

Nuclear Yeast Two-Hybrid Library Construction Kit

核蛋白酵母双杂交建库试剂盒

70202ES

产品使用说明书

Ver. CN20240605

A large, decorative orange wave graphic at the bottom of the page, consisting of several overlapping, rounded shapes in various shades of orange, creating a modern, fluid design.

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
储存条件	2
使用说明	2
核蛋白酵母双杂交文库构建操作步骤	3
附录	9
注意事项	10

产品简介

Nuclear Yeast Two-Hybrid Library Construction Kit 是一款用于构建真核生物的全长核蛋白酵母双杂交文库的试剂盒，本试剂盒含有三个改造的 PGADT7-S 序列载体，分别命名为 PGADT7-S1、PGADT7-S2、PGADT7-S3，三个载体含有不同的读码框阅读方式，可以方便合成一份相同的双链 cDNA 构建三框文库。且改造的 PGADT7-S 序列载体多克隆上游含有 NLS 信号序列，可以把文库全部转录本基因定位到核内。本产品适用于起始模板为 100 ng-100 µg 不同来源真核生物总 RNA 样本。经过 mRNA 分离、单链 cDNA 合成、双链 cDNA 合成、双链 cDNA 分级纯化、小量连接转化确定分级取舍、大量连接转化。

产品信息

货号	70202ES04
规格	4 T

组分信息

组分编号	组分名称	70202ES04	保存温度	翌圣货号	组分位置
引物	70202-A1 ○ SMART III Oligo-N	10 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-A2 ○ CDS III -N Primer	10 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-A3 ○ 5' PCR-N Primer	100 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-A4 ○ 3' PCR-N Primer	100 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-A5 ○ T7 Primer	100 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-A6 ○ 3' A D Primer	100 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
试剂	70202-B1 ● PGADT7-S1 Linearized carrier	20 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-B2 ● PGADT7-S2 Linearized carrier	20 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-B3 ● PGADT7-S3 Linearized carrier	20 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-B4 ● DH10B 宿主菌	200 µL	-85~-75°C	NA	试剂盒 1
	70202-C1 ● 5× Hifair® III Buffer	250 µL	-25~-15°C	11111ES	试剂盒 2
	70202-C2 ● Hifair® III Reverse Transcriptase	50 µL	-25~-15°C	11111ES	试剂盒 2
	70202-C4 ● dNTP Mix	100 µL	-25~-15°C	NA	试剂盒 2
	70202-C5 ● RNase H	10 µL	-25~-15°C	12906ES	试剂盒 2
	70202-C6 ● RNase inhibitor	10 µL	-25~-15°C	10603ES	试剂盒 2
	70202-C7 ● Mouse liver total RNA (1.0 µg/µL)	5 µL	-25~-15°C	NA	试剂盒 2
	70202-D1 ● Hieff® Fast T4 DNA Ligase	100 µL	-25~-15°C	10299ES	试剂盒 2
	70202-D2 ● 10 × T4 DNA Ligase Buffer	250 µL	-25~-15°C	10299ES	试剂盒 2
	70202-E1 ● Sodium acetate (3M; pH 4.8)	200 µL	2~8°C	NA	包装袋
	70202-E2 ● Hepatic glycogen (20 µg/µL)	100 µL	-25~-15°C	NA	试剂盒 2
	70202-F1 ● FuniCut™ Sfil	100 T	-25~-15°C	15057ES	试剂盒 2
	70202-F2 ● Purified column buffer	30 mL	2~8°C	NA	包装袋
	70202-F3 ● 2× Hieff® PCR Master Mix	1 mL	-25~-15°C	10102ES	试剂盒 2
	70202-F4 ● Xylene cyanol (1%)	1 mL	室温(避光)	NA	包装袋
	70202-F5 NA Purification column	4 个	室温	NA	包装袋

