

2014-6-4 G3样品实验步骤

2014年6月4日 12:37

一、目标:

二、底物 pBR322

三、引物设计:

序号	引物名称	引物	限制性内切酶	Nmoles	所加TE，目标浓度为100uM
1	Prime1_A_bio	5' Bio-CCTGACGAGCATCACAAA 3'			
2	Prime1_B_xbai	5' GCTCTAGA GCCATACCAAACGACGAG 3'	XbaI		
3	Prime2_A_saci	5' CGAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'	SacI		
4	Prime2_B_dig	5' dig-GCCATACCAAACGACGAG 3'			

加入合适的TE buffer，将primer配制成100uM的溶液，取出5ul备用。

四、Tag酶:

One Taq® 2X Master Mix with Standard Buffer

One Taq® 2X Master Mix with Standard Buffer is an optimized blend of Taq and Deep VentR™ DNA Polymerases ideally suited to routine PCR applications from a variety of templates including pure DNA solutions, bacterial colonies, and cDNA products. The 3'→5' exonuclease activity of Deep Vent DNA Polymerase increases the fidelity and robust amplification of Taq DNA Polymerase (1). The convenient master mix formulation contains dNTPs, MgCl2, buffer components and stabilizers, requiring only the addition of primers and DNA template for robust amplification.

Buffer Composition
20 mM Tris-HCl
22 mM KCl
22 mM NH4Cl
1.8 mM MgCl2
5% Glycerol
0.05% Tween® 20
0.06% IGEPAL® CA-630
0.2 mM dNTPs
25 units/ml OneTaq® DNA Polymerase
pH 8.9@25°C

五、限制性内切酶

1、XbaI
5'...TCTAGA...3'
3'...AGATCT...5'

2、SacI-HF
5'...GAGCTC...3'
3'...CTCGAG...5'

六、PCR setup

序号	目标	PCR程序标号	PCR setup		PCR Program
1	1kb biotin标记的DNA片段	G301	a、One Taq® 2X Master Mix	25 ul	1) An initial denaturation step for 1 minutes at 94°C. 2) 35 cycles for 30 seconds at 94°C, for 30 seconds at 48°C, for 60 seconds at 68°C. 3) A final incubation for 5 minutes at 68°C. 4) Hold at 4 °C.
			b、primer1_A_Bio (1A)	1 ul (10uM)	
			c、primer1_B_XbaI (1B)	1 ul (10uM)	
			d、ddH2O	22.5ul	
			e、pBR322	0.5ul (1000ug/ml,500ng)	
2	1kbp Dig标记的DNA片段	G302	a、One Taq® 2X Master Mix	25 ul	1) An initial denaturation step for 1 minutes at 94°C. 2) 35 cycles for 30 seconds at 94°C, for 30 seconds at 48°C, for 60 seconds at 68°C. 3) A final incubation for 5 minutes at 68°C. 4) Hold at 4 °C.
			b、primer2_A_saci (2A)	1 ul (10uM)	
			c、primer2_B_Dig (2B)	1 ul (10uM)	
			d、ddH2O	22.5ul	
			e、pBR322	0.5ul (1000ug/ml,500ng)	

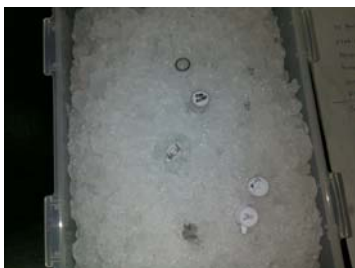
七、实验步骤

A、PCR实验过程

PCR setup (10倍)	
a、One Taq® 2X Master Mix	25 ul*10=250ul
b、primer1_A_Bio (1A)	1 ul *10=10ul
c、primer1_B_kpni (1B)	1 ul *10=10ul
d、ddH2O	22.5ul*10=225ul
e、pBR322	0.5ul *10=5ul
a、One Taq® 2X Master Mix	25 ul *10=250ul
b、primer2_A_saci (2A)	1 ul (10uM)*10=10ul
c、primer2_B_Dig (2B)	1 ul (10uM) *10=10ul
d、ddH2O	22.5ul*10=225ul
e、pBR322	0.5ul*10=5ul

1、制备1kb biotin标记的DNA片段

(1) 准备One Taq® 2X Master Mix、primer1_A_Dig和primer1_B_XbaI以及 pBR322等，分别插到准备好的冰盒中，反应物一定要放置在冰上；



