



**Membrane
Yeast Two-Hybrid Library
Construction Kit**

**膜蛋白酵母双杂交建库
试剂盒 (5T)**

Catalog#JKR23009M

Sufficient reagents for library construction assays per kit.

Store at -80°C~4°C

目录

一、产品简介	02
二、产品组分	02
三、实验流程概要	04
四、实验时间表	05
五、适用范围	06
六、自备材料	06
七、注意事项	06
八、实验步骤	06
1. 总RNA提取和质量检测	06
2. mRNA纯化	07
3. 第一链 cDNA 的合成	08
4. 第二链 cDNA 的合成	09
5. 双链cDNA纯化	10
6. 双链cDNA酶切和分级分离	10
7. 纯化的双链 cDNA 组分小量连接与纯化	11
8. 纯化的双链 cDNA 组分小量转化	12
9. 双链cDNA大量连接与纯化	14
10. 双链cDNA大量连接产物转化	15
11. 文库插入片段鉴定	15
九、问题解决方案	16
十、附录	18



一、产品简介

酵母膜体系文库构建试剂盒,提供了一种从总RNA或者poly A+ RNA获得高质量全长cDNA文库的方法。本试剂盒在基于分离的泛素(split-ubiquitin)介导的膜蛋白酵母双杂交系统上,通过对pPR3-N序列载体进行改造,额外增加了三框文库的构建。本产品适用于从100~500 μg不同来源的真核生物总RNA中,经过mRNA分离、单链cDNA合成、双链cDNA合成、双链cDNA分选、小量连接转化、大量连接转化,构建获得高质量的酵母cDNA文库。该试剂盒提供的试剂可以用来构建5个cDNA文库。相较于市面上其他的试剂盒,本试剂盒针对文库质量做了以下优化:

1. 该试剂盒提供的反转录酶是市面上经过改造的MMLV反转录酶,显著增加了反转录酶的热稳定性和半衰期,合成cDNA效率更高,片段长度完整性更好;
2. 该试剂盒通过对pPR3-N载体进行了移码突变,形成三个不同的读码框(命名为pPR3-NS-1, pPR3-NS-2, pPR3-NS-3),相对传统以引物的方式引入的突变而言,新型的三框文库构建方式只需要合成一份双链cDNA,可以保证三框文库的片段长度,阳性率,文库滴度等信息的一致性。
3. 该试剂盒在三框文库载体的基础上,通过引入CCDB自杀基因极大降低了空载的产生,基本实现100%阳性率;
4. 该试剂盒提供的DH10B是经过高抗性压力筛选的菌株,配合试剂盒中的最优方法制备的感受态以及对应的仪器工作条件,文库的转化效率能够达到至少 1×10^{10} ;
5. 该试剂盒提供的试剂与市面上其他公司相比,更加齐全,基本不需要再额外购买其他试剂材料。

二、产品组分

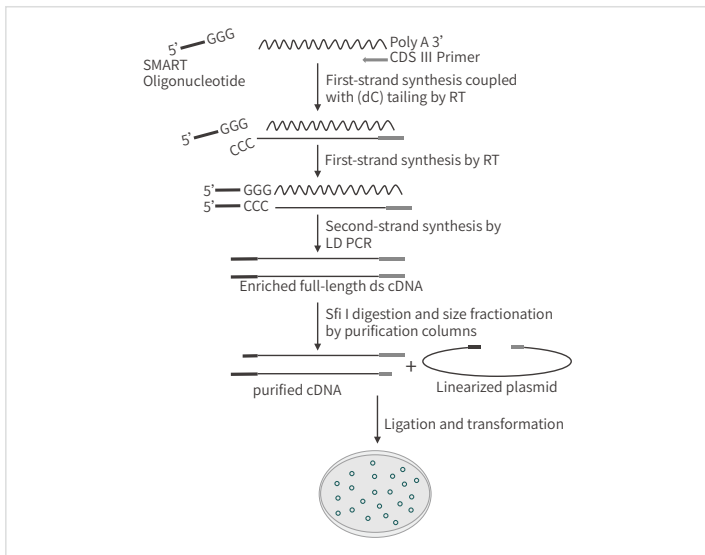
分类	编号	组分名称	5T提供量	保存温度	存放位置
引物	23009-1	SMART Oligonucleotide (10uM)	10μL	- 80°C	BoxA
	23009-2	pPR3-F Primer(10μM)	500μL×3	- 20°C	BoxA
	23009-3	pPR3-R Primer(10μM)	500μL×3	- 20°C	BoxA
	23009-4	5' PCR Primer(10uM)	100μL	- 20°C	BoxA
	23009-5	3' PCR Primer(10uM)	100μL	- 20°C	BoxA
	23009-6	CDS III Primer(10uM)	20μL	- 20°C	BoxA
试剂	23009-A1	RNA control	10μL	- 80°C	BoxA
	23009-A2	dNTP mix(各10mM)	50μL	- 20°C	BoxA

