

Clonage - Protocole

1. Introduction

2. 1.A. Caractéristiques vectorielles

Surplis en T pour un clonage PCR simple: Les vecteurs Easy pGEM®-T et pGEM®-T (a, b) sont des vecteurs linéarisés avec une seule thymidine à l'extrémité 3-terminale. Les surplombs en T au site d'insertion améliorent considérablement l'efficacité de la ligature des produits de PCR en empêchant la recircularisation du vecteur et en fournissant un surplomb compatible pour les produits de PCR générés par certaines polymérases thermostables (1,2).

Sélection bleue / blanche des recombinants: Les vecteurs pGEM®-T et pGEM®-T Easy sont des vecteurs à grand nombre de copies contenant des promoteurs d'ARN polymérase T7 et SP6 encadrant une région de clonage multiple dans la région codant pour le peptide α de l'enzyme β -galactosidase. L'inactivation insertionnelle du peptide α permet l'identification de recombinants par criblage bleu / blanc sur des plaques indicatrices.

Choix des sites de restriction pour la libération de l'insert: les vecteurs pGEM®-T et pGEM®-T Easy contiennent tous deux de nombreux sites de restriction dans la région de clonage multiple. La région de clonage multiple pGEM®-T Easy Vector est flanquée de sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction EcoRI, BstZI et NotI, fournissant trois digestions mono-enzyme pour la libération de l'insert. La région de clonage du vecteur pGEM®-T est flanquée de sites de reconnaissance de l'enzyme BstZI. En variante, une double digestion peut être utilisée pour libérer l'insert de l'un ou l'autre vecteur.

Rapid Ligation: Les systèmes pGEM®-T et pGEM®-T Easy Vector sont fournis avec un tampon 2X Rapid Ligation. Les réactions de ligature utilisant ce tampon peuvent être incubées pendant 1 heure à température ambiante. La période d'incubation peut être prolongée pour augmenter le nombre de colonies après transformation. Généralement, une incubation d'une nuit à 4 ° C produit le nombre maximal de transformants.

1.B. Considérations importantes pour le succès du clonage du vecteur T

- Évitez d'introduire des nucléases, qui pourraient dégrader les surplombs en T du vecteur. Utilisez uniquement la T4 DNA Ligase fournie avec le système, car son activité exonucléase minimale a été testée. Utilisez de l'eau stérile et exempte de nucléase dans vos réactions de ligature.
- Utilisez des cellules compétentes à haute efficacité ($\geq 1 \times 10^8$ cfu / μ g d'ADN) pour les transformations. La ligature de fragments avec un porte-à-faux unique peut être inefficace, il est donc essentiel d'utiliser des cellules ayant une efficacité de transformation d'au moins 1×10^8 cfu / μ g d'ADN afin d'obtenir un nombre raisonnable de colonies. Cependant, l'utilisation de cellules compétentes à très haute efficacité (par exemple, les cellules XL10 Gold®) peut entraîner un fond plus important de colonies bleues.
- Limitez l'exposition de votre produit de PCR aux rayons ultraviolets à ondes courtes afin d'éviter la formation de dimères de pyrimidine. Utilisez une plaque de verre entre le gel et la source UV. Si possible, visualisez uniquement le produit de PCR avec une source UV à ondes longues.

2. Matériel

3. Protocole pour les ligatures utilisant les vecteurs Easy pGEM®-T et pGEM®-T et le tampon de ligature rapide 2X

3.A. Protocole de ligature

1. Centrifuger brièvement les tubes à ADN pGEM®-T ou pGEM®-T Easy Vector et Control Insert pour recueillir le contenu au fond des tubes.

2. Configurez les réactions de ligature comme décrit ci-dessous.

Remarque: Utilisez des tubes de 0,5 ml dont la capacité de liaison à l'ADN est faible (par exemple, réf. VWR n ° 20170-310).

Vortexer vigoureusement le tampon de ligature 2X Rapid avant chaque utilisation.

3. Mélangez les réactions par pipetage. Incuber les réactions pendant 1 heure à température ambiante.

Sinon, si le nombre maximum de transformants est requis, incuber les réactions pendant une nuit à 4 ° C.

