



# M5 HIPER™

## RACE cDNA Synthesis Kit使用手册

(请使用低吸附枪头)

Cat.# MF670-01

10T (12.5ul体系)

完整的5'和3' cDNA末端  
简便的一管两步法程序  
低至50 ng 总RNA或25 ng poly A+ RNA

# 目录

I. 简介.....	2
II. HIPER™ cDNA 合成技术 .....	2
III. 操作简述.....	4
IV. HIPER™试剂盒组分 .....	6
V. 注意事项.....	7
VI. 引物设计.....	8
VII. 总 RNA 和 m RNA 制备与处理.....	10
VIII. 第一链 cDNA 合成 .....	11
IX. 快速扩增 cDNA 末端 ( Rapid Amplification of cDNA Ends , RACE).....	13
X. RACE 产物鉴定.....	15
XI. 常见问题及解决方案 .....	17
XII. 参考文献.....	23

## I. 简介

HIPER™ RACE cDNA合成试剂盒通过扩增基因的5'和3'末端精细、有效地完整克隆基因。HIPER™ RACE方法可有效地在样品cDNA 5'和3'末端加入人工接头，尽可能地形成最完整的RACE产物。反转录步骤后合成的第一链cDNA可直接用于5'和3' RACE PCR反应，无需再进行繁复的第二链cDNA合成和接头连接的过程。其他RACE方法均因扩增的高背景和截短的5'末端而存在明显的劣势。优化后的方法既便是在样本很小的情况下，也可以显著降低非特异性的扩增，且只需单一PCR管和两步法的程序就可使您的RNA样品合成cDNA。

此外，HIPER™技术由于避免了接头连接的步骤，在RACE PCR过程中直接使用cDNA作为模板，从而降低了RACE的过程的复杂性，并使其更快捷（Chenchik *et al*, 1998），操作时间更缩短至4个小时。

HIPER™ PCR RACE Kit也对PCR过程也进行了优化，增加RACE反应的灵敏性的同时，降低了试验背景。因此，试验者可用很少的mRNA或是总RNA作为反转录的模板来构建全长cDNA。

## II. HIPER™ cDNA 合成技术

通常 cDNA 的合成方法均通过逆转录酶（反转录）将 mRNA 反转录成第一链的单链 cDNA（single-stranded cDNA, ss cDNA）。受限于反转录的效率，基因的 5'端在反转录过程中常常不能被转录，最终形成的 cDNA 的 5'端通常并不完整。在基因序列较长、mRNA 连续出现二级结构，特别是仅以 oligo（dT）引物合成第一链 cDNA 的情况下，5'端 cDNA 链合成截短的现象尤为突出。以未降解的 RNA 构建的 cDNA 文库中，出现的截短的 cDNA 的分子常因反转录过程异常终止所致。但无论如何，HIPER™ 方法能够优先富集的全长 cDNA 片段。

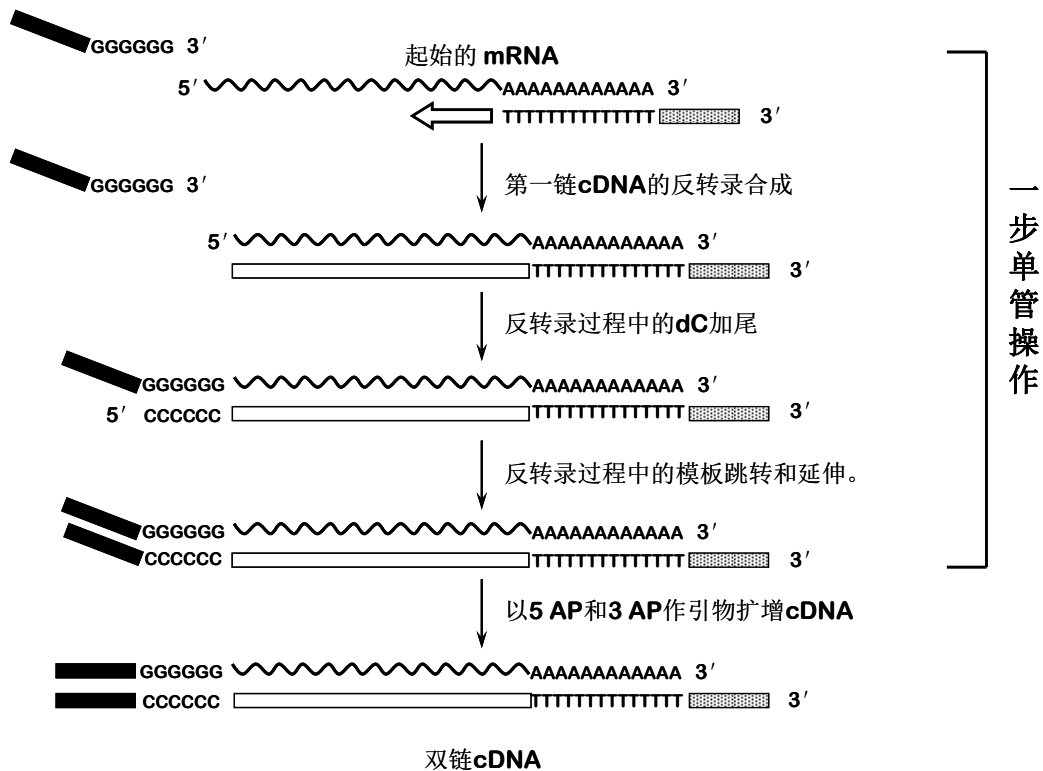


图1. HIPER™ 技术的流程

第一链cDNA合成由优化的oligo (dT) 引物起始。反转录至mRNA模板5'末端时，反转录酶的末端转移酶活性会在cDNA 3'端加入dC残基。HIPER™ 5RRT引物与cDNA 3'端加入dC残基间的退火为HIPER™ Reverse Transcriptase的反转录提供了可供延伸的模板。

