

cDNA 文库构建

cDNA 文库

[原理]:

cDNA 文库不同于基因组文库, 被克隆 DNA 是从 mRNA 反转录来源的 DNA。CDNA 组成特点是其中不含有内含子和其他调控序列。从而做 cDNA 克隆时应是先从获得 mRNA 开始, 在此基础上, 通过反转录酶作用产生一条与 mRNA 相互补的 DNA 链, 然后除掉 mRNA, 以第一条 DNA 链为模板复制出第二条 DNA 链 (双链); 再进一步把此双链插入原核或真核载体。

cDNA 文库的构建

分为六个阶段:

阶段 1: 反转录酶催化合成 cDNA 第一链

阶段 2: cDNA 第二链的合成

阶段 3: cDNA 的甲基化

阶段 4: 接头或衔接子的连接

阶段 5: Sepharose CL-4B 凝胶过滤法分离 cDNA

阶段 6: cDNA 与λ噬菌体臂的连接

[阶段 1: 反转录酶催化合成 cDNA 第一链]

1. 在置于冰上的无菌微量离心管内混合下列试剂进行 cDNA 第一链的合成:

poly(A) ⁺ RNA (1μg/μl)	10μl
寡核苷酸引物(1μg/μl)	1μl

1mol/L Tris-HCl (pH8.0, 37°C)	2.5μl
1mol/L KCl	3.5μl
250 mmol/L MgCl ₂	2μl
dNTP 溶液 (含 4 种 dNTP, 每种 5mmol/L)	10μl
0.1 mol/L DTT	2μl
RNase 抑制剂 (选用)	25 单位
加 H ₂ O 至	48μl

2. 当所有反应组在 0°C 混合后, 取出 2.5μl 反应液转移到另一个 0.5ml 微量离心管内。在这个小规模反应管中加入 0.1μl [α -³²P] dCTP (400 Ci/mmol, 10mCi/ml) 。
3. 大规模和小规模反应管都在 37°C 温育 1h。
4. 温育接近结束时, 在含有同位素的小规模反应管中加入 1μl 0.25mol/L EDTA, 然后将反应管转移到冰上。大规模反应管则在 70°C 温育 10 min, 然后转移至冰上。
5. 参考《分子克隆实验指南》第三版附录 8 所述方法, 测定 0.5μl 小规模反应物中放射性总活度和可被三氯乙酸 (TCA) 沉淀的放射性活度。此外, 用合适的 DNA 分子质量参照物通过碱性琼脂糖凝胶电泳对小规模反应产物进行分析是值得的。
6. 按下述方法计算 cDNA 第一链的合成量 (推算方法略) :

$$[\text{掺入的活度值(cpm)}/\text{总活度值}] \times 66(\mu\text{g}) = \text{合成的 cDNA 第一链}(\mu\text{g})$$
7. 尽可能快地进行 cDNA 合成的下一步骤。

[阶段 2: cDNA 第二链的合成]

1. 将下列试剂直接加入大规模第一链反应混合物中:

10 mmol/L MgCl ₂	70μl
-----------------------------	------

2 mol/L Tris-HCl (pH7.4)	5μl
10 mCi/ml[α- ³² P] dCTP (400 Ci/mmol)	10μl
1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	1.5μl
RNase H (1000 单位/ml)	1μl
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (10 000 单位/ml)	4.5μl

温和振荡将上述试剂混合，在微量离心机稍离心，以除去所有气泡。在 16℃温育 2~4h。

2. 温育结束，将下列试剂加到反应混合物中：

β-NAD (50 mmol/L)	1μl
大肠杆菌 DNA 连接酶(1000~4000 单位/ml)	1μl

室温温育 15min。

3. 温育结束，加入 1μl 含有 4 种 dNTP 的混合物和 2μl T4 噬菌体 DNA 聚合酶。反应混合物室温温育 15 分钟。

4. 取出 3μl 反应物，按步骤 7 和 8 描述的方法测定第二链 DNA 的质量。

5. 将 5μl 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)加入剩余的反应物中，用酚：氯仿和氯仿分别抽提混合物一次。在 0.3 mol/L(pH5.2)乙酸钠存在下，通过乙醇沉淀回收 DNA，将 DNA 溶解在 90μl TE(pH7.6)溶液中。

