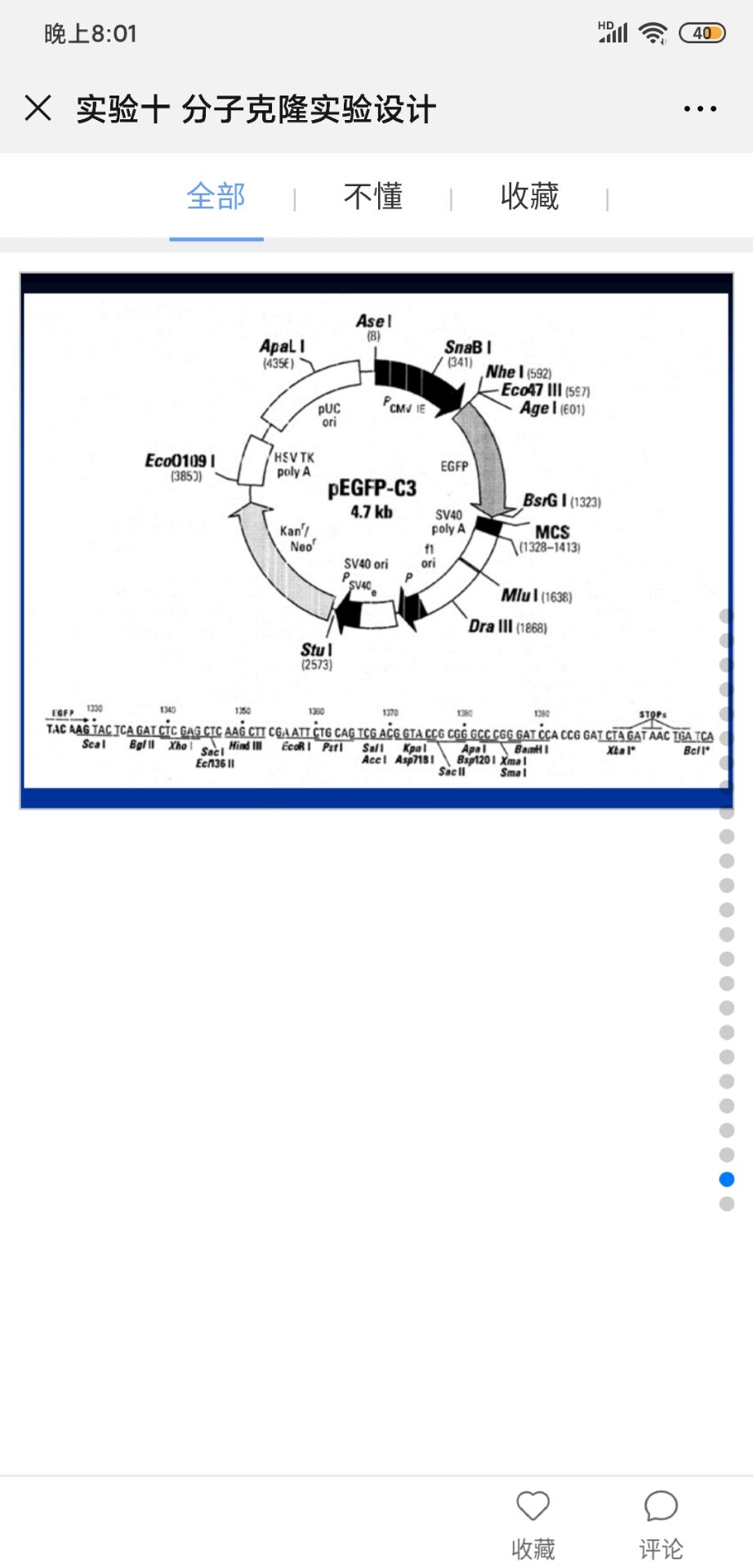
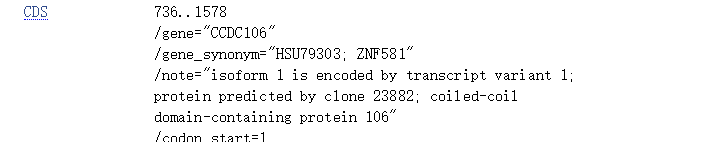