HIPER™可将多聚腺苷酸mRNA或总RNA反转录合成cDNA。而反转录合成使用的引物均经过反复优化(3' HIPER™ 3RRT1/ 3RRT2) (图1)。反转录进行至基因mRNA的5'末端时，HIPER™的末端转移酶活性可在cDNA的3'末端增加以胞嘧啶C为主的其他核苷酸。由于HIPER™ 5RRT引物在其3'末端富含胸腺嘧啶G，这样通过C-G之间的碱基配对，反转录的cDNA又以5RRT为模板进行延伸，直至5RRT引物的末端 (Chenchik *et al* , 1998)。最终获得的完整的单链cDNA包括完整的5'端基因，以及与HIPER™ 5RRT引物互补的序列。HIPER™ 3AP和HIPER™ 5AP的引物扩增形成了cDNA的5'末端至3'末端的扩增。反转录过程进行至mRNA模板5'末端中止前，全长cDNA-RNA分子间

的碱基配对效率要远远高于HIPER™ 5RRT与RNA分子的配对。因逆转录活性不完全形成的序列不完整的cDNA或是基因组DNA污染将以非指数型进行扩增。需要注意的是，如果初始的转录本中含有降解的RNA模板，也会因HIPER™ 3AP和HIPER™ 5AP的扩增出现在最终构建的PCR产物中。

### III. 操作简述

#### 1. 引物设计 ( 详见第VI节A )

无论是 5'-RACE 和 ( 或 ) 3'-RACE 反应都必须设计基因特异性引物 ( gene-specific primers , GSP ), 分别命名为 GSP1 和 GSP2。各自的巢式 PCR 基因特异性引物(NGSP1 和 NGSP2)可用于 RACE 产物的分析。在某些情况下, 这些巢式的引物也可用于 RACE PCR 反应。第VI节中会详述引物设计的方法。图 2 显示了 HIPER™ RACE 反应中所使用的引物与其序列来源的相对关系。

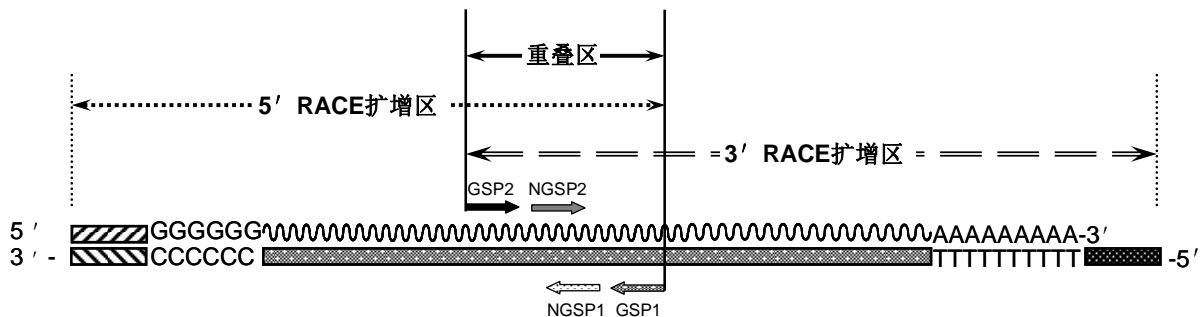


图2. 基因特异性引物与cDNA的关系

该图显示第一链cDNA模板，制备的5'或3'RACE用cDNA中,RNA和DNA杂交链不一定出现。

#### 2. 第一链cDNA合成 ( 详见第IV节 )

HIPER™ RACE Kit 可以合成两种类型的 cDNA——5'-RACE 用的 cDNA 和 3'-RACE 用的 cDNA，但只有 5'-RACE 用的 cDNA 具有延长的 5'末端。5'-RACE 用的 cDNA 是以改进过的锚定 oligo ( dT ) 引物和 HIPER™ 5RRT 反转而成。改进过的锚定

oligo ( dT ) 引物名为 HIPER™ 3RRT1 , 在其 3'端有两个兼并的核苷酸。这些兼并核苷酸位于 poly A+尾的前两位 , 与经典的 oligo ( dT ) 引物相比可降低 3'结合的非均质性 ( Borson et al , 1992 )。3'-RACE 用的 cDNA 则以特殊的 oligo ( dT ) 引物在传统的反转录程序下反转而成。

### 3.RACE PCR反应 ( 详见第IX节 )

只要使用不同的基因特异性引物 , 反转录后的 RACE 用 cDNA 就可用于多个基因的 5'-和 3'-RACE 扩增。HIPER™ RACE 操作体系中附带的 HIPER™ Hot Start DNA polymerase ( BT0012 ) 是重组 *Taq* DNA 聚合酶和其抗体的混合物 , *Taq* DNA 聚合酶具有 3'至 5'核酸外切酶的活性 , 大幅提高了 PCR 扩增的保真度 ; 而添加的 *Taq* DNA 聚合酶抗体则提高了 PCR 反应的特异性、灵敏度和产量。经 PCR 条件优化后可扩增长度达 12 ~ 20 kb 的片段。因此 , HIPER™ Hot Start PCR Kit 可高效、便捷、精确地以 cDNA 为模板进行长距离 PCR ( long distance PCR , LD PCR ) ( Barnes, 1992 ; Cheng et al 1994 ) , 适于高保真地扩增复杂或高 GC 含量的模板。

### 4.鉴定RACE产物 ( 详见第X节 )

在构建全长 cDNA\*前 , 强烈建议通过以下步骤确认目的序列 : (1) GSP1 和 HIPER™ 5AP、NGSP1 和 HIPER™ 5AP 两种 PCR 产物的比较 ; (2) 以内部序列 ( 如 NGSP1 ) 标记的引物对 PCR 产物进行 Southern blot 分析 ; (3) 对 RACE 产物进行克隆和测序 , 至少获得部分的序列信息。

\* “全长” cDNA : 没有任何一种 cDNA 合成的方法可以保证一定得到全长的 cDNA , 尤其是 5'末端。确定 5'末端的真实性需要结合 RNase 保护分析、引物延伸分析和/或 cDNA 或是基因组的序列信息。大多数的 HIPER™ RACE cDNA 包括具有全长的 5'末端的 cDNA , 但是在某些情况下如果具有复杂的二级结构 RNA 或是 cDNA 将会阻断反转录或 PCR 过程。与传统 RACE 或是文库的方法获得的 cDNA 相比 , HIPER™ RACE 全长 cDNA 的比例更高。为了最大限度获得序列的 5'末端 , 在进行 5'-

