

Version 2

Cat No. AG11618

# 5' / 3' RACE 试剂盒

# 5' / 3' RACE Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 即 cDNA 末端快速扩增技术, 是以部分区域已知序列为起点, 对未知基因的 cDNA 末端快速扩增技术。本制品是使用 Total RNA 或 Poly A<sup>+</sup> RNA 作为模板进行反转录, 快速扩增获得 cDNA 5' 末端和 3' 末端序列的试剂盒。试剂盒包含 5' RACE 和 3' RACE 扩增所需组分, 可根据需求进行选择。

进行 5' RACE 时, 利用反转录酶的模板转换活性 (Template-switching), 在 RNA 的 5' 末端添加接头, 可直接进行 RACE PCR 扩增, 不需要 adaptor 连接等步骤, 整个流程更快、操作更简单; PCR 扩增体系使用本公司性能优越的 *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase, 具有扩增长片段或高 GC 含量等复杂片段扩增能力, 精心优化的 Buffer 体系, 使得本制品具有较高的特异性, 可减少 RACE 实验中的弥散现象。

本制品包含精心优化的 5' RACE 和 3' RACE 反应的所有试剂, 请使用本试剂盒包含的试剂进行反转录和 PCR 扩增实验, 如需替换, 请先进行验证。

## ➤ 产品组成

组分名称 ( Package 2-1, -80°C保存 )	AG11618 ( 10 rxns )
Template Switching Oligo (TSO) ( 24 μM )	10 μl
Control Mouse Liver Total RNA ( 1 μg / μl )	10 μl

组分名称 ( Package 2-2, -20°C保存 )	AG11618 ( 10 rxns )
3' RACE RT Primer ( 12 μM )	10 μl
5' RACE RT Primer ( 12 μM )	10 μl
Random Primer ( 20 μM )	10 μl
RNase Inhibitor ( 40U / μl )	10 μl
5X RACE RT Buffer	40 μl
<i>Evo M-MLV</i> RTase for RACE ( 100U / μl )	20 μl
dNTP Mix ( 10mM each )	120 μl
10X Universal Primer Mix	400 μl
Tricine EDTA Buffer	1 ml x 2 pcs
Universal Short Primer ( 10 μM )	50 μl
Control 5'-Gene-Specific Primer ( 10 μM ) *	25 μl
Control 3'-Gene-Specific Primer ( 10 μM ) *	25 μl
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5U / μl )	25 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	500 μl
Nuclease free water	1 ml

\*: 使用 Control 5'-Gene-Specific Primer 扩增出的 DNA 片段长度为 1.6 kb; 使用 Control 3'-Gene-Specific Primer 扩增出的 DNA 片段长度为 0.6 kb。

## ➤ 保存

保存温度: Package 2-1 -80°C保存

Package 2-2 -20°C保存

运输温度: Package 2-1 -20°C冰袋运输或干冰运输 (避免反复冻融)

Package 2-2 -20°C冰袋运输或干冰运输

## ➤ 产品优势

1. 操作便捷, 不需要 Adaptor 的连接步骤;
2. *Evo M-MLV* RTase for RACE 具有较强的反转录能力, 对于长片段及复杂结构模板能进行较好的反转;
3. *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase 具有较强的扩增能力, 对于长片段或高 GC 含量等复杂片段的扩增都适用;
4. 本制品可反转 10 ng ~ 1 μg 的总 RNA 或 Poly A<sup>+</sup> RNA;
5. RACE PCR 扩增产物可进行 TA 克隆。

## ➤ 使用注意事项

1. 设计 Gene specific primers (GSP)/ Nested gene specific primers (NGSP) 引物时, 应按下述“实验前准备中的 1) GSP 引物设计要求”进行设计, 否则容易导致非特异性扩增; 同时可以针对同一待测转录本设计多条引物以提高扩增成功率。
2. 建议使用完整且无污染的 RNA。不完整或降解的 RNA 会影响合成 cDNA 完整性及长度, 进而影响后续 RACE 扩增, 导致实验失败。建议实验前可以使用琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 的完整性; 或使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Code. 5067-1513) 检测 RNA 的完整性。
3. 如果使用无 Poly (A) 尾的 RNA, 研究其 5' 末端序列, 可使用 Random Primer 替换 5' RACE RT Primer, 用法及用量与 5' RACE RT Primer 相同, 研究其 3' 末端序列, 需使用 Poly (A) 聚合酶加 A 尾后进行后续实验。
4. 本制品建议反转 RNA 用量不超过 1 μg, 但如果目的基因的丰度较低可适当提高 RNA 的使用量。
5. 进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染, 需要使用无菌无酶的器具, 操作过程中要避免说话, 且需要穿实验服和戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