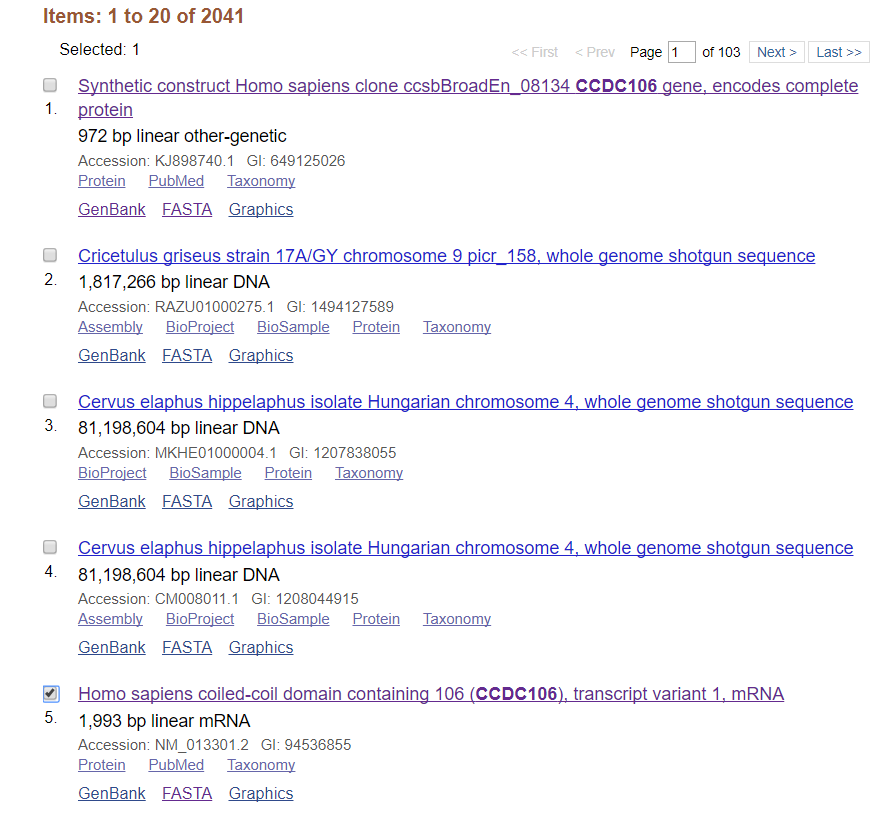
**CCDC106基因的克隆构建**

