

经验交流

从 cDNA 文库中筛选分析阳性克隆的简便方法*

周兆澜 朱 祯 刘春明 肖桂芳 李向辉

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 cDNA 文库中阳性克隆的传统筛选分析法既费时又费力, 利用微波炉加热的方法, 简化了原位杂交中噬菌斑裂解、DNA 变性与固定的程序, 进一步运用 PCR 扩增技术, 特异扩增克隆载体中插入的 cDNA 片段, 加快了阳性克隆分析的进程。

关键词 cDNA 文库, 杂交筛选, 阳性克隆分析

构建 cDNA 文库是分离目的基因的最有效途径之一。cDNA 文库往往富集了特定时期特异组织内表达的基因, 并先天去除了内含子, 便于在细菌中研究表达, 便于进行基因测序和氨基酸序列推测, 以及研究发育过程中基因表达时空特异性。然而传统的利用核酸探针筛选分析 cDNA 文库的方法既费时又费力, 从初筛到确定一个阳性克隆往往需要一个月的时间, 在分析阳性克隆时又会面临要大量提取噬菌体 DNA 的麻烦。我们比较研究了多种筛选 cDNA 文库的方法, 并结合 PCR 的方式摸索出一套快速简便的新方法, 可大大加快基因分离的进程。

1 阳性克隆的筛选

参照文献 [1] 的方法将待杂交筛选的噬菌斑从平板上吸印到尼龙膜 (Hybond N, Amersham 公司) 上, 揭下尼龙膜室温晾干 10 min, 用 $2\times\text{SSC}$ 溶液浸湿后叠放于平皿上, 两层膜之间用 3MM 滤纸隔开, 于微波炉 (650W) 中加热 3 min 至溶液蒸发干净, 然后再参照文献 [1] 的方法直接进行预杂交、杂交。这样将传统的噬菌斑裂解、DNA 变性与固定三步骤于微波炉中一步完成, 就筛选文库时一般要同时处理几十张膜而言, 节省了大量时间, 而且杂交信号明确, 背景干扰较少。图 1 是我们利用合

成的水稻巯基蛋白酶抑制剂 (oryzacystatin) 基因 5' 端 21 nt 长的寡核苷酸探针筛选水稻未成熟种子 cDNA 文库时的杂交结果。

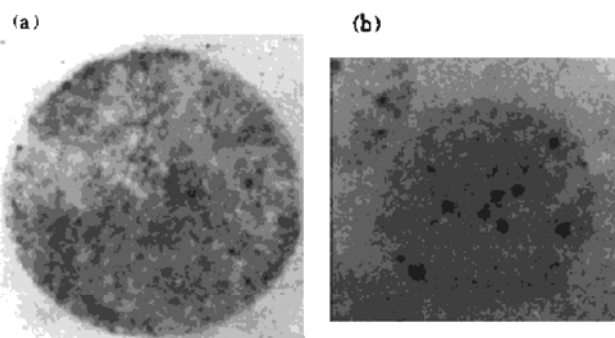


图 1 利用 Oryzacystatin 探针筛选 cDNA 文库时的杂交结果

(a) 初筛 (2×10^4 噬菌斑单位 (pfu) 每 15 cm 平皿); (b) 二筛 (200 pfu 每 9 cm 平皿)。

2 阳性克隆的分析

cDNA 文库的克隆载体一般为 $\lambda\text{gt}10$ 系列和 $\lambda\text{gt}11$ 系列两种。分析阳性克隆中 cDNA 插入片段的情况时, 传统方法是首先大量提取阳性克隆的 λDNA , 再用限制性内切酶消化, 电泳检测其中插入片段的大小。由于 λDNA 的分子

* 总理基金及“863”计划基金资助。

收稿日期: 1994-12-17, 修回日期: 1995-02-21

量较大, 插入的 cDNA 片段又小, 对于同时要分析的多个阳性克隆来讲, 工作量很大且花费时间. 我们根据 λ gt11 系列载体多克隆位点前后的测序引物序列, 合成特异引物:

正向: 5' TGGCGACGACTCCTGGAG 3'; 反向: 5' TTGACACCAGACCAACTGGT 3'

特异扩增载体中插入的 cDNA 片段. 于 50 μ l PCR 反应体系, 微量提取阳性克隆的 DNA 为模板, 加入两种引物各 50 pmol, 100 C 预变性 10 min 后加入 2U Taq DNA 聚合酶, dNTP 各 200 μ mol, 并覆盖一层液体石蜡, 然后 93 C 变性 1 min, 54 C 退火 1.5 min, 72 C 延伸 3 min, 36 个循环后电泳检测扩增出的各阳性克隆的 cDNA 插入片段的情况. 图 2 给出了我们利用 PCR 方法对筛选出的 Oryzacystatin 9 个

阳性克隆的 cDNA 插入片段的分析. 进一步对插入片段最长的 1 号克隆进行序列分析, 得到了我们所要分离的 Oryzacystatin cDNA. 这样大大节省了分析阳性克隆所用的时间, 成本也低.

上述两步方法上的改进和简化, 使得传统的筛选分析 cDNA 文库的工作变得快速和简便, 不仅节省了工作时间, 也降低了成本, 而且易于获得明确的实验结果. 该方法同样可应用于基因组文库的杂交筛选以及菌落原位杂交.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 2: 109~2: 117

Introduce a Rapid Method to Screening and Analysis of a cDNA Library. Zhou Zhaolan, Zhu Zhen, Liu Chunming, Xiao Guifang, Li Xianghui (*Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract *In situ* hybridization is a necessary and hard work for screening cDNA library. Heated by microwave oven, bacteriophage lysis, DNA denaturation and fixation of DNA to filter occur in a single step; On the other hand, it is a really rapid procedure for analysis of the cDNA inserts of positive clones via polymerase chain reaction (PCR) amplification.

Key words cDNA library, *in situ* hybridization, analysis of positive clones

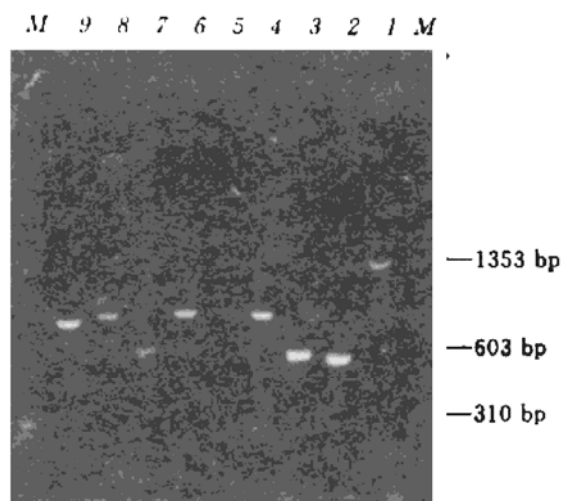


图 2 利用 PCR 方法对 9 个 Oryzacystatin 阳性克隆 cDNA 插入片段的电泳分析

1~9: No. 1~9 阳性克隆; M: Φ x174/HaeIII marker.