

# RNA 的提取和 cDNA 合成

## 第一节 概述

从真核生物的组织或细胞中提取 mRNA,通过酶促反应逆转录合成 cDNA 的第一链和第二链,将双链 cDNA 和载体连接,然后转化扩增,即可获得 cDNA 文库,构建的 cDNA 文库可用于真核生物基因的结构、表达和调控的分析;比较 cDNA 和相应基因组 DNA 序列差异可确定内含子存在和了解转录后加工等一系列问题。总之 cDNA 的合成和克隆已成为当今真核分子生物学的基本手段。

自 70 年代中叶首例 cDNA 克隆问世以来,已发展了许多种提高 cDNA 合成效率的方法,并大大改进了载体系统,目前 cDNA 合成试剂已商品化。cDNA 合成及克隆的基本步骤包括用反转录酶合成 cDNA 第一链,聚合酶合成 cDNA 第二链,加入合成接头以及将双链 DNA 克隆到于适当载体(噬菌体或质粒)。

### 一、RNA 制备

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点,容易受 RNA 酶的攻击反应而降解,加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在,因而在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染,并设法抑制其活性,这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶,人的皮肤、手指、试剂、容器等均可能被污染,因此全部实验过程中均需戴手套操作并经常更换(使用一次性手套)。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200℃烘烤 2 小时以上。凡是不能用高温烘烤的材料如塑料容器等皆可用 0.1%的焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶液处理,再用蒸馏水冲净。DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂,它和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性。DEPC 与氨水溶液混合会产生致癌物,因而使用时需小心。

试验所用试剂也可用 DEPC 处理,加入 DEPC 至 0.1%浓度,然后剧烈振荡 10 分钟,再煮沸 15 分钟或高压灭菌以消除残存的 DEPC,否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。但 DEPC 能与胺和巯基反应,因而含 Tris 和 DTT 的试剂不能用 DEPC 处理。Tris 溶\_\_\_\_\_液可用 DEPC 处理的水配制然后高压灭菌。

配制的溶液如不能高压灭菌,可用 DEPC 处理水配制,并尽可能用未曾开封的试剂。除 DEPC 外,也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外,为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器血管壁上,所有器皿一律需经硅烷化处理。

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

细胞内总 RNA 制备方法很多,如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒,可快速有效地提取到高质量的总 RNA。分离的总 RNA 可利用 mRNA 3'末端含有多聚(A)<sup>+</sup>的特点,当 RNA 流经 oligo (dT)纤维素柱时,在高盐缓冲液作用下,mRNA 被特异的吸附在 oligo(dT)纤维素上,然后逐渐降低盐浓度洗脱,在低盐溶液或蒸馏水中,mRNA 被洗下。经过两次 oligo(dT)纤维素柱,可得到较纯的 mRNA。纯化的 mRNA 在 70%乙醇中-70℃可保存一年以上。

## 二、cDNA 第一链的合成

所有合成 cDNA 第一链的方法都要用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶(反转录酶)来催化反应。目前商品化反转录酶有从禽类成髓细胞瘤病毒纯化到的禽类成髓细胞病毒(AMV)反转录酶和从表达克隆化的 Moloney 鼠白血病病毒反转录酶基因的大肠杆菌中分离到的鼠白血病病毒(MLV)反转录酶。

AMV 反转录酶包括两个具有若干种酶活性的多肽亚基,这些活性包括依赖于 RNA 的 DNA 合成,依赖于 DNA 的 DNA 合成以及对 DNA:RNA 杂交体的 RNA 部分进行内切降解(RNA 酶 H 活性)。MLV 反转录酶只有单个多肽亚基,兼备依赖于 RNA 和依赖于 DNA 的 DNA 合成活性,但降解 RNA:NA 杂交体中的 RNA 的能力较弱,且对热的稳定性较 AMV 反转录酶差。MLV 反转录酶能合成较长的 cDNA(如大于 2-3kb)。AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA 时的最适 pH 值,最适盐浓度和最适温度各不相同,所以合成第一链时相应调整条件是非常重要的。

AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶都必须有引物来起始 DNA 的合成。cDNA 合成最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3'端 poly(A)结合的 12-18 核苷酸长的 oligo(dT)。

## 三、cDNA 第二链的合成

cDNA 第二链的合成方法有以下几种:

(1) 自身引导法 合成的单链 cDNA 3'端能够形成一短的发夹结构,这就为第二链的合成提供了现成的引物,当第一链合成反应产物的 DNA:RNA 杂交链变性后利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段或反转录酶合成 cDNA 第二链,最后用对单链特异性的 S1 核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用 S1 核酸酶切割发夹结构时无一例外地将导致对应于 mRNA 5'端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

(2) 置换合成法 该方法利用第一链在反转录酶作用下产生的 cDNA:mRNA 杂交链不用碱变

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

性,而是在 dNTP 存在下,利用 RNA 酶 H 在杂交链的 mRNA 链上造成切口和缺口。从而产生一系列 RNA 引物,使之成为合成第二链的引物,在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的作用下合成第二链。该反应有 3 个主要优点: (1) 非常有效; (2) 直接利用第一链反应产物,无须进一步处理和纯化; (3) 不必使用 S1 核酸酶来切割双链 cDNA 中的单链发夹环。目前合成 cDNA 常采用该方法。

#### 四、cDNA 的分子克隆

已经制备好的双链 cDNA 和一般 DNA 一样,可以插入到质粒或噬菌体中,为此,首先必需连接上接头(Linker),接头可以是限制性内切酶识别位点片段,也可以利用末端转移酶在载体和双链 cDNA 的末端接上一段寡聚 dG 和 dC 或 dT 和 dA 尾巴,退火后形成重组质粒,并转化到宿主菌中进行扩增。合成的 cDNA 也可以经 PCR 扩增后再克隆入适当载体。

## 第二节 动植物组织 mRNA 提取

### 一、材料

水稻叶片或小鼠肝组织。

### 二、设备

研钵, 冷冻台式高速离心机, 低温冰箱, 冷冻真空干燥器, 紫外检测仪, 电泳仪, 电泳槽。

### 三、试剂

1、无 RNA 酶灭菌水: 用将高温烘烤的玻璃瓶 (180℃ 2 小时) 装蒸馏水, 然后加入 0.01% 的 DEPC (体积/体积), 处理过夜后高压灭菌。

2、75%乙醇: 用 DEPC 处理水配制 75%乙醇, (用高温灭菌器皿配制), 然后装入高温烘烤的玻璃瓶中, 存放于低温冰箱。

3、1×层析柱加样缓冲液: 20mmol/L Tris-Cl(pH7.6), 0.5mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA(pH8.0), 0.1% SDS。

4、洗脱缓冲液: 10mmol/L Tris-Cl (pH7.6), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 0.05% SDS。

### 四、操作步骤

#### (一) 动植物总 RNA 提取-Trizol 法

Trizol 法适用于人类、动物、植物、微生物的组织或培养细菌, 样品量从几十毫克至几克。

用 Trizol 法提取的总 RNA 绝无蛋白和 DNA 污染。RNA 可直接用于 Northern 斑点分析, 斑

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

点杂交， Poly(A)+分离，体外翻译，RNase 封阻分析和分子克隆。

- 1、将组织在液 N 中磨成粉末后，再以 50-100mg 组织加入 1ml Trizol 液研磨，注意样品总体积不能超过所用 Trizol 体积的 10%。
- 2、研磨液室温放置 5 分钟，然后以每 1ml Trizol 液加入 0.2ml 的比例加入氯仿，盖紧离心管，用手剧烈摇荡离心管 15 秒。
- 3、取上层水相于一新的离心管，按每 ml Trizol 液加 0.5ml 异丙醇的比例加入异丙醇，室温放置 10 分钟，12000g 离心 10 分钟。
- 4、弃去上清液，按每 ml Trizol 液加入至少 1ml 的比例加入 75%乙醇，涡旋混匀，4℃下 7500g 离心 5 分钟。
- 5、小心弃去上清液，然后室温或真空干燥 5-10 分钟，注意不要干燥过分，否则会降低 RNA 的溶解度。然后将 RNA 溶于水中，必要时可 55℃-60℃水溶 10 分钟。RNA 可进行 mRNA 分离，或贮存于 70%乙醇并保存于-70℃。