分类	编号	组分名称	5T提供量	保存温度	存放位置
试剂	23009-A3	5× FS Buffer	30μL	- 20°C	BoxA
	23009-A4	DTT(100mM)	10μL	- 20°C	BoxA
	23009-A5	Reverse Transcriptase(200U/uL)	10μL	- 20°C	BoxA
	23009-A6	50× Advantage 2 Polymerase Mix	20μL	- 20°C	BoxA
	23009-A7	10× Advantage 2 Buffer	150μL	- 20°C	BoxA
	23009-A8	RNase H(5U/uL)	10μL	- 20°C	BoxA
	23009-A9	RNase-free water	1mL	- 20°C	BoxA
	23009-A10	deionized water	1mL	- 20°C	BoxA
	23009-B1	10× Restriction Buffer	100μL	- 20°C	BoxA
	23009-B2	sfil(20U/uL)	50μL	- 20°C	BoxA
	23009-B3	10× T4 DNA Ligase Buffer	100μL	- 20°C	BoxA
	23009-B4	T4 DNA Ligase(400U/uL)	60μL	- 20°C	BoxA
	23009-B5	Glycogen(5mg/mL)	50μL	- 20°C	BoxA
	23009-B6	NH ₄ Ac(7.5 M)	500μL	- 20°C	BoxA
	23009-C1	DH10B	500μL	- 80°C	BoxA
	23009-C2	pPR3-NS-1,2,3 Linearized plasmid	100μL	- 20°C	BoxA
	23009-C3	2× PCR Master Mix	5mL×2	- 20°C	BoxA
	23009-D1	Oligo (dT) ₂₅ beads	1mL	4°C	BoxB
	23009-D2	Binding Buffer	5mL	4°C	BoxB
	23009-D3	Washing Buffer	5mL	4°C	BoxB
	23009-D4	10 mM Tris-HCl	1mL	4°C	BoxB
	23009-E1	Sodium acetate (3M, pH5.0)	200μL	室温	BoxC
	23009-E2	PCR-Pure Kit (10 columns, 10 mL CP buffer, 30 mL PW buffer, 1 mL TE buffer)	1kit	室温	BoxC

分类	编号	组分名称	5T提供量	保存温度	存放位置
试剂	23009-E3	Xylene cyanol (二甲苯蓝)	200 μ L	室温	BoxC
	23009-E4	Purification columns	5个	室温	BoxC
	23009-E5	Column buffer	20mL	室温	BoxC
	23009-E6	清洗缓冲液母液粉末	1.5g	室温	BoxC

备注：试剂盒收到后按照组分信息中保存条件，将试剂依据要求存放，避免污染与反复冻融，稀释成工作浓度试剂即用即弃，不可重复使用！

三、实验流程概要



四、实验时间表



五、适用范围

酵母膜体系文库构建试剂盒构建的文库，后续可用于膜蛋白-膜蛋白或膜蛋白-可溶性蛋白之间的互作筛选，主要运用该系统实现筛选得到和膜蛋白互作的蛋白。

六、自备材料

RNase-free的离心管和移液器的tip头，PCR仪，磁力架，电穿孔仪，电转杯，琼脂糖凝胶电泳仪，凝胶成像分析仪，无水乙醇，80%乙醇，提取总RNA以及制备固/液体培养基所需的所有材料，DNA Marker。

七、注意事项

1. 总RNA起始材料以及纯化的mRNA的完整性和纯度是合成高质量双链cDNA的前提，一定要先检查总RNA和纯化的mRNA的质量，保证质量的前提下再进行后续实验，我们强烈建议，样本尽量保持新鲜，如果需要药物胁迫处理，尽量要把残留药物去除干净，以免影响RNA的提取。
2. 总RNA提取、mRNA纯化以及第一链cDNA合成的整个实验流程，均需要在无RNase污染的情况下进行，需要佩戴口罩与手套，使用的所有离心管和移液器的tip头均为无RNase污染的，且所有反应尽量在冰上进行。
3. 总RNA提取、mRNA纯化以及第一链cDNA合成的整个实验流程最好在一天以内完成，避免RNA降解对后续实验产生影响。
4. 最后在反应混合物中加入酶。通过轻轻地上下移取混合物，确保酶完全混合到反应混合物中。
5. 尽量不要增加任何反应的规模（体积），所有组分都已针对指定的体积进行了优化。