1. 载体的选择

选择pEGFP-C3载体，因为该质粒携带有EGFP绿色荧光蛋白基因且该基因位于多克隆位点上游，所以插入的基因无需去掉终止密码子，且无需添加Kozaq序列。

1. 查找基因的mRNA序列

到NCBI 上搜索CCDC106基因的mRNA序列：



Homo sapiens coiled-coil domain containing 106 (CCDC106), transcript variant 1, mRNA

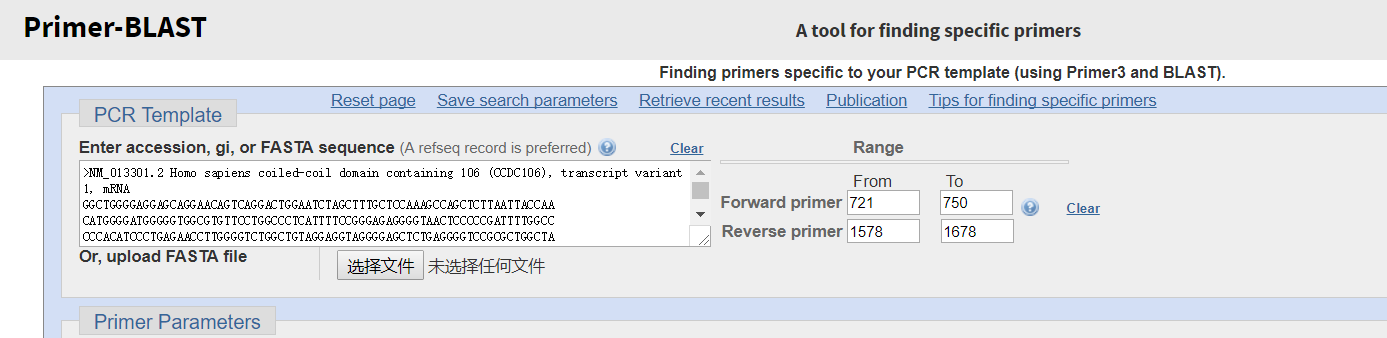
NCBI Reference Sequence: NM\_013301.2

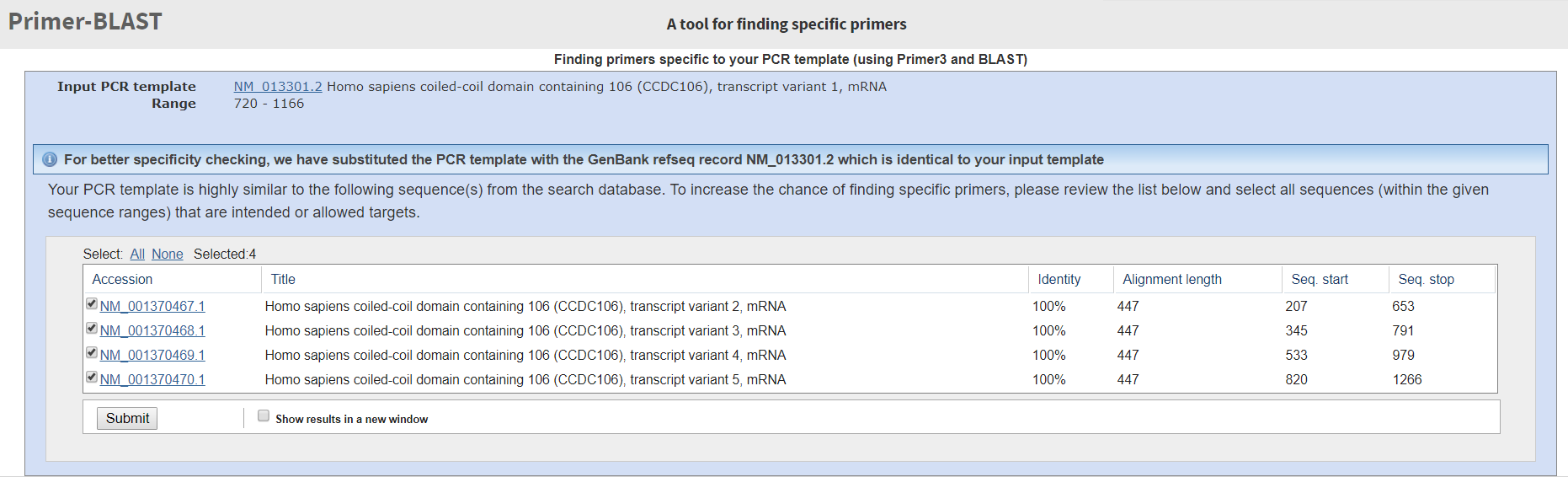
>NM\_013301.2 Homo sapiens coiled-coil domain containing 106 (CCDC106), transcript variant 1, mRNA