6. 将下列试剂加到 DNA 溶液中：

10×T4 多核苷酸激酶缓冲液	10μl
T4 多核苷酸激酶 (3000 单位/ml)	1μl

室温温育 15 分钟。

7. 测定从上面步骤 4 取出的 3μl 反应物中放射性活度，并按《分子克隆实验指南》第三版附录 8 所述方法测定 1μl 第二链合成产物中能被三氯乙酸沉淀的放射性活度。

8. 用下面公式计算第二链反应中所合成的 cDNA 量。要考虑到已掺入到 DNA 第一链种的 dNTP 的量。

$$[\text{第二链反应中所掺入的活度值(cpm)/总活度值(cpm)}] \times (66\mu\text{g} - x\mu\text{g}) = \text{cDNA 第二链合成量}/\mu\text{g}$$

x 表示 cDNA 第一链量。CDNA 第二链合成量通常为第一链量的 70~80%

9. 用等量酚：氯仿对含有磷酸化 cDNA（来自步骤 6）的反应物进行抽提。
10. Sephadex G-50 用含有 10 mmol/L NaCl 的 TE(pH7.6)溶液进行平衡，然后通过离子柱层析将未掺入的 dNTP 和 cDNA 分开。
11. 加入 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠（pH5.2）和 2 倍体积的乙醇，沉淀柱层析洗脱下来的 cDNA，将样品置于冰上至少 15 分钟，然后在微量离心机上以最大速度 4℃离心 15 分钟，回收沉淀 DNA。用手提微型监测仪检查，是否所有放射性都沉淀下来。
12. 用 70%乙醇洗涤沉淀物，重复离心。
13. 小心吸出所有液体，空气干燥沉淀物。
14. 如果需要用 *EcoR* I 甲基化酶对 cDNA 进行甲基化, 可将 cDNA 溶解于 80μl TE(pH7.6) 溶液中。另外，如果要将 cDNA 直接与 *Not* I 或 *Sal* I 接头或寡核苷酸衔接子相连，可将 cDNA 悬浮在 29μl TE(pH7.6)溶液。沉淀的 DNA 重新溶解后，尽快进行 cDNA 合成的下一步骤。

[阶段 3: cDNA 的甲基化]

1. 在 cDNA 样品中加入以下试剂：

2 mol/L Tris-HCl (pH8.0)	5μl
5 mol/L NaCl	2μl

0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	2μl
20 mmol/L S-腺苷甲硫氨酸	1μl
加 H ₂ O 至	96μl

2. 取出两小份样品（各 2μl）至 0.5ml 微量离心管中，分别编为 1 号和 2 号，置于冰上。
3. 在余下的反应混合液中加入 2μl *EcoR* I 甲基化酶（80 000 单位/ml），保存在 0°C 直至步骤 4 完成。
4. 再从大体积的反应液中吸出另外两小份样品（各 2μl）至 0.5ml 微量离心管中，分别编为 3 号和 4 号。
5. 在所有四小份样品（来自步骤 2 和步骤 4）加入 100 ng 质粒 DNA 或 500 ng 的λ噬菌体 DNA。这些未甲基化的 DNA 在预实验中用作底物以测定甲基化效率。
6. 所有四份小样实验反应和大体积的反应均在 37°C 温育 1h。
7. 于 68°C 加热 15min，用酚：氯仿抽提大体积反应液一次，再用氯仿抽提一次。
8. 在大体积反应液中加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠（pH5.2）和 2 倍体积的乙醇，混匀后贮存于-20°C 直至获得小样反应结果。
9. 按下述方法分析 4 个小样对照反应：
 - a. 在每一对照反应中分别加入：

