DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.008

人胎肝cDNA文库构建及鉴定*

杨晓明 贺福初** 邢桂香** 吴祖泽** 李梦东 (第三军医大学西南医院传染科) 630038

提 要 从人胎肝组织提取总RNA并纯化出mRNA,经反转录合成第一、二链cDNA,去除小于200bp的cDNA片段后,连接EcoRI人工接头,与去磷酸化的λgt11噬菌体长、短臂连接,体外包装后感染E.coli Y1090,成功构建含4.2×10^8重组子的人胎肝cDNA表达文库,重组子平均外源插入片段约1.5 kb,适合用于筛选低丰度mRNA的cDNA克隆。

关键词 人胎肝;cDNA文库

中图法分类号 Q75

人胚胎肝脏含有多种可促进肝细胞增殖的生物活性因子,如肝脏刺激物质[1](Hepatic Stimulator Substance,HSS)、肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor,HGF)等,这类因子在治疗严重肝病中有一定疗效。虽然近年对其生物学活性、理化性质有了较多的了解,但由于多种原因,有关分子生物学研究一直未有突破性进展,分离并克隆这类基因对评价它们在治疗重型肝炎中的作用,阐明肝再生调控机理及最终进行基因工程产品的研制具有重要意义。

克隆新型细胞因子最有效的方法是构建cDNA文库,进而进行筛选、分离、亚克隆、测序。为分离并克隆HSS等cDNA克隆,我们以λgt11 DNA为载体,构建了人胎肝cDNA表达文库。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

E.coli Y1090 hsdR株,λgt11噬菌体去磷酸化长、短臂DNA购自Promega公司。

1.2 工具酶及试剂

总RNA提取、mRNA纯化、cDNA合成所有试剂及工具酶;EcoRI人工接头,T_4多核苷酸激酶,噬菌体体外包装系统,Sephacryl-S400层析柱、λ噬菌体吸附剂均购自Promega公司。α-^{32}P dCTP购自福瑞公司(比活性>3000 ci/mmol)。

1.3 人胎肝组织总RNA提取及mRNA纯化

取新鲜4月龄水囊引产胎儿肝脏约1 g,置异硫氰酸胍变性溶液,冰浴匀称20 s,加2 mol/L醋酸钠,等量酚-氯仿,混匀后置冰上5 min抽提,等量异丙醇沉淀,重新溶于变性溶液,等量异丙醇沉淀,离心去上液,沉淀即为总RNA。

取总RNA 5 μg溶于无RNA酶的去离心水,65℃保温10 min,加生物素标记的oligo(dT)探针和20×SSC溶液,加入已洗涤的可结合生物素的球形磁珠(SA-PMPs),室温保温10 min,用磁力架收集poly(A)$^+$mRNA-oligo(dT)-生物素-亲和素-磁珠,0.1×SSC溶液洗三次,用不含RNA酶水洗脱,无水乙醇沉淀,离心,沉淀即为poly(A)$^+$mRNA。

1.4 第一、二链cDNA合成

5 μg mRNA加oligo(dT)2.5 μg,70℃保温5 min,加5×第一链缓冲液,40 mmol/L焦磷酸钠和AMV逆转录酶,总反应体积55 μl,混匀后取5 μl至另管,加α-^{32}P-dCTP 4 μci作为示踪管。两管42℃保温120 min,加EDTA终示踪管。

第一链合成反应体系中加入10×第二链缓冲液,E.coli DNA聚合酶I,E.coli RNA酶H,总反应体积250 μl。取10 μl加α-^{32}P-dCTP作为示踪管,两管于14℃保温3 h,反应管70℃ 10 min后,加T_4 DNA多聚酶,37℃保温后用TE溶液平衡过的酚-氯仿抽提,无水乙醇沉淀,70%乙醇液洗二次,沉淀溶于40 μl TE溶液。两示踪管按文献[3]进行掺入量测定,并按公式(1)计算掺入率。

掺入率=掺入cpm值/总cpm值计数×100% (1)