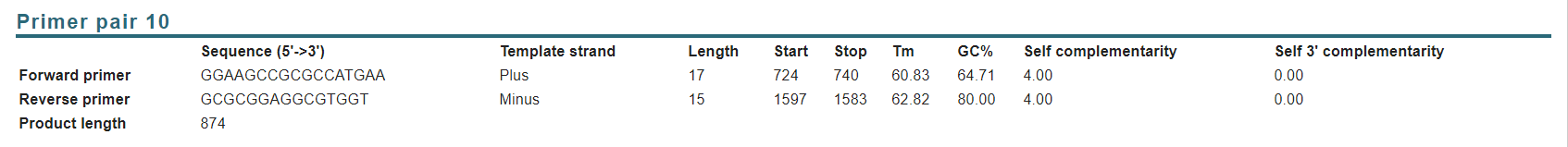
GGCTGGGGAGGAGCAGGAACAGTCAGGACTGGAATCTAGCTTTGCTCCAAAGCCAGCTCTTAATTACCAACATGGGGATGGGGGTGGCGTGTTCCTGGCCCTCATTTTCCGGGAGAGGGGTAACTCCCCCGATTTTGGCCCCCACATCCCTGAGAACCTTGGGGTCTGGCTGTAGGAGGTAGGGGAGCTCTGAGGGGTCCGCGCTGGCTAGTTCCTGAGAGAGCGTTAAAAGTAGATTCTCCTTTCGCTCCAACTTTCTCGGTGTCTCAAACACTCTCCTGCCTTCTGGGCCCATTGGGCACACCGCCACCCAATCCGGGGACCCCCGGAGACTCGCCAGCTCTCCAGGATGGGAATTTCGTGATGTTCCCTGCCTGAGCTTCGGGGAGGGCGGGGGAGTGCTGTAAGGGGCTATCGCGCAAGTGCAGACCCTCTGCTTCTGCCGCAAACGGCGGGCCTCACCTGGACCCGGGGACTCTTCAACGAGGGGCGCTAGCCTGGCCCGACTGGGCGAGTCCCCGCGTCCCTGCCCGTTCCGTCGCTCAGTTCCACGACACGCTCCCCTGCCGCCCCGCCTGTTCGCGGGTGGGTGGGCGCTTCCCTCGGCTCCCCGTGACACTTTGCAGACGCTCCCCGGCGCCGGGCATGGGCGCCGCCGCCGTCGGTCCCCGAGCCGGATTCCGCGAGCGGTGCCCCTGAGGCCCTCGGCTGCTGGGGTCCGTAGGAAGCCGCGCCATGAATGACCGGAGCAGTCGGAGGCGGACAATGAAGGACGATGAGACCTTCGAGATCTCCATTCCCTTCGATGAGGCACCCCACCTAGACCCACAGATCTTTTAC