[注意]

- 1、整个操作要戴口罩及一次性手套，并尽可能在低温下操作。
- 2、加氯仿前的匀浆液可在-70℃保存一个月以上，RNA 沉淀在 70%乙醇中可在 4℃保存一周，-20℃保存一年。

## (二) mRNA 提取

由于 mRNA 末端含有多 poly(A)+，当总 RNA 流经 oligo(dT)纤维素时，在高盐缓冲液作用下，mRNA 被特异的吸附在 oligo(dT)纤维素柱上，在低盐浓度或蒸馏水中，mRNA 可被洗下，经过两次 oligo(dT) 纤维素柱，可得到较纯的 mRNA。

- 1、用 0.1mol/L NaOH 悬浮 0.5-1.0g oligo(dT)纤维素。
- 2、将悬浮液装入灭菌的一次性层析柱中或装入填有经 DEPC 处理并经高压灭菌的玻璃棉的巴斯德吸管中，柱床体积为 0.5-1.0ml，用 3 倍柱床体积的灭菌水冲洗柱床。
- 3、用 1x 柱层析加样缓冲液冲洗柱床，直到流出液的 pH 值小于 8.0。
- 4、将（一）中提取的 RNA 液于 65℃温育 5 分钟后迅速冷却至室温，加入等体积 2x 柱层析缓冲液，上样，立即用灭菌试管收集洗出液，当所有 RNA 溶液进入柱床后，加入 1 倍柱床体积的 1x 层析柱加样溶液。
- 5、测定每一管的 OD<sub>260</sub>，当洗出液中 OD 为 0 时，加入 2-3 倍柱床体积的灭菌洗脱缓冲液，

**免责声明：**以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

以 1/3 至 1/2 柱床体积分管收集洗脱液。

6、测定 OD260，合并含有 RNA 的洗脱组分。

7、加入 1/10 体积的 3M NaAc(pH5.2)， 2.5 倍体积的冰冷乙醇， 混匀， -20℃30 分钟。

8、4℃下 12000g 离心 15 分钟，小心弃去上清液，用 70%乙醇洗 涤沉淀，4℃下 12000g 离心 5 分钟。

9、小心弃去上清液，沉淀空气干燥 10 分钟，或真空干燥 10 分钟。

10、用少量水溶解 RNA 液，即可用于 cDNA 合成（或保存在 70%乙醇中并贮存于-70℃）。

[注意] 1、mRNA 在 70%乙醇中-70℃可保存一年以上。

2、oligo(dT)纤维素柱用后可用 0.3mol/l NaOH 洗净，然后用层析柱加样缓冲液平衡，并加入 0.02%叠氮钠（NaN<sub>3</sub>）冰箱保存，重复使用。每次用前需用 NaOH 水层析柱加样缓冲液依次淋洗柱床。

### 第三节 植物病毒 RNA 提取

大多植物病毒 RNA 为单链 RNA，并且其极性与 mRNA 极性相同，植物病毒 RNA 提取较为简单，一般使用酚氯仿即可获得满意结果。

#### 一、材料

提纯 TMV 病毒液（10mg/ml）。

#### 二、设备

冷冻台式离心机，低温真空干燥仪，电泳仪，电泳槽。

#### 三、试剂

TE-饱和酚:氯仿（1:1），氯仿，3M NaAc(pH5.2)，乙醇(100%和 70%)，TE 缓冲液，无 RNA 酶的双菌水。

#### 四、操作步骤

1、取一 eppendorf 管加入提纯 TMV（10mg/ml）400ml，再加入等体积酚/氯仿，盖紧管盖后用手充分振荡 1 分钟，4℃下 12000g 离心 10 分钟。