储存条件

试剂盒收到后可按照组分信息中保存条件将试剂依据要求存放，避免污染与反复冻融，稀释成工作浓度试剂即用即弃，不可重复使用。

使用说明

1. 实验前请仔细阅读

1) 关于双链 cDNA 扩增 (Library Amplification)

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 1 列举了使用本试剂盒进行文库扩增，Input Total RNA 量与相应扩增循环数的推荐。

表 1 Input Total RNA 量与扩增循环数推荐表*

Input Total RNA	PolyA RNA	Number of cycles
5 µg	100 ng	14-16
3 µg	50 ng	15-17
1 µg	25 ng	16-18
500 µg	10 ng	17-19
250 µg	5 ng	18-20
100 µg	-	19-21
50 µg	-	20-22
10 µg	-	22-24

【注】：*由于文库产量不仅与投入量和扩增循环数相关，样本质量、片段化条件、分选条件等都会影响产量。为了确定样品和条件的最佳循环次数，我们强烈建议您执行一系列循环：16,18,20 和 22 个循环。

2. 关于三框文库构建

利用酵母双杂交系统筛选文库研究蛋白互作是建立在蛋白在酵母细胞内正确翻译表达的基础上。所以酵母双杂交 cDNA 文库插入片段的正确性是一个重要的评价指标。蛋白以三联体密码子翻译成蛋白质，不同的读码框克隆会得到不同的产物，即使是定向克隆的方式也只有 1/3 的可能得到正确的翻译产物。针对以上问题，翌圣生物设计了三种含有相同接头不同读码方式的定向克隆线性化载体，可以有效纠正蛋白读码方式，PGADT7-S2 Linearized carrier 和 PGADT7-S3 Linearized carrier 是在 PGADT7-S1 Linearized carrier 基础上分别引物译码突变，改变了克隆基因的读码方式。三种线性化载体的浓度均为 250 ng/µL。可等体积混合构建三款文库，而不需要繁琐的利用引物突变的方式引入双链 cDNA 的突变。

3. 自备材料 (Other Materials)

- 1) MolPure® PCR Purification Kit PCR 产物纯化试剂盒（翌圣货号：19106ES50）。
- 2) MolPure® TRleasy Plus Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒(带离心柱)（翌圣货号：19211ES60）。
- 3) mRNA purification kit。
- 4) LD-PCR 双链扩增用酶。
- 5) 电感受态细胞,我们建议使用转换效率 $> 1 \times 10^9$ cfu/µg 的电感受态细胞。
- 6) 其他材料：SOC 培养基、TE 缓冲液（10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 mM EDTA）、DNA marker(翌圣货号：10501ES; 10502ES)、50X TAE 电泳缓冲液(翌圣货号：60116ES)、LB-Amp 平板培养基、电转化仪、PCR 仪(翌圣货号:80491ES)等。