(2) 将超净台灭菌15分钟以上;

(3) 将枪、离心管(离心管用平头或者凸头的都可以)等用酒精消毒后放到超净台中;



(4) 准备PCR的混合液(10X), 首先配制10倍的混合液(不加DNA底物), 然后分成10管, **再在试管壁上加上DNA底物:**

(5) 注意所有的反应物都放置在冰上;

(6) 将以上混合液分装成10管, 每管49.5ul;

(7) 在两管混合液的离心管加入0.5ul的pBR322底物, 注意一定要加在离心管的侧壁上, 原因是:

防止模板被污染; 防止模板与混合液中的酶相互作用影响PCR结果;

(8) 为了防止混合液中有**气泡**产生, 需要进行离心操作, 将小离心管装入600ul的中离心管中, 再装入1.5ml的大离心管中, 转速10000, 时间半分钟;



(9) 打开PCR仪, 用酒精将PCR消毒, 将小管放入PCR仪中;



(10) 按'run', 选择事先编号的程序, 开始PCR, 注意PCR的加热方式中, 选择“Block”的上盖同时加热方式。



(11) 经过大概1个多小时，PCR完成。

2、PCR产物的电泳检验（采用life的E-gel设备）



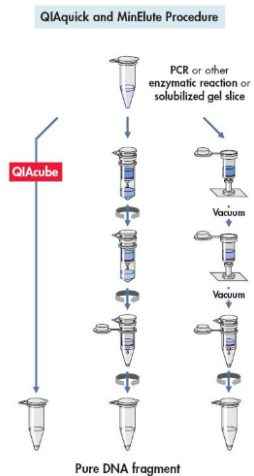
使用该产品，省去了制备胶的步骤。

- (1) 每种样品取出2ul，加入12ul的TE稀释；
- (2) 打开胶的包装，并将样品的主入口开封；
- (3) 在1-2道中加入14ul的DNA样品；
- (4) 在第4道中加入DNA 1kb ladder；
- (5) 其他的道中加入TE buffer；
- (6) 打开电源，按“mode”选择合适的程序，这里选择“0.8-2% E-gel”；
- (7) 按“Go”，开始电泳，时间18分钟；
- (8) 盖上滤光盖，实时观测（将电灯关闭，背景光尽量小，因为染料是溴化乙锭）；



实验观测，得到正确的PCR产物。

B、纯化PCR产物（样品不需要放置在冰上，因为冰不干净）



1、打开PCR纯化试剂盒包装：



2、准备特殊枪头（带滤芯的DNA、RNA free）



3、将清洁的枪头外包装消毒后，放入通风橱中；

4、配制PE buffer：用吸量管吸取24ml 100%的纯乙醇，加入到标有PE buffer的瓶中，坐上标记，PE buffer配制完成；

5、我们有8种分别12/24管50ul PCR产物，将每种DNA分别合成一管；



6、用5x体积的PB buffer分别稀释八种PCR产物；

7、将装有Spin管的包装袋消毒，注意封口处细细消毒，取出八个Spin管；

8、离心过程：

- 首先用酒精将离心机消毒；
- 将离心机的转速设定为17900转（说明书中说13000rpm，但是要求为17900g，根据我们的离心机，选择17900rpm），时间1分钟；
- 由于一个spin管最多只能加入750ul的液体，因此这里我们分多次将PCR的产物转移到spin管中。并对不同的PCR产物标记好。将Spin对称的放入离心机，开始离心（不对称时，需要用空管配平）；
- 离心后，将Spin管底部消毒，注意口部不要喷酒精，防止酒精进入；
- 将Spin管放入超净台中，轻轻拔出Spin管上部，将下部的废液倒入废液缸中；
- 在Spin管中加入750ul的PE buffer；
- 再次离心，转速同上；如此用PE buffer再洗两次（总共三次）；
- 将废液倒空后，再次离心，将废液彻底分离；
- 将Spin管的上部轻轻拔出，转移到普通1.5ml的离心管中；
- 加入50ul的EB buffer，这一步是将DNA洗出，十分的关键，加EB的时候，将EB小心的滴到过滤棉的中心部位，注意枪不要扎到过滤棉，等待一分钟（或者4分钟）让EB和DNA充分反应；