AGTCTGAGCCCCTCTCGGAGAAACTTCGAGGAGCCTCCGGAGGCTGCGTCCTCCGCCCTGGCTCTGATGAACAGCGTCAAGACCCAGCTGCACATGGCTCTGGAGAGGAACTCCTGGCTGCAGAAGCGCATCGAGGACCTGGAGGAAGAGAGGGACTTCCTGCGGTGCCAGCTGGACAAATTCATCTCTTCTGCTCGGATGGAGGCAGAGGACCACTGCCGGATGAAGCCTGGGCCCAGGCGGATGGAGGGGGACAGCCGTGGTGGGGCTGGGGGCGAGGCCTCGGACCCTGAGTCAGCAGCCTCCTCCCTCAGCGGAGCGTCCGAAGAAGGCAGCGCCAGTGAGAGGAGGCGGCAGAAGCAGAAGGGAGGTGCTAGTCGGAGGCGCTTTGGGAAGCCCAAGGCCCGGGAGAGGCAGCGAGTGAAGGACGCCGACGGGGTCCTCTGCCGGTACAAGAAGATCCTGGGCACCTTCCAGAAGCTCAAGAGCATGTCGCGGGCCTTCGAGCACCACCGCGTGGACAGGAACACCGTGGCGCTGACCACGCCCATCGCCGAGCTGCTCATTGTGGCCCCCGAGAAGCTGGCCGAGGTGGGCGAGTTCGACCCCTCCAAGGAGCGCCTGCTCGAGTACTCCCGCCGCTGCTTTCTGGCCCTGGACGACGAGACGCTCAAGAAGGTGCAGGCGCTCAAGAAGAGCAAGCTGCTGCTGCCCATCACCTACCGCTTCAAGCGGTGATCGCACCACGCCTCCGCGCCTCCACCCGGGCCTTCCTCCCCCGTGGACCCCGGTGGATGACCTGCCCCTCTCCCCGCCGCGCCCCTGCCCCTCCTCCTCGCTCCCTGGGTTGGGGGCTCCCTTAGCCGGGCCCCCAAGCGCGACGGCCCCGGACCGGCCGCGGCCCCTTCCCGAACGCCGGCACCCCCTTCCGCTTGGGCTGCCCAGCCCTGTCCTCGCCGGGCCCCTTCCTCCTGGAAAACCAGGCAGGCGGGTGCCCCCCCCTCGAGTGGGGGACTGTACAGACCCCGTCTCCGCCCTGGCCCCGCGGAGGAGCTGCCCACCTGATTCCCGGACAGACCTCCCCAACTCCGCGTGAGACAGAGAATTATTCAGATAATTTAAATTAAAAAACGACGTGAAAATTTGGAATAAA