2、吸取水相于一新 eppendorf 管，再用酚/氯仿抽提，直至水相和有机相交界面无蛋白为止。

3、吸取水相于新 eppendorf 心管，加入等体积氯仿，用手倒置离心管数十秒，4℃下 12000g 离心 10 分钟。

4、取水相，加入 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc(pH5.2)，2.5 倍体积的冰冷乙醇，混匀，-20℃

**免责声明：**以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。



30 分钟。

5、4℃下 12000g 离心 15 分钟，小心弃去上清液，用 70%乙醇洗涤沉淀，4℃下 12000g 离心 5 分钟。

6、小心弃去上清液，沉淀真空干燥 5 分钟或空气干燥 10 分钟，并溶于无 RNA 酶的双菌水或 TE 缓冲液中。

7、取 10ml 进行电泳分析，另 10ml 用于 cDNA 合成。

[注意]

1、整个操作应尽可能在低温下进行。

2、由于病毒 RNA 镶嵌于外壳蛋白里面，因此要充分剥去病毒外壳蛋白，一般需要多次进行酚/氯仿的抽提。

## 第四节 cDNA 合成技术

### 一、Riboclone M-MLV(H-) cDNA 合成技术

Promega 公司的 RibocloneR M-MLV(H-) cDNA 合成系统采用 M-MLV 反转录酶的 RNase H 缺失突变株取代 AMV 反转录酶,使合成的 cDNA 更长。该系统的第一链合成使用 M-MLV 反转录酶,cDNA 第二链合成采用置换合成法,采用 RNaseH 和 DNA 聚合酶 I 进行置换合成,最后用 T4 DNA 聚合酶切去单链末端,方法简便易行。该系统试剂包括:

20μg 特异性引物

200μl M-MLV 第一链缓冲液(5×), 配方如下: 250mmol/L Tris·Cl pH8.3(37℃时); 375mmol/l KCl; 15mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 50mmol/L DTT; 10mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP 混合物(各 2.5mmol/L)

2×625μ rRNasinR RNA 酶抑制剂

10,000μ M-MLV 反转录酶, RNase H-

5μg 对照 RNA

400μl M-MLV 第二链缓冲液(10×), 配方如下:

400mmol/L Tris·Cl ,pH7.2; 850mmol/L KCl; 44mmol/L MgCl<sub>2</sub>;

30mmol/L DTT; 0.5mg/ml BSA。

500μ RNase H

500μ DNA 聚合酶 I

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

100 $\mu$  T4 DNA 聚合酶 I

2 $\times$ 1.25ml 不含核酸酶的水

以上所有试剂除对照 RNA 需在-70 $^{\circ}$ C保存外,其余均可保存于-20 $^{\circ}$ C,可以合成 40 $\mu$ g mRNA。

### (一) 第一链合成

#### 1. 试剂

[ $\alpha$ -32 P] dCTP (>400Ci/mmol), EDTA (50mM 和 200mM), TE-饱和酚:氯仿 (1:1), 7.5M NH<sub>4</sub>Ac, 乙醇(100%和 70%), TE 缓冲液。

#### 2. 操作步骤

(1) 取一灭菌的无 RNA 酶的 eppendorf 管,加入 RNA 模板和适当引物,每  $\mu$ g RNA 使用 0.5 $\mu$ g 引物(如使用 Not I 引物接头,使用 0.3 $\mu$ g),用 H<sub>2</sub>O 调整体积至 15 $\mu$ l, 70 $^{\circ}$ C处理 5 分钟,冷却至室温,离心使溶液集中在管底,再依次加入

5 $\times$ 第一链缓冲液 5 $\mu$ l

rRNasin RNA 酶抑制剂 25U

M-MLV(H-)反转录酶 200U

H<sub>2</sub>O 调至总体积 25 $\mu$ l

(2) 用手指轻弹管壁,吸取 5 $\mu$ l 至另一 eppendorf 管,加入 2-5 $\mu$ Ci [ $\alpha$ -32 P] dCTP (>400Ci/mmol), 用以第一链同位素掺入放射性活性测定。