RACE试验的时候，至少测序的克隆数为5~10个。

即使是两次 RACE 反应均为单一产物，上述对 RACE 产物的定性试验也可以避免在之后的试验中浪费您的时间，或是导致试验的假阳性。在发现有多条基因的 RACE 产物，或是克隆的目的基因为某个基因家族的某一成员的情况下，这些试验对得到正确的结果尤为重要。

#### IV. HIPER™试剂盒组分

所有试剂均保存于-20℃。需要注意的是HIPER™ RACE cDNA 合成试剂盒分为动物来源 (MF670-A)、植物来源 (MF670-P) 和具polyA尾的RNA病毒 (MF670-V) 3种不同规格，请根据试验样品购买相应的试剂盒，以达到最好的试验效果！

目的	试剂		10T (12.5ul 体系)
	反转录	1	●HIPER™ 3RRT1 Oligonucleotide
2		●HIPER™ 3RRT2 Oligonucleotide	6μL (黄色盖)
3		●dNTP Mix (10 mM)	20 μL (黄色盖)
4		●Deionized H <sub>2</sub> O	100 μL (蓝色盖)
5		●5X First-Strand Buffer (RNase-Free)	30 μL (蓝色盖)
6		●HIPER™ Solution I	5 μL (蓝色盖)
7		●HIPER™ Solution II	5 μL (蓝色盖)
8		●RNase Inhibitor (40 U/μL)	6 μL (蓝色盖)
9		●HIPER™ Reverse Transcriptase (200 U/μL)	6 μL (蓝色盖)
10		●HIPER™ 5RRT Oligonucleotide	6 μL (红色盖)
PCR	11	●5AP PCR Primer (12 μM)	30 μL (红色盖)
	12	●3AP PCR Primer (12 μM)	30 μL (红色盖)
	13	●10×HIPER™ Hot Start Buffer	100 μL (绿色盖)
	14	●dNTP Mix (2.5 mM of each dNTP)	200 μL (绿色盖)
	15	●HIPER™ Hot Start DNA polymerase (5U/μL)	10 μL (绿色盖)

##### 1. cDNA合成部分

- HIPER™ 5RRT：用于cDNA 3'接头 (对应mRNA 5'端) 引物的跳转；
- HIPER™ 3RRT1：用于起始第一链cDNA合成；
- HIPER™ 3RRT2：用于起始第一链cDNA合成，该引物带有cDNA 5'接头(对应mRNA 3'端)；

##### 2. PCR扩增部分

- HIPER™ 5AP : 为HIPER™ 5RRT的部分序列 , 用于基因的5' RACE试验
- HIPER™ 3AP : 为HIPER™ 3RRT的部分序列 , 用于基因的3' RACE试验

## V. 注意事项

1. HIPER™ 技术所需的模板跳转过程需要使用 *M-MuLV* RNase H-点突变的反转录酶。HIPER™ Reverse Transcriptase 是一种遗传修饰的 *M-MuLV* 反转录酶, 该酶具有 RNA 和 DNA 依赖的聚合酶活性, 但是缺乏 RNase H 活性 ( 该活性区域点突变 ), 不能降解第一链 cDNA 合成时形成的 RNA-DNA 复合物中的 RNA, 因而可获得全长的 cDNA。在 42~55°C 范围内 HIPER™ Reverse Transcriptase 均有酶活性, 因此适合逆转录具有较多二级结构的 RNA 分子。
2. HIPER™ 试剂盒所优化的操作步骤适用于总 RNA 和 mRNA 模板。第一链 cDNA 合成所需的最小起始量为 50 ng 的总 RNA 或是 25 ng 的 mRNA。但是如果样品 RNA 的取材不受限制, 我们强烈建议以 1 µg 的总 RNA 或是 0.5 µg 的 mRNA 起始第一链的 cDNA 合成。
3. 无论您以何种目的使用该试剂盒, 试验的成功与否取决于起始样品的总 RNA 或 mRNA 的质量。
4. 在进行第一链 cDNA 合成前, 我们强烈推荐以甲醛/EtBr/琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 完整性的检测。哺乳动物的总 RNA 28S 和 18S 带电泳条带接近于 4.5 kb 和 1.9 kb 分子量的 Marker。28S 与 18S 的比值接近于 1.5~2.5 : 1。完整的哺乳动物 mRNA 电泳显示为分布于 0.5~12 kb 间的弥散条带, 并伴有微弱的 28S 和 18S rRNA 条带。非哺乳动物 ( 如植物、昆虫、酵母和两栖动物 ) 的 mRNA 电泳则可能在 0.5~3 kb 间弥散分布。
5. 操作过程中佩戴口罩和手套可降低 RNA 和 cDNA 样品被核酸酶降解的风险。



6. 本操作过程中的循环参数设置已在自动热盖的 PCR 仪中反复优化，但是仍需根据您的 PCR 仪和模板优化试验循环参数的设置。
7. 为使 PCR 反应管中的试剂混合均匀，须轻柔吸打溶液，并瞬时离心，使反应液沉积于 PCR 反应管底部。
8. 未注明的情况下，所有操作均在冰上进行。
9. 反应体系中的酶需要最后添加，并轻柔吸打溶液，使酶与反应体系中的其他组分充分混匀。
10. 由于反应体系中的各组分均经过反复优化，酶和模板的量请勿随意增减。
11. RACE PCR 的有效性取决于 RNA 样品中您的目的基因的表达丰度。此外，不同引物也会有不同最适的退火和延伸温度。