6. 由于本制品检测灵敏度高，要避免与其他实验的交叉污染。建议反转录在单独、干净的 PCR 实验区（或超净工作台）进行。
7. 如果 PCR 扩增产物无明显目的条带，或者特异性较差，可采用巢式 PCR 方法进行二轮 PCR 扩增。
8. 建议实验全程在冰上操作。
9. 配制反应液过程中，建议酶最后一步加入。

## ➤ 实验原理

### 3' RACE 原理

3' RACE 是对基因特定位点(已知序列)与 3' 末端之间片段进行扩增的技术。以 mRNA 3' 末端 Poly (A) 尾的引物结合位点,以带有接头的 Oligo (dT) 为引物在反转录酶的作用下,合成 5' 端带有接头的 cDNA。然后用一个基因特异引物 (gene specific primer, GSP)作为上游引物,用一个含有部分接头序列的通用引物作为下游引物,以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,获得 cDNA 3' 端序列(基因特异性引物→3' 末端)。

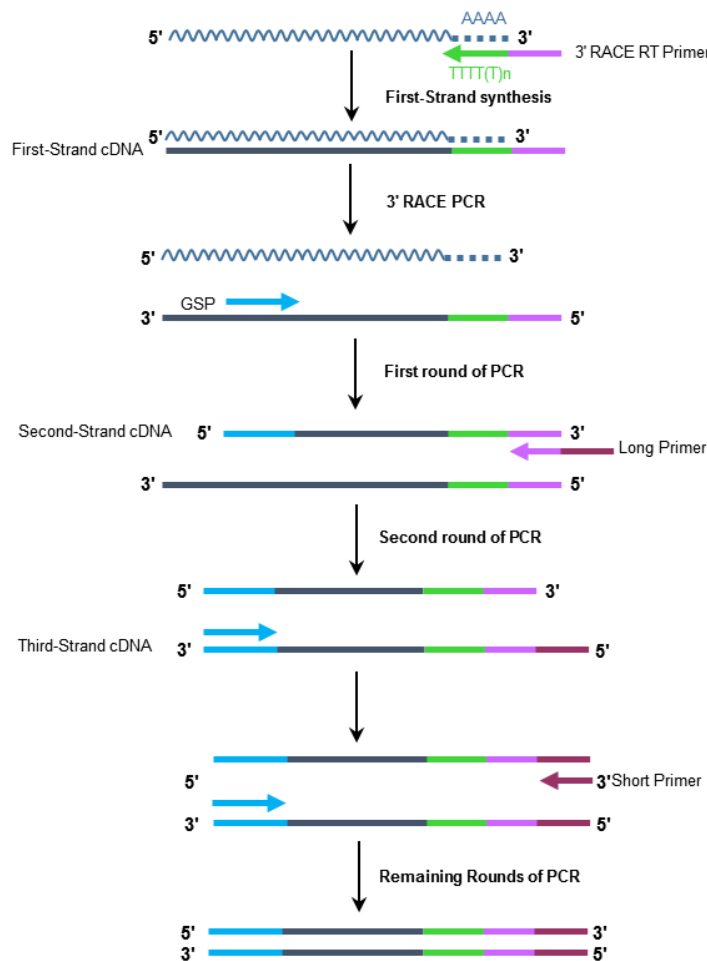


图 1. 3' RACE 扩增流程

### 5' RACE 原理

5' RACE 是对基因特定位点（已知序列）与 5' 末端之间片段进行扩增的技术。以含有 3' 末端 Poly (A) 的 mRNA 为模板,以 Oligo (dT) 为引物,在反转录酶的作用下合成 cDNA,依靠反转录酶的末端转移酶活性,实现模板转换 (Template-switching),在反转录达到 cDNA 的 3' 末端时自动加上 3~5 个 (dC) 残基,(dC) 残基与通用接头引物的 3' 寡核苷酸序列 Oligo (dG) 配对后,转换为以通用接头序列为模板继续延伸,从而在 cDNA 3' 端添加一段通用接头序列。以第一链 cDNA 为模板,用一个含有部分接头序列的通用引物作为上游引物,用一个基因特异引物 (gene specific primer, GSP) 作为下游引物进行 PCR 扩增,获得 cDNA 5' 端序列 (基因特异性引物→5' 末端)。