4. 操作流程

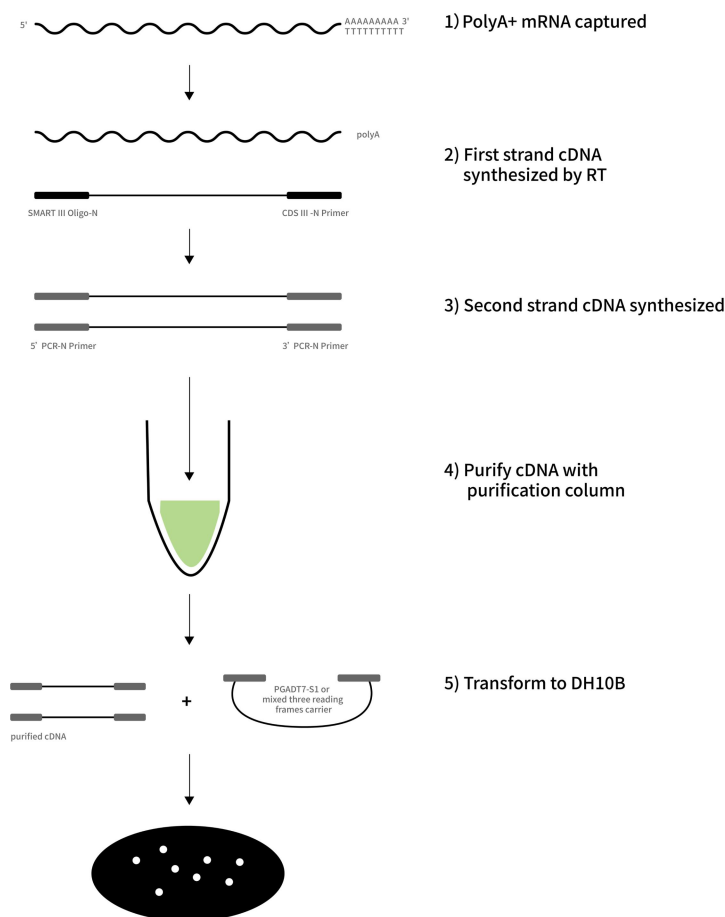


图 1 核蛋白酵母双杂交文库构建试剂盒流程原理图

核蛋白酵母双杂交文库构建操作步骤

1. 总 RNA 准备和处理

总 poly A + RNA 起始材料的完整性和纯度是高质量 cDNA 合成的重要元素。上海翌圣提供了几种用于从多种来源样本中分离总 RNA 的试剂盒。

1) MolPure® TRleasy™ Plus Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒(带离心柱) (翌圣货号:19211ES60) 是利用 MolPure® RNA Column A1 和改进的异硫氰酸胍/酚一步法 (TRIzol 法) 来提取样品中的总 RNA, 适用于 TRIzol 法所能提取的所有样本, 包括各种动植物、细菌组织和细胞样品。该试剂盒结合了 TRIzol 法试剂稳定性好, 纯度高和离心柱方便快捷的优点, 且不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程。试剂盒内的 MolPure® RNA Column A1 可选择性吸附核酸, 不吸附蛋白质、多糖和其它非核酸类物质, 提取的总 RNA 纯度高。

2) MolPure® Plant RNA Kit 植物 RNA 提取试剂盒 (翌圣货号: 19291ES50) 适用于拟南芥、水稻、玉米、小麦、番茄、烟草和棉花、冬青等简单多糖多酚植物样品中 RNA 的提取。提取过程不需要用到有毒的酚、氯仿等有机物抽提, 操作简便, 可在 40 min 内完成植物样品 (100-200 mg 新鲜或冷冻保存样本) 总 RNA 的提取和纯化工作。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料, 配合本公司独特的裂解液配方可以最大限度的回收高纯度 RNA。DNase I 直接在柱上消化 gDNA, 提取的总 RNA 纯度高, 质量稳定可靠

3) 评估总 RNA 完整性的方法

SYBR Green I 琼脂糖凝胶显色:

通过用 SYBR Green I (翌圣货号: 10222ES) 荧光染色, 在琼脂糖凝胶上 28S:18S RNA 的比例可以目测评估总 RNA 的完整性。真核 RNA 的理论 28S:18S 比率约为 2:1。对于哺乳动物的总 RNA, 你应该观察到两条明亮的条带, 大约 1.9 和 4.5 kb; 这些条带代表 28S 和 18S 核糖体 RNA。这些带的强度比应为 1.5~ 2.5:1。

2. mRNA 纯化

我们强烈建议用经过纯化的 mRNA 作为起始材料来构建文库, 纯化的 mRNA 可以排除 rRNA 和 tRNA 对下游 PCR 扩增产生的非特异性干扰, 增强文库的有效扩增, 可以保证下游双链扩增中合适的循环数来源的双链 cDNA, 在一定程度上保证了文库的均一性。

