水解ssRNA*

1. 使用Zymo DNA clean & concentration Kit 试剂盒纯化cDNA

*\*单链cDNA在-20度保存1个月，可于-80度长期保存，避免反复冻融*

**STEP3: PCR**

1. 引物溶解，稀释

*\*以10倍nmol数值的体积稀释后，浓度为100pmol/* *µL, PCR反应引物需稀释至10pmol/* *µL*

1. 配制MIX（25ul体系,15个基因）

5\*GXL buffer 5 µL 5x17=85 µL

dNTP(2.5uM) 2 µL 2x17=34 µL

DNA polymerase 0.5 µL 0.5x17=8.5 µL x17

cDNA 1 µL 1x17=17 µL

NF H2O 14.5 µL 14.5x17=246.5 µL *√*

23 µL

*\*cDNA尽量不稀释, 反应数量10以内MIX多1个反应量，10以上样品多2个反应量，加样时，每加一个样品在旁边打“√”，加样顺序依体积从大到小。*

1. MIX混匀后，用枪加到8连管中，23 µL /管
2. 加入引物F及R各1 µL

*\*每个反应不同，单独加，换枪头*

1. 盖紧管盖，避免蒸发。震荡混匀，瞬离。即可
2. 反应程序：

98°C 1min

98°C 10s

60°C 15s 30X

68°C 3 min 30s

68°C 10min

4°C

\* *Primerstar GXL具有的最大特别是可以在宽广的范围内对cDNA进行良好扩增，但其保真性与Fusion 聚合酶相似，因而，追求更高保真性建议使用KOD Plus Neo，其保真性达普通Taq 酶80倍。*

**Step 4 胶回收**

1. 配胶：配胶过程中不加染料。用13孔的大梳子配胶。

*\*配制1.2%-1.5%的胶，低浓度容易破碎，配胶前需用纯水洗净胶模盒，梳子等。跑胶时需更换新的TAE buffer,依据不同的酶使用不同的buffer， Primerstar GXL 推荐使用TAE。*

1. 6\*Loading buffer中加入10000\*的染料。以配制500 µL 为例。

计算：10000\* 6\*

？ 500 µL

故，需加染料为（500\*6）/10000=0.3

*\* 可提高至5000x*

1. 配样：样本25 µL + 5 µL 6x loading buffer（已加染料的）
2. 注意:为避免样本浪费，配胶完后，可先切一孔出来加marker跑胶试试所配的胶是否可用。
3. 加样。将配好的样本30 µL 全部加入。130V跑胶约15min。

*注意：加样时必须换枪头，点样时样本之间相互空一格，方便切胶。*

1. 看胶。确定哪些有出来。笔记本上按照上样顺序做好标记

*\*每次点样完在记录本处记录点样样品顺序及最终图片名称：例如lma20160807a*

1. 切胶。清理台面，避免污染。先将胶在外面一个一个切下来，在放在紫外下确定条带位置，然后小心将有条带的部分切下来放在预先标好序号的1.5ml EP 管中。

*注意：避免污染。如条带于紫外切胶仪处不清晰，请置于成像仪拍照，然后将胶放回胶模，然后对照成像仪图片切取，切完一个后，擦拭台面和刀片，以此类推。*

1. 称胶。先称一个空的1.5ml EP 管去皮。再逐一称取样本的重量，并在管子上做好记录。按照100mg=100 µL进行换算。
2. 用胶回收试剂盒进行回收。（AXYGEN）
3. 加入3倍体积的Buffer DE-A，混匀后75°C加热（金属浴），间断拿出混匀（2-3min），直至凝胶块完全熔化（约6-8min）。
4. 加0.5倍体积的Buffer DE-B，混匀。当分离的DNA片段小于400bp时，需再加入1倍体积的异丙醇。
5. 将2）中的混合液转移到DNA制备管（置于2ml离心管）中，12000\*g离心1min。弃滤液。
6. 再加500 µL Buffer W1，12000\*g离心30s。弃滤液。
7. 加700 µL Buffer W2，12000\*g离心30s。弃滤液。
8. 重复步骤5）。
9. 空离一次。12000\*g离心1min。
10. 将制备管置于洁净的1.5ml离心管中，在制备膜中央加25-30 µL Eluent或去离子水，室温静置1min。12000\*g离心1min洗脱DNA。