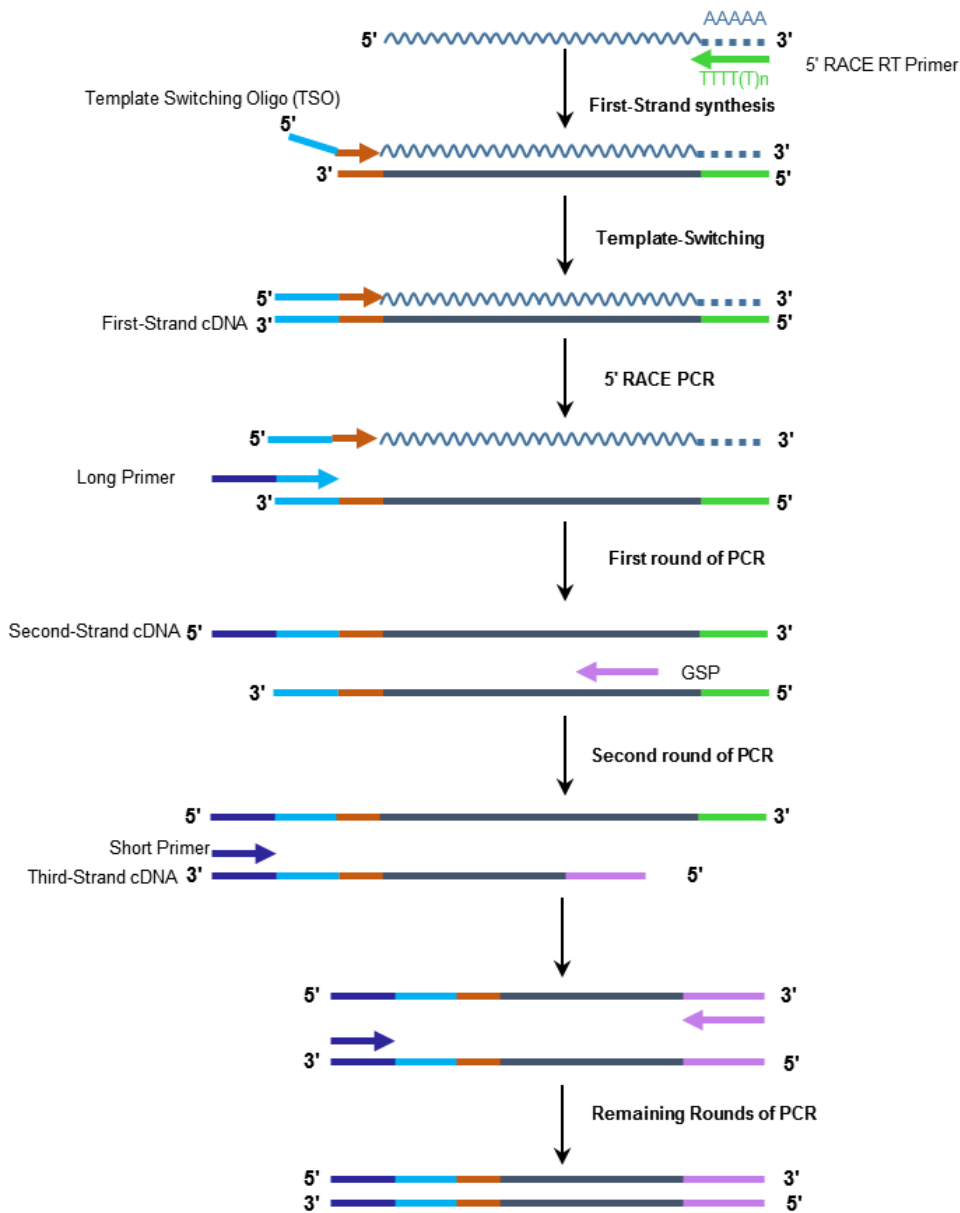


图 2. 5' RACE 扩增流程

## ➤ 实验前准备

### 1) GSP 引物设计要求:

- ❖ 建议引物长度为 23 ~ 28 nt, GC 含量保持在 50% ~ 70%之间, 以保证特异性退火。也可根据实际需要进行调整。
- ❖ T<sub>m</sub> 值对于产物特异性至关重要, 设计引物时应保证 T<sub>m</sub> 值 ≥ 65°C; 如果 T<sub>m</sub> 值 > 70°C, 可以使用 Touchdown PCR 方法进行扩增以提高产物特异性。  
建议 T<sub>m</sub> 值以 IDT 分析得到的 T<sub>m</sub> 值为准, [sg.idtdna.com/calc/analyzer](http://sg.idtdna.com/calc/analyzer)
- ❖ 对于较长 (>10 kb) 的待测转录本, 尽量在靠近 cDNA 的末端进行设计引物; 建议靠近末端的长度不超过 3 kb。
- ❖ GSP 引物应与 10X Universal Primer Mix (UPM) 的 3'端不互补。  
Long primer:  
5' - CATATACCATTACGTCAAGGGCATGCGATGCTTAGCCAGCAATACG -3'  
Short primer:  
5' - CATATACCATTACGTCAAGGGC - 3'
- ❖ Nested gene specific primers ( NGSP ) 的设计原则:
  - 引物长度、GC 含量、T<sub>m</sub> 值等同 GSP(基因特异性引物)设计原则;
  - 设计位置: NGSP 应设计在靠近 GSP 位置的 3' 末端, 建议 NGSP 的 5' 末端不要与 GSP 引物重叠。

### 2) RNA 准备

RNA 起始材料的完整性及纯度对合成高质量的 cDNA 至关重要; 在进行 RNA 提取时需注意以下几点:

- ❖ 在单独的工作台使用专用的移液器进行操作, 保证没有 RNase 污染;
- ❖ 整个提取过程中始终佩戴手套和口罩, 避免 RNA 降解;
- ❖ 建议使用一次性带滤芯枪头防止污染;

RNA 纯度检测:

- ❖ RNA 样本中存在的有机物、金属离子、盐或核酸酶可能会抑制酶活性或降解 RNA, 建议检查 RNA 的纯度确保无污染; 杂质可通过多次乙醇沉淀去除, 然后用 80%乙醇洗涤并完全去除所有剩余乙醇;
- ❖ 如果提取植物或色素含量较高的 RNA 模板, 要注意多糖或色素污染; 多糖或色素很难去除, 也不能在琼脂糖凝胶上检测到; 这些糖蛋白可能会干扰 cDNA 第一链合成过程中 RNA 的引物结合位点, 导致 cDNA 产量降低;