使用 mRNA purification kit 将 mRNA 从 20 μ g-100 μ g 完整度良好的总 RNA 中进行分离纯化。

- 1) 测定样品总 RNA 浓度, 取 75 μ g 样品加 DEPC 水定容至 100 μ L, 65 $^{\circ}$ C 水浴处理 5min 后, 破坏二级结构, 冰上放置备用。
- 2) 将磁珠充分重悬后吸取 200 μ L 转移至 1.5 mL 灭菌的离心管中, 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上 30s 或至磁珠完全沉淀于离心管底部。
- 3) 弃上清, 离心管从磁力架上移开后, 加入 100 μ L Binding Buffer 重悬磁珠, 将离心管放回磁力架, 待磁珠完全沉淀后弃上清, 将离心管从磁力架上移开, 加入 100 μ L Binding Buffer 重悬磁珠。
- 4) 将 RNA 样品加入离心管中, 充分混匀, 用移液器快速吹打 5 min, 使 mRNA 与磁珠上的寡聚胸腺嘧啶 (dT)25 退火结合。
- 5) 将离心管置于磁力架上至溶液澄清, 去上清。
- 6) 将离心管从磁力架上移开, 用 200 μ L Washing Buffer 清洗 mRNA-磁珠的混合物 2 次, 每次清洗后借助磁力架将上清去除, 可以留 2 μ L 液体, 避免吸到磁珠。
- 7) 向离心管中加入 10 μ L 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 的缓冲液, 全部转入灭菌的 PCR 管中, 打开 PCR 仪, 设置为 65 $^{\circ}$ C, 将加入样品的 PCR 管, 放入 PCR 仪, 同时在 2min 内把 PCR 仪温度从 65 $^{\circ}$ C 升至 80 $^{\circ}$ C, 然后迅速置于磁力架上, 带溶液澄清后将上清转移至新的 RNA-free PCR 管中。
- 8) 在 PCR 仪上按照表 2 所示设置反应程序打开 mRNA 二级结构。待第一链 cDNA 合成。

表 2 打开 2 mRNA 二级结构反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105 $^{\circ}$ C	on	
65 $^{\circ}$ C	10 sec	14 cycles *初始温度为 65 $^{\circ}$ C, 以后每个循环增加 1 $^{\circ}$ C, 直到 80 $^{\circ}$ C 结束
80 $^{\circ}$ C	2 sec	1

【注】: 当温度升到 65 $^{\circ}$ C 再把样本放入 PCR 仪中, 当温度升到 80 $^{\circ}$ C 立即把样本拿出置于冰上。

3. 第一链 cDNA 的合成

- 1) 将第一链合成试剂从 -20 $^{\circ}$ C 取出, 颠倒混匀后瞬离。在灭菌的 PCR 离心管中加入以下物质, 高速离心混匀: (X=总 RNA 加 1 μ g, 浓度至少为 0.1 μ g/ μ L。mRNA 至少加 0.3 μ g 以上, 浓度至少为 0.1 μ g/ μ L)。按表 3 所示, 配制第一链 cDNA 合成的反应液。

表 3 第一链 cDNA 合成反应体系 1

名称	体积 (μ L)
Fragmented mRNA	X μ L
CDSIII-N 引物 (10 μ M)	1 μ L
dNTP Mix(10 mM)	1 μ L
无菌 H ₂ O	11-X μ L
Total	13 μ L

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬间将反应液离心至管底。在PCR仪上72°C温育2分钟。
- 3) 迅速冰上冷却2分钟; 11000 rpm/min, 10 s。
- 4) 取一只新的灭菌的PCR管，按表4所示配制以下体系。

表 4 第一链 cDNA 合成反应体系 2

名称	体积 (μL)
5×Hifair® III Buffer	4.0 μL
RNase inhibitor	1 μL
Hifair® III Reverse Transcriptase	1 μL
Total	6 μL

- 5) 将上述第一链 cDNA 合成反应体系 2 加入到 第一链 cDNA 合成反应体系 1 中。
- 6) 在 PCR 仪上 42°C温育 10 分钟。
- 7) 加入 1 μL SMART III oligo-N (10 μM) 引物，混匀，42°C PCR 仪温育 1 小时。
- 8) 在 PCR 仪上 75°C温育 10 分钟，终止第一链的合成。
- 9) 冷却至室温，加入 1 μL RNase H (2 units) 。
- 10) 在 PCR 仪上 37°C温育 20 分钟，-20°C保存待用 (单链 cDNA 可于-20°C保存 3 个月)。或者结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 5 所示设置反应程序，进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

