



中华人民共和国国家标准

GB/T 25168—2010

畜禽 cDNA 文库构建与保存技术规程

Technical regulation of farm animals cDNA library construction and preservation

2010-09-26 发布

2011-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:马月辉、关伟军、陆涛峰、李向臣、佟春玲、余露露、刘鹏。



畜禽 cDNA 文库构建与保存技术规程

1 范围

本标准规定了畜禽 cDNA 文库构建方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽 cDNA 文库构建与保存。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

cDNA complementary deoxyribonucleic acid

以成熟 mRNA 为模板,在反转录酶的作用下合成的 cDNA 链。

3.2

cDNA 文库 cDNA library

将处于特定发育阶段真核生物体的特定器官或组织中提取的总 RNA,经过反转录等一系列的生化反应合成双链 cDNA 群体后,再插入到适当的载体上,经转化寄主菌株构成特定的 cDNA 克隆群体。

3.3

寡核苷酸 oligonucleotide

一类只有 20 个以下碱基对的短链核苷酸的总称,常用作探针确定 DNA 或 RNA 的结构。

3.4

噬菌斑 plaque

被噬菌体感染的细菌所释放的子代噬菌体,会继续感染周围的细胞,致使在琼脂平板上生长的菌苔中有大量的细胞发生裂解,形成的透明区域。

4 试剂及溶液配制

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 一级用水的要求。

4.1 焦碳酸二乙酯(diethyropyrocarbonate, DEPC)处理水

在 1 000 mL 去离子水中加入 1 mL DEPC,37 °C 静置 12 h,高压灭菌(120 °C 30 min)。

4.2 2 mol/L MgSO₄

称取 246.50 g MgSO₄ · H₂O,加 400 mL 双蒸水(double distilled H₂O, ddH₂O)溶解后,定容到 500 mL,高压灭菌。

4.3 10 mmol/L MgSO₄

量取 1 mL 2 mol/L MgSO₄ 加 ddH₂O 定容到 200 mL,高压灭菌,30 min。

4.4 1 mol/L Tris-Cl(pH7.5)

称取 121.14 g Tris,碱溶于 800 mL ddH₂O 中,调 pH 至 7.5,定容到 1 L,高压灭菌。

4.5 SM 缓冲液

称取 5.80 g NaCl、2.00 g MgSO₄ · 7H₂O,量取 50 mL 1 mol/L Tris-Cl(pH7.5)和 5 mL 2%(质

量浓度)明胶,定容到 1 L,高压灭菌。

4.6 5×一链缓冲液

250 mmol/L Tris(pH8.3),30 mmol/L MgCl₂,375 mmol/L KCl。

4.7 10×DNA 连接酶缓冲液

500 mmol/L Tris-Cl(pH7.8),100 mmol/L MgCl₂,100 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),0.5 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)。

4.8 LB 液体培养基

取 10.00 g NaCl、10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨和 5.00 g 细菌培养用酵母提取物加 1 L ddH₂O 溶解后,高压灭菌。

4.9 LB 固体培养基

取 10.00 g NaCl、10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨、5.00 g 细菌培养用酵母提取物和 20.00 g 细菌培养用琼脂加 1 L ddH₂O 溶解后,高压灭菌。

4.10 LB 顶层培养基

将 0.70 g 琼脂糖加入 100 mL LB 液体培养基中,高压灭菌。

4.11 20%麦芽糖

取 20.00 g 麦芽糖溶于 100 mL ddH₂O 中,过滤除菌。

5 主要仪器、设备

水浴锅、电泳仪、电泳槽、电子天平、电热恒温鼓风干燥箱、培养箱、PCR 扩增仪、超纯水仪、-80℃低温冰箱、凝胶自动成像分析系统和低温离心机等。

6 cDNA 文库构建

6.1 样品采集

畜禽机体的组织可作为构建 cDNA 文库的实验材料。将新鲜离体的组织样品迅速投放到液氮中,或剪切成 1 mm³ 大小的组织碎块后放入 RNA 保存液中。

6.2 总 RNA 提取

使用 TRIzol 法提取畜禽组织的总 RNA。在不断填充液氮的研钵中将 30 mg~100 mg 的组织样品磨碎,加入 1 mL Trizol(含有酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉和 β-巯基乙醇的单相液),混匀后移至经 DEPC 处理水浸泡过的离心管中,静置 5 min。加入 200 μL 三氯甲烷,混匀,静置 2 min~3 min,4℃下,13 200g 离心 15 min。移上清至另一离心管中,加入 400 μL 异丙醇,混匀后静置 10 min,4℃下,13 200g 离心 10 min。弃上清,用 DEPC 处理水配制的 75%乙醇洗涤沉淀 2 次,室温静置 5 min~10 min,晾干后用 50 μL~100 μL 的 DEPC 处理水溶解沉淀后用 1%变性琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖 0.3 g,DEPC 处理水 21.6 mL,10×Mops 3 mL,37%甲醛 5.4 mL,核酸显示剂 2 μL~3 μL)检测 RNA 质量,于-80℃冰箱中保存。

6.3 cDNA 合成

6.3.1 cDNA 第一链合成

采用 5'末端 RNA 转录子转换机制(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript, SMART)技术合成全长 cDNA 双链。首先取一 PCR 管分别加入 0.05 μg~1.0 μg 总 RNA 样品、1.0 μL 10 μmol/L 经过修饰的 Oligo(dG)的寡核苷酸和 1.0 μL 10 mmol/L 经过修饰的 Oligo(dT)3'引物,添加 DEPC 处理水使总体积达到 5.0 μL,混匀,72℃下放置 2 min,冰浴 2 min。然后,分别加入 2.0 μL 5×一链缓冲液、1.0 μL 20 mmol/L DTT、1.0 μL 10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate,dNTP)和 1.0 μL 200 U/μL Primerscrip™反转录酶,混匀,42℃下放置 1 h,冰浴 2 min 终止反应后进行下一步操作或-20℃下短期保存。