RNA 完整性检测:

- ❖ 使用安捷伦 2100 生物分析仪 (Agilent, Code. 5067-1513) 或其他等效产品; 每次分析只需要 2 ~ 7 ng 的 RNA; 建议使用 RNA 完整性高 (RIN $\geq$ 7) 的 RNA 样本;
- ❖ 如果没有安捷伦 2100 生物分析仪, 可以通过琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 的完整性: 真核 RNA 的 28S : 18S 理论比值约为 2 : 1, 如果 RNA 的 28S : 18S 比率小于 1, 那么此 RNA 模板就不适合进行后续 RACE 实验。

### 3) 自备试剂 & 耗材

- ❖ 克隆、转化等产品: 如 DNA 连接试剂盒 (Code. AG11801) 或其他等效产品; *E.coli* HST08 感受态细胞 (Code. AG11804) 或其他等效产品。
- ❖ 其他材料: RNase-free PCR 管、Primer、RNA 模板、枪头、冰浴或冰盒。

### 4) 仪器:

- ❖ PCR 仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪、安捷伦 2100 生物分析仪。

## ➤ 操作方法

本试剂盒包含 5' RACE 和 3' RACE 的所有组分, 可选择只进行 5' RACE 或 3' RACE 实验, 建议 5' RACE 实验和 3' RACE 实验分开进行配制, 避免试剂混淆及交叉污染。

### 一. 第一链 cDNA 合成:

本操作步骤可将 10 ng ~ 1  $\mu$ g 的总 RNA 或 Poly A<sup>+</sup> RNA 反转成 RACE 第一链 cDNA; 进行本步骤之前, 确保 RNA 是完整的且没有污染; 在进行实验时, 建议使用本试剂盒包含的小鼠肝脏 RNA 作为阳性对照合成 cDNA; 为了区分非特异性扩增, 也可设置不添加 *Evo M-MLV* RTase for RACE 的阴性对照。

针对无 Poly (A) 尾的 RNA, 若进行 5' RACE 实验, 可使用 Random Primer 替换 5' RACE RT Primer, 用法及用量与 5' RACE RT Primer 相同; 若进行 3' RACE 实验, 需使用 Poly (A) 聚合酶进行加 A 尾后进行后续的反转实验。

#### 1. RNA 变性、退火:

- 本实验体积小, 建议使用 200  $\mu$ l tube 且按照推荐的反应体系添加各组分;
- 实验开始前提前预热 PCR 仪并设置相应程序;
- 提前准备实验所需的试剂, 置于冰上融化, 待完全融化后按照下表配制反应液, 整个实验过程需在冰上操作;