4. 第二链 cDNA 的合成

- 1) 将第二链合成试剂从-20 °C 取出，解冻后颠倒混匀；按照表 5 所示，配制第二链 cDNA 合成反应液。

表 5 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
1st Strand cDNA	5
Deionized H ₂ O	25
10*Advantage 2 Buferr	5
dNTP Mix	4
5' PCR-N Primer (10 μM)	5
3' PCR-N Primer (10 μM)	5
50* Advantage 2 polymerase mix	1
Total	50

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬间将反应液离心至管底。
- 3) 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 6 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 6 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	on	
95°C	30 sec	1
95°C	10 sec	15-22 cycles *
68°C	6 min	
68°C	5 min	1
16°C	Hold	-

4) 取 5 μL 第二链 cDNA 合成扩增产物做 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余的 -20°C 保存备用 (此时的产物在 $45\mu\text{g}$ 左右)。

5. 双链 cDNA 回收

推荐使用 MolPure[®] PCR Purification Kit PCR 产物纯化试剂盒 (货号: 19106ES50)

- 1) 将样品加入到 1.5 mL 离心管中, 加入 4 倍体积的 CP buffer, 混匀后转移至纯化柱中。
- 2) 11000 rpm/min, 离心 1 min, 弃上清。
- 3) 加入 700 μL DNA washing buffer, 11000 rpm/min, 离心 1 min, 弃上清。
- 4) 重复步骤 3。
- 5) 11000 rpm/min, 空离 2 min, 弃去收集管。
- 6) 更换成新的 1.5 mL 离心管, 加入 50 μL ddH₂O, 11000 rpm/min, 离心 1 min 洗脱 (此时的产物在 $36\mu\text{g}$ 左右)。

6. cDNA 双链酶切和纯化

1) cDNA 双链酶切, 按照表 7 体系配制 Sfi I 酶切体系:

表 7 cDNA 双链酶切体系

名称	体积 (μL)
cDNA sample($8\mu\text{g}$)	X (根据双链的定量浓度计算体积)
10 \times restriction buffer	10
FuniCut [™] SfiI	4
Sterile Water	X (根据双链量的添加体积来添加水定容到总体积 100 μL)
Total	100

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀, 并短暂离心将反应液收集至管底。配好混合体系后分装成 50 μL /管于 PCR 仪 50°C 酶切过夜。
- 3) 将两个 PCR 管反应产物混合, 然后向双链体系中加入 10 μL 1%二甲苯蓝染料并充分混合。
- 4) 标记两组 20 个 1.5 mL EP 管, 并按顺序排列在双面板上。
- 5) 准备一个 cDNA 双链纯化色谱柱用于纯化, 将柱反转几次以完全重悬凝胶基质, 通过反转色谱柱几次从色谱柱中去除气泡。然后取下底盖, 让色谱柱自然滴下 (如果色谱柱在 3 分钟后没有排出, 请重新盖上顶盖。此压力应导致色谱柱排出)。将色谱柱连接到环形支架上。
- 6) 让储存缓冲液通过重力流通过色谱柱, 直到可以看到色谱柱中的凝胶珠表面。即流速应约为 1 滴/40-60 秒。1 滴的体积应约为 40 μL 。如果流速太慢 (即超过 1 滴/100 秒) 并且一滴的体积太小 (即小于 25 μL), 则应完全重悬基质并重复滴注程序直至达到以上参数。
- 7) 当存储缓冲液停止滴出时, 小心轻柔地 (沿着色谱柱内壁) 向色谱柱顶部添加 700 μL 柱缓冲液并使其排出。
- 8) 当此缓冲液停止滴落 (约 15-20 分钟) 时, 小心均匀地将约 85 μL PCR 产物和二甲苯蓝染料混合产物加入基质的顶部中心表面。
- 9) 向纯化柱中加入用 100 μL Purified column buffer, 让缓冲液从色谱柱中排出, 直到树脂上方没有液体流出。当缓冲液停止下滴时, 继续下一步。此时, 染料层应在柱内几毫米处。
- 10) 将包含收集管的双面板放在色谱柱下方, 使第一个管位于色谱柱出口下方。加入 600 μL 柱缓冲液, 立即开始收集管号 1-20 中的单滴组分 (每管约 35 μL)。
- 11) Nanodrop 2000 检测每个收集管的双链 cDNA 浓度, 通常第五个级分是含有目标 cDNA 的, 收集含有 cDNA 的级分。

