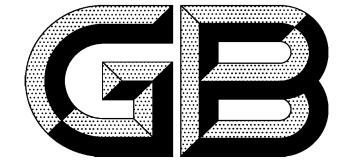


ICS 65.020.30
B 40



中华人民共和国国家标准

GB/T 25170—2010

GB/T 25170—2010

畜禽基因组 BAC 文库构建与 保存技术规程

Technical regulation of farm animals genome BAC library
construction and preservation

中华人民共和国
国家标准
畜禽基因组 BAC 文库构建与
保存技术规程
GB/T 25170—2010

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2010 年 11 月第一版 2010 年 11 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-40632 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 25170-2010

2010-09-26 发布

2011-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:关伟军、马月辉、刘长青、潘春留、刘洪坤、甫亚斌、余露露。

束后,取出凝胶,将 DNA 分子量标尺与相邻胶切下,在 $0.5 \times \text{TBE}$ 中染色 40 min 后。置于长波紫外灯下观察,用标尺测量并标记凝胶块所需回收的分子量的片段(100 kb~400 kb)。

6.1.4.2 第二次电泳选择

将未染色的样品条带切成 100 kb~200 kb、200 kb~300 kb 和 300 kb~400 kb 三段。

用新的 1%琼脂糖凝胶进行第二次脉冲电泳,电泳条件同第一次电泳选择条件。根据 DNA 分子量标尺切下各条带中 100 kb~400 kb 的 DNA 片段,用 TE 洗 2 次~3 次,保存在 0.5 mol/L EDTA 中。

6.1.5 电洗脱

6.1.5.1 透析袋处理

透析袋在 2%(质量浓度)NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA(pH8.0)溶液中煮沸 10 min,用蒸馏水彻底漂洗,再置于 1 mmol/L EDTA(pH8.0)中煮沸 10 min 后冷却,4 ℃ 下保存于纯水中。

6.1.5.2 电泳

将不同大小范围 DNA 胶条分别放入一透析袋中,用 $0.5 \times \text{TBE}$ 充满透析袋,浸泡在 $0.5 \times \text{TBE}$ 的电泳槽中,13 ℃,120°角,4 V/cm~5 V/cm 电泳 3 h,使 DNA 分子从凝胶中移出。将透析袋旋转 180°,再电泳 30 s~1 min,以解析透析袋上的 DNA 分子。

6.1.5.3 电泳后处理

电泳结束后将透析袋在 4 ℃ 下 $0.5 \times \text{TE}$ 中透析 12 h,从透析袋中将回收的 DNA 溶液吸出,依照一定的分子量标尺对回收的基因组 DNA 进行定量。保存于 4 ℃,一周内使用。

6.2 BAC 质粒载体制备

6.2.1 BAC 载体制备

SDS 碱裂解法制备 BAC 载体。将含有适当 BAC 质粒的菌液涂布于含 12.5 μg/mL 的氯霉素的 LB 平板上,37 ℃ 培养 12 h。挑单个菌落接种到 LB 液体培养液中,200 r/min,37 ℃ 振荡过夜。将 6 mL 培养物,4 ℃ 下,20 000g 离心 1 min,收集细菌。细菌沉淀悬浮于碱裂解液 I 中,剧烈振荡。加新配制的碱裂解液 II 于细菌悬液中,颠倒混匀,放置于冰上。加碱裂解液 III,颠倒混匀。4 ℃ 下,20 000g 离心 30 min,取上清,加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min。4 ℃ 下,20 000g 离心 30 min,回收核酸沉淀。用 70%的乙醇涮洗管底及管壁,室温干燥 DNA 沉淀。用 TE(pH8.0)溶解核酸沉淀。

6.2.2 超螺旋质粒纯化

密度梯度离心法纯化超螺旋质粒。每毫升 DNA 样品加 1.00 g 固体 CsCl,至完全溶解。加 λ DNA 和 CsCl 溶液,混匀,加石蜡油,800 000g 离心 24 h 后,可见两条相隔约 4 mm 的清晰条带,弃石蜡油和部分溶液,吸取线环式质粒和超螺旋质粒于一离心管中。收集液体于透析袋中,依次用 2.0 L $0.5 \times \text{TE}$ 透析 3 h,4 L $0.5 \times \text{TE}$ 透析 4 h,4 L $0.5 \times \text{TE}$ 透析 12 h。收集液体,4 ℃ 保存。

6.2.3 BAC 载体酶切和去磷酸化

用适当的限制性内切酶进行酶切,反应体系为 20 μL 10×缓冲液;100 μL(5 μg~10 μg)载体 DNA;1 μL 40 mmol/L 亚精胺;适当的限制性内切酶;用 ddH₂O 定容至 150 μL,37 ℃ 下酶切 6 h 后,加入 2.0 μL 1 U/μL 牛小肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)和 20 μL 10×CIAP 缓冲液,用 ddH₂O 定容至 190 μL,37 ℃ 放置 1 h 后,70 ℃ 反应 15 min,进行去磷酸化。通过低熔点琼脂糖凝胶电泳分离载体 DNA,染色,紫外灯显示条带,经融化凝胶和酚、三氯甲烷抽提进行载体 DNA 的回收。

6.2.4 载体脱磷效果检测

分别用 T4 DNA 连接酶和 T4 DNA 连接酶缓冲液及 T4 多核苷酸激酶对所制备的载体于 16 ℃ 自连 12 h。取 1.5 μL~2.0 μL 连接产物加到 18 μL~20 μL 适当的感受态细胞中,37 ℃ 下,在 SOC 培养基中,200 r/min 下培养 1 h。将转化的菌液适量涂布于含有氯霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基表面,于 37 ℃ 下放置 24 h~36 h,检测脱磷效率。

畜禽基因组 BAC 文库构建与保存技术规程

1 范围

本标准规定了畜禽基因组 BAC 文库构建方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽的基因组 BAC 文库构建与保存。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

基因组文库 genome library

用重组 DNA 技术将某种生物细胞的核 DNA 的全部片段随机地连接到载体上,再转移至适当的宿主细胞中,通过细胞增殖而形成的各个片段的无性繁殖系的总集。

3.2

细菌人工染色体 bacterial artificial chromosome, BAC

以大肠杆菌致育因子为基础,利用现代重组 DNA 技术体外人工合成的具有容纳高分子量外源 DNA 的特性载体。

3.3

DNA 连接 DNA ligation

在 DNA 连接酶催化下,靶 DNA 片段与载体 DNA 相邻的 5'端磷酸与 3'端羟基之间形成磷酸二酯键的过程。

3.4

感受态细胞 competent cells

在特定条件下细胞膜通透性发生改变,允许外源 DNA 进入细胞内的特殊状态下的受体细胞。

3.5

电转化 electrotransformation

在高压脉冲的作用下,将外源 DNA 导入感受态细胞的过程。

3.6

脉冲场凝胶电泳 pulse field gel electrophoresis, PFGE

利用脉冲场电泳系统电场方向周期性交替变化的功能而分离和鉴定生物大分子的技术。

3.7

重组体 recombinant

两种以上不同来源的 DNA 片段连接所形成的杂种 DNA 分子。