*\*普通柱子洗脱体积需大于30 µL，但Zymo 柱子仅需大于7 µL*

1. 再次跑胶验证胶回收结果。
2. 配胶。同上。
3. 配制6\*Loading buffer加染料。同上
4. 配样。6\*Loading buffer 1 µL

样本 2 µL

NF H2O 3 µL

6 µL

1. 上样，看胶。同上。

**STEP 5：k**

1.体系

10xNEBuffer(CutSmart) 2µL

Plasmid（pFGFP） (1 µg)

SmaI 1µL

DDW to 20 µL

2. @25°C反应 2小时

3. 加入SpeI 1 µL，@37°C反应2小时

*\* SmaI 易热失活，其在37°C半衰期仅15分钟，使用任何酶或试剂前推荐阅读其供应商手册信息，且并非所有限制性内切酶在CutSmart缓冲液中100%活性。载体必须充分酶切，酶切底物最好是插入1-2kb片段的质粒。*

4. 配胶，跑胶，胶回收。

*\*确保跑胶酶切出的小片段可见*

**STEP 6: In fusion**

1. 体系： 2\*assembly mix 1 µL

载体 0.5 µL

PCR产物 0.5 µL

2 µL

PCR仪50度反应15分钟。

*注意：不要使用金属浴，避免蒸发。*

1. 冰上冷却数秒。
2. -20度保存，或直接用于转化。

**STEP 7：大肠杆菌转化**

1. 将DH5a置于冰上冰融（大约10-15min）。
2. 准备1.5ml EP管，命名，置冰上预冷。
3. 每管加入50 µL DH5a，再将Infusion 产物（2 µL）加入其中，用枪头稍混匀。
4. 冰浴30分钟。
5. 热激：42°C，1.5min。

*注意：可用水浴，也可金属浴。*

1. 热激完速放置于冰上5min。
2. 超净台每孔加入300-400ul 预热（37°C）的LB。
3. 摇菌：37°C 1-1.5h。

*\*大肠杆菌约20分钟繁殖一代（依据不同条件，15-30min）*

1. 涂板：可先将菌液离心5000\*g离心8 min，弃掉部分上清，使菌液剩余100 µL左右（可根据板的大小决定液体用量）。将其全部涂抹在板上。进行梯度涂板（一边涂得多，一边涂得少）。
2. 倒置，孵育16h以上，第二天观察长菌情况。

**STEP 7：挑菌**

1. 每个板挑3-4个单克隆。准备1.5ml 离心管，命名，格式：1-1,1-2,1-3.
2. 预热LB，加卡那霉素。每管加入2ml LB.

*\*Ampicillin（Amp）松弛型质粒60µg/ml,严谨型质粒20µg/ml*

*Kanamycin （Kan）松弛型质粒50µg/ml,严谨型质粒10µg/ml*

*抗生素需0.22µm滤器过滤，待室温加入，不能灭菌。此外，不是所有抗生素都用水溶解，请配置母液前阅读说明书或网络搜索。*

1. 用中号枪头将单克隆挑入离心管中。

*\*需使用5倍LB体积以上的摇菌管，提供充足空气*

1. 37度培养箱培养6h以上，可过夜。

*\*pFGFP载体复制子为pBR322，为松弛型中低拷贝（15~20质粒/细胞）质粒，在细胞培养的对数生长中期加入氯霉素（终浓度170ug/ml）再继续培养8h,可迅速提高其质粒拷贝数。*