7. 纯化的双链 cDNA 组分小量检测

1) 取 200 μL PCR 管, 并分别按照级分名称标记。按照表 8 反应体系配制小量连接反应体系。于 PCR 仪上 16°C 连接 16 小时。

表 8 cDNA 小量连接反应体系

名称	体积 (μL)
cDNA: pGADT7-sfil-1 线性化载体	X 摩尔比 (3:1)
10 × T4 DNA Ligase Buffer	1
Hieff® Fast T4 DNA Ligase	1
Sterile Water	10-X
Total	10

2) 在超净台中取对应灭菌的 1.5 mL EP 管，并分别标记满足浓度要求的 cDNA 的前四个级分，放置冰上预冷 5 min。同时准备 4 个 2 mm 电极杯，放置冰上预冷。

3) 向对应的 EP 管中加入 80 μL 解冻的 DH10B 电转化感受态，2 μL 小量连接产物，用 200 μL 移液器充分混匀。

4) 用 200ul 移液器将混合产物转移到预冷的电极杯中，并做好标记。

5) 电击反应，电转化参数：2.0 KV，5 ms，电击后迅速加入 1 mL SOC 培养基，转移至 1 mL 培养基，37°C 250 rpm 培养 30 min。

6) 取 200 μL 培养产物涂布 10 cm 直径含 amp 抗性的 LB 平板。37°C 培养箱过夜培养。

7) 第二天用 T7/3' AD 通用引物对大肠杆菌单菌落做菌落 PCR 鉴定。建议每个组分产物菌落选取 10 个单菌落抽检。

8) 跑胶分析对应纯化组分片段长度。一般要求片段长度在 750 bp-2000 bp 之间。将满足要求的组分混合合并待大量转化。

8. 双链 cDNA 大量转化

1) 经检测合格的分级纯化产物混合后进行肝糖原沉淀:按照表 9 体系配制肝糖原沉淀体系。

表 9 肝糖原沉淀反应体系

名称	体积 (μL)
分级的 cDNA 双链	X
肝糖原(5 mM)	4
NH ₄ Ac(7.5 mM)	0.5*X
无水乙醇	2.5* (X+0.5*X)
Total	-

2) 于-80 °C放置 2h。

3) 11000 rpm/min，30 min，4 °C，弃上清。

4) 加入 150 μL 75%乙醇漂洗 1 次，11000 rpm/min，10 min，4 °C，弃上清，开盖室温干燥 5 min。

5) 加入 10 μL 去离子水，待大量连接转化。

6) 分级纯化混合产物和 pGADT7-sfil-1 (也可以和 pGADT7-sfil-1、pGADT7-sfil-2、pGADT7-sfil-3 按照 mol 比 1:1 混合连接构建三框文库) 线性化载体连接，连接反应体系参照表 8。

连接产物电转化感受态细胞 DH10B (电转化感受态)。按照表 10 体系设计转化反应。

表 10 连接产物大量转化反应体系

名称	实验组体积 (μL)	阳性对照组体积 (μL)	阴性对照组体积 (μL)
连接产物	1	-	-
pUC19 质粒 (10 pg/μL)	-	1	-
DH10B 感受态细胞	50	50	50
Total	51	51	50