八、实验步骤

1. 总RNA提取和质量检测

- 1) 总RNA起始材料的完整性和纯度是高质量cDNA合成的重要元素。可根据实验材料来选择合适的试剂盒用于总RNA的提取。
- 2) 总RNA质量检测：配置1%的琼脂糖胶，取2 μ L总RNA与loading buffer混匀后跑胶，胶槽需要用超纯水冲洗干净，电泳缓冲液也需要换成新的，在200V恒压下跑胶15min后扫胶，如图1所示，质量好的RNA在琼脂糖凝胶上可观察到两条明亮的条带，28S:18S RNA的比例可以评估总RNA的完整性，真核RNA的理论28S:18S比率约为2:1。对于哺乳动物的总RNA，带的强度比应为1.5~ 2.5:1。

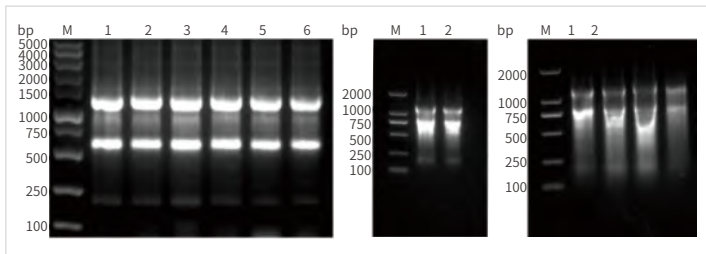


图1 总RNA跑胶示例图

(左图总RNA样品是合格的,中间和右图总RNA样品不合格)

- 3) 总RNA稳定性检测:从总RNA中取出2 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育2 h以上,电泳检测后与原RNA无明显区别,说明没有RNase的污染,是比较稳定的,可以进行下一步实验。如果孵育2 h后,总RNA降解严重,则需要重新提取总RNA。

2.mRNA纯化

我们强烈建议使用经过纯化的mRNA作为起始材料来进行单双链合成,纯化的mRNA可以排除rRNA和tRNA对下游PCR扩增产生的非特异性干扰,增强文库的有效扩增。使用mRNA purification kit将mRNA从100 μ g~500 μ g完整度良好的总RNA中进行分离纯化。

- 1) 测定样品总RNA浓度,取100 μ g总RNA样品加DEPC水定容至100 μ L,65 $^{\circ}$ C水浴处理5min后,破坏二级结构,冰上放置备用。
- 2) 将磁珠充分重悬后吸取200 μ L转移至RNase-free的PCR管中,将PCR管置于磁力架上30s或至磁珠完全沉淀于离心管底部。
- 3) 弃上清,离心管从磁力架上移开后,加入100 μ L Binding Buffer重悬磁珠,将离心管放回磁力架,待磁珠完全沉淀后弃上清,将离心管从磁力架上移开,加入100 μ L Binding Buffer重悬磁珠。
- 4) 将RNA样品加入离心管中,充分混匀,用移液器快速吹打5min,使mRNA与磁珠上的寡聚胸腺嘧啶(dT)₂₅退火结合。
- 5) 将离心管置于磁力架上至溶液澄清,去上清。
- 6) 将离心管从磁力架上移开,用200 μ L Washing Buffer清洗mRNA-磁珠的混合物2次,每次清洗后借助磁力架将上清去除,可以留2 μ L液体,避免吸到磁珠。

- 7) 向离心管中加入15 μL 10 mM Tris-HCL, pH 7.5的缓冲液, 全部转入灭菌的PCR管中, 打开PCR仪, 设置为65°C, 将加入样品的PCR管, 放入PCR仪, 同时在2min内把PCR仪温度从65°C升至80°C, 然后迅速置于磁力架上, 带溶液澄清后将上清转移至新的RNase-free 离心管中。