6.3.2 cDNA 第二链的合成

取一 PCR 管分别加入 2.0 μL 一链 cDNA、80 μL ddH₂O、10 μL 10×Ex taq 缓冲液、2.0 μL

2.5 mmol/L 50×dNTP、2.0 μL 10 μmol/L 5'引物、2.0 μL 10 μmol/L 经过修饰的 Oligo(dT)3'引物和 2.0 μL 5 U/μL *Ex taq* 酶,总体积为 100 μL,混匀,95 ℃ 预变性 25 s 后,95 ℃ 变性 25 s,68 ℃ 退火延伸 6 min,共 21 个循环。用 1.1%琼脂糖对 5.0 μL PCR 产物进行电泳检测,双链 cDNA 的分布范围在 0.1 kb~4.0 kb 之间。

引物序列为:

5' 引物序列 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'

3' 引物序列 5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30N₋₁N-3'

(N=A,G,C 或 T;N₋₁=A,G 或 C)

6.4 cDNA 的纯化、酶切与分离

6.4.1 cDNA 的纯化

取一 PCR 管分别加入 50 μL 2.0 μg~3.0 μg 双链 cDNA、2.0 μL 20 μg/μL 蛋白酶 K,混匀,45 ℃ 下放置 20 min。然后加入 50 μL ddH₂O 和 100 μL 苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),混匀,13 200g 离心 5 min。移上清至另一离心管中,加入 100 μL 三氯甲烷-异戊醇(24:1),混匀,13 200g 离心 5 min。移上清至另一离心管中,分别加入 10 μL 3 mol/L 乙酸钠(pH4.8)、1.3 μL 20 μg/μL 肝糖元、260 μL 95%乙醇,13 200g 离心 20 min。弃上清,用 100 μL 80%乙醇洗涤沉淀后干燥 10 min,然后加入 79 μL ddH₂O 溶解沉淀。

6.4.2 cDNA 的酶切

取一 PCR 管分别加入 79 μL 双链 cDNA、10 μL 10×*Sfi* I 缓冲液、10 μL 20 U/μL *Sfi* I 内切酶和 1.0 μL 100×BSA,总体积为 100 μL,混匀,50 ℃ 下放置 2 h。加 2.0 μL 1%的二甲苯胺指示剂,混匀。

6.4.3 cDNA 的分离

重悬分离柱内容物,自然滴尽柱中溶剂,加入 700 μL 柱缓冲液,滴尽。加入 100 μL 酶切产物,滴尽。加入 100 μL 柱缓冲液,滴尽。加入 600 μL 柱缓冲液,用 16 支离心管分别逐滴收集,每管一滴。每管取 3.0 μL 样品,用 1.1%琼脂糖凝胶进行片段大小检测。收集 300 bp 以上的 cDNA 片段于一离心管中,分别加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠(pH4.8)、1.3 μL 20 mg/mL 肝糖元和 2.5 体积 95%乙醇,混匀,-20 ℃ 下沉淀 12 h。4 ℃ 下,13 200g 离心 20 min,弃上清,干燥 10 min,7.0 μL ddH₂O 溶解沉淀,混匀,-20 ℃ 保存。

6.5 cDNA 片段与载体的连接

取一 PCR 管分别加入 100 ng 的 cDNA、1.0 μL 500 ng/μL λTripl Ex2 载体、0.5 μL 10×DNA 连接缓冲液、0.5 μL 10 mmol/L 三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate,ATP)、0.5 μL 400 U/μL T4 DNA 连接酶,加 ddH₂O 使总体积达到 5.0 μL,混匀,16 ℃ 下连接 12 h。

6.6 cDNA 重组体的包装

解冻包装蛋白抽提物,取 10 μL,加入 4.0 μL 连接产物,混匀,22 ℃ 下包装 2 h 后加入 500 μL SM 缓冲液和 20 μL 三氯甲烷,混匀。进行未扩增文库滴度测定或 4 ℃ 保存。

7 文库的扩增与保存

在含 10 mmol/L MgSO₄、终浓度为 0.2%麦芽糖的 LB 液体培养基中培养 VCS257 菌,使细菌 OD₆₀₀ 值为 2.0,1 000g 离心 10 min,然后用 10 mmol/L MgSO₄ 重悬细胞,调 OD₆₀₀ 值至 4.0。分别在 20 个离心管中加入 500 μL 的菌液和足够形成 6.0×10⁴ 个~7.0×10⁴ 个噬菌斑的稀释包装液,37 ℃ 放置 15 min 后加到 3 mL LB 顶层培养基中,混匀,立即倒入 LB 琼脂平板中,涂匀,37 ℃ 放置 6 h~18 h,直至噬菌斑相互接触后,每个平板上再加 12 mL SM 缓冲液,4 ℃ 放置 12 h 后,50 r/min,37 ℃ 振荡培养 1 h。最后将噬菌体溶解物移至 50 mL 离心管中,加入 10 mL 三氯甲烷,混匀,2 000g 离心 10 min,再将上清液转移到另一离心管,加二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)至终浓度为 7%后分装,-70 ℃ 长期保存。