1. 引物设计和合成引物



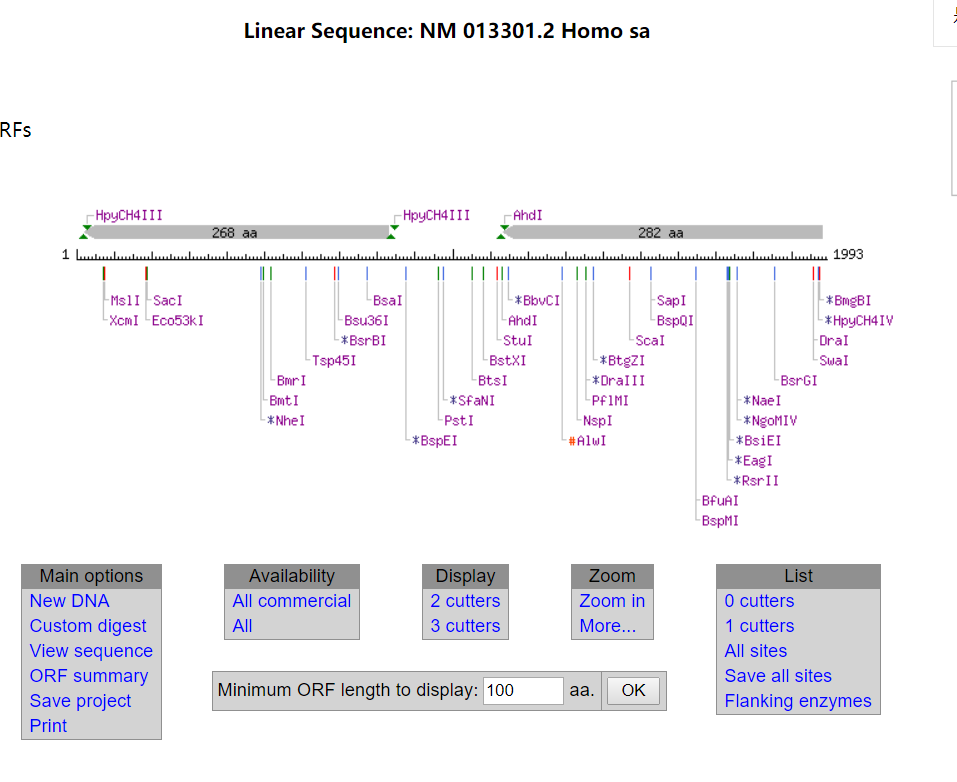


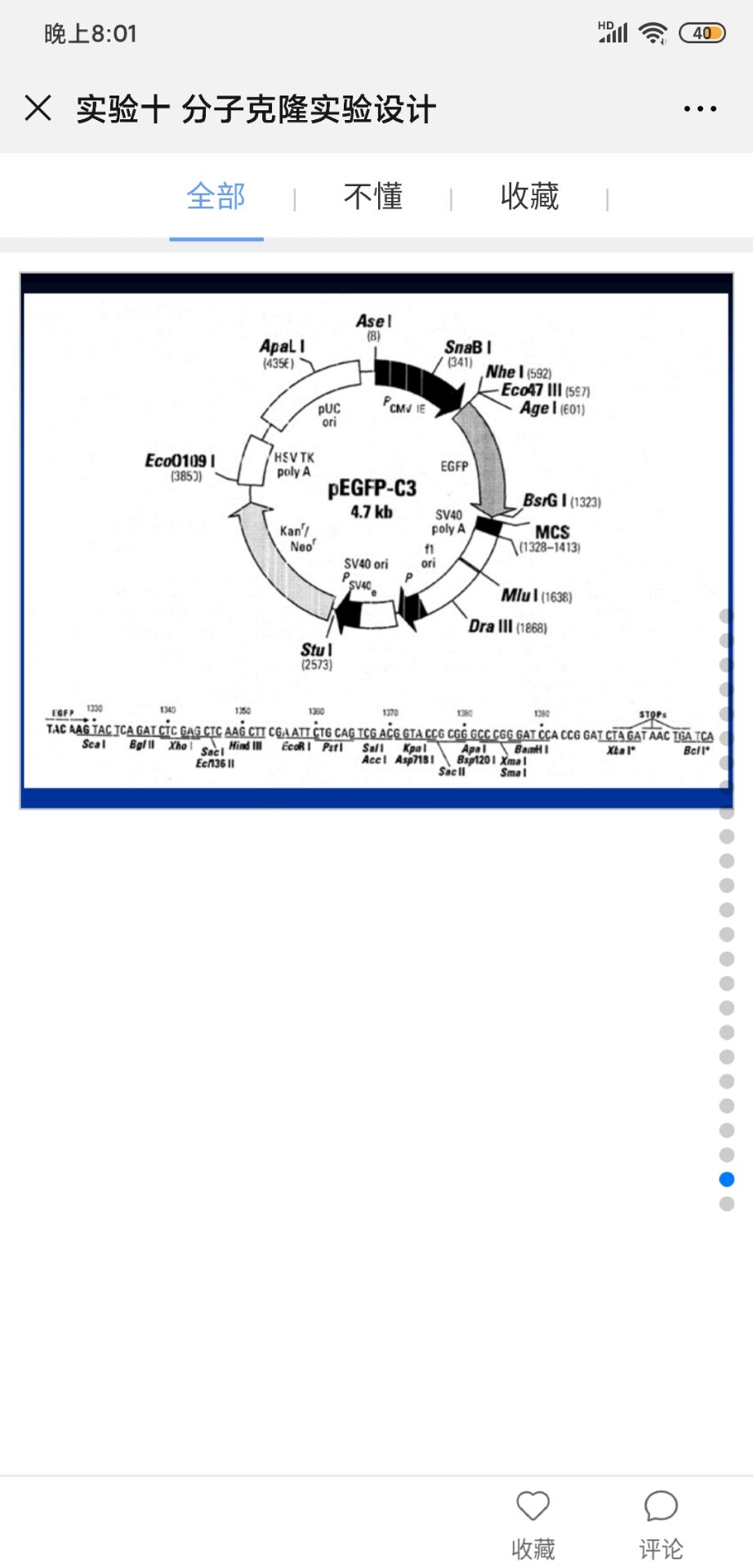


Forward primer GGAAGCCGCGCCATGAA

Reverse primer GCGCGGAGGCGTGGT

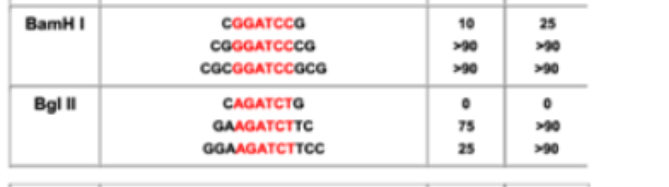
查找酶切位点：





选择添加酶切位点EcoRⅠ和BamHⅠ

添加保护碱基：



Forward primer GGAATTCTG GGAAGCCGCGCCATGAA

Reverse primer CGGGATCC GCGCGGAGGCGTGGT

1. PCR扩增

1、PCR模板的准备

提取人细胞系的总RNA或mRNA，反转录合成cDNA的第一条链

2、在0.2 mL EP管中，依次加入以下各成分:  
ddH2O:   8.2 μL

10x PCR buffer:   2.5 μL

NTPs (2.5 mM)： 1.0 μL

Forward primer (10 μM):  1.0 μL

Reverse primer (10 μM):  1.0 μL

Taq DNA聚合酶(5 U/μL) :  0.3 μL

cDNA：1.0 μL

总体积  25 μL

1. 载体和产物的酶切、电泳和DNA胶回收

载体及PCR产物同样的2种酶进行酶切、电泳 →回收目的DNA条带

**酶解**：依次加入下列溶液于PCR管中(10 μL)

ddH2O  3 μL

10xGreen buffer  1.0 μL  
载体/产物DNA  5 μL (500ng)

EcoR I  0.5 μL (0.5X)

BamHI  0.5 μL (0.5X)  
轻轻混匀，瞬时离心5秒，置于37"C水浴中酶解1小时。

