

检测 cDNA 文库克隆中插入片段大小的简易方法

SIMPLE METHOD BASED ON PCR TECHNIQUE FOR CLONE IDENTIFICATION

刘振辉 张士瑾

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

关键词 PCR 技术, 克隆检测, 简易方法

在 cDNA 文库克隆的大规模测序之前, 一般需对克隆中插入片段的大小进行检测。传统的检测方法是首先用煮沸法^[1,2]或碱裂解法^[1,3]提取质粒 DNA, 然后用限制性内切酶进行酶切分析。在对大量的克隆进行检测时, 这种方法则显得十分烦琐、费时。Zon 等^[4]于 1989 年提出了一种基于 PCR 技术的直接用于克隆检测的方法。与传统的酶切检测法相比, 此种方法相对简单、快速得多。但是它仍然需要提取质粒 DNA, 而且实验成本较高。新近, Tang^[5]等对 Zon 等的方法进行了进一步的改进。改进后的方法不需要提取质粒 DNA, 而是直接用菌液作为模板进行 PCR 检测。这使得克隆的检测变得更加容易、快速, 并使实验成本大大降低。作者已将上述方法应用于文昌鱼 cDNA 文库克隆中插入片段大小的检测, 并摸索出了一套便于克隆大规模检测的实验程序, 本文作一详细介绍。

1 材料与方法

1.1 挑取单克隆

用无菌牙签挑取 cDNA 文库单克隆在盛有 500 μ l 的 LB(A⁺) 培养基的 1.5 ml eppendorf 离心管中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌 (200 r/min) 培养过夜, 作为待检测的菌液。

1.2 准备 PCR 反应缓冲液

每 20 ml 的 PCR 反应缓冲液中含有: H₂O 18.1 ml; MgCl₂ (1 mol/L) 0.06 ml; Tris.Cl (1 mol/L, pH 8.4) 0.26 ml; KCl (4 mol/L) 0.327 ml; 明胶 (1%) 0.026 ml; BSA (100 g/L) 0.346 ml; dNTP (每种 100 mmol/L) 4 $\times$ 0.026 ml; Nonidet P40 0.025 6 ml。

1.3 PCR 反应条件

在 1.5 ml 的 eppendorf 离心管中加入 PCR 反应缓冲液 900 μ l, 无菌水 400 μ l, 引物 T7 和 SP6 (50 μ mol/L) 各 10 μ l, Taq DNA 聚合酶 12 μ l (5 U/ μ l), 混匀后向每个 PCR 反应管中加 24 μ l, 然后用无菌牙签沾取过夜培养的菌液直接在 PCR 反应管中沾一下即可。

1.4 PCR 反应程序

先在 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 然后进行 35 个循环, 每一循环包括 95 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C (具体温度因不同的引物而不同) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1.1% 的琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色后用 GDS8000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 进行拍照, 并用 Gel worksID 软件包 (3.0 版本) 对每一扩增带的分子量进行分析鉴定。

2 结果与讨论

图 1 示用不同的模板 (质粒 DNA、甘油菌液和不含甘油的菌液) 进行克隆检测的结果。实验证明: 用菌液直接作为 PCR 反应的模板和用质粒 DNA 作模板进行克隆的 PCR 检测都能得到同样明确的结果; 同时含甘油的菌液与不含甘油的菌液作为模板都可直接进行 PCR 检测。

(下转第 22 页)

第一作者: 刘振辉, 出生于 1971 年, 博士生, 目前在研课题“中国文昌鱼基因组计划启动项目”。E-mail: zhenhuiliu@hotmail.com

收稿日期: 2001-08-16; 修回日期: 2002-05-18

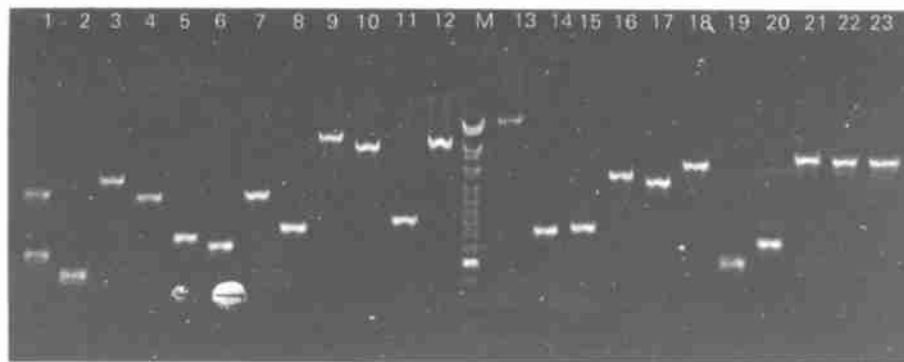


图1 青岛文昌鱼 cDNA 文库克隆 PCR 检测结果

1~7: 以煮沸法提取的质粒 DNA 为模板进行 PCR 检测的结果; 8~15: 以不含甘油的过夜培养的菌液为模板进行 PCR 检测的结果; 16~23: 以甘油保存菌为模板进行 PCR 检测的结果; M: 100 bp DNA ladder.

作者已在实验中大量应用该技术来检测单克隆中插入片段的大小。由于不需提取质粒 DNA,而且每次可对大量样品进行检测,因而能大大提高工作效率。

参考文献

- 1 Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. . Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.1~
- 2 Holmes D.S. and Quigley M. . A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, *Anal. Biochem.*, 1981, 114: 193~197
- 3 Birnboim H.C. and Doly J.. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7: 1 513~1 523
- 4 Zon L.I., Dorman D. M. and Orkin S.H. . The polymerase chain reaction clone miniprep, *Biotechniques*, 1989, 7: 696~698
- 5 Tarig H., Gerd H. and Horst Z. . Direct clone identification by PCR Miniprep, *Molecular Biology Today*, 2000, 1(3): 65~66 (本文编辑:刘珊珊)