



Nuclear/Membrane Yeast Two-Hybrid Library Construction Kit

核/膜蛋白酵母双杂交建库 试剂盒 (5T)

Catalog#JKR23009HM

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

酵母核/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GAL4酵母单双杂系统以及基于分离的泛素 (split-ubiquitin) 介导的膜蛋白酵母双杂系统上，通过对PGADT7以及pPR3-N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。只需要一份样品，合成一份双链，即可同时构建获得核体系、膜体系文库。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PGADT7、pPR3-N载体进行了移码突变，形成三个不同的读码框（命名为PGADT7-S1, PGADT7-S2, PGADT7-S3以及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℃ | BoxA |
| | 23009-2 | T7 Primer(10uM) | 500μL × 3 | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-3 | 3AD Primer(10uM) | 500μL × 3 | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-4 | 5' PCR Primer(10uM) | 100μL | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-5 | 3' PCR Primer(10uM) | 100μL | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-6 | CDS III Primer(10uM) | 20μL | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-7 | pPR3-F Primer(10μM) | 500μL × 3 | - 20℃ | BoxA |
| | 23009-8 | pPR3-R Primer(10μM) | 500μL × 3 | - 20℃ | BoxA |



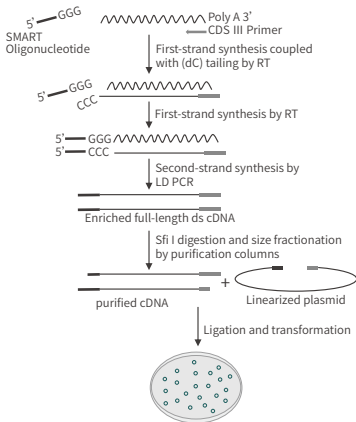
| 分类 | 编号 | 组分名称 | 5T提供量 | 保存温度 | 存放位置 |
|----|-----------|----------------------------------|--------|--------|------|
| 试剂 | 23009-A1 | RNA control(10uM) | 10μL | - 80°C | BoxA |
| | 23009-A2 | dNTP mix(各10mM) | 50μL | - 20°C | BoxA |
| | 23009-A3 | 5×FS Buffer | 30μL | - 20°C | BoxA |
| | 23009-A4 | 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 | pGADT7-1,2,3 Linearized plasmid | 100μL | - 20°C | BoxA |
| | 23009-C3 | 2×PCR Master Mix | 5 mL×2 | - 20°C | BoxA |
| | 23009-C4 | pPR3-NS-1,2,3 Linearized plasmid | 100μL | - 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 |



| 分类 | 编号 | 组分名称 | 5T提供量 | 保存温度 | 存放位置 |
|----|----------|---|-------|------|------|
| 试剂 | 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 |
| | 23009-E3 | Xylene cyanol (二甲苯蓝) | 200μL | 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

酵母核体系文库构建试剂盒构建的文库，后续可用于核酵母单/双杂筛选，主要运用该系统实现筛选得到调控目的基因启动子的转录因子、或者筛选和检测细胞核、细胞质蛋白之间的蛋白—蛋白相互作用。酵母膜体系文库构建试剂盒构建的文库，后续用于膜蛋白-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2μL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。

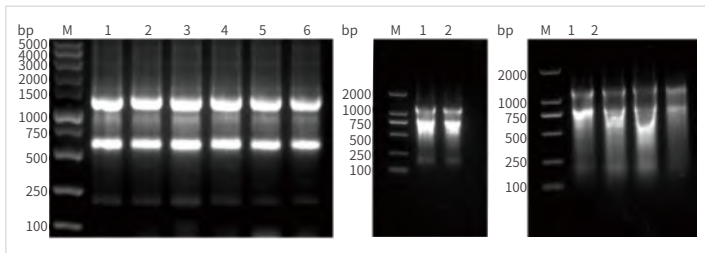


图1 总RNA跑胶示例图

(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 μL , 于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h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2h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 μg ~500 μg 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 μg 总RNA样品加DEPC水定容至100 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 液体, 避免吸到磁珠。

- 7) 向离心管中加入15 μ L 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 μ L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1~3kb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 μ g, 浓度至少为0.1 μ g/ μ L。mRNA至少加0.3 μ g以上, 浓度至少为0.1 μ g/ μ L)。

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

- 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 μ L |
| DTT (100mM) | 1.0 μ L |
| Superscript III (Reverse Transcriptase) | 1.0 μ L |
| 总体积 | 6.0 μ L |



- 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 | 15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15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, 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；

- 6) 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；
- 7) 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；
- 8) 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产物加入基质的顶部中心表面；
- 9) 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；
- 10) 将包含收集管的离心管架放在柱下方，使第一个管位于柱出口下方。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 ；
- 11) 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

- 1) 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 | 150 ng |
| PGADT7-1,2,3线性化载体(核体系) 或 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 |

- 2) 16°C过夜连接(16 h左右)，65°C下孵育5min，使酶失活；
- 3) 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°C半小时左右；
- 4) 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1h;
- 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7.5M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℃，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℃，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℃，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℃，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℃，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℃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℃，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℃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℃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:

$$\frac{100}{0.1 \times 10^{-5}} \times 10^3 = 1 \times 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{g DNA}$$