程序: 65°C 8s 14 cycLes 每个循环加1度
80°C 2s

注意: 当温度升到65°C再把样本放入PCR仪中, 当温度升到80°C立即把样本拿出置于冰上静置2 min。

- 8) 将离心管置于磁力架上至溶液澄清, 转移上清至一个新的RNase-free的PCR管中, 取5 μL 用于琼脂糖凝胶电泳, 剩下的用于合成第一链 cDNA。mRNA琼脂糖凝胶电泳的条件与总RNA的一致, 如图所示, mRNA电泳后在琼脂糖凝胶上显示的是一条弥散的带, 主要分布在1~3 kb范围内。如果没有检测到信号, 或者大部分信号明显小于1kb, 则需要重新进行mRNA的分离。

3.第一链 cDNA的合成

- 1) RNase-free的PCR管中加入以下物质, 高速离心混匀: (X=总RNA加1 μg , 浓度至少为0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。mRNA至少加0.3 μg 以上, 浓度至少为0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

总RNA/mRNA样品	X μL
CDSIII引物 (10 μM)	1 μL
dNTP Mix(10mM)	1 μL
RNase-free H ₂ O	11-X μL
总体积	13 μL

- 2) 72°C温育2分钟;
3) 迅速冰上冷却2分钟; 11,000rpm,10s;
4) 将以下混合物配好并加入上述PCR离心管中, 混匀:

5×First-Strand Buffer	4.0 μL
DTT(100mM)	1.0 μL
Superscript III (Reverse Transcriptase)	1.0 μL
总体积	6.0 μL

- 5) 42°C温育10分钟(用PCR仪)；
- 6) 加入1μL SMART Oligonucleotide (10μM) 引物，混匀，42°C孵育半小时；50°C孵育半小时；
- 7) 85°C温育5分钟，终止第一链的合成；
- 8) 冷却至室温，加入1 μL RNase H (2units)；
- 9) 37°C温育不少于20分钟，-20°C保存待用(单链cDNA可于-20°C保存3个月)。

4.第二链 cDNA的合成

- 1) 将第二链合成试剂从-20°C冰箱取出，解冻后涡旋混匀，短暂离心；按照下表所示，配制第二链cDNA合成反应液。

First-Strand cDNA	5 μL	10 μL
Deionized H ₂ O	33 μL	66 μL
10× advantage 2 buffer	5 μL	10 μL
dNTP Mix(10mM)	1 μL	2 μL
5' PCR Primer (10 μM)	2.5 μL	5 μL
3' PCR Primer (10 μM)	2.5 μL	5 μL
50× advantage 2 polymerase mix	1 μL	2 μL
Total	50 μL	100 μL

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将反应液离心至管底。将上述PCR管置于PCR仪中，按照下表所示设置反应程序，进行第二链cDNA的合成。

温度	时间	循环数
95°C	30s	1
95°C	10s	23个循环
68°C	6min	
68°C	5min	1
16°C	∞	1

- 3) 取5 μL 第二链cDNA合成扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余的 -20°C 保存备用(可以先扩增50 μL 体系, 合成的双链琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 再将剩下的一链全部合成二链)。双链cDNA产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。如果扩增23个循环跑胶无条带或条带较浅, 可将跑胶剩下的产物放入PCR仪, 再扩增3~5个循环后检测。

5. 双链cDNA纯化

使用PCR-Pure Kit纯化合成的双链cDNA:

- 1) 将200 μL 左右的双链加入到1.5mL离心管中, 加入5倍体积的CP buffer, 混匀后转移至2个纯化柱中;
- 2) 11,000rpm, 离心1min, 弃上清;
- 3) 加入700 μL DNA PW buffer (已经加入无水乙醇, 可以直接使用), 11,000rpm, 离心1min, 弃上清;
- 4) 重复步骤3;
- 5) 11,000rpm, 离心2min, 弃去收集管;
- 6) 更换成新的1.5mL离心管, 每个纯化柱上加入50 μL TE buffer, 11,000rpm, 离心2min洗脱。

6. 双链cDNA酶切和分级分离

- 1) 按照下表体系配制 Sfi I 酶切体系:

组分	加入量
双链cDNA	X μL (10 μg)
10 \times restriction buffer	10 μL
Sfi I	5 μL
ddH ₂ O	(85 - X) μL
Total	100 μL

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀, 并短暂离心将反应液收集至管底。配好混合体系后分装成50 μL /管于PCR仪, 50°C 酶切16h;
- 3) 将两个PCR管产物混合, 然后向体系中加入10 μL 1%二甲苯蓝染料并充分混合;
- 4) 标记一组20个1.5 mL EP管, 并按顺序排列在离心管架上;
- 5) 准备一个凝胶过滤树脂离心柱 (Purification columns) 用于分离出大片段, 将柱反转几次以完全