0.1 mol/L MgCl ₂	2μl
10× <i>EcoR</i> I 缓冲液	2μl
加 H ₂ O 至	20μl
 - b. 在 2 号和 4 号反应管中分别加入 20 单位 *EcoR* I。
 - c. 四个对照样品于 37°C 温育 1h，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。
10. 微量离心机以最大速度离心 15min(4°C)以回收沉淀 cDNA。弃上清，加入 200μl 70%

乙醇洗涤沉淀，重复离心。

11. 用手提式微型探测器检查是否所有放射性物质均被沉淀。小心吸出乙醇，在空气中晾干沉淀，然后将 DNA 溶于 29 μ l TE (pH8.0)。

12. 尽可能快地进行 cDNA 合成的下一阶段。

[阶段 4: 接头或衔接子的连接]

cDNA 末端的削平

1. cDNA 样品于 68°C 加热 5 min。

2. 将 cDNA 溶液冷却至 37°C 并加入下列试剂:

5 \times T4 噬菌体 DNA 聚合酶修复缓冲液	10 μ l
dNTP 溶液, 每种 5 mmol/L	5 μ l
加 H ₂ O 至	50 μ l

3. 加入 1~2 单位 T4 噬菌体 DNA 聚合酶 (500 单位/ml), 37°C 温育 15min。

4. 加入 1 μ l 0.5mol/L EDTA(pH8.0), 以终止反应。

5. 用酚: 氯仿抽提, 再通过 Sephadex G-50 离心柱层析, 除去未掺入的 dNTP。

6. 在柱流出液中加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH5.2) 和二倍体积的乙醇, 样品于 4°C 至少放置 15 min。

7. 在微量离心机上以最大速度离心 15 min(4°C), 回收沉淀的 cDNA。沉淀经空气干燥后溶于 13 μ l 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)。

接头-衔接子与 cDNA 的连接

8. 将下列试剂加入到已削成平末端的 DNA 中:

10 \times T4 噬菌体 DNA 聚合酶修复缓冲液	2 μ l
---------------------------------	-----------

800~1000 ng 的磷酸化接头或衔接子 2 μ l

T4 噬菌体 DNA 连接酶 (10⁵ Weiss 单位/ml) 1 μ l

10 mmol/L ATP 2 μ l

混匀后，在 16°C 温育 8~12h。

9. 从反应液中吸出 0.5 μ l 贮存于 4°C，其余反应液于 68°C 加热 15min 以灭活连接酶。

[阶段 5: Sepharose CL-4B 凝胶过滤法分离 cDNA]

Sepharose CL-4B 柱的制备

1. 用带有弯头的皮下注射针头将棉拭的一半推进 1ml 灭菌吸管端部，用无菌剪刀剪去露在吸管外的棉花并弃去，再用滤过的压缩空气将余下的棉拭子吹至吸管狭窄端。
2. 将一段无菌的聚氯乙烯软管与吸管窄端相连，将吸管宽端浸于含有 0.1 mol/L NaCl 的 TE (pH7.6) 溶液中。将聚氯乙烯管与相连于真空装置的锥形瓶相接。轻缓抽吸，直至吸管内充满缓冲液，用止血钳关闭软管。
3. 在吸管宽端接一段乙烯泡沫管，让糊状物静置数分钟，放开止血钳，当缓冲液从吸管滴落时，层析柱亦随之形成。如有必要，可加入更多的 Sepharose CL-4B，直至填充基质几乎充满吸管为止。
4. 将几倍柱床体积的含 0.1 mol/L 氯化钠的 TE(pH7.6) 洗涤柱子。洗柱完成后，关闭柱子底部的软管。