## VI. 引物设计

### 1. 引物设计

基因特异性引物 ( Gene-Specific Primers , GSPs ) 应该具有以下特征：

- 20~28个核苷酸；
- 40~70% GC；
- $T_m \geq 50^\circ\text{C}$ 。

HIPER™ RACE反应所使用的引物与模板和所得到的RACE产物的关系见图2。完整的HIPER™ RACE操作至少需要2条基因特异性引物——**5'-RACE PCR所需的反义链引物 ( GSP1 )**和**3'-RACE PCR 所需的正义链引物 ( GSP2 )**。如果只做5'-或3'-RACE，设计一条GSP及其内部的NGSP即可满足试验要求。引物长度最好是20~25个核苷酸，避免使用过短或过长的引物。

如图2所示，基因特异性引物的5'-RACE和3'-RACE扩增产物间最好存在重叠区。重

叠区内如有合适的限制性酶切位点，可以通过酶切和连接反应获得全长的cDNA。若设计的两个基因特异性引物RACE产物间有100~200 bp的重叠区，这两条引物就能用于PCR反应的阳性对照。当然，GSP不一定必须有重叠区。在cDNA较长或丰度较低的情况下，引物最好设计在靠近cDNA的末端，两条引物间可以不存在重叠。此外，引物自身也可以重叠（如互补）。

**基因特异性引物GC含量要在40%~70%间，T<sub>m</sub>值一般在65°C以上，DNAman软件melting temperature分析获得的Hybridization T<sub>m</sub>值最好超过50°C（Freier *et al*, 1986）。**我们的试验结果表明，RACE的PCR扩增时，尤其是那些表达丰度低或有存在复杂的二级结构的样品扩增时，序列较长且Hybridization T<sub>m</sub>值超过55°C的引物可以得到更为稳定的结果。此外，设计T<sub>m</sub>值接近的GSP1和GSP2更有助于HIPER™ RACE的试验。通过计算或PCR的温度梯度试验均能得到GSP1和GSP2的适宜退火温度。需要注意的是，要避免使用自身带有二级结构的引物。

**注意：不要在GSPs的5'末端和/5'和3'末端加入酶切位点，这些附加的序列将增加PCR的反应背景。**

## 2.基因内引物序列的位置

我们使用HIPER™ RACE Kit从GSP扩增至基因的5' cDNA和3' cDNA末端最长片段的为6 kb。但为了得到较好的结果，推荐设计的GSP到5' cDNA和3' cDNA末端不超过3 kb。

## 3.GSP的巢式引物

在cDNA制备完毕后的第一次扩增时，不建议使用GSP的巢式引物。GSP和HIPER™ 5AP或HIPER™ 3AP一般都会造成扩增的背景。但是以GSP的巢式引物（NGSP1 and NGSP2）作为探针对RACE产物进行Southern blot分析有助于鉴定RACE PCR产物。此外，初次GSP扩增时，背景较高，或是有非特异性性扩增时，也需要以巢式基因特异性引物进行巢式PCR。

如果第一条基因特异性引物和HIPER™ 5AP或HIPER™ 3AP扩增的结果为弥散产物，取适当体积( 1/10~1/1000 )利用GSP的巢式引物( NGSP1或NGSP2 )和HIPER™ 5AP或HIPER™ 3AP进行第二次扩增。GSP的巢式引物的设计也应当遵循上面的原则。并且GSP的巢式引物不应与GSP的序列有重叠。已知的序列本身如果很短，巢式引物3'的序列应尽量具有唯一性。

## VII.总RNA和m RNA制备与处理

### 1.一般提示：

- 全程佩戴并经常更换手套及口罩，以避免RNA和cDNA的降解！
- 悬浮沉淀或是进行溶液混合的过程中，用枪头轻柔吸打溶液，或是轻弹离心管底部，使其混合均匀。混合完毕后进行瞬时离心，保证所有的组份均集中于离心管底部。悬浮沉淀过程中不要使用漩涡混合器混合样品，避免造成核酸断裂！
- 未特殊注明的情况下，所有操作均应在冰上进行。
- 反应体系中的酶需要最后添加，并保证将酶完全加入已经配好的混合物后，轻柔吸打溶液，使酶与反应体系中的其他组分充分混匀。
- 由于本试剂盒内提供的所有的反应体系及试剂均经过反复调试，因此切勿随意增减反应的试验体系！
- PCR管与吸头均为一次性使用。

### 2.RNA分析

在进行第一链cDNA合成前，我们强烈推荐以甲醛/EtBr/琼脂糖凝胶电泳进行RNA完整性的检测。哺乳动物的总RNA 28S和18S带电泳条带接近于4.5 kb和1.9 kb分子量的Marker。28S与18S的比值接近于1.5~2.5 : 1。完整的哺乳动物mRNA电泳显示为分布于0.5~12 kb间的弥散条带，并伴有微弱的28S和18S rRNA条带。非哺乳动物(如植物、

昆虫、酵母和两栖动物)的mRNA电泳则可能在0.5~3 kb间弥散分布。

如果试验样品的mRNA明显小于预计的大小(如小于1~5 kb),我们建议在确认RNA纯化试剂未被RNA酶和其他物质污染的情况下,重新制备试验样品所需的RNA。如果新制备的RNA经重新检测后仍小于预计的大小,则需要通过其它的细胞或组织提取RNA。

## VIII.第一链cDNA合成

未注明的情况下,所有操作均在冰上进行。**进行说明书中有明确温度要求的操作时,应该在PCR仪的反应模块温度与设置温度一致后,再将PCR反应管放在PCR仪的反应模块上。**反应体系中的酶需要最后添加,并轻柔吸打溶液,使酶与反应体系中的其他组分充分混匀。反应体系中的各组分均经过反复优化,酶和模板的量请勿随意增减。

(请注意: 25ul体系可以做5次, 12.5ul可以做10次以上, 等比例减半即可)

1. 每个样品及对照均在200  $\mu$ L或500  $\mu$ L PCR反应管内添加下列组分,吸打混匀,并瞬时离心。

### 制备5'-RACE用的cDNA :

RNA 样品*	1~6 $\mu$ L	<b>1~12 <math>\mu</math>L</b>
●HIPER™ 3RRT1 Oligonucleotide	0.5 $\mu$ L	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
●dNTP Mix(10 mM of each dNTP)	1.5 $\mu$ L	<b>3 <math>\mu</math>L</b>
补足无 RNA 酶、DNA 酶去离子水至总体积	8 $\mu$ L	<b>16 <math>\mu</math>L (推荐)</b>