- 重悬凝胶基质，通过反转离心柱几次从柱中去除气泡；
- 然后取下底盖（轻轻扭断即可），打开顶盖，让储存缓冲液通过重力流通过凝胶过滤树脂离心柱，直到可以看到柱中的凝胶珠表面。即流速应约为1滴/40-60秒，1滴的体积应约为40 μL 。如果流速太慢或一滴的体积太小，则需重新重悬基质并重复滴注程序直至达到以上参数；
 - 当存储缓冲液停止滴出时，小心轻柔地（沿着色谱柱内壁）向柱顶部添加700 μL column buffer并使其排出；
 - 当此缓冲液停止滴落（约15-20分钟）时，小心均匀地将PCR产物和二甲苯蓝染料混合物加入基质的顶部中心表面；
 - 向纯化柱中加入100 μL column buffer，让缓冲液从柱中排出，直到树脂上方没有液体流出。当缓冲液停止下滴时，继续下一步。此时，染料层应在柱内几毫米处；
 - 将包含收集管的离心管架放在柱下方，使第一个管子位于柱出口下方。加入600 μL 柱缓冲液，立即开始收集，每个管子依次收集一滴，每管约35 μL ；
 - Chroma Spin柱基于凝胶过滤色谱的原理，填充有树脂，树脂由亲水性多孔材料组成。大于孔径的分子被排除在树脂之外。当PCR产物通过重力作用流经柱时，大分子迅速移动通过凝胶，而小于孔径的分子则被留在树脂上。因此，DNA按分子大小减小的顺序从柱中洗脱。通常第6~9管是含有目标cDNA的组分。Nanodrop 2000检测这些收集管的双链cDNA浓度。

7. 纯化的双链 cDNA 组分小量连接与纯化

- 分别取步骤6中的第6~9管双链cDNA，每一管分别按照下表进行小量连接：

双链cDNA	120 ng
pPR3-NS 1,2,3线性化载体（膜体系）	200 ng (1.5 μL)
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	1 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
去离子水	补足至10 μL

- 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接（16 h左右），65 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育5min，使酶失活；
- 向每个管中加入1 μL 的3M醋酸钠（pH5.2）和20 μL 的无水乙醇，置于 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 半小时左右；
- 16,000g，离心20min，可在管底看见白色沉淀，倒掉上清；

- 5) 向管中加入1 mL无水乙醇漂洗一次, 16,000g, 离心20min, 倒掉上清;
- 6) 开盖室温干燥 8 min, 加入8 μ L的ddH₂O溶解沉淀。

8. 纯化的双链 cDNA 组分小量转化

- 1) 在超净台中取4个灭菌的1.5 mL EP管, 并分别做好标记, 放置冰上预冷5min。同时准备5个2 mm电极杯, 放置冰上预冷;
- 2) 按照下表所示依次向管中加入:

第1管	80 μ L的DH10B感受态细胞	第6管分级小量连接产物2 μ L
第2管	80 μ L的DH10B感受态细胞	第7管分级小量连接产物2 μ L
第3管	80 μ L的DH10B感受态细胞	第8管分级小量连接产物2 μ L
第4管	80 μ L的DH10B感受态细胞	第9管分级小量连接产物2 μ L
第5管	80 μ L的DH10B感受态细胞	pUC19 质粒 (10 pg/ μ L, 阳性对照) 1 μ L

用移液器吹打混匀后, 将管中液体依次转移到对应的冰浴预冷的 2 mm的电极杯中, 注意不要产生气泡。

- 3) 电转化参数: 2.0 KV, 5 ms, 电击后迅速加入1 mL SOC培养基, 转移电击反应产物至灭菌的1.5 mL EP管中, 37°C, 250rpm 培养1 h;
- 4) 取100 μ L培养产物涂布10 cm直径含氨苄抗性的LB平板。37°C培养箱过夜培养;
- 5) 第二天用T7/3' AD通用引物对大肠杆菌单菌落做菌落PCR鉴定。建议每个分级组分选取24个单菌落抽检;
- 6) 跑胶分析对应组分片段长度。一般要求片段长度在750 bp~2000 bp之间。将满足要求的几管分级产物混合, 向管中加入5 μ L的糖原 (Glycogen)、0.5倍体积的7.5 M醋酸铵以及2.5倍体积的无水乙醇, 于-80 °C放置 2h (例如产物100 μ L, 则加入50 μ L的7.5 M醋酸铵以及387.5 μ L的无水乙醇);
- 7) 4 °C, 16000g离心30 min, 弃上清;
- 8) 加入1 mL无水乙醇漂洗1次, 4 °C, 16000g离心20 min, 弃上清, 开盖室温干燥8 min;
- 9) 向管中加入30 μ L的ddH₂O, Nanodrop 2000检测双链cDNA浓度。