k) 再次将离心机消毒，离心一次，将DNA收集到Spin管的底部；

C、测DNA浓度

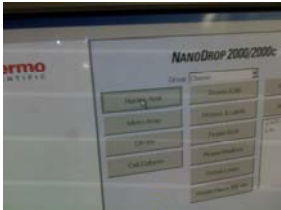
1、准备几个小管，分别装着2ul的八种PCR产物以及EB buffer；

2、使用NanoDrop测量DNA的浓度；

- 插上NanoDrop的电源；



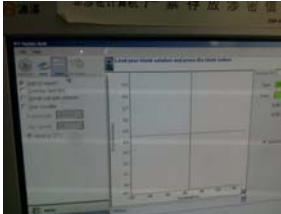
b) 打开电脑，点击NanoDrop的图标，进入程序；



c) 用专用的纸，将NanoDrop的上下两个触点轻轻的擦拭3-4遍；

d) 将EB buffer轻轻的滴到NanoDrop的中心小孔中，改好上盖；

e) 点击“Blank”；



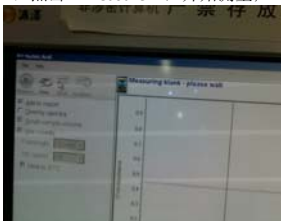
f) 再次将NanoDrop的触点擦拭干净，用纸不同的部位将其擦干净；



g) 滴入Bio-DNA；



h) 点击“Measure”，开始测量；



i) 将触头擦拭干净；

l) DNA质量的好坏，可以通过“260/280”的数值得到，在1.5~2.0之间最好，说明比较纯；

m) 将制备好的NA保存在-80℃中，准备做下面的实验。

序号	DNA fragment	浓度 (ng/ul)	2ug 对应的体积 (ul)
----	--------------	------------	----------------

1	1kb biotin DNA		
2	1 kb Dig DNA		

将PCR的产物，保存一部分10ul（-80度），以便后来使用（1、若酶切产量不够，就可以利用这些PCR产物，再次PCR，产出更多的产物；2、利用这些产物，便于后来构建新的DNA）

D、酶切过程

1、酶切的程序设计（反应体系的大小，参见NEB对应的酶的说明书）：

PCR最终产物为50ul，取出2ug/50ul 做酶切。我们需要做8个酶切的过程，注意50 ul体积中，DNA的量不要超过2 ug。

因为我们需要大量的DNA进行连接，所以酶切的过程需要多个50 ul的反应体系，我们每个反应建立了10个反应体系。

序号	DNA片段	限制性内切酶	setup		反应条件	灭活条件（本实验无需灭活）
1	1kb Bio标记DNA	XbaI	1、Cut Smart Buffer 2、1kb-Bio-DNA 3、XbaI 4、ddH2O	5ul（10x的缓冲液，总体积配到50ul） 3.9ul（DNA的质量不超过2ug） 1ul 40.1ul	Cut Smart Buffer 37℃，3小时	65℃，20分钟；
8	1kb Dig标记DNA	SacI-HF	1、Cut Smart Buffer 2、1kb-Dig-DNA 3、SacI-HF 4、ddH2O	5ul 4.ul 1ul 40ul	Cut Smart Buffer 37℃，3小时	SacI-HF 65℃，20分钟

酶切实验注意事项：

1）、反应体积

内切酶活力单位的定义是：1小时内，50ul反应体积中，降解1μg的底物DNA所需的酶为一个活力单位。因此酶：DNA的反应比例可以由此确定。较小的反应体积更容易受到移液器误差的影响。为了将甘油的浓度控制在5%以下，要注意酶的体积不要超过总体积的10%(一般酶都贮存于50%的甘油中)。

2）、混合

这是非常重要然而常常被忽略的一步。想要反应完全，必须使反应液充分混合。我们推荐用枪反复吸取混合，或是用手指轻弹管壁混合，然后再快速离心一下即可。注意：不可振荡！

3）、反应温度

大部分酶的反应温度为37°C;从嗜热菌中分离出来的内切酶则要求更高的温度。一般为50-65°C不等。

2、编写PCR程序（dbcut）

- （1）37℃ 保持4小时；
- （2）不需要灭活，因为跑胶过程会提纯出DNA，并且在胶中加入的Goldview也会灭活酶；
- （3）最终保持在4℃。
- （4）PCR程序运行时，注意选择“BLOCK”选项。

3、混匀步骤注意：

- a、将酶从冰箱中取出，并放置在冰面上；
- b、首先将除了酶以外的其他反应物混合，并用枪头细细混匀；
- c、将酶小心的加入；
- d、轻敲离心管，将反应物再次混匀；
- e、在离心机上离心（10000rpm，30 seconds）。

