

## cDNA 文库固相构建法

王义琴 孙勇如

(中科院遗传所 北京 100101)

**摘要** 本文介绍一种 cDNA 文库的固相构建法。文库构建过程 cDNA 的合成和修饰全部在固相介质—磁珠上完成,简便、迅速、文库质量高,能满足不同目的的 cDNA 文库构建,是一种值得借鉴和应用的好方法。

**关键词** cDNA 库 固相构建 磁珠

### 1 前言

七十年代中叶首例 cDNA 克隆问世以来,构建 cDNA 文库已成为获取目的基因的基本手段之一。文库构建最重要的就是获得完整的文库,为了达到这一目的,在 mRNA 提纯、cDNA 合成等方面,出现了许多技术和方法,并大大改进了载体系统。目前许多公司都有现成的 cDNA 试剂盒出售,用少量的 mRNA 即可照例建立起一个内容丰富的 cDNA 文库。其中较为出色的有 Amersham Pharmacia 公司的 Timer-Saver cDNA 合成试剂盒,将 cDNA 文库的构建缩短为一天,实现了一天建库的愿望。虽然如此,cDNA 的合成和克隆尚非易事,仍是件费钱、费力的工作。

为了满足不同的应用需要,目前已有许多构建文库的方案可供选择。但所有的方案都有一个共同的操作流程,即通过 oligo(dT)结合的纤维素、磁珠或其他固体颗粒,分离纯化 mRNA,加入酶和反应底物直接进行 cDNA 的单链和双链合成,然后再将 cDNA 进行修饰,切平端,连上接头,磷酸化后,与载体相连。这个过程是一连串的酶反应,为了尽可能地使每一步反应中的酶都是在最适条件下发挥作用,每步的最后要将 cDNA 用乙醇沉淀出来后,再进入下一步反应。由于提取过程中肯定有 cDNA 的损失,这样就存在一个得率的问题,而 cDNA 的得率不好势必会影响到文库构建的完整性,这是 cDNA 合成中遇到的最大问题。

### 2 cDNA 文库固相合成法

cDNA 的固相合成是早为人们熟知的技术

(Kris N Lambert 1993, Yasnory F Sasaki et al. 1994),但局限之处是 oligo(dT)与纤维素、胶粒或磁珠的结合比较牢固,将 cDNA 洗脱下来时得率不是很高,而且以后的反应步骤也不能都在介质上进行,这可能是该技术应用并不十分广泛的原因。

最近 Thomas Roeder 提出了一种新的 cDNA 文库固相合成方法(Thomas Roeder 1998),克服了以前文库构建中存在的缺点,所用的酶和试剂与传统方法完全相同,不同的是 cDNA 的合成和修饰均在固相支持物——磁珠(magnetic beads)上完成,使一天建库的工作更为轻松。现将该方法简介如下(见图 1):

5'端生物素化的 oligo(dT)<sub>25</sub>-Primer 中含有一段 NotI 的识别序列(5'-biotin-GA GA GA GA GA-GA GCGGCCGCT<sub>25</sub>G/A/C-3'),连接在链霉亲和素包被的磁珠上,将总 RNA 与磁珠混合后, mRNA 便与 oligo(dT)<sub>25</sub>结合,通过磁性吸附,可一步分离磁珠—mRNA 复合物。cDNA 的合成以 oligo(dT)和随机片段作为引物,以 oligo(dT)为引物时,可在磁珠—mRNA 复合物中直接加入逆转录酶、dNTP 等进行 cDNA 第一链的合成;用随机引物(5'-biotin-GA GA GA GA GA GA GCGGCCGCGNNNNN-3')时,则将 mRNA 洗脱下来,加到含随机引物的溶液中,合成第一链 cDNA。cDNA 第一链合成后,两种引物的以后的各步就是相同的了。在 3-7 的步骤中,每步开始前吸去上清,用此步的溶液洗磁珠—cDNA 复合物两遍后,再加入反应的酶和溶液。注意反应过程中要不断轻微摇动。他们用此方法获得了高质量的 cDNA 文库,cDNA 的大小分布, oligo(dT)引物的 cDNA 带从 300bp 到 7kb,随机引物的 cDNA 带则由 <100bp---7kb,非常丰富。