DH10B电转感受态的制备:

- 1) 配置一个无抗性的LB平板, 从 - 80°C冰箱拿出保存的DH10B感受态菌株, 用灭菌接种环蘸取菌液划线, 37°C培养约15h。并按照需要配置YT液体培养基、10%甘油、清洗缓冲液, 并准备超纯水

以及离心管和离心瓶，高压灭菌。

注意：反复冻融的DH10B菌株活性会下降，建议一次至少保存50管，每次划线使用1管。清洗缓冲液需要用超纯水配置，10%甘油用清洗缓冲液配置，离心管和离心瓶也需要用超纯水润洗。

- 2) 将大肠杆菌接种于含有10 mL YT液体培养基的100 mL锥形瓶中，振荡培养过夜，接种4 mL菌液到含有400mL的2×YT液体培养基的2L锥形瓶中，振荡培养至OD₆₀₀值为0.4~0.5，振荡培养的温度为37°C，转速为220rpm，大约培养2~3h；
- 3) 将步骤2得到的菌液转移至预冷的500 mL离心瓶中，冰上静置30 min后进行4°C，7000 rpm离心2 min，弃上清，回收菌体；
- 4) 往每个弃上清后的离心瓶中加入45 mL预冷的清洗缓冲液，重悬菌体，转移至4个50mL离心管中，4°C，4000 rpm离心5 min，弃上清，回收菌体；
- 5) 重复步骤4一次；
- 6) 往每个弃上清后的离心管中加入15 mL预冷的10%甘油，重悬菌体，4°C，4000 rpm离心5 min，弃上清，回收菌体；
- 7) 往每个弃上清后的离心管中加入1 mL预冷的10%甘油，重悬菌体，将其分别转入4个1.5 mL离心管中，4°C，7000 rpm离心1 min，弃上清，回收菌体；
- 8) 往每个弃上清后的离心管中加入200 μL预冷的10%甘油，重悬菌体，得到电转化感受态细胞，取50 μL用于检测感受态细胞转化效率，其余的液氮冻存后-80°C保存；
- 9) 0.2 cm电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上5分钟沥干水分，正置5分钟，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电击杯顶离冰面0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置5分钟充分降温；
- 10) 取50 μL感受态细胞于1.5 mL离心管中，加入目的DNA(测定转化效率使用1μL 10 pg/μL 的对照质粒pUC19)并用手拨打EP管底轻轻混匀，避免产生气泡，立即插入冰中；
- 11) 用200 μL枪头将感受态-DNA混合物快速移到电击杯中(避免产生气泡)，轻轻晃动使液面保持水平状态，盖上杯盖，插入冰中；
- 12) 电转化参数：2.0 KV, 5 ms, 电击后迅速加入1 mL SOC 培养基，转移电击反应产物至灭菌的1.5 mL EP管中，37°C，250rpm 培养1 h。

取100-200 μL涂布到含相应抗生素的LB平板上。将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养13-17小时。

取稀释100倍的菌液100 μL涂布10 cm的LB平板(氨苄抗性)，37°C培养过夜，统计菌落数，计算转化效率。

举例计算:

• 每板克隆数 = 100

则转化效率为:

$$\frac{100}{0.1 \times 10^{-5}} \times 10^7 = 1 \times 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{f DNA}$$

感受态的效率至少要高于 1×10^9 cfu/ μg DNA 才可以用于建库。

2 \times YT培养基的配方:

胰蛋白胨: 17g

酵母提取物: 10g

氯化钠: 5g 1M HCl调节pH至7.0

清洗缓冲液: 称取0.238 g清洗缓冲液母液粉末, 加入800 mL的超纯水溶解粉末, 待粉末全部溶解后再用超纯水定容至1 L。

9. 双链cDNA大量连接与纯化

1) 按照下表配置3份大量连接体系:

