

技术与方法 Techniques and Methods

PCR快速分析水稻cDNA文库构建质量方法的简化

向太和*

杭州师范学院生命科学学院, 杭州 310036

Simplification of a PCR Method for Analysis the Condition of Rice cDNA Library

XIANG Tai-He*

School of Life Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036

提要 对由水稻cDNA文库铺成平板的噬菌斑, 采用tip吸头穿刺噬菌斑后在PCR反应混合液中吸打2次, 直接作为PCR扩增模板进行PCR反应和电泳分析的方法, 可以达到快速、简便地分析水稻cDNA文库构建的质量。此法无需提取噬菌斑DNA作为PCR扩增模板, 操作简单、方便、快捷。

关键词 PCR; cDNA文库; 质量; 方法; 水稻

构建cDNA文库是图位克隆基因的关键性步骤之一, 构建的cDNA文库质量直接关系到能否获得完整或较大的基因片段^[1], 因此, 对获得的cDNA文库需进行构建质量即插入噬菌载体中cDNA片段大小的分析检测。通常的方法是将构建的文库铺成平板形成单个噬菌斑后挖取噬菌斑, 加入氯仿和特定的缓冲液让噬菌斑DNA释放, 再感染宿主菌繁殖噬菌体, 最后提取噬菌体DNA用于PCR扩增反应或者酶切鉴定插入的cDNA片段大小^[2]。此种鉴定程序较为复杂。我们在水稻cDNA文库的构建中, 采用了一种快速分析cDNA文库构建质量的简单方法, 现介绍如下。

材料与amp;方法

水稻(*Oryza sativa*)品种农林8号cDNA文库由安徽省农业科学院生物技术室用Stratagene公司的ZAP cDNA试剂盒构建完成。依据ZAP载体两端含有T₃和T₇启动子序列^[3]设计PCR引物。引物序列是P₁: 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3', P₂: 5' TAATACGACTCACTATAGG 3'。PCR反应体积是35 μL, 其中含有3.5 μL 10×反应缓冲液、2 μL dNTP(2 mmol·L⁻¹, 美国Promega公司)、P₁和P₂引物(1 pmol·μL⁻¹, 上海Sangon公司合成)各2 μL、1 μL Taq DNA聚合酶(2 U·μL⁻¹, 美国Promega公司)。方法1是我们采用的简易方法, 即每35 μL PCR反应体积中加入24.5 μL ddH₂O, 用20 μL tip吸头刺穿单个噬菌斑后在

PCR反应混合液中吸打2次, 以此作为DNA模板。方法2是通常采用的方法, 每35 μL反应体积中加ddH₂O 23.5 μL, 按照Stratagene公司的操作指南提取单个噬菌斑的DNA, 取1 μL(约100 ng·μL⁻¹)作为DNA模板。PCR反应程序为94℃变性5 min后, 按照94℃ 45 s、58℃ 45 s、72℃ 90 s进行35个循环, 循环结束后在72℃延伸5 min。扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶上电泳1.5~2 h(5 V·cm⁻¹), 以100 bp ladder plus(美国Promega公司)作为DNA分子量标记, 溴化乙锭染色, 紫外光下观察, 用凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)观察和拍照记录。

结果与amp;讨论

随机选取铺成的噬菌斑平板, 噬菌斑的密度为直径10 cm的培养皿中含有2 500~3 000个噬菌斑。图1中上图是用方法1对随机选取的20个噬菌斑扩增的结果, 下图是用方法2对随机选取的10个噬菌斑扩增的结果。可以看出方法1同样可以获得较清晰的PCR扩增结果。这是因为PCR反应十分灵敏, 即使DNA模板含量少至1~2 pg, 从理论上讲甚至1个DNA分子也可通过PCR反应扩增出特征性条带^[4], 而方法1用tip吸头穿刺噬菌

收稿 2003-10-08 修定 2003-12-05

资助 杭州师范学院科研启动基金(87)。

*E-mail: xth0101@sina.com, Tel: 0571-88804115

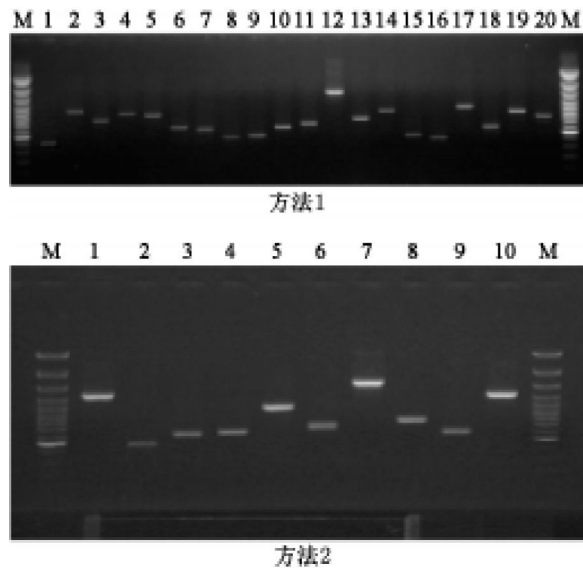


图1 两种方法对水稻cDNA文库噬菌斑扩增结果的比较
M: 100 bp ladder plus DNA 分子量标记; 方法1中1~20、方法2中1~10: 单个噬菌斑PCR扩增条带。

斑后在PCR反应液中吸打2次, PCR反应液中已含有足够量的DNA分子满足PCR扩增反应。通过扩增结果可以看出, 构建的cDNA插入片段大小在400~2 000 bp之间均匀分布, 构建的质量较好。

方法1的最大优点在于无需提取噬菌斑DNA, 操作简单、快速, 节约试剂和材料。根据我们的操作经验, 采用方法1时还应注意如下两点: (1) tip吸头选用20 μL 较好, tip吸头太大, 刺吸噬菌斑时易带上培养基; 同时使用20 μL 微量进样器, 并将20 μL 微量进样器调至5 μL 加样刻度, 加样器刻度调得太小吸打时无力, 太大则易产生泡沫。(2) 若铺成的噬菌斑平板培养基较厚

时, 不要穿透培养基, 仅需刺穿噬菌斑即可, 以免tip吸头带上培养基。

值得一提的是, 我们曾设计需要筛选的特定基因的两端引物, 试图利用这种简易方法, 从cDNA文库中直接筛选目的基因, 但需要筛选的噬菌斑数量太多, 即每一个噬菌斑都需要进行一次PCR反应, 工作量极大。不过, 根据这种方法, 若设计机械化的均匀铺噬菌斑平板的设备, 再用机械手臂均匀穿刺噬菌斑进行PCR反应, 就可达到快速、简易地筛选cDNA文库的目的。另一方面, 在cDNA文库的筛选中, 当通过原位分子杂交筛选到阳性克隆时, 通常需提取阳性克隆噬菌斑, 重新铺平板再进行第二次原位分子杂交。而用这一方法完全可以省略第二次原位杂交, 无需提取噬菌体重新铺平板, 可针对筛选到的阳性克隆噬菌斑, 进行一次PCR扩增就可快速、简便地对阳性克隆斑进行验证。此外, 该方法对于分析构建的基因组文库如BAC库、YAC库和TAC库等的质量可能也有效。

参考文献

- 1 Bethards LA, Skadsen RW, Scandalios JG. Isolation and characterization of a cDNA clone for the gene in maize and its homology with other catalases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (19): 6830~6834
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989
- 3 Short JM, Fernandez JM, Sorge JA et al. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(15): 7583~7600
- 4 胡稳奇, 张志先. PCR技术在环境微生物检测中的应用. *环境科学*, 1994, 15(4): 80~83