4、50ul/tube，并做好标记，将离心管放置到PCR中，开始酶切（因为在PCR仪中，最好的反应体积为50 ul）。

E、酶切产物提纯，采用PCR提纯试剂盒，并测浓度。

1、以前都是采用跑胶、胶提纯的方法，实际的产率非常的低。主要考虑酶切的小片段会影响后面连接的过程。

PCR的提纯试剂盒中，能够回收100bp-10kb的DNA片段，而小于100bp的小片段都会滤掉，因此采用PCR提纯即可，还可以保持比较高的提取率。

Binding capacity	10 μg
Elution volume	> 30 μl
Format	Tube
Fragment size	100 bp – 10 kb
Fragments removed	< 40mers
Processing	Manual
Sample type: applications	ssDNA or dsDNA from PCR and other enzymatic reactions
Technology	Silica technology
Type(s) of DNA recovered	ss DNA and dsDNA

<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/dna-cleanup/qiaquick-pcr-purification-kit#technicalspecification>

2、测DNA浓度。

序号	浓度 (ng/ul)
1	
2	

3、换算DNA的浓度。

1) 根据1kbDNA 1ug大约对应着1.6pmol，对我们得到的DNA进行换算。（DNA and RNA Molecular Weights and Conversions）

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>

dsDNA Size and Mass Conversions

Size (nt)	Daltons or g/mol	1 µg equivalent	
		pmol	molecules
20	12,306	81.26	4.89×10^{13}
100	60,898	16.42	9.89×10^{12}
300	182,378	5.48	3.3×10^{12}
500	303,858	3.29	1.98×10^{12}
1000	607,556	1.65	9.91×10^{11}
1800	1,093,478	0.91	5.51×10^{11}

$$\text{ng}/\mu\text{L} = \mu\text{g}/\text{mL} = 1.6 \text{ pmol}/\text{mL} = 1.6 \text{ nmol}/\text{L} = 1.6 \text{ nM}$$

2) 我们得到的各种DNA片段的浓度

序号	DNA片段	浓度 (nM)
1	1kb	
2	1kb	

F、连接过程

标准的程序设计：

EMAIL MY NEB PRINT PDF

Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202)

Protocol

- Sat up the following reaction in a microcentrifuge tube on ice.
(T4 DNA Ligase should be added last. Note that the table shows a ligation using a molar ratio of 1:3 vector to insert.)

COMPONENT	20 µl REACTION
10X T4 DNA Ligase Buffer*	2 µl
Vector DNA (3 kb)	50 ng (0.025 pmol)
Insert DNA (1 kb)	50 ng (0.076 pmol)
Nuclease-free water	to 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

* The T4 DNA Ligase Buffer should be thawed and resuspended at room temperature.

- Gently mix the reaction by pipetting up and down and microfuge briefly.
- For cohesive (sticky) ends, incubate at 16°C overnight or room temperature for 10 minutes.
- For blunt ends or single base overhangs, incubate at 16°C overnight or room temperature for 2 hours (alternatively, high concentration T4 DNA Ligase can be used in a 10 minute ligation).
- Chill on ice and transform 1-5 µl of the reaction into 50 µl competent cells.

(a) twist free 8kb target:

10×T4 buffer		4ul
1kb flourescein-DNA (片段1)		2ul (15 nM)
8kb DNA (片段3)		10ul (5 nM)
1kb Bio-DNA (片段5)		2ul (15 nM)
3kb 单个Dig-DNA (片段6)		6ul (15 nM)
T4 ligase		2ul
ddH2O		14ul

(b) twist free 177-12 target:

10×T4 buffer		4ul
1kb flourescein-DNA (片段1)		3ul (21 nM)
177-12 DNA 47.9ng/ul (片段9)		8ul (7 nM)
1kb Bio-DNA (片段5)		2ul (21 nM)
3kb 单个Dig-DNA (片段6)		8ul (21 nM)
T4 ligase		2ul
ddH2O		13ul

2、反应条件，在PCR仪上编写A76 LW程序

(1) 16°C，反应时间20小时；

- (2) (不需要灭活) ;
- (3) 保持在4℃。

3、分装

- (1) 用10mM的TRIS HCL+10nM的EDTA稀释DNA成50pM;
- (2) 每管2ul, 分装完成后立刻保存在-80℃。

4、测试

能够得到11um左右完整的DNA。