1.5 连接EcoRI人工接头、克隆λgt11噬菌体载体、体外包装及效价测定

用经无菌去离子水洗涤5次的Sephacryl-S400柱去柱小于200 bp的合成cDNA片段,取cDNA 500 ng加连接缓冲液,牛血清白蛋白,EcoRI人工接头和T_4 DNA连接酶,15℃保温过夜,然后用T_4多核苷酸激酶对人工接头磷酸化,酚-氯仿抽提,Sephacryl-S400柱去除未连接上的EcoRI人工接头,连接上EcoRI接头的cDNA重组到已去磷酸化的λgt11噬菌体长、短臂,取5 μl加入噬菌体体外包装系统,22℃保温2 h,混合多份包装体系,加SM溶液1 ml,氯仿30 μl,4℃保存,并进行文库效价测定。

2 结果与讨论

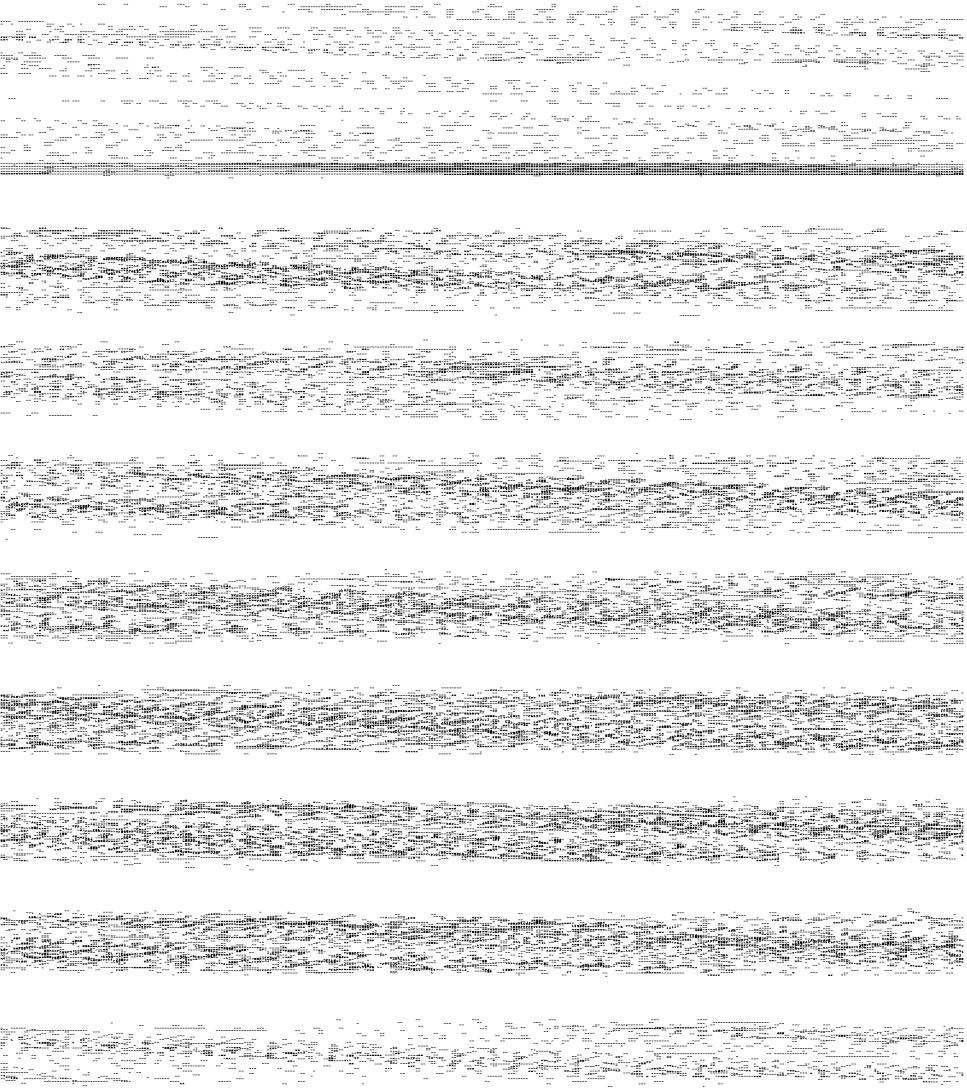
2.1 第一链(ss$^-$)、第二链(ds$^-$)cDNA的合成量及产物鉴定

从1 g人胎肝组织中提取总RNA 7500 μg,从中

* 国家863计划资助课题(863-102-19-4)

** 北京军事医学科学院放射医学研究所

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net