**STEP 8：菌液PCR**

1. 配置MIX

2\* Super mix 10 µL

通用引物 F 0.5 µL

通用引物 R 0.5 µL 混匀后加入PCR管中，19ul/管。

NF H2O 8 µL

菌液 1 µL

1. 反应程序

94°C 10min

94°C 30s

55°C 30s 35 X

72°C \* 3 min30s

72°C 7min

4°C

*\* 1kb/min*

3. 跑胶验证

4. 取菌液1 ml送测序。要求返质粒。

*\*Sanger 测序前60 bp易错，因此需使用离基因>60 bp CXF与CXR。*

**STEP 9: Sanger测序分析**

1. 下载序列分析软件，安装后打开.seq格式序列

*\*seq格式序列分析软件可从“小木虫”或“丁香园”网站下载*

1. 复制序列， Blast比对

*\* 拟南芥：<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>*

*水稻: http://rice.plantbiology.msu.edu/standalone\_blast.shtml*

1. 确认是否比对目标基因及其异构体

*\*必须确认克隆正确的mRNA异构体，如AT1G52530.1,若比对出是AT1G52530.2，仍错误*

1. “F”序列比对起始于“ATG”，“R”序列起始于终止密码-3（如总长1793，起始于1790）

*\*因克隆基因的C-terminal需带-GFP融合蛋白，因此必须去掉终止密码子，以翻译GFP。*

1. 确认克隆引物未出现碱基缺失

*\*公司合成的引物是混合物，在克隆中，有1/10的概率会碰到碱基缺失。*

1. 确认600bp以内无插入或缺失

*\*插入或缺失碱基会导致“ORF”移码，最终编码出错误蛋白。*

1. 确认无突变或有突变但氨基酸未变

*\*可将从ATG开始的序列用软件翻译成蛋白，比对蛋白数据库，确认碱基的点突变是否造成氨基酸的替代。*

1. 确认正确无误后，对对应质粒贴Barcode（标注测序结果日期），并将测序结果归类至测序正确。

**STEP 10: 农杆菌转化**

1. 将50 µL感受态农杆菌置于冰上，加入1µg质粒DNA（体积不宜超过10 µL ），充分混匀，冰上放置30 min；
2. 置液氮中快速冷却约1min后迅速转入37℃水浴中，待其融化；
3. 加1 ml 无抗生素的LB 液体培养基于28℃，230 r/min 培养2-4 h；（或直接用500 µL，留500 µL于管中）
4. 3000 r/min 离心2 min收集菌体，将上清吸去, 留100~150µL培养菌直接涂布含抗生素的LB+ Rifampicin+KAN平板；
5. 重悬菌体并涂到含有适当抗生素的LB平板上吹干, 28℃培养过夜；
6. 挑取3个单菌落，分别将含有目的载体的农杆菌接种于2~3 ml LB（含有相应抗生素）液体培养基；28 °C，200 rpm培养过夜；

*\*注：AGL-0, EHA105抗利福平霉素。在转化前后的所有培养基中均可加入相应的这两种抗生素，以防止杂菌污染。以上挑菌及抗生素加入工作均在超净台上进行。*

7. 将含有目的载体的农杆菌接种于2~3 ml LB（含有相应抗生素）液体培养基；28 °C，200 rpm培养过夜；

8. 菌液PCR验证；

9. 吸取1 ml 测序正确的菌液转接至150 ml含有抗生素的LB液体培养基中， 28 °C培养过夜。

10. 室温下4,000 rpm离心10 min，弃上清，用150 ml重悬液（5%蔗糖和0.03 % Silwet-L 77）重悬菌体。

**STEP11: 拟南芥种子种植**

方法1: 直接播种

1. 取20µL拟南芥种子，加入1 ml 75%酒精（with 0.01% Triton X-100）消毒10-15分钟，用100%酒精上下吸打3次，快速吸干酒精。
2. 抽真空离心2-5分钟除去酒精
3. 加入200µL以上无菌水，放置4°C冷库层积3-4天
4. 在种子取出前一天拌土，土：蛭石≈1.5：1，浇水过夜，让其自然吸入。

*\*土需要捏成粉末，块状容易长菌，此外，靠近袋壁的土尽量不要用，容易长菌，土与蛭石需搅拌均匀，且在装入盘时用手压均匀。水位大约在花盆的1/3-1/2高。土壤吸水时间至少3小时。*

1. 层积完的种子用1 ml的枪点种子，每pot点5个位置，四个角及中间，每个位置5~6粒种子。

*\*可加水调节至1滴水1粒种子*

1. 加盖塑料盖子直至长出1-2片真叶

*\*拟南芥在子叶期时无侧根，待真叶长出时才有侧根，侧根的出现将极大的提升拟南芥的吸水能力。此外，中华植物园的空气湿度是低于50%的，因此，在无真叶长出时极易逆境。*

1. 揭盖后浇水每周2次为宜，直至抽薹，抽薹后每周至少浇水3次。

*\* 过度频繁浇水会导致病虫害持续发生，病虫害发生时，抽薹前以飞虱防治为主，抽薹后以蚜虫防治为主，可用1：1000倍稀释液吡虫啉（蚜虫、飞虱）或毒死稗（飞虱），喷施时全温室喷施，不留死角，3天后再次喷施，同时放置黏虫板，可有效防治。*

*\*夏天需提前一天将水蓄积起来，待其水温降至温室温度，才用以第二日浇水，因福州地面温度极高，水温非常高。*

*\*拟南芥对所有逆境都很敏感，所以请只在托盘里没有水时浇水，且浇水时水量不宜过多，不超过盘的1/3。*

*\*至少喷施2次花多多，在抽薹前至少喷施1次花多多，1：1000倍稀释喷叶或1：2000灌施，抽薹后喷1次花多多。（50ml盖子花多多配3L水）*

1. 待有1/3种子饱满时停水.