\* (0.025~1  $\mu$ g mRNA或0.05~5  $\mu$ g的总RNA)。

### 制备3'-RACE用的cDNA :

RNA 样品*	1~6.5 $\mu$ L	<b>1~13 <math>\mu</math>L</b>
●HIPER™ 3RRT2 Oligonucleotide	0.5 $\mu$ L	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
●dNTP Mix(10 mM of each dNTP)	1.5 $\mu$ L	<b>3 <math>\mu</math>L</b>

补足无 RNA 酶、DNA 酶去离子水至总体系	8.5 $\mu\text{L}$	<b>17 <math>\mu\text{L}</math> (推荐)</b>
-------------------------	-------------------	---

\* (0.025~1  $\mu\text{g}$  mRNA或0.05~5  $\mu\text{g}$ 的总RNA)。

2. 70°C孵育5 min，立即冰浴3 min。瞬时离心使溶液收集于PCR反应管管底。
3. 在无核酸酶PCR反应管中继续添加下列组分 (**注意，添加的组份可配制Mix，也可单独添加，但每一组份加入后均需马上吸打混匀，以保证各组份发挥最佳的效果!**)。吸打混匀，避免产生气泡，瞬时离心收集溶液。

#### 制备5'-RACE用的cDNA：

●5×HIPER™ First-Strand Buffer	2.5 $\mu\text{L}$	<b>5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Solution I	0.25 $\mu\text{L}$	<b>0.5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Solution II	0.25 $\mu\text{L}$	<b>0.5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●RNase Inhibitor	0.5 $\mu\text{L}$	<b>1 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Reverse Transcriptase	0.5 $\mu\text{L}$	<b>1 <math>\mu\text{L}</math></b>
补足水至总体系	至 12 $\mu\text{L}$	<b>至 24 <math>\mu\text{L}</math> (推荐)</b>

42°C孵育30 min后，12.5  $\mu\text{L}$ 反转录体系加入0.5  $\mu\text{L}$  ●HIPER™ 5RRT Oligonucleotide；25  $\mu\text{L}$ 反转录体系加入1  $\mu\text{L}$  ●HIPER™ 5RRT Oligonucleotide，吸打混匀，并瞬时离心，42°C继续孵育1 h。

#### 制备3'-RACE用的cDNA：

●5×HIPER™ First-Strand Buffer	2.5 $\mu\text{L}$	<b>5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Solution I	0.25 $\mu\text{L}$	<b>0.5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Solution II	0.25 $\mu\text{L}$	<b>0.5 <math>\mu\text{L}</math></b>
●RNase Inhibitor	0.5 $\mu\text{L}$	<b>1 <math>\mu\text{L}</math></b>
●HIPER™ Reverse Transcriptase	0.5 $\mu\text{L}$	<b>1 <math>\mu\text{L}</math></b>
补足水至总体系	至 12.5 $\mu\text{L}$	<b>至 25 <math>\mu\text{L}</math> (推荐)</b>

42°C孵育1 h 30 min。

注意：若使用水浴或无热盖的PCR仪进行42°C孵育，须在PCR反应管中添加矿物油以避免溶液挥发。

4. 70°C孵育10 min，降至4°C后，将PCR反应管从PCR仪取出，置于冰上，终止第一链

cDNA合成。

5. 如果直接进行PCR步骤，吸取1 μL或其整数倍的cDNA至一干净、冰浴的200或500 μL PCR反应管中作为模板进行后续的PCR反应。如果您在第一链cDNA合成为避免挥发使用矿物油，在吸取溶液时应小心避免吸入矿物油。**如果第一链cDNA合成的产物不立即使用的话，应该进行每管3 μL cDNA的分装，将分装后的cDNA保存于-20°C。该产物可于-20°C保存1个月。**

至此，您已获得3'-和5'-RACE用的cDNA。扩增您的目的基因只需少量cDNA即可，制备好的cDNA可用于多个基因的扩增。如果您在完成3'-RACE和5'-RACE后，想用全长cDNA进行长距离PCR（LD PCR）只需留存适量样品进行PCR即可。

## IX.快速扩增cDNA末端（Rapid Amplification of cDNA Ends，RACE）

5'-RACE和3'-RACE PCR反应组分如表1所示。注意，全部的PCR反应均经过HIPER™ Hot Start DNA polymerase优化。

1. 制备PCR Mix时注意多制备1份以保证各体系的充足。5'-RACE和3'-RACE反应试剂相同，各组分如下表所示：

表1 PCR反应组分配制

组分	5'-RACE 样品	5AP 单引物 (- Control)	3'-RACE 样品	3AP 单引物 (- Control)
10× HIPER™ Hot Start Buffer	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
dNTP Mix (2.5mM)	2~2.5 μL	2~2.5 μL	2~2.5 μL	2~2.5 μL
GSP1 (12 μM)	0.1 μL	/	/	/
GSP2 (12 μM)	/	/	0.1 μL	/
5AP (12 μM)	0.1μL	0.2 μL	/	/
3AP (12 μM)	/	/	0.1 μL	0.2 μL
cDNA (试验样)	0.5 μL*	0.5 μL*	0.5 μL*	0.5 μL*
HIPER™ Hot Start DNA polymerase	0.3~0.5 μL	0.3~0.5 μL	0.3~0.5 μL	0.3~0.5 μL
PCR-Grade Water	至25 μL	至25 μL	至25 μL	至25 μL

\*50 ng~0.5 μg

\*\*GSP及接头引物在12  $\mu\text{M}$ 的浓度下，25  $\mu\text{L}$  PCR扩增体系的添加体积注意不要超过0.2  $\mu\text{L}$ 。引物添加体积过大不仅容易形成非特异性扩增，还容易造成扩增产物的高背景。

2. 涡旋混匀（切勿产生气泡），并瞬时离心。
3. 在200  $\mu\text{L}$ 或500  $\mu\text{L}$  PCR反应管中依序添加表1中的各组分，并混合均匀。
4. 每管中加2滴矿物油，并将管盖盖严。

