

ICS 65.020.30  
B 40



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 25168—2010

GB/T 25168—2010

## 畜禽 cDNA 文库构建与保存技术规程

Technical regulation of farm animals cDNA library construction and preservation

中华人民共和国  
国家标准  
畜禽 cDNA 文库构建与保存技术规程  
GB/T 25168—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 0.5 字数 7 千字

2010年11月第一版 2010年11月第一次印刷

\*

书号:155066·1-40630 定价 14.00 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 25168—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

量浓度)明胶,定容到 1 L,高压灭菌。

#### 4.6 5×一链缓冲液

250 mmol/L Tris(pH8.3),30 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,375 mmol/L KCl。

#### 4.7 10×DNA 连接酶缓冲液

500 mmol/L Tris-Cl(pH7.8),100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,100 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),0.5 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)。

#### 4.8 LB 液体培养基

取 10.00 g NaCl、10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨和 5.00 g 细菌培养用酵母提取物加 1 L ddH<sub>2</sub>O 溶解后,高压灭菌。

#### 4.9 LB 固体培养基

取 10.00 g NaCl、10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨、5.00 g 细菌培养用酵母提取物和 20.00 g 细菌培养用琼脂加 1 L ddH<sub>2</sub>O 溶解后,高压灭菌。

#### 4.10 LB 顶层培养基

将 0.70 g 琼脂糖加入 100 mL LB 液体培养基中,高压灭菌。

#### 4.11 20%麦芽糖

取 20.00 g 麦芽糖溶于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中,过滤除菌。

### 5 主要仪器、设备

水浴锅、电泳仪、电泳槽、电子天平、电热恒温鼓风干燥箱、培养箱、PCR 扩增仪、超纯水仪、-80℃ 低温冰箱、凝胶自动成像分析系统和低温离心机等。

### 6 cDNA 文库构建

#### 6.1 样品采集

畜禽机体的组织可作为构建 cDNA 文库的实验材料。将新鲜离体的组织样品迅速投放到液氮中,或剪切成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织碎块后放入 RNA 保存液中。

#### 6.2 总 RNA 提取

使用 TRIzol 法提取畜禽组织的总 RNA。在不断填充液氮的研钵中将 30 mg~100 mg 的组织样品磨碎,加入 1 mL Trizol(含有酚、异硫氰酸胍、8-羟基喹啉和 β-巯基乙醇的单相液),混匀后移至经 DEPC 处理水浸泡过的离心管中,静置 5 min。加入 200 μL 三氯甲烷,混匀,静置 2 min~3 min,4℃ 下,13 200g 离心 15 min。移上清至另一离心管中,加入 400 μL 异丙醇,混匀后静置 10 min,4℃ 下,13 200g 离心 10 min。弃上清,用 DEPC 处理水配制的 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,室温静置 5 min~10 min,晾干后用 50 μL~100 μL 的 DEPC 处理水溶解沉淀后用 1% 变性琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖 0.3 g, DEPC 处理水 21.6 mL,10×Mops 3 mL,37% 甲醛 5.4 mL,核酸显示剂 2 μL~3 μL)检测 RNA 质量,于 -80℃ 冰箱中保存。

#### 6.3 cDNA 合成

##### 6.3.1 cDNA 第一链合成

采用 5' 末端 RNA 转录子转换机制(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript, SMART)技术合成全长 cDNA 双链。首先取一 PCR 管分别加入 0.05 μg~1.0 μg 总 RNA 样品、1.0 μL 10 μmol/L 经过修饰的 Oligo(dG)的寡核苷酸和 1.0 μL 10 mmol/L 经过修饰的 Oligo(dT)3' 引物,添加 DEPC 处理水使总体积达到 5.0 μL,混匀,72℃ 下放置 2 min,冰浴 2 min。然后,分别加入 2.0 μL 5×一链缓冲液、1.0 μL 20 mmol/L DTT、1.0 μL 10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 和 1.0 μL 200 U/μL Primerscrip™ 反转录酶,混匀,42℃ 下放置 1 h,冰浴 2 min 终止反应后进行下一步操作或 -20℃ 下短期保存。

##### 6.3.2 cDNA 第二链的合成

取一 PCR 管分别加入 2.0 μL 一链 cDNA、80 μL ddH<sub>2</sub>O、10 μL 10×Ex taq 缓冲液、2.0 μL

## 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:马月辉、关伟军、陆涛峰、李向臣、佟春玲、余露露、刘鹏。