依据大小分离回收 DNA

5. 用巴斯德吸管吸去柱中 Sepharose CL-4B 上层的液体，将 cDNA 加到柱上（体积 50 μ l 或更小），放开止血钳，使 cDNA 进入凝胶。用 50 μ l TE(pH7.6) 洗涤盛装 cDNA 的微量离心管，将洗液亦加于柱上。用含 0.1 mol/L NaCl 的 TE(pH7.6) 充满泡沫管。

6. 用手提式小型探测器监测 cDNA 流经柱子的进程。放射性 cDNA 流到柱长 2/3 时，开始用微量离心管收集，每管 2 滴，直至将所有放射性洗脱出柱为止。
7. 用切仑科夫计数器测量每管的放射性活性。
8. 从每一管中取出一小份，以末端标记的已知大小 (0.2kb~5kb) 的 DNA 片断作标准参照物，通过 1%琼脂凝胶电泳进行分析，将各管余下部分贮存于-20℃，直至获得琼脂糖凝胶电泳的放射自显影片。
9. 电泳后将凝胶移至一张 Whatman 3MM 滤纸上，盖上一张 Saran 包装膜，并在凝胶干燥器上干燥。干燥过程前 20min 至 30min 于 50℃加热凝胶，然后停止加热，在真空状态继续干燥 1~2h.
10. 置-70℃加增感屏对干燥的凝胶继续 X 射线曝光。
11. 在 cDNA 长度≥500bp 的收集管中，加入 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠 (pH5.2) 和二倍体积的乙醇。于 4℃放置至少 15min 使 cDNA 沉淀，用微量离心机于 4℃以 12 000g 离心 15min，以回收沉淀的 cDNA。
12. 将 DNA 溶于总体积为 20μl 的 10 mmol/L Tris-HCl(pH7.6)中。
13. 测定每一小份放射性活度。算出选定的组分中所得到的总放射性活度值。计算可用于 λ噬菌体臂相连接的 DNA 总量。

$$[\text{选定组分的总活度值(cpm)}/\text{掺入到第二链的活度值(cpm)}] \times 2 \times \mu\text{g cDNA 第二链合成量} \\ = \text{可用于连接的 cDNA}$$

[阶段 6: cDNA 与λ噬菌体臂的连接]

1. 按下述方法建立 4 组连接-包装反应：

连接	A(μl)	B(μl)	C(μl)	D(μl)
λ噬菌体 DNA(0.5μg/μl)	1.0	1.0	1.0	1.0

10×T4DNA 连接酶缓冲液	1.0	1.0	1.0	1.0
cDNA	0 ng	5 ng	10 ng	50 ng
T4 噬菌体 DNA 连接酶 (10 ⁵ Weiss 单位/ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
10 mmol/L ATP	1.0	1.0	1.0	1.0
加 H ₂ O 至	10	10	10	10

连接混合物于 16°C 培育 4~16h。剩余的 cDNA 储存于 -20°C。

- 按包装提取物厂商提供的方法，从每组连接反应物中取 5μl 包装到噬菌体颗粒中。
- 包装反应完成后，在各反应混合物中加入 0.5ml SM 培养基。
- 预备适当的大肠杆菌株新鲜过夜培养物，包装混合物做 100 倍稀释，各取 10μl 和 100 μl 涂板，于 37°C 或 42°C 培养 8~12 小时。
- 计算重组噬菌斑和非重组噬菌斑，连接反应 A 不应产生重组噬菌斑，而连接反应 B、C 和 D 应产生数目递增的重组噬菌斑。
- 根据重组噬菌斑的数目，计算 cDNA 的克隆效率。
- 挑取 12 个重组λ噬菌体空斑，小规模培养裂解物并制备 DNA，以供适当的限制性内切核酸酶消化。
- 通过 1% 琼脂凝胶电泳分析 cDNA 插入物的大小，用长度范围 500bp~5kb 的 DNA 片段作为分子质量参照。