4. Une partie aliquote de la réaction PCR doit être analysée sur un gel d'agarose avant d'être utilisée dans la réaction de ligature afin de vérifier que la réaction a produit le produit souhaité. Le produit de PCR à ligaturer peut être purifié sur gel ou purifié directement à partir de l'amplification.

de PCR en utilisant le gel Wizard® SV et le système de purification PCR (Cat. N ° A9281). Le nettoyage des réactions avant la ligature est recommandé pour éliminer les dimères d'apprêt ou d'autres produits de réaction indésirables et pour améliorer l'efficacité de la ligature. L'exposition des produits de PCR à la lumière ultraviolette à ondes courtes doit être minimisée afin d'éviter la formation de dimères de thymidines.

3.B. Optimisation de l'insertion: rapports molaires vectoriels

Les systèmes Easy Vector pGEM®-T et pGEM®-T ont été optimisés en utilisant un rapport molaire de 1: 1 de l'ADN de l'insert de contrôle aux vecteurs. Cependant, des ratios de 8: 1 à 1: 8 ont été utilisés avec succès. Si les expériences initiales avec votre produit de PCR sont sous-optimales, une optimisation du ratio peut être nécessaire. Les rapports de 3: 1 à 1: 3 fournissent de bons paramètres initiaux. La concentration du produit de PCR doit être estimée par comparaison aux standards de masse de l'ADN sur gel ou à l'aide d'un dosage fluorescent (3). Les vecteurs pGEM®-T et pGEM®-T Easy mesurent environ 3 kb et sont fournis à 50 ng / µl. Pour calculer la quantité appropriée de produit de PCR (insert) à inclure dans la réaction de ligature, utilisez l'équation suivante.

4. Transformations utilisant les réactions de ligature de vecteur facile pGEM®-T et pGEM®-T

Utilisez des cellules compétentes à haute efficacité ($\geq 1 \times 10^8$ cfu / µg d'ADN) pour les transformations. La ligature de fragments avec un porte-à-faux unique peut être inefficace, il est donc essentiel d'utiliser des cellules avec une efficacité de transformation de 1×10^8 cfu / µg d'ADN (ou plus) afin d'obtenir un nombre raisonnable de colonies. Nous vous recommandons d'utiliser les cellules compétentes JM109 à haute efficacité (Cat. # L2001); ces cellules sont fournies avec les systèmes Easy Vector II pGEM®-T et pGEM®-T. D'autres souches hôtes peuvent être utilisées, mais elles devraient être compatibles avec le criblage des couleurs bleu / blanc et la sélection de l'ampicilline standard.

Remarque: l'utilisation de cellules compétentes à très haute efficacité (par exemple, les cellules XL10 Gold® Ultracompetent) peut entraîner un fond plus important de colonies bleues.

Si vous utilisez des cellules compétentes autres que les cellules compétentes à haute efficacité JM109 achetées chez Promega, il est important de suivre le protocole de transformation approprié. La sélection des transformants doit être effectuée sur des plaques LB / ampicilline / IPTG / X-Gal (voir la recette à la section 10.C). Pour de meilleurs résultats, n'utilisez pas d'assiettes datant de plus d'un mois.

Le génotype de JM109 est recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rK-, mK +), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15] (4).

4.A. Protocole de transformation

Matériaux à fournir par l'utilisateur

(Les compositions de solution sont fournies dans la section 10.C)

- Plaques LB avec ampicilline / IPTG / X-Gal
- SOC moyen

1. Préparez deux plaques LB / ampicilline / IPTG / X-Gal pour chaque réaction de ligature, ainsi que deux plaques pour déterminer l'efficacité de la transformation. Équilibrer les plaques à la température ambiante.

2. Centrifuger les tubes contenant les réactions de ligature pour recueillir le contenu au fond. Ajouter 2 µl de chaque réaction de ligature dans un tube en polypropylène stérile (17 × 100 mm) ou un tube à centrifuger de 1,5 ml sur de la glace (voir la Note 1). Mettre en place un autre tube sur la glace avec 0,1 ng de plasmide non coupé pour la détermination de l'efficacité de transformation des cellules compétentes.

3. Retirez le (s) tube (s) des cellules compétentes JM109 congelées à haute efficacité congelées et placez-les dans un bain de glace jusqu'à ce qu'elles soient décongelées (environ 5 minutes). Mélanger les cellules en tapotant doucement le tube. Évitez les pipetages excessifs car les cellules compétentes sont extrêmement fragiles.