	3' RACE 扩增	5' RACE 扩增
组分名称	加入体积	加入体积
RNA <sup>*1</sup>	10 ng ~ 1 μg	10 ng ~ 1 μg
3' RACE RT Primer ( 12 μM )	1.0 μl	-
5' RACE RT Primer ( 12 μM )	-	1.0 μl
Nuclease free water	Up to 11.5 μl	Up to 10.5 μl

\*1: 如果使用本试剂盒中 Control Mouse Liver Total RNA (1 μg / μl), 建议加入 1 μl。

- d) 使用移液器将溶液混匀, 在桌面离心机上短暂离心将溶液收集于管底, 然后置于 PCR 仪中反应, 反应程序如下:

**反应程序:**

72°C	3 min
4°C	-

- e) 退火完成后短暂离心, 立即放置于冰上。

## 2. cDNA 合成:

- a) 按照下表在冰上配制反转录反应液 ( 为保证体积量充足, 建议额外多配制 1 个反应的量 ), 使用移液器轻柔混匀后短暂离心将溶液收集于管底;

组分名称	加入体积
5X RACE RT Buffer	4.0 μl
dNTP Mix ( 10 mM each )	2.0 μl
RNase Inhibitor ( 40 U / μl )	0.5 μl
<i>Evo M-MLV</i> RTase for RACE ( 100 U / μl ) <sup>*2</sup>	2.0 μl
<b>Total Volume</b>	<b>8.5 μl</b>

\*2: 建议 *Evo M-MLV* RTase for RACE 最后加入。

- b) 取上述配制好的反转录反应液 8.5 μl 加入到第一步退火完成后的试剂中 ( 5' RACE 需要额外添加 1.0 μl Template Switching Oligo ), 如下表:

	3' RACE	5' RACE
组分名称	加入体积	加入体积
上述变性、退火后反应液	11.5 μl	10.5 μl
反转录反应液	8.5 μl	8.5 μl
Template Switching Oligo (TSO) ( 24 μM )	-	1.0 μl
<b>Total Volume</b>	<b>20 μl</b>	<b>20 μl</b>



- c) 使用移液器将溶液混匀，在桌面离心机上短暂离心将溶液收集于管底；  
 d) 立即置于设置好程序的 PCR 仪或水浴中进行反应：

**反应程序：**

42°C	90 min
70°C	15 min
4°C	Hold

- e) 反应结束后，将上述第一条链 cDNA 合成反应产物取出放置于冰上。因待测目的基因转录本丰度不同，且不同的 RNA 样本中含有的各转录本差异较大，避免因模板量太多导致后续 PCR 扩增时出现非特异性扩增，建议用 Tricine-EDTA Buffer 稀释 cDNA，如起始量为 200 ng RNA，可在 20 μl cDNA 中加入 20 μl Tricine-EDTA Buffer。可根据起始 RNA 加入量及目的基因的丰度调整稀释倍数。  
 f) 得到 5' RACE cDNA 和 3' RACE cDNA，可在 -20°C 条件下保存三个月，长期保存建议放置于 -80°C。

## 二. cDNA 末端快速扩增 (RACE 扩增)

RACE PCR 的扩增效率取决于 RNA 样本中目的基因的丰度；另外，不同的引物有不同的退火温度，有关优化 PCR 条件的请参见<附录 2: 常见问题与解决方法>；使用本试剂盒包含的小鼠肝脏 RNA 作为阳性对照合成 cDNA，使用 5' 和 3' RACE 对照 GSP 引物和 10X Universal Primer Mix (UPM) 引物进行扩增。

1. **PCR 反应液配制：**按照下表在冰上配制 PCR 反应液（为保证体积量充足，建议额外多配制 1 个反应的量），使用移液器轻柔混匀后置于 PCR 仪中反应。

### 5' RACE<sup>3</sup>

组分	终浓度	加入量
5' RACE cDNA	-	2.5 μl
10X Universal Primer Mix	1X	5 μl
5' Gene-Specific Primer ( 10 μ M )	0.2 μ M	1 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	1X	10 μl
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U / μ l )	2.5U	0.5 μl
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.4 mM	2 μl
Nuclease free water	-	Up to 50 μl

### 3' RACE<sup>3</sup>

组分	终浓度	加入量
3' RACE cDNA	-	2.5 μl
10X Universal Primer Mix	1X	5 μl
3' Gene-Specific Primer ( 10 μ M )	0.2 μ M	1 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	1X	10 μl
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5U / μ l )	2.5 U	0.5 μl
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.4 mM	2 μl
Nuclease free water	-	Up to 50 μl