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×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 |
| PGADT7-1,2,3线性化载体(核体系) 或 pPR3-NS 1,2,3线性化载体(膜体系) | 300 ng (2 μL) |
| 10 × T4 DNA Ligase Buffer | 2 μL |
| T4 DNA Ligase | 2 μL |
| 去离子水 | 补足至20 μL |

2) 16°C过夜连接(16 h左右), 65°C下孵育5 min, 使酶失活;

3) 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°C半小时左右;

4) 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 μ L解冻的DH10B电转化感受态, 2 μ L连接产物, 用200 μ L移液器充分混匀;
- 3) 用200 μ L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 μ L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 μ L 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 μ L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) 将余下未稀释菌液按600 μ L/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 μ L |



| 组分 | 体积 |
|--|-------------|
| Deionized H ₂ O | 17 μ L |
| T7 (10 μ M) 核体系 pPR3-F Primer(10 μ M)膜体系 | 1.5 μ L |
| 3' AD (10 μ M) 核体系 pPR3-R Primer(10 μ M)膜体系 | 1.5 μ L |
| 总体积 | 40 μ L |

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。 |

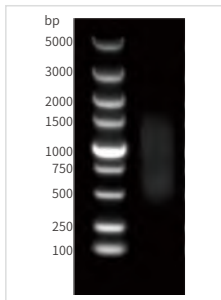


| 问题 | 可能的原因 | 解决方案 |
|------------------------|--------------------------------|--|
| 双链cDNA跑胶条带小于预期大小 | 使用的总RNA或者mRNA存在降解、样品不纯、浓度太低等问题 | <ol style="list-style-type: none"> 1.通过琼脂糖凝胶检测总RNA和mRNA的质量,确保质量和纯度均没有问题(如果RNA质量很好,但浓度太低,则使用更多你的RNA来进行双链的合成;如果RNA质量不行,则需要重新提取RNA); 2.按照步骤1中的方法进行RNA稳定性的检测,如果RNA容易降解,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。 |

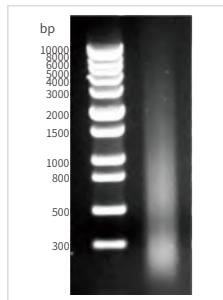
| 问题 | 可能的原因 | 解决方案 |
|----------|---|---|
| 文库插入片段太小 | 如果超过50%的克隆具有较小的插入片段(即<0.4 kb), 则双链cDNA分级分离不成功 | <ol style="list-style-type: none"> 1.重新合成双链cDNA、纯化后酶切双链cDNA进行分级分离; 2.严格执行分级分离的实验步骤,例如,在洗涤和洗脱步骤中使用过多或过少的柱缓冲液,或省略一个步骤,则柱的分级分离功能将减弱; 3.不要让柱中的基质在洗涤等步骤中变干,干燥的基体可以从柱壳体的内壁收缩离开。然后,双链cDNA混合物可以沿着柱的侧面向下流动,使小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

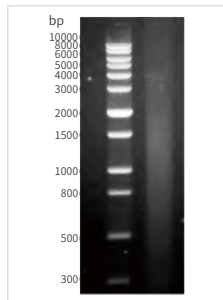
附录1:mRNA纯化结果



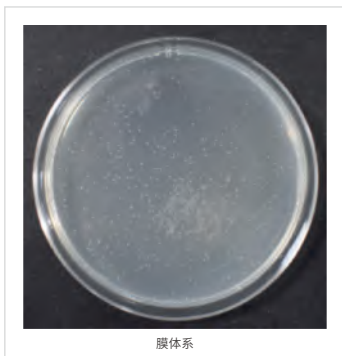
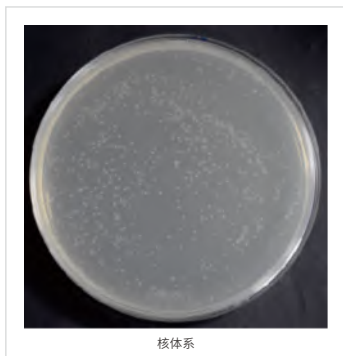
附录2:双链cDNA合成结果



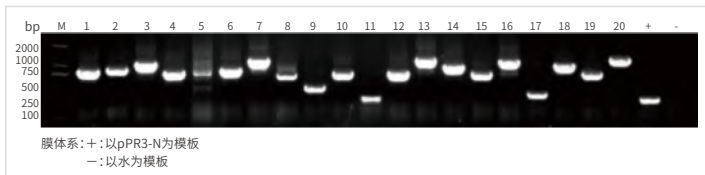
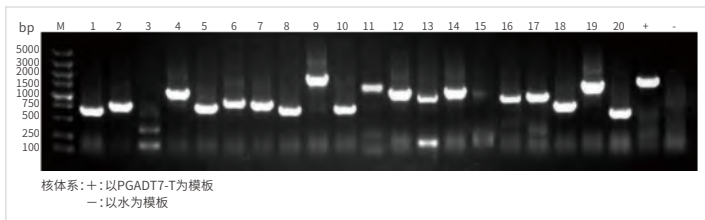
附录3:双链cDNA纯化结果



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 GENECREATE 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