(3) 37 $^{\circ}$ C(随机引物)或 42 $^{\circ}$ C(其它引物)温浴 1 小时

(4) 取出置于冰上

(5) 掺入测定的 eppendorf 管加入 95 $\mu$ l 50mM EDTA 终止反应,并使总体积为 100 $\mu$ l。可取 90  $\mu$ l 进行电泳分析(先用苯酚抽提),另 10 $\mu$ l 进行同位素掺入放射性活性测定。第一链合成 eppendorf 管可直接用于第二链合成

注: 以上 25 $\mu$ l 反应总体积中所用 RNA 量为 1 $\mu$ g,如合成 5 $\mu$ g RNA,则可按比例扩大反应体积, 倒

5 $\mu$ g RNA 使用 125 $\mu$ l 总体积进行合成。

### (二) 第二链合成

1、 取第一链反应液 20 $\mu$ l, 再依次加入

10 $\times$ 第二链缓冲液 20 $\mu$ l

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

DNA 聚合酶 I 23 $\mu$

RNase H 0.8 $\mu$

H<sub>2</sub>O 加至终体积为 100 $\mu$ l

2、轻轻混匀,如需进行第二链同位素掺入放射性活性测定,可取出 10 $\mu$ l 至另一 eppendorf 管,加入 2-5 $\mu$ Ci[ $\alpha$ -32 P] dCTP。

3、14 $^{\circ}$ C 温浴 2 小时(如需合成长于 3kb 的 cDNA, 则需延长至 3-4 小时)。

4、掺入测定 eppendorf 管中加入 90 $\mu$ l 50mM EDTA, 取 10 $\mu$ l 进行同位素掺入放射性测定,余下的可进行电泳分析。

5、cDNA 第二链合成离心管反应液 70 $^{\circ}$ C 处理 10 分钟, 低速离心后置冰上。

6、加入 2 $\mu$  T4 DNA 聚合酶, 37 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟。

7、加入 10 $\mu$ l 200mmol/L EDTA 终止反应。

8、用等体积酚:氯仿抽提 cDNA 反应液,离心 2 分钟。

9、水相移至另一 eppendorf 管,加入 0.5 倍体积的 7.5M 醋酸铵(或 0.1 倍体积的 1.5M 醋酸钠,pH5.2), 混匀后再加入 2.5 倍体积的冰冷乙醇(-20 $^{\circ}$ C), -20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后离心 5 分钟。

10、小心丢去上清液,加入 0.5ml 冰冷的 70%乙醇,离心 2 分钟。

11、小心移去上清液,干燥沉淀。

12、沉淀溶于 10-20 $\mu$ l TE 缓冲液。

(三) 同位素掺入放射性活性测定、计算和电泳分析

#### 1. 试剂

1mg/ml 鲑鱼精 DNA, 三氯乙酸(TCA, 5%和 7%), 碱性琼脂糖胶, 碱性胶电泳缓冲液, (30mM NaOH, 1mM EDTA), 2 $\times$ 样品缓冲液, (20mM NaOH, 20% 甘油, 0.025%溴酚蓝)。

#### 2. 操作步骤

(1) 各取一(2)(5)中和二(4)反应液各 3 $\mu$ l, 点于玻璃纤维滤纸, 室温干燥, 这些样品代表总放射性活性。

(2) 同样各取 3 $\mu$ l 中反应液至含有 100 $\mu$ l(1mg/ml)鲑鱼精 DNA 中, 混匀, 加入 0.5ml 5% TCA, 涡旋混合仪混合后置冰上 5-30 分钟。

(3) 用玻璃纤维滤纸过滤, 用冰冷的 5% TCA 洗三次, 每次用 5ml TCA, 再用 5ml 丙酮或乙醇漂洗, 这些样品代表掺入放射性活性。

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。



(4) 分别测定总放射性活性强度和掺入放射性活性强度,可用盖革计算器,也可用液闪计数。

### 3. 第一链产量测定

第一链掺入率(%)= 掺入 cpm/总 cpm ×100%

掺入 dNTP(nmol)=2nmol dNTP/μl ×反应体积(μl)×(第一链掺入率)