\*3: 为了区分非特异性扩增背景产物, 建议设计仅使用 10X Universal Primer Mix( UPM ) / Gene Specific Primers ( GSP ) 单引物的对照, 具体配制方法可参考<附录 1: 单引物对照配制方法>。

## 2. 反应程序

根据 T<sub>m</sub> 值选择不同的程序。

程序 I ( 如果基因特异性引物 T<sub>m</sub> 值为 60 ~ 70°C, 请选择此程序 )

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 25 ~ 30 <sup>15</sup>
退火	55 ~ 68°C	30 sec	
延伸	72°C	3 min <sup>4</sup>	
最终延伸	72°C	5 min	1

程序 II ( 如果基因特异性引物 T<sub>m</sub> > 70°C, 请优先选择 Touchdown PCR )

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 5
延伸	72°C	3 min <sup>4</sup>	
变性	94°C	30 sec	} 5
退火	70°C	30 sec	
延伸	72°C	3 min <sup>4</sup>	} 20 ~ 25 <sup>15</sup>
变性	94°C	30 sec	
退火	68°C	30 sec	
延伸	72°C	3 min <sup>4</sup>	} 20 ~ 25 <sup>15</sup>
最终延伸	72°C	5 min	

- \*4: 最佳延伸时间取决于目的扩增子的长度。长度为  $\leq 3$  kb 的扩增子, 一般延伸时间为 3 min; 长度  $> 3$  kb 的扩增子, 每增加 1 kb, 延伸时间增加 1 min。
- \*5: 一般 Poly A<sup>+</sup> RNA 推荐 25 个循环, Total RNA 推荐 30 个循环; 可根据目的基因的丰度进行循环数的调整, 若基因丰度低, 可适当地增加循环数。

附: 试剂盒中正对照推荐使用程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 30
退火	56°C	30 sec	
延伸	72°C	3 min	
最终延伸	72°C	5 min	1

### 3. 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。若未获得目的条带或条带弥散, 可进行 Nested PCR (巢式 PCR) 扩增。巢式 PCR 扩增方法可参考下述 [【可选步骤】Nested PCR \(巢式 PCR\) 扩增](#)。

#### [【可选步骤】Nested PCR \(巢式 PCR\) 扩增](#)

如果上一轮 PCR 扩增未获得目的条带或条带弥散, 可参照下述方法进行 Nested PCR。

- 取 5  $\mu$ l 上述 PCR 产物, 加入 245  $\mu$ l 的 Tricine-EDTA Buffer, 振荡混匀。
- 按照下表在冰上配制 Nested PCR 反应液, 用移液器轻柔混匀后置于 PCR 仪中反应:

组分	终浓度	加入量
步骤 1 稀释的 PCR 产物	-	5 $\mu$ l
Universal Short Primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Nested gene specific primers (NGSP)	0.2 $\mu$ M	-
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	1X	10 $\mu$ l
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	2.5U	0.5 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM each)	0.4 mM	2 $\mu$ l
Nuclease free water	-	Up to 50 $\mu$ l

### 3. 反应程序:

参照上述步骤 [< cDNA 末端快速扩增 \(RACE 扩增\) 步骤中程序 I >](#) 进行。

### 三. RACE 产物纯化与检测

建议通过克隆和测序的方法验证扩增产物，如果扩增条带单一，建议使用本公司 *SteadyPure* PCR 反应液纯化试剂盒 (Code. AG21003)；如果扩增条带较多且有弥散带，推荐使用本公司 *SteadyPure* DNA 凝胶回收试剂盒 (Code. AG21005) 或其他等效产品回收产物进行克隆测序。