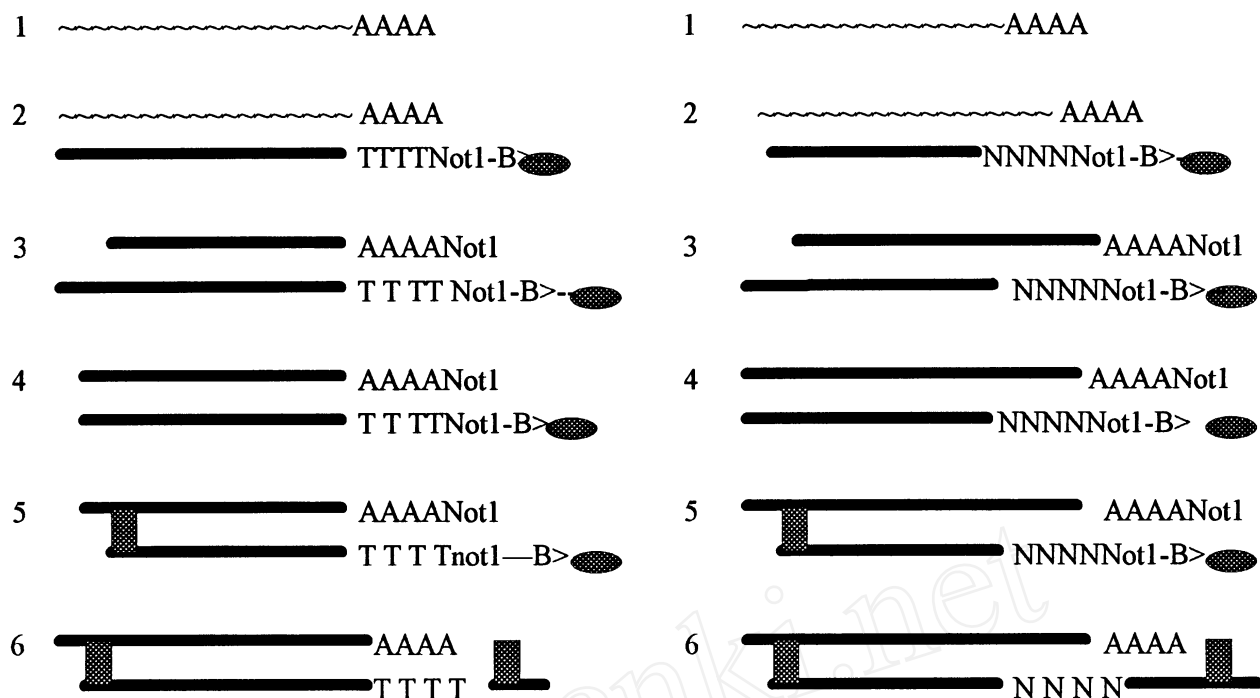


图1 cDNA 文库固相构建法简介(引自 Thomas Roeder)

1. 5'端生物素化的oligo(DT) 25-Primer 连接在链霉亲和素包被的磁珠(Streptavidin coated magnetic beads)上,将总RNA与磁珠混合后,通过磁性吸附,可一步分离磁珠-mRNA复合物;2. 以oligo(dT)和随机片段为引物合成第一链cDNA;3. cDNA第二链的合成;4. T4-DNA多聚酶切平端;5. 连上EcoRI接头并磷酸化;6. 用NotI酶将cDNA从磁珠上释放下来,与载体连接。

### 3 cDNA 固相构建法的优点

Thomas Roeder 的方法与传统的方法相比主要有两点改进之处,第一是利用生物磁珠法这种简便、快速、高效的分子生物学分离技术,同时结合生物素-链霉亲和素系统的特异亲和力,大大提高了分离效率。每步反应中不需用化学试剂沉淀cDNA,减少了cDNA的损失,由于生物素和链霉亲和素的结合几乎是不可逆的,在用溶液冲洗磁珠-cDNA混合物的过程中,也不会有cDNA的损失,并且能够保证各步反应中酶的反应条件最适;第二点是在oligo(dT)与生物素之间加了一个NotI的酶切位点,使修饰好的cDNA从磁珠上的分离变得十分方便。切下来的cDNA双链可直接与载体相连,顺利地解决

了生物素与链霉亲和素不可逆结合的问题。

由这种方法构建的cDNA文库是高质量的,因为每一步反应都是在酶的最适条件下进行,cDNA合成的效率非常高,而且修饰过程中几乎无cDNA的损失,这种方法使文库的构建变得简便、迅速,不仅节省大量时间,而且非常经济,是一种值得推广的构建高质量文库的好方法。

### 参考文献

- [1] Kris N. Lambert and Valerie M. Williamson. Nucleic Acids Research, 1993, 21(3): 775 - 776.
- [2] Yasnory F. Sasaki, Dai Ayusawa and Michio Oishi. Nucleic Acids Research. 1994, 22(6): 987 - 992.
- [3] Thomas Roeder. Nucleic Acids Research. 1998, 26(14): 3451 - 3452.

## A Method for Solid-phase cDNA Library Construction

Wang Yiqin Sun Yongru

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences Beijing 100101)

**Abstract** A method for cDNA library construction was introduced. All enzymatic steps of library synthesis was performed on a solid support-magnetic beads. Therefore it combines rapid, convenient with high quality library, making it ideally suited for most purposes. It is a good method and worth learning and using.

**Key words** cDNA library solid-phase construction magnetic beads

www.cnki.net