方法2：移苗法

1. 拟南芥野生型或rdr6-11在MS+1%sucrose板上种植

*\* 配制MS培养基时需调pH值至6.2，待灭菌后最终保持在5.8*

*\*此外，Agar浓度为0.8%，Agar极易在酸碱及高温时水解，如若凝固不好，需加大Agar浓度至1%或灭菌时长减少为15-18分钟。*

*\*1 ml 75%酒精（+0.01%Triton-X-100，Triton-X-100是表面活性剂，可以使得种子表皮充分接触酒精）, 10-15分钟（用两个板夹住持续摇晃），1 ml 100%酒精快速吸打三次，快速洗掉酒精（100%酒精会杀死种子），真空离心2-5分钟（保证干掉），一管不宜灭菌超过30µL种子。*

*\*氯气消毒方法（通风橱）：烧杯中加入40mL NaClO, 5ml 浓盐酸，种子打开盖至于整理盒中，处理2个小时。*

1. 层积3-4天后放置光照培养箱培养

*\* 23°C，16L/8D, 65%湿度*

1. 待长出第一片真叶后移栽至土壤，不伤根，保持高湿度。

*\*移苗后需加水，盖盖子，保持高湿度至第二片真叶发出*

下同直接播种

**STEP12：拟南芥的浸花转化**

1. 长日下生长的拟南芥，抽苔后剪掉花序，一周左右待更多花蕾露出时即可用于转化。

2. 将制备好的农杆菌转化液浸泡花序30 sec，将已转化植株用黑色塑料袋或托盘罩住避光、保持高湿，24 h后打开。

*\* 浸泡时间不易过长，且浸泡后甩干，保证花序上无大量残留脓杆菌。*

3. 待种子成熟收获，用于筛选转化阳性植株。

**STEP13：拟南芥T1代**

1. 收到T1种子在37℃烘箱洪干3天，入库，记录，标号

*\*因福州天气潮湿，必须放置在干燥箱中。长期保存需彻底烘干后放置于-20℃，种子从-20℃或4℃拿出时，一定要放到室温，才开盖，否则会潮湿。*

1. 每个基因种植两个小pot，种植时以铺满整个土壤表面但不重叠为最佳

*\*好的转化效率将筛选出≈15-20个存活植株/pot，需种植空载对照*

1. 2L Basta（10%Basta稀释1500至2000倍）/盘
2. 4℃层积3-4天
3. 萌发3天，待水干后，浇正常水

*\*注意及时揭盖，以便种子密度过高，及湿度过高引起霉菌感染。*

1. 待4~5片真叶时，取一片小叶，置蔡司荧光显微镜观察是否有荧光，记录荧光强度，保留GFP表达line

*\*仔细阅读桌面说明书，软件照出来的会清晰*

1. 待8 ~10片真叶时，取6个line，每个line取一片叶，提取蛋白，做Western Blot，保留高表达、中表达及低表达总计3个line单株收种，收到种子为T2代（如果筛选单拷贝，则需要保留更多的line）。

**STEP14：单拷贝筛选（突变体必须，过表达可选）**

1. T2代种子种植MS+1%Sucrose+Basta平板

*\*Basta使用Sigma进口，终浓度22mg/L，Basta不能灭菌，需过0.22µm滤器，灭菌后加。*

2. 计算存活：死亡植株比例，单拷贝=（3：1）两个拷贝=（15：1）

*\*AGL-0农杆菌大多为单拷贝插入（75%存活），但实际实验结果显示大多数情况下为两个拷贝，即93.75%存活*

**STEP15：T2 代**

1. T2代种子可以开展光表型实验以及亚细胞定位实验
2. T2代种子同T1代加basta种植，需种植16株
3. 每株单株收种，标记如KME16-1-1

**STEP16：T3 代**

1. T3代line种植MS+1%Sucrose+Basta平板,100%存活，为纯合体，则移苗繁种，标记命名如KME16-1 HM
2. 混合收种
3. 开展下游实验

实验方案最终仍需要每个人自己去归纳总结：

具体方案：读3个以上方案，

理解每个化学试剂的作用

保留所有方案中都相同的步骤

然后归纳总结自己的方案