**注意：**如用具有热盖功能的PCR仪可无需添加矿物油。

5. 使用下列程序启动PCR仪。根据cDNA的起始模板是mRNA或是总RNA选择适宜循环数\*。

**注意：**PCR设定的循环次数取决于目的基因的表达丰度，需要依据不同基因选择适宜的PCR扩增参数。以之前描述的体系、步骤先运行30或35个循环后，在1.5%的EtBr胶中检测PCR产物。如果条带微弱或无带，将装有剩余产物的PCR管置于PCR仪上再运行5个循环。最适延伸时间的设置依据所扩增片段的长度。扩增长度为2~4 kb时延伸时间为4 min，目的产物为0.2~2 kb时可将延伸时间降至2 min，5~10 kb的产物则增加至10 min。

**程序（DNAMAN软件melting temperature分析获得的Hybridization T<sub>m</sub>值50~70℃）：**

- 35个循环（mRNA）：或
- 40个循环（总RNA）：
  - 94℃ 30 sec
  - 50~70℃（设定温度梯度） 30 sec
  - 72℃ 3 min\*

\*如果片段>3 kb，产物长度每增加1 kb延伸时间延长1 min。

6. [可选步骤]建议在50~68℃的温度范围内选取6个温度同时进行温度梯度扩增，每25  $\mu\text{L}$  PCR体系添加cDNA模板0.5  $\mu\text{L}$ 。如果初次的PCR反应没有得到清晰的目的条带，或是泳道呈弥散状，可以cDNA或是巢式引物作探针进行Southern blot分析。或是以巢式引物进行第2次PCR反应。

①在没有明显扩增条带的情况下，将6管不同温度梯度下第1次PCR扩增产物各吸取5~15  $\mu\text{L}$ ，进行PCR产物回收后，以相同体积的水洗脱，去除第1次PCR扩增产物中的引物及小于100 bp的短片段。第1次PCR产物直接或用水稀释至1~100倍后，利用巢式引物和接头引物进行第2次PCR反应。使用的引物为0.1  $\mu\text{L}$ 的HIPER™ 5AP/3AP和0.1  $\mu\text{L}$ 的NGSP，循环次数为30~33个。

②在有明显条带的情况下,将有条带的第1次PCR产物各吸取5~10 μL( 存在PCR扩增产物温度两侧的产物也可以同时进行回收 ), 进行PCR产物回收后,以相同体积的水洗脱,去除第1次PCR扩增产物中的引物及小于100 bp的短片段。将第1次PCR产物直接或用水稀释至1~100 倍后,利用巢式引物和接头引物进行第2次PCR反应。使用的引物为0.1 μL的HIPER™ 5AP/3AP和0.1 μL的NGSP,循环次数为30~33个。

## X.RACE产物鉴定

本操作手册推荐对RACE产物进行鉴定,以确定扩增产物为目的片段。这一操作可在已经获得全长cDNA,甚至得到单一的PCR扩增产物情况下进行,进行该操作的目的主要是为了避免浪费您的试验时间。在RACE试验获得多个PCR扩增产物,或是怀疑扩增的产物为多基因家族的情况下,进行RACE产物鉴定的操作尤为重要。

产物鉴定的方法有3种可供选择:①比较以GSP和NGSP获得的RACE产物;②Southern blotting;③克隆和测序。操作①和②需要NGSP以分析5'-RACE和3'-RACE产物。Southern blotting和克隆、测序等操作步骤可参见Sambrook & Russell( 2001 )或是其他适宜的操作手册。

### 1.比较以GSPs和NGSPs获得的RACE产物

5'-RACE反应需要比较初次扩增产物( HIPER™ 5AP和GSP1的扩增产物 )与二次扩增产物( HIPER™ 5AP和NGSP1的扩增产物 ),相应的,3'-RACE反应则需要比较初次扩增产物( HIPER™ 3AP和GSP2的扩增产物 )与二次扩增产物( HIPER™ 3AP和NGSP2的扩增产物 )。在初次PCR产物为多个条带,或是非特异性引物进行扩增时,进行这一步骤有助于获得正确的试验结果。如果条带为目的条带,在以巢式基因特异性引物进行二次扩增的时候,产物会变小,产物片段的差值应与GSP和NGSP之间的距离一致。以HIPER™ 5AP和GSP1 ( 或HIPER™ 3AP和GSP2 ) 进行扩增时如果有多个条带,在以



HIPER™ 5AP和NGSP1( 或HIPER™ 3AP和NGSP2 )进行扩增时某些条带可能会消失。

## 2.Southern Blotting分析

若以巢式的基因特异性引物作为探针（通常是其他的GSP或是NGSPs）进行Southern blotting分析，可确定RACE产物是否为目的产物。初次PCR产物得到多个条带，或是用非特异性引物进行PCR扩增时，Southern Blotting尤为重要。5'-RACE比3'-RACE更容易出现多个条带。

①琼脂糖/EtBr胶检测RACE产物。

②拍照后，将DNA转移至标准的尼龙膜上。

③制备与GSP1( 或GSP2 ) 序列不同的杂交探针，末端标记的NGSP1( 或NGSP2 ) 也可用作探针。如果试验的GSP在5'和3'片段有重叠区的话，GSP2可用作检测5'-RACE产物，GSP1可用作检测3'-RACE产物。缺刻转移或是之前克隆的部分cDNA的随机引物内部限制性酶切片段均可用作探针。

④Southern blotting与探针进行杂交，在中等~高度严谨的条件下进行洗膜和曝光。

⑤将Southern blotting的杂交图和电泳照片进行比对。一般来讲，倾向于分离Southern blotting膜中最大的RACE产物所对应的条带。如果凝胶电泳中存在某些更大的产物但并不能与基因特异性引物杂交，这些产物一般可以确定为非特异性扩增。小于目的产物，且能与探针杂交的条带可能是不完整的转录产物，但是也不能完全排除，这些短的条带可能来源于正确的基因可变剪接产物，或来源于多个启动子的转录本，或是来源于多基因家族。