**电泳**：

1%琼脂糖凝胶的制备  
(1)称取0.2 g琼脂糖，置于三角瓶(锥形瓶)中，加入20 mL 0.5X TBE缓冲液，瓶口用纸包好，将该三角瓶置于微波炉加热60sec直至琼脂糖溶解。  
(2)将梳子放置在制胶槽上，将冷却至60℃左右的琼脂糖凝胶液，加入2 μL的4S Red Plus,混合均匀，小心地倒在制胶槽上，控制灌胶速度和量，使胶液缓慢地展开，直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层，避免胶面上产生气泡。  
加样  
(1)将胶放入电泳槽，用微量加样器将样品分别加入胶板的样品孔(负极)内。加完样后的凝胶板即可通电进行电泳，建议在80~100V的电压下电泳(一般情况下，电压/电极间距离应小于5V/cm) ，当溴酚兰移动到距离胶板下沿约1cm处停止电泳。  
观察与拍照  
(1)在紫外灯(310nm波长)下观察染色后的凝胶。DNA存在处显示出桔黄色的荧光条带。在紫外灯下观察时，应戴上防护眼镜或有机玻璃防护面罩，避免眼睛遭受强紫外光损伤。  
拍照电泳图谱时，可采用凝胶成像系统。

**胶回收**：

1.从琼脂糖凝胶中割下含目标片段的胶块，称重。  
2.加入胶块重量3-6倍的Buffer B2， 50°水浴5-10分钟溶胶。  
3.(选做) 对于< 500bp的片段，加入1/3Buffer B2体积的异丙醇。  
4.将溶胶液移入吸附柱中，8,000 xg离心30秒。倒掉收集管中液体。  
5.加入500 μl Wash Salution, 9,000 x g离心30秒，倒掉收集管中液体。  
6.重复步骤5一次。   
7.空吸附柱于9,000 xg离心1分钟。  
8.将吸附柱放入一个干净的1.5 ml离心管中，在吸附膜中央加入15-40 μl Elution Buffer,室温静置1分钟后，离心1分钟。保存管中的溶液。