设 330 为每 mol dNTP 的平均分子量

合成 cDNA 量(ng)=掺入 dNTP (nmol)×330ng/nmol

mRNA 向 cDNA 转变率=合成 cDNA 量(ng) / 模板 RNA 量(ng)×100%

例如总放射性活性强度为 254,000cpm, 掺入放射性活性强度为 3040cpm, 所用 RNA 模板量为 1μg,反应体积为 25μl, 则:

掺入率=3040/254000×100%=1.2

掺入 dNTP 量=2nmol dNTP/μl×25×1.2%=0.6nmol

合成 cDNA 量=0.6nmol dNTP×330ng/nmol=198ng

mRNA 向 cDNA 转变率=198nm/1000ng×100%=19.8%

由于 1000ng RNA 中 20%(5μl/25μl)用于掺入测定,而反应体积占总体积 80%,因而实际第一链 cDNA 合成量为 0.8×198ng=158ng。

### 4. 第二链产量计算

除需去除第一链掺入 dNTP 外,方法同第一链产量计算

第二链掺入率= 掺入放射性活性/ 总放射性活性??

掺入 dNTP 量(nmol)=[0.4nmol dNTP/μl×反应体积(μl) - 第一链掺入 nmol]×第二链掺入率

第二链 cDNA 合成量(ng)=nmol dNTP×330ng/nmol

双链 cDNA 转变率=双链 cDNA 合成量(ng)/ 单链 cDNA 合成量(ng)

例: 第二链掺入放射性活性强度为 2780cmp, 总放射性活性强度为 235000cpm.

第二链掺入率=2780/235000×100%=1.18%

第二链合成 dNTP 量=[(0.4nmol/μl×100μl) - 0.48nm]×1.18% =0.47nmol

合成第二链 cDNA 量(ng)=0.47nmol×330ng/nmol =155ng

双链 cDNA 转变率=155ng /158ng×100%=98%

一般 cDNA 第一链转变率和双链转变率以 12-50%和 50-200%为好。

### (四) 电泳分析

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

通常合成的 cDNA 第一链和第二链长度为 350-6000 碱基,需进行 1.4%碱性琼脂糖电泳。将第一链和第二链掺入测定管中的反应液先用酚抽提,乙醇沉淀,方法见本章(二)第二链合成中的 9-12 步,一般第一链和第二链上样量相同。

#### 1. 标准分子量 DNA 参照物的同位素标记

(1) 通常使用  $\lambda$ DNA/HindIII 片段,用 Klenow DNA 聚合酶进行 32 P 标记

10 $\times$ HindIII 缓冲液 2.5 $\mu$ l

dATP 0.2mmol/L

dGTP 0.2mmol/L

[ $\alpha$ -32 P]dCTP(400Ci/mmol) 2 $\mu$ Ci

$\lambda$ DNA/HindIII 标准 DNA 1 $\mu$ g

Klenow DNA 聚合酶 1 $\mu$

加 H<sub>2</sub>O 到总体积 25 $\mu$ l

(2) 室温放置 10 分钟,加 2.5 $\mu$ l 200mM EDTA 终止反应,加入 2 $\times$ 样品缓冲液,贮存于-20 $^{\circ}$ C。

#### 2. 电泳分析

(1) 用 50mM NaCl, 1mM EDTA 制备 1.4%的碱性琼脂糖电泳,并置碱性电泳缓冲液中 30 分钟。

(2) 取样品液,用 TE 调整体积,使第一链和第二链产率测定液的体积相同,加入等体积的 2 $\times$ 样

品缓冲液(20mmol/L NaOH, 20%甘油, 0.025%溴酚兰)。

(3) 加样,电泳到染料距前沿只剩胶长度的 1/3 处,电泳缓冲液为 30mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA。