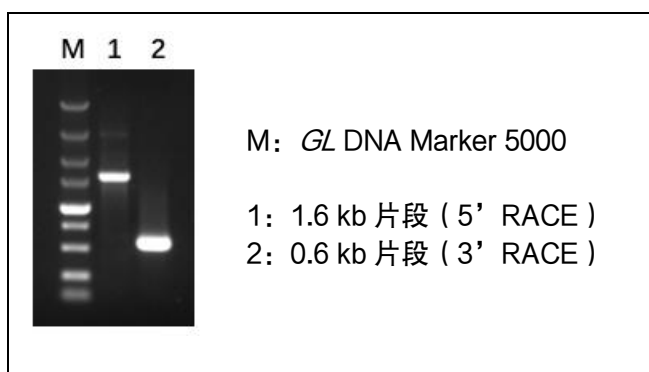
### 四. 克隆转化

1. *L-Exp* 试剂盒扩增产物的 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体；DNA 连接推荐使用本公司 DNA 连接试剂盒 (Code. AG11801) 或其他等效产品，具体步骤流程见其产品说明书。
2. 转化：常规感受态均可使用，可使用本公司产品 *E.coli* HST08 感受态细胞 (Code. AG11804)，具体步骤流程见其产品说明书。
3. 阳性筛选：挑选单菌落进行菌落 PCR 筛选，可使用本公司产品 2X *Accurate Taq* 预混液 (含染料) (Code. AG11009)，对于 5' RACE 产物，建议挑取 8~10 个单克隆以获得 5' 端最大的序列。
4. 测序分析：确认目的基因已经插入载体中，进行一代测序鉴定，测序引物可选择载体通用引物或自己设计引物。

### ➤ 实验例

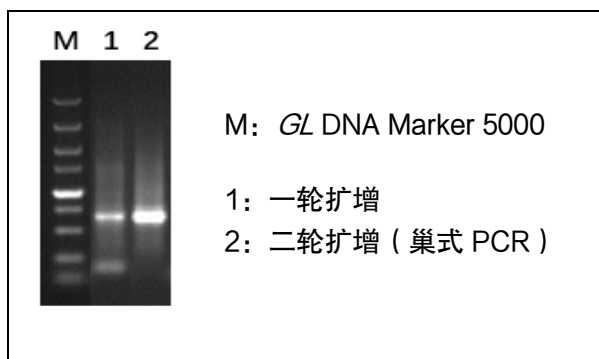
1. 以本试剂盒中自带的正对照 RNA (Control Mouse Liver Total RNA) 为模板，结合正对照 5' 引物 (Control 5'-Gene-Specific Primer) 和 3' 引物 (Control 3'-Gene-Specific Primer) 及试剂盒中其他组分分别进行 5' 和 3' RACE 扩增，成功获得 5' 产物 (1.6 kb) 和 3' 产物 (0.6 kb)。

电泳结果如下图所示：



- 使用小鼠心脏模板，采用本试剂盒进行小鼠 *Hspb1* 基因 5' RACE 扩增，一轮扩增时有非特异性条带；将一轮扩增产物进行二轮扩增（巢式 PCR），可明显提高产物特异性且有单一的目的条带。

电泳结果如下图所示：



## ➤ 产品注意事项

### 1. 高纯度及完整的 RNA 模板

- ❖ RNA 纯度是成功合成 cDNA 的关键因素。RNA 样本中残留的有机物、金属离子、盐或核酸酶等会抑制后续 RT 及 PCR 反应。建议实验前检查 RNA 的纯度，以确保 RNA 中没有污染物。盐或有机污染物等杂质可以通过重复的乙醇沉淀去除，随后用 80% 的乙醇洗涤，完全去除所有剩余的乙醇。
- ❖ RNA 完整性同样是成功合成 cDNA 的关键因素。建议在实验前使用琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 的完整性；或使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Code. 5067-1513) 检测 RNA 的完整性。
- ❖ 目的基因的丰度低：可能无扩增条带或条带弥散，可适当增加 RNA 的用量。

### 2. 合适的引物

- ❖ 如果出现多条非特异性带或弥散带，建议设计仅使用 10X Universal Primer Mix (UPM) / Gene Specific Primers (GSP) 单引物的对照，以区分非特异扩增背景产物，配制方法可参考<附录 1: 单引物对照配制方法>。
- ❖ 如果持续出现非特异性扩增，建议设计引物时尽量使其  $T_m$  值  $\geq 70^\circ\text{C}$ ，并使用 Touchdown PCR 方法进行扩增。
- ❖ 设计新引物时可在原引物的不同位置进行设计，尽量保证扩增目的片段长度在 1 ~ 3 kb 范围内，长度为  $\leq 3$  kb 的扩增子，一般延伸时间为 3 min；如果长度  $> 3$  kb 的扩增子，每增加 1kb，延伸时间增加 1 min。

### 3. cDNA 稀释

- ❖ 建议使用试剂盒中提供的 Tricine-EDTA 缓冲液来重悬和稀释本 cDNA 样本，因为 Tricine 缓冲液在高温下比基于 Tris 的缓冲液更能保持其 pH 值。基于 Tris 的缓冲液会导致低 pH 条件引起 DNA 降解。
- ❖ 如进行 RACE 扩增时无扩增条带或条带弥散，可能是由于目的基因的丰度较低，可适当减少 cDNA 稀释倍数以增加 cDNA 添加量。