4. Transférer avec précaution 50 µl de cellules dans chaque tube préparé à l'étape 2 (utiliser 100 µl de cellules pour la détermination de l'efficacité de la transformation).

5. Feuillotez doucement les tubes pour les mélanger et placez-les sur la glace pendant 20 minutes.

6. Effectuer un choc thermique sur les cellules pendant 45 à 50 secondes dans un bain-marie à 42 ° C (secouer).

7. Remettre immédiatement les tubes dans la glace pendant 2 minutes.

8. Ajouter 950 µl de milieu SOC à la température ambiante aux tubes contenant les cellules transformées par des réactions de ligature et 900 µl au tube contenant des cellules transformées avec le plasmide non coupé (le bouillon LB peut être substitué, mais le nombre de colonies peut être inférieur).

9. Incuber pendant 1,5 heure à 37 ° C sous agitation (~ 150 tr / min).

10. Plaquer 100 µl de chaque culture de transformation sur des plaques dupliquées LB / ampicilline / IPTG / X-Gal. Pour le contrôle de la transformation, une dilution au 1/10 avec du milieu SOC est recommandée pour le placage. Si un nombre plus élevé de colonies est souhaité, les cellules peuvent être sédimentées par centrifugation à 1000 xg pendant 10 minutes, remises en suspension dans 200 µl de milieu SOC et 100 µl placées sur chacune des deux plaques.

11. Incuber les boîtes pendant la nuit (16 à 24 heures) à 37 ° C. Si 100 µl sont étalés sur plaque, environ 100 colonies par plaque sont systématiquement observées à l'aide de cellules compétentes représentant 1 × 10⁸cfu / µg d'ADN. L'utilisation de cellules compétentes à très haute efficacité peut entraîner un nombre plus élevé de colonies de fond. Des incubations plus longues ou un stockage des plaques à 4 ° C (après une incubation d'une nuit à 37 ° C) peuvent être utilisés pour faciliter le développement de la couleur bleue. Les colonies blanches contiennent généralement des inserts; Cependant, les inserts peuvent également être présents dans les colonies bleues.

4.C. Criblage de transformants pour inserts

Le clonage réussi d'un insert dans le vecteur facile pGEM®-T ou pGEM®-T interrompt la séquence codante de la β-galactosidase; Les clones recombinants peuvent être identifiés par criblage de couleur sur des plaques indicatrices. Cependant, les caractéristiques des produits de PCR clonés dans les vecteurs peuvent affecter de manière significative le rapport des colonies bleues / blanches obtenues. Généralement, les clones contenant des produits de PCR produisent des colonies blanches, mais des colonies bleues peuvent résulter de fragments de PCR clonés en phase avec le gène lacZ. De tels fragments sont généralement un multiple de 3 paires de bases longues (y compris les surplombs 3'-A) et ne contiennent pas de codons d'arrêt dans l'image. Des fragments d'ADN jusqu'à 2 kb ont été rapportés et ont produit des colonies bleues. Même si votre produit de PCR ne représente pas un multiple de 3 bases, le processus d'amplification peut introduire des mutations (délétions ou mutations ponctuelles) pouvant entraîner des colonies bleues.

L'ADN de l'insert de contrôle fourni avec les systèmes pGEM®-T et pGEM®-T Easy est un fragment de 542 pb de l'ADN de vecteur pGEM®-luc (Cat. N ° E1541). Cette séquence a été mutée pour contenir plusieurs codons d'arrêt dans les six cadres de lecture, ce qui garantit un faible fond de colonies bleues pour la réaction de contrôle. Les résultats obtenus avec l'ADN de l'insert de contrôle peuvent ne pas être représentatifs de ceux obtenus avec votre produit de PCR.

5. Séquences vectorielles pGEM®-T et pGEM®-T Easy, sites de multi-clonage et cartes circulaires

5.A. Séquence et site de multi-clonage du vecteur pGEM®-T

Le vecteur pGEM®-T est dérivé du vecteur pGEM®-5Zf (+) (numéro d'accèsion GenBank® n ° X65308). Le vecteur pGEM®-T a été créé en linéarisant le vecteur pGEM®-5Zf (+) avec EcoRV à la base 51 et en ajoutant un T aux deux extrémités. Le site EcoRV ne sera pas récupéré lors de la ligature du vecteur et de l'insert.