双链cDNA	180 ng
pPR3-NS 1,2,3线性化载体 (膜体系)	300 ng (2 μL)
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μL
T4 DNA Ligase	2 μL
去离子水	补足至20 μL

- 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接 (16 h左右), 65 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育5 min, 使酶失活;
- 将3管连接产物合成一管, 向管中加入6 μL 的3M醋酸钠 (pH5.2) 和120 μL 的无水乙醇, 混匀后转移至1.5 mL离心管中, 置于 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 半小时左右;
- 16,000g, 离心20min, 可在管底看见白色沉淀, 倒掉上清;
- 向管中加入1 mL无水乙醇漂洗一次, 16,000g, 离心20min, 倒掉上清;
- 开盖室温干燥 8 min, 加入20 μL 的ddH₂O溶解沉淀。

10. 双链cDNA大量连接产物转化

- 1) 在超净台中取灭菌的1.5 mL EP管, 放置冰上预冷5 min。同时准备2 mm电极杯, 放置冰上预冷;
- 2) 向对应的EP管中加入100 μL 解冻的DH10B电转化感受态, 2 μL 连接产物, 用200 μL 移液器充分混匀;
- 3) 用200 μL 移液器将混合产物转移到预冷的电极杯中, 电击反应, 电转化参数: 2.0 KV, 5 ms, 电击后迅速加入1 mL SOC培养基, 转移至50 mL离心管中, 37°C, 250 rpm培养1.5 h;
- 4) 分别取稀释1000倍、10000倍的菌液100 μL 涂布10 cm的LB平板(氨苄抗性), 37 °C培养过夜, 统计菌落数, 计算滴度; 克隆数 = cfu/mL 铺板体积 (mL) \times 稀释因子

举例计算:

- 每板克隆数 = 100
- 铺板体积 = 0.1 mL
- 稀释因子 = 10^4

则文库滴度为:

$$\frac{100}{0.1\text{mL} \times 10^4} = 1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$$

- 5) 根据统计结果计算达到文库库容 1×10^7 转化子所需的转化实验组个数N, 按照大量转化体系转化N个实验组。如N=10, 则需转化10个100 μL DH10B电转化感受态。
- 6) 从转化N个组的菌液中分别取稀释1000倍、10000倍的菌液100 μL 涂布100 mm LB平板(氨苄抗性), 37°C培养过夜, 第二天根据平板克隆数计算文库库容。
文库库容 = 文库滴度 \times 未稀释菌液总mL数
- 7) 将余下未稀释的菌液按600 μL /板涂布150 mm LB平板(氨苄抗性), 37°C培养过夜。第二天收集转化子, 即为原始文库菌液, 加入等体积的灭菌的50%甘油, 保存于 - 80°C冰箱。

11. 文库插入片段鉴定

计算出文库库容后, 挑单克隆进行菌落 PCR, 抽样检测文库基因插入片段大小: 按照下表配制菌落 PCR 反应体系。

组分	体积
template	单菌落
2 \times PCR Master Mix	20 μL

组分	体积
Deionized H ₂ O	17 μL
pPR3-F Primer(10μM)	1.5 μL
pPR3-R Primer(10μM)	1.5 μL
总体积	40 μL

使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将反应液离心至管底。

将上述PCR管置于PCR仪中，按照下表所示设置反应程序，进行文库菌落PCR鉴定。

步骤	温度	时间
1	95 °C	5 min
2	95 °C	30 s
3	54 °C	30 s
4	72 °C	1 min
2~4 循环数30		
5	72 °C	5 min
6	25 °C	2 min

PCR结果进行琼脂糖凝胶电泳检测，合格的送测，鉴定文库的插入片段和阳性率。

九、问题解决方案

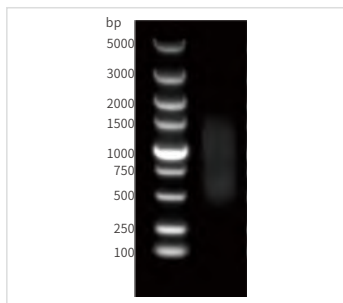
问题	可能的原因	解决方案
双链cDNA跑胶没有条带	第一链合成或第二链合成中一种或多种试剂没有添加	重复两个合成反应，要仔细核对每一项，确保所有试剂都进行了正确的添加。