⑥一旦得到一条或数条目的条带，需以胶回收试剂盒分离相应的目的片段，继续进行试验。

## 3.RACE产物的克隆和测序

①对目的条带进行切胶纯化，并克隆至T/A克隆载体。

②对5'-RACE产物，我们推荐挑取8~10个不同的克隆以最大可能地获取完整的5'末端。一旦获得含有最长片段的克隆，即可进行测序。理论上您可以获取整个的开放阅读框、5'和3'非翻译区。

## XI. 常见问题及解决方案

5'-RACE和3'-RACE反应一般都可以进行优化，这种反应体系的优化也是试验所必需的。优化的内容包括提高目的片段的产量、减少非特异性扩增的背景和/或不完整的RACE产物。本操作手册推荐的cDNA合成方法制备的5'-RACE和3'-RACE用的cDNA足够进行100次以上的RACE PCR反应，因此有充足的模板可用于优化RACE扩增。

### 1. 第一链cDNA合成和HIPER™ PCR扩增

如果目的产物较小（小于3 kb），产量较低，或无PCR产物须检查以下步骤以确定反转录步骤的正确性。

HIPER™ 试剂盒中附带的HIPER™ Reverse Transcriptase等，均可实现反转录过程的模板跳转。HIPER™ 技术所需的模板跳转过程需要使用*M-MuLV* RNase H一点突变的反转录酶。HIPER™ Reverse Transcriptase是一种遗传修饰的*M-MuLV*反转录酶，该酶具有RNA和DNA依赖的聚合酶活性，但是缺乏RNase H活性（该活性区域点突变），不能降解第一链cDNA合成时形成的RNA-DNA复合物中的RNA，因而可获得全长的cDNA。在42~55°C范围内HIPER™ Reverse Transcriptase均有酶活性，因此适合逆转录具有较多二级结构的RNA分子。

①**RNA可能在贮存和（或）第一链合成的过程中发生降解。**起始反应物中低品质的RNA将会降低全长cDNA合成的能力。RNA须于-70°C贮存。工作区域、设备及溶液中都不能含有RNase A。

②**操作过程中可能使用了不适宜的孵育温度或是遗漏了某一或某些重要组分。**仔细

检查操作过程，并重复第一链cDNA合成和PCR反应。

③**需优化PCR的条件及参数。**不同的PCR仪、聚合酶或是RNA样品应该修正PCR的循环次数。如果PCR反应的平台期出现在24个循环或之后，说明PCR的反应条件并非最佳，需进行调整，并以新制备的0.5 μL（或其整数倍的）第一链产物重复PCR步骤。

④**PCR产物量较低，或是得到的PCR产物较短。**通常RNA样品浓度较低或是降解时会出现这样的结果，此外，样品中含有抑制第一链cDNA合成的物质也会产生这种现象。如果样品来源于非哺乳动物，该物种可能的确会出现类似的PCR产物。如果RNA样品来源于非哺乳动物，显然截短的PCR产物可能与该物种RNA正常大小的分布有关。以昆虫为例，正常的RNA分布就是小于2~3 kb。因此有必要在甲醛变性胶中检测试验样品RNA的含量及完整性。

样品中RNA含量较低，但品质很好时，可以通过增加反转录过程中RNA模板的含量，或是增加PCR过程中的循环次数进行优化。

在合成第一链之前样品就（因含有RNA酶）存在部分降解时，需重新制备RNA，并吸取一小部分在42℃孵育2 h，通过甲醛变性胶电泳比较样品孵育前后的状态。如果RNA在孵育过程中发生降解，也将影响第一链的cDNA合成。因而需要以其它方式重新分离RNA。多次的酚：氯仿抽提可以显著增加RNA的稳定性。

若样品中含有抑制cDNA合成的成份，以80%的乙醇洗涤两次可以除去某些水溶性成份，如果这一方法仍不奏效，需要以其它技术或RNA分离试剂盒提取RNA。

## 2.对照PCR反应

HIPER™ 5AP/3AP单引物扩增cDNA的阴性对照。小于35个循环时，应该不出现扩增产物。如果该对照的扩增产物为弥散条带或多个条带形成的ladder，则需要重新修改循环参数。

## 3.PCR中一般会出现的问题

①富含GC的模板：如果PCR产物，尤其是5'-RACE产物，未出现目的条带，或是非预期条带，可能是由于模板GC含量较高。试剂盒中提供的 HIPER™ Hot Start DNA polymerase可用于扩增富含GC的模板。但是PCR mix的体系和参数还需依据模板进行修正。

②高保真PCR：若RACE产物还用于其他分析或研究，可以用高保真酶扩增全长cDNA。

③降落PCR的问题：出现问题时应首先修正程序最后设定的循环数（即68°C运行的30~35个循环）。若电泳检测后发现无扩增产物，可将剩余产物重新置于PCR仪上再运行5个循环。如果还没有，可在68°C再运行3~5个循环。若仍无产物，请重新进行PCR扩增，并将第3次循环的退火温度降至68°C到65°C之间的某一温度。如果GSP的T<sub>m</sub>值接近70°C，上述程序的改进会比较有效。

4.3'-RACE成功，但5'-RACE无扩增产物。

这种情况常常是由于未能合成全长cDNA和/或未进行模板跳转反应，应重新合成第一链cDNA。

另外，合成的cDNA已经降解。反转录后的产物未于-20°C冻存，或使用后未及时于-20°C冻存，或频繁冻融cDNA都会出现这一情况。

5.RACE反应中都未出现扩增条带

PCR（尤其是5'-RACE和3'-RACE）的30~35个循环之后还未发现扩增条带，将剩余产物重新置于PCR仪上再运行5个循环。需要根据不同的PCR仪优化PCR反应体系及参数。如果这些方法都不奏效，则可能是由于cDNA合成和/或模板跳转反应失败造成的，需要重新合成第一链cDNA。