[注]: 用移液器将待转化产物转移到冰浴预冷的 0.2 cm 的电极杯中，注意不要产生气泡。

- 7) 电转化参数: 2.0 KV, 5 ms, 电击后迅速加入 1 mL SOC 培养基, 转移电击反应产物到至灭菌的 1.5 mL EP 管, 37°C 250 rpm 培养 30 min。
- 8) 分别取稀释 100 倍、1000 倍的菌液 100 μ L 涂布 100 mm LB 平板(氨苄抗性), 37 °C培养过夜, 统计菌落数, 计算滴度。
- 9) 根据统计结果计算达到文库滴度 2×10^6 转化子所需的转化实验组个数 N, 按照表 10 大量转化体系转化 N 个实验组。
- 10) 分别取稀释 100 倍、1000 倍的菌液 100 μ L 涂布 100 mm LB 平板(氨苄抗性), 37°C培养过夜。
- 11) 将余下菌液按 300 μ L/板涂布 150 mm LB 平板(氨苄抗性), 37°C培养过夜。
- 12) 收集转化子。

DH10B 电转化感受态制备方案

- 1) 挑取 DH10B 单菌落接种 2 只 3 mL LB 液体培养基试管(灭菌), 过夜培养。
- 2) 第二天分别转接到 2 个 350 mL 的 LB 液体培养基中, 培养至 OD 值 0.4-0.5, 约 2.5 个小时左右(早上 8:30-11:00), 冰上静置 0.5 h。
- 3) 分装到 50 mL 离心管中, 3500 rpm/min, 15min, 4°C, 弃上清。
- 4) 每管加入预冷的灭菌水 45 mL, 颠倒悬沉淀, 3500 rpm/min, 15min, 4°C, 弃上清。
- 5) 每管加入预冷的灭菌水 30 mL, 颠倒悬沉淀, 3500 rpm/min, 15min, 4°C, 弃上清。
- 6) 每管加入预冷的 10%灭菌甘油 5 mL, 颠倒悬沉淀, 4000 rpm/min, 15 min, 4°C, 弃上清。
- 7) 将管内剩余液体重悬, 收集至 1.5 mL 离心管中, 10000 rpm/min, 2 min, 4°C, 弃上清。
- 8) 最后用 800 μ L 预冷的 10%灭菌甘油重悬, 置于冰上备用。

9. 文库插入片段鉴定

- 1) 对转化子进行菌落 PCR 抽样检测文库基因插入片段大小: 按照表 11 反应体系配制单一菌落 PCR 反应体系。

表 11 菌落 PCR 反应体系

名称	体积 (μ L)
Deionized H ₂ O	4.95
T7 Primer (100 mM)	0.05
3' A D Primer (100mM)	0.05
2×Hieff® PCR Master Mix	4.95
Total	10

- 2) 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。
- 3) 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 12 所示设置反应程序, 进行文库菌落 PCR 鉴定。

表 12 菌落 PCR 鉴定反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	on	
96°C	6 min	1
96°C	30 sec	30 cycles *
46°C	45 sec	
72°C	2 min	
72°C	6 min	1
16°C	Hold	-

【注】:文库菌落 PCR 方案鉴定方案适用于大肠杆菌文库,若转化到酵母需要先利用缺陷培养基培养后用翌圣酵母质粒提取试剂盒(翌圣货号:70201ES)提取酵母质粒后, 进行 PCR 扩增鉴定。

10. 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过滴度检测和长度分布检测来进行质量评价。参照步骤 8 对文库滴度进行质控检测。参照步骤 9 对文库长度分布进行质量评估。