### 4. 巢式 PCR 注意事项

- ❖ 在第一轮 PCR 扩增特异产物的条带较弱或有较多非特异性带时，可选择使用试剂盒中提供的 Universal Short Primer ( 10 μM ) 与自己设计的 NGSP 进行巢式 PCR，此方法可提高扩增特异性和产物的产量。
- ❖ 如果产生非特异性扩增，可进行胶回收后进行巢式 PCR。
- ❖ 为保证扩增结果的准确性，建议巢式 PCR 不要超过三轮。

### 5. 防污染措施

- ❖ 本品是由 RNA 制备 cDNA，进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服、戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解；使用无 RNase 污染的耗材。
- ❖ 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即水或 70% 的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验可设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

## ➤ 附录 1：单引物对照配制方法

按照下表在冰上配制单引物对照 PCR 反应液，使用移液器轻柔混匀后置于 PCR 仪中反应。

组分	UPM 单引物对照	GSP 单引物对照
5' or 3' RACE cDNA	2.5 μl	2.5 μl
10X Universal Primer Mix	5 μl	-
5' or 3' GSP Primer	-	1 μl
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10 μl	10 μl
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5 U / μl )	0.5 μl	0.5 μl
dNTP Mix ( 10 mM each )	2 μl	2 μl
Nuclease free water	Up to 50 μl	Up to 50 μl

➤ 附录 2: 常见问题及解决方法

问题	可能的原因	解决方法
5' RACE 和 3' RACE 扩增无目的条带	基因丰度较低	尝试增加扩增循环数: 建议扩增循环数不超过 40 个, 使用 Touchdown PCR 方法的循环数不超过 50 个; 如果仍然没有扩增条带, 建议增加 RNA 使用量 (1 ~ 4 μg) 或使用目的基因含量更高的 RNA 模板。
	退火温度过高	2°C 一个梯度, 降低退火温度, 摸索合适的退火温度。
	GSP 引物不适合	重新检查设计的引物, 可根据 GSP 引物设计要求多设计几对新的引物进行尝试 (引物 T <sub>m</sub> 值很重要)。
	扩增片段可能存在复杂结构, 如二级结构或 GC 含量较高	尝试在靠近 cDNA 末端的地方设计 GSP 引物; 或尽量避开高 GC 序列区域设计 GSP 引物。
	已知序列信息可能存在问题	建议对已知序列进行核对, 确保已知序列的准确性。
	实验过程发生错误	使用正对照试剂进行扩增, 确认是否能正常扩增出目的条带。
5' RACE 和 3' RACE 扩增产物为 Smear 带	RNA 模板中无目的转录本	设计目的片段区域的 PCR 引物或 qPCR 引物进行目的片段扩增。
	RNA 模板中基因丰度较低	增加 RNA 模板加入量 (1 ~ 4 μg); 增加 5' 或 3' RACE cDNA 量 (减少 cDNA 稀释倍数), 增加 GSP 引物量 (1 ~ 5 μl); 设计 Nested GSP, 进行多轮 Nested PCR (不超过三轮)。
	RNA 降解或有其他杂质污染	RNA 提取完成后进行 RNA 纯度检测及完整性检测 (琼脂糖凝胶电泳评价或 Agilent 仪器检测)。
	PCR 扩增片段较长	增加 PCR 延伸时间, 如产物每增加 1 kb 延伸时间提高 1 min; 在尽量靠近序列的末端设计引物, 保证扩增。

	模板量过高	将模板进行稀释 (RNA 模板量控制在 10 ng ~ 1 μg); cDNA 模板稀释后进行 RACE 扩增。
	PCR 条件不合适, 如循环数过高, 退火温度偏低等	减少循环数或提高退火温度, 或尝试使用 Touchdown PCR。
	GSP 特异性不好	重新设计引物, 可考虑提高引物 Tm 值。尽量使 Tm 值 ≥ 65°C。
5' RACE 和 3' RACE 扩增产物有多个条带	多个条带测序结果能与已知序列比对上, 但长短不一致	该基因可能存在不同剪切方式, 生成多个转录本; 针对 5' RACE, 可能存在不同转录起始位点, 可能 RNA 存在降解; 针对 3' RACE, 可能存在多个 Poly (A) 位点。
	测序结果不能与已知序列部分比对上, 可能是非特异性扩增	与 GSP 引物设计有关, 可尝试上调退火温度, 重新设计引物提升特异性。
无阳性克隆	扩增产物回收的量较少	扩增多管进行产物富集, 尽量获得更大的产物浓度; 扩大克隆体系, 增加目的片段的添加量。