1. 将PCR产物和载体连接

10 X DNA ligase buffer: 2.0μL

DNA ligase: 1.0μL

Vector: 100ng  
Inserted DNA: XμL(一般与载体等mol)  
加ddH2O至总体积 20μL

16℃ 8~24 h

1. 转化和筛选

大肠杆菌感受态细胞的制备  
①预培养：从 LB 平板上挑取单菌落,接种于10ml LB 液体培养基中，振荡培养过夜；  
②将该菌悬液按2%接种量接种于50mL LB液体培养基的锥形瓶中，振荡培养1.5-3小时至OD600 达到0.4~0.5；  
③将菌液转移到2个50mL离心管中，冰上放置10分钟，同时预冷离心机、离心管、tip头和CaCl2溶液；  
④离心收集菌体，在无菌工作台到处上清液，将离心管倒置片刻使上清液流尽；  
⑤加入5ml预冷的0.1mol/L CaCl2 溶液，轻吹并悬浮细胞，冰上放置5-10min，离心，去上清；  
⑥用5ml预冷的0.1mol/L CaCl2 溶液重复洗涤1遍，冷冻离心去上清；  
⑦用2mL预冷的含15%甘油的0.1 mol/L的CaCl2 溶液重悬菌体，用枪轻吹悬浮细胞（冰上操作）。  
⑧按100uL/管分装感受态细胞，-80℃冻存。

感受态细胞的热激转化  
①取100uL感受态细胞，冰上解冻后加入重组质粒DNA，混匀；  
②冰上放置30分钟；  
③42℃水浴中热击90秒，立即冰浴5分钟；  
④每EP管中加入800μL LB 液体培养基，用无菌针头在EP管盖上扎一个小洞， 800rmp振荡培养复苏1小时左右；  
⑤9000rpm离心5分钟，去上清，留100uL菌液，用枪头吸打均匀后涂布在加入了kan的LB固体平板上；  
⑥倒置培养过夜；  
⑦对平板上的单菌落进行划线扩大培养。

筛选、鉴定重组质粒是否拼接成功  
①挑取感受态细胞在热激转化后所涂布的平板上的单菌落

②检测转化进入感受态细胞中的质粒是否为重组质粒：  
菌落PCR鉴定：用煮冻法提取全基因组，PCR扩增外源插入DNA片段，电泳检测；  
酶切鉴定：以10μl的体系进行酶切（EcoRI、BamHI），电泳检测。

1. 质粒小量制备  
   ①培养细菌:将带有重组质粒的大肠杆菌接种到液体培养基中，37 °C震荡210rpm培养12~16小时。

②将1.5 mL菌液加入Eppendorf离心管中，12000 g离心1min，弃尽上清。  
③加入250 μL Buffer P1悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。  
④加入250 μL Buffer P2 ( Buffer P2使用完后立即盖紧瓶盖，以免空气中CO2中和NaOH，降低溶菌效率)，盖紧管口，温和并充分地上下翻转混匀4~ 6次使菌体充分裂解(避免剧烈摇晃，否则导致基因组DNA污染)，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过5 min。    
⑤加入350  μL Buffer P3,温和并充分上下翻转混匀6~8次，12000g离心10min。

⑥纯化质粒:  
(1)将制备管置于2 mL离心管中，将步骤5中的上清转移至制备管，12000g 离心1 min,弃滤液。

(2)将制备管放回原来的离心管，加500 μL Buffer PW，12000g 离心1 min，弃滤液。重复操作1次。

(3)将制备管放回离心管，12000 g离心1 min。  
⑦洗脱:将制备管移入新的1.5mL离心管中，在制备管膜中央加60μL Eluent(预热)，室温静置1min,12000g离心1 min，保留滤液。

1. 酶切验证、测序

酶切鉴定：可用10ul的体系进行酶切（EcoRI、BamHI），电泳检测。