6.样品制备的第一链cDNA，5'-或3'-RACE均无目的条带。

需要首先确认目的基因是否表达！

如目的基因在您使用的RNA中表达丰度并不高时，可在原PCR循环数上再多运行5个循环，直至RACE产物出现，但是降落PCR的循环数不要超过50个，非降落PCR的循环数不要超过41个。若仍无目的条带，需要在目的基因表达丰度较高的样品中重复试验。

设计的基因特异性引物的退火温度低于68°C，可以进行50~70°C之间的温度梯度试验。

设计的基因特异性引物不适用于该PCR体系。以第VI部分引物设计的原则检查引物的设计是否合理，并视需要重新设计引物。

由于目的基因富含二级结构和/或富含GC，难于进行PCR扩增。在靠近cDNA末端的位置重新设计引物。如已知某区域富含GC，避免在该区域设计引物。

目的基因太长，不能完全反转和/或进行长距离PCR。尽可能在靠近cDNA末端的位置设计引物，并重新以基因特异性引物或是6核苷酸的随机引物代替试剂盒中的HIPER™ 3RRT1重新合成第一链cDNA。

**从总RNA中纯化出mRNA后，再进行反转录，可大大提高基因5'-RACE的成功率。**

7.RACE产物含有多个条带。

某些情况下，试验样品会产生多个5'-RACE和/或3'-RACE产物。如上文所述，这种情况下，需要判定哪一（或哪些）条带为目的片段，哪些为假阳性片段，确定目的片段和全长片段需要确定转录起始位点、内含子/外显子结构、多腺苷酸化位点和基因组测序等研究工作，利用下面的方法有助于剔除假阳性片段。

多条产物并不表示不能得到全长cDNA。若能剔除非特异性条带，最终也能节约试验时间。通常以每次RACE产物中的得到的最长的片段进行下面的试验就能获得真正的、完整的RACE产物。

① “阳性”多条RACE产物的来源

个别基因由于存在多个转录本会形成多个RACE片段，机制通常分为以下3类：

mRNA的可变剪接可形成多个5'-或3'- RACE产物；不同的转录起始位点可形成多个5'-RACE产物；不同的多聚腺苷酸化位点可形成多个3'-RACE产物。

另一方面,目的基因可能是多基因家族的成员之一,由于基因家族间序列的相似性,设计的基因特异性引物可在多个基因间进行PCR扩增。

区分真正的序列不同的RNA属于科学研究的范畴,但是,通过本试剂盒能发现某一来源的RNA表达丰度要高于其他来源的RNA。

### ②假阳性产物的来源

多条扩增产物通常并不实际对应真实、完整的转录本。这些假阳性的RACE产物可分为两类,即不完整的RACE产物和非特异性的RACE产物。

正确的引物结合位点的不完整扩增片段可能是以下几个原因造成的:因反转录中止而产生的不完整的第一链cDNA通常会形成多条的5'-RACE产物。在RNA分子较大时这种现象尤为普遍,但也较为难以解决,因为这一现象是由反转录过程的内在缺陷决定的,很难克服;以降解的RNA起始第一链cDNA的合成通常会形成多条的5'-RACE产物;某一特定基因因模板的高GC含量使PCR扩增过程十分困难,也会导致形成多条5'-或3'-RACE产物;非特异性RACE产物则来源于引物与双链cDNA的多个非特异性的结合位点结合,或是由引物二聚体造成的假阳性。

### ③建议:

注意一定要进行推荐的对照PCR扩增,并且GSP的单引物扩增不应有条带,而与接头引物结合进行扩增时应只有单一条带。若GSP的单引物扩增有条带的话,应修改循环参数或设计NGSP;使用5  $\mu$ L 5~10倍稀释的RACE-Ready cDNA重复PCR扩增;检测用于第一链cDNA合成的RNA(见第VII部分)。如果RNA分子量低于理论值,重新进行RNA提取和cDNA合成的步骤。

采用以上操作后,如果仍有多个条带,依据以下方式改进PCR循环参数:以2~5°C

为一个单位升高PCR的退火温度，以增加PCR的严谨性。一般非特异性扩增的条带会消失，只保留正确或不完整的目的基因扩增产物；减少循环次数；减少延伸时间；RACE产物较大的情况下，增加延伸时间也能消除多余的条带。

如果经过上述处理还有多个条带，依据以下方式设计新的一组PCR引物：最好设计巢式的基因特异性PCR引物，其产物大小有一定差别。这两条基因特异性引物既可以单独与接头引物组合后使用，也可以第1次PCR的产物做为模板进行巢式PCR。与任一基因特异性引物扩增相比，巢式PCR通常会降低PCR反应的背景和非特异性扩增，巢式引物的设计请参见第VI部分。

与巢式PCR相比，我们首先推荐进行GSP1/NGSP1与5AP的PCR扩增。这两次PCR的结果有助于显示多个条带是特异性还是非特异性的。特异性条带在两次扩增中都会出现，但是巢式的基因特异性引物的扩增产物要小一些。两次扩增产物的碱基数之差与引物设计时对应的cDNA距离一致。如果上述的各种方法均不能得到特异性的结果，应以基因特异性引物和随机引物代替本试剂盒提供的HIPER™ 3RRT1/ 3RRT2重新合成cDNA。

#### 8.RACE cDNA产物为弥散条带。

某些RACE产物的条带非常复杂，呈弥散状。大多，尤其是3'-RACE反应呈弥散状，是由于RACE反应前的问题造成的。5'-RACE的弥散条带通常是因反转录的模板或是RNA存在降解造成的。

合成第一链cDNA的RNA中存在污染或是反转录过程中出现问题都会造成扩增条带出现弥散。无论是哪种情况，都应当重新提取RNA后再进行RACE工作（或是确认用于第一链合成的RNA不存在污染）。

## **XII.参考文献**

Borson, N. D., Sato, W. L. and Drewes, L. R. (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Applic.* 2:144–148.

Chenchik, A., Zhu, Y. Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. & Siebert, P. D. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR* (BioTechniques Books, MA), pp. 305–319.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. and Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695–5699.

Freier, S. M., Kierzek, R., Jaeger, J. A., Sugimoto, N., Caruthers, M. H., Neilson, T. and Tumer, D. H. (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373–9377.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).