问题	可能的原因	解决方案
双链cDNA跑胶条带小于预期大小	使用的总RNA或者mRNA存在降解、样品不纯、浓度太低等问题	<ol style="list-style-type: none"> 1.通过琼脂糖凝胶检测总RNA和mRNA的质量,确保质量和纯度均没有问题(如果RNA质量很好,但浓度太低,则使用更多你的RNA来进行双链的合成;如果RNA质量不行,则需要重新提取RNA); 2.按照步骤1中的方法进行RNA稳定性的检测,如果RNA容易降解,检查所用的离心管、tip头等是否有RNase的污染,并换一种方法重新提取总RNA; 3.为了更容易地确定是否是RNA的问题,请使用试剂盒中提供的对照RNA进行平行反应。
合成的双链cDNA产物太少	PCR的循环数不合适	<ol style="list-style-type: none"> 1.将PCR反应混合物再扩增两个循环,然后重新跑胶鉴定。如果增加循环次数不能提高PCR产物的得率,则重新使用第一链产物进行第二链的合成; 2.请使用试剂盒中提供的对照RNA进行平行反应。如果对照RNA获得了良好的结果,但实验RNA没有,那么RNA可能有问题。
双链cDNA产物中存在较多<0.1Kb的条带	PCR的循环数太多了	重新使用第一链产物进行第二链的合成,PCR时减少3~4个循环数
文库库容量低	连接效率低	<ol style="list-style-type: none"> 1.检查分级分离后双链cDNA的浓度,双链cDNA的浓度应该在100~200 ng/μL的浓度范围内; 2.请按照试剂盒说明书中的连接体系,连接体系中线性化载体和双链产物的配比不合适,或者连接体系中这两者所加入的量太多均会影响连接效率。

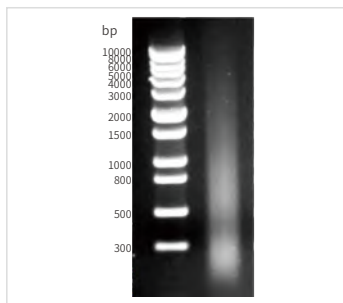
问题	可能的原因	解决方案
文库插入片段太小	如果超过50%的克隆具有较小的插入片段(即<0.4 kb), 则双链cDNA分级分离不成功	<ol style="list-style-type: none"> 1.重新合成双链cDNA、纯化后酶切双链cDNA进行分级分离; 2.严格执行分级分离的实验步骤,例如,在洗涤和洗脱步骤中使用过多或过少的柱缓冲液,或省略一个步骤,则柱的分级分离功能将减弱; 3.不要让柱中的基质在洗涤等步骤中变干,干燥的基体可以从柱壳体的内壁收缩离开。然后,双链cDNA混合物可以沿着柱的侧面向下流动,使小污染物过快地进入基质主体,并在早期的级分中洗脱; 4.柱应在室温下储存和使用。如果在4°C下冷却,然后加热到室温使用,可能会形成气泡,从而干扰柱的正常工作; 5.双链cDNA混合物在柱表面上的极端不均匀沉积会导致双链cDNA与低分子量污染物的低效分离。

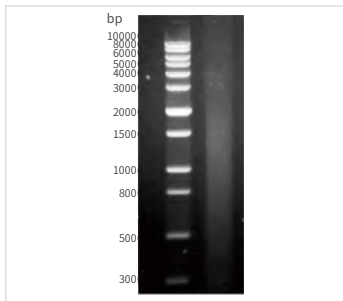
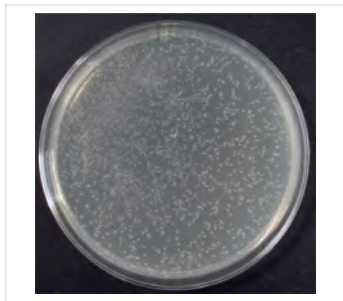
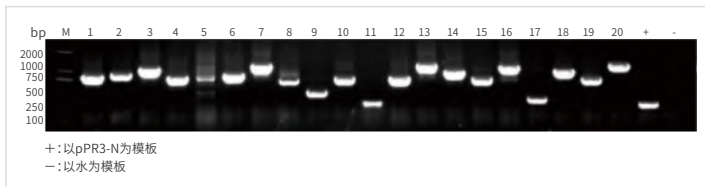
十、附录

附录1:mRNA纯化结果



附录2:双链cDNA合成结果



附录3: 双链cDNA纯化结果

附录4: 文库库容量检测结果

附录5: 菌落PCR鉴定结果




武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