附录

附录一：循环数优化效果展示

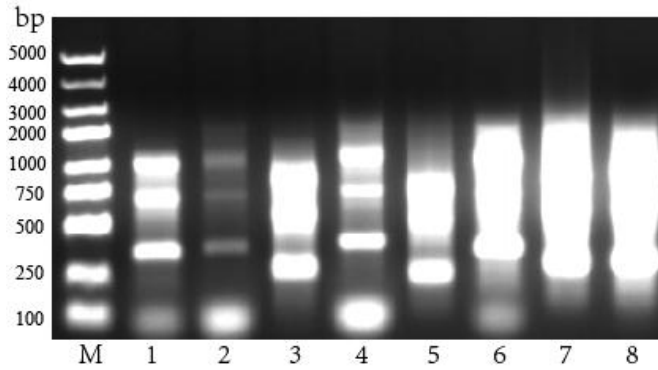


图 1. mRNA 不同投入量的循环数优化结果

Marker (5000/4000/3000/2000/1000/750/500/250/100 bp)

泳道 1: 循环数为 16, mRNA 投入量为 1 µg; 泳道 2: 循环数为 16, mRNA 投入量为 0.5 µg

泳道 3: 循环数为 18, mRNA 投入量为 1 µg; 泳道 4: 循环数为 18, mRNA 投入量为 0.5 µg

泳道 5: 循环数为 20, mRNA 投入量为 1 µg; 泳道 6: 循环数为 20, mRNA 投入量为 0.5 µg

泳道 7: 循环数为 22, mRNA 投入量为 1 µg; 泳道 8: 循环数为 22, mRNA 投入量为 0.5 µg

【注】：本结果使用的 RNA 是 Agilent 公司的 Universal Human Reference RNA。

附录二：菌落 PCR 鉴定结果

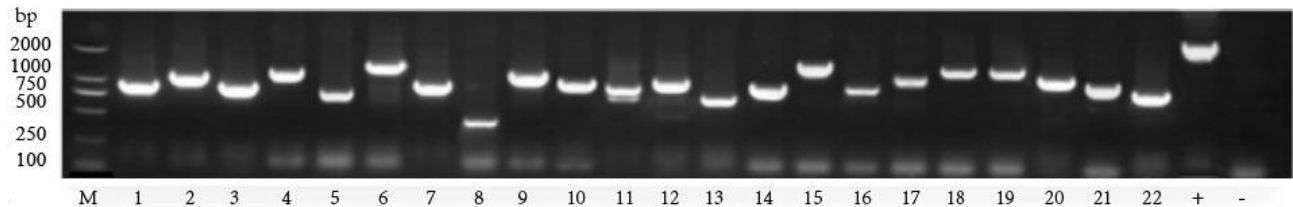


图 2. 文库菌落 PCR 鉴定

Marker (2000/1000/750/500/250/100 bp)

注意事项

1. 关于操作

- 1) 本产品仅作科研用途。
- 2) 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
- 3) 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- 4) 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
- 5) 请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用固相 RNA 清除剂(翌圣货号: 10609ES)去除 RNA 酶污染。
- 6) PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁（固相 RNA 清除剂(翌圣货号: 10609ES)），以保证实验环境的洁净度。

2. 应用范围

- 1) 本产品仅作科研用途！
- 2) 本试剂盒适用于起始模板量为 100 ng-75 μg （体积 $\leq 100 \mu\text{L}$ ）的高质量动物、植物和真菌等真核生物的总 RNA。如初始 RNA 浓度偏低，体积超过 100 μL ，可使用 Hieff NGS[®] RNA Cleaner 磁珠进行浓缩。RNA 需通过 Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico 芯片检测，RIN 值要求 >7 ，以保证 mRNA 有完整的 poly(A)尾结构。
- 3) 本试剂盒的 mRNA 分离模块使用的是 oligo (dT)磁珠，只有带 poly(A)尾的 mRNA 才能被提取；其他不具 poly(A)尾的 RNA，如非编码 RNA、无 poly(A)尾的 mRNA 等不能适用本试剂盒。此外，FFPE 样本中的 mRNA 降解严重，通常无完整的 poly(A)尾结构，故亦无法使用本试剂盒进行建库。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