(4) 将胶浸入 7% TCA 中,室温放置 30 分钟(直至染料由蓝色变至黄色),取出置滤纸上,干燥数小时。

(5) 用保鲜膜包裹干燥的胶,室温压 X 光片(用增感屏时-70 $^{\circ}$ C 压片)。

#### 二、其它 cDNA 合成技术

除 Riboclone M-MLV(H)-cDNA 合成技术外, Promega 公司还提供有多个 AMV 合成试剂盒,不同试剂盒所提供的引物或引物-延接头(Primpr-Adaptor)不同,有 oligo(dT)15 引物、随机引物、Xba I 引物-延接头、Not I 引物-延接头等,其余试剂一样,这些系统包括:

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

20mg 引物

20ml 5×第一链缓冲液, 配方如下:

250mmol/L Tris-Cl, pH8.3(42℃); 250mmol/L KCl; 50mmol/L

MgCl<sub>2</sub>; 2.5mmol/L 亚精胺(Spermidine); 50mmol/L DTT;

20mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP(各 5mmol/L)。

50ml 40mM 焦碳酸钠

625m rRNasin RNA 酶抑制剂

600m AMV 反转录酶

5mg 1.2kb 对照 RNA

200ml 10×第二链缓冲液, 配方如下:

400mmol/L Tris-Cl, pH7.2; 900mmol/L KCl; 30mmol/L

MgCl<sub>2</sub>; 30mmol/L DTT; 0.5mg/ml BSA。

2m E.Coli RNaseH

500m E.Coli DNA Polymerase I

100m T4 DNA Polymerase I

1.5ml 不含核酸酶的水

以上所有试剂除对照 RNA 需在-70℃保存外, 其余均可保存于-20℃, 可以合成 40mg mRNA。

#### (一) 第一链合成

下面介绍的是 25ml 体积反应系统, 该系统可合成多至 2mg mRNA, 每增加 1mg mRNA, 需增加反应体积 10ml, 如 5mg mRNA 需 55ml 反应体积。

引物或引物-延接头和反转录酶与 mRNA 的比例应分别保持为 0.5mg/mg (对 Not I 引物-延接头为 0.3mg/mg) 和 15m/mg。

#### 1、试剂:

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (>400ci/mmol), EDTA(50mM 和 200mM), TE 饱和酶/氯仿, 7.5mM NH<sub>4</sub>Ac, 100% 和 70%乙醇, TE 缓冲液(10mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA)。

#### 2、操作步骤:

(1) 取一灭菌的无 RNA 酶的 eppendorf 管加入的 RNA 样品, 及引物或引物-延接头, 用 H<sub>2</sub>O 调节 0.5mg 引物/mg mRNA (或 0.3mg Not I 引物-延接头/mg mRNA) 的体积至 15ml,

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

70℃加热 5 分钟，待冷至室温，离心数秒钟使溶液集中在管底，然后依次加入：

5×第一链缓冲液 5ml

rRNasinR RNA 酶抑制剂 25ml

40mM 焦碳酸钠 2.5ml

AMV 反转录酶 15m/mg RNA

加无水 RNA 酶水至总体积 25ml

在加入焦碳酸钠和 AMV 反转录酶前，需将反应液 42℃温浴 5 分钟，以阻止焦碳酸钠沉淀。

焦碳酸钠主要用于抑止第一链形成发夹结构。

(2) 轻弹 eppendorf 管，取出 5ml 至另一加于 2-5m[a-32P]dCTP c>400ci/mmol) (其体积不能超过 1ml)，用以第一链同位素掺入放射性活性测定。

(3) 42℃温浴 1 小时。

(4) 取出置冰上。

(5) 掺入测定的 eppendorf 管加入 50mM EDTA, 终止反应, 并使总体积为 100ml。可取 90ml 进行电泳分析, 另 10ml 进行同位素掺入测定。

(6) 第一链合成离心管可直接用于第二链合成。

## (二) 第二链合成

第二链合成可在第一链合成反应液中直接进行。

1、第一链反应液 (20ml) 中依次加入

10X 第二链缓冲液 10ml

E.Coli DNA polymerase I 23m

E.Coli RNaseH 0.8m

加无核酸酶水至总体积 100ml

余下步骤同本章第四节一 (二) 2-12 步及 (三) 和 (四)。