

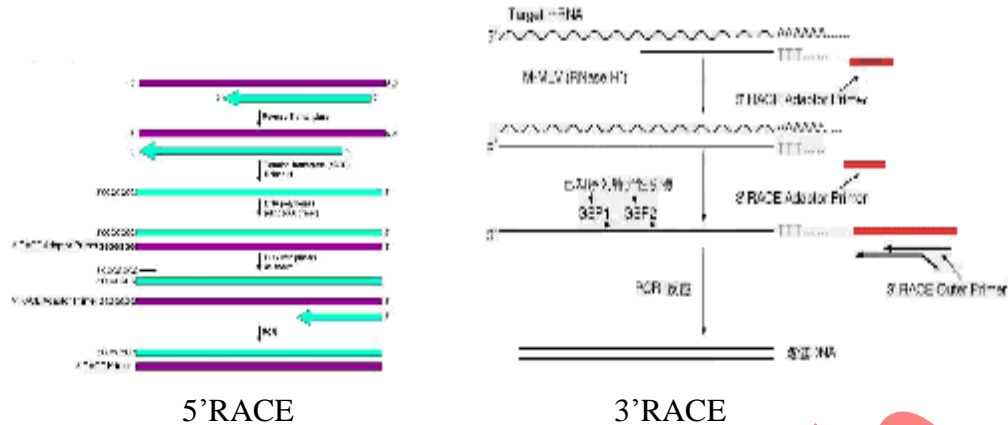


RACE 技术原理和常见问题解答

cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 是一种基于 PCR 从低丰度的转录本中快速扩增 cDNA 的 5'和 3'末端的有效方法, 以其简单、快速、廉价等优势而受到越来越多的重视。

经典的 RACE 技术是由 Frohman 等 1988 年发明的, 主要通过 RT-PCR 技术由已知部分 cDNA 序列来得到完整的 cDNA 5'和 3'端, 包括单边 PCR 和锚定 PCR。该技术提出以来经过不断发展和完善, 克服了早期技术步骤多、时间长、特异性差的缺点。对传统 RACE 技术的改进主要是引物设计及 RT-PCR 技术的改进: 改进之一是利用锁定引物 (lock docking primer) 合成第一链 cDNA, 即在 oligo (dT) 引物的 3' 端引入两个简并的核苷酸【5'-Oligo (dT) 16-30MN-3', M=A/G/C; N=A/G/C/T】, 使引物定位在 poly (A) 尾的起始点, 从而消除了合成第一条 cDNA 链时 oligo (dT) 与 poly (A) 尾的任何部位的结合所带来的影响; 改进之二是在 5' 端加尾时, 采用 poly (C), 而不是 poly (A); 改进之三是采用 RNase H-莫洛尼氏鼠白血病毒 (MMLV) 反转录酶或选择嗜热 DNA 聚合酶可能在高温 (60°C -70°C) 有效地逆转录 mRNA, 从而消除了 5'端由于高 CC 含量导致的 mRNA 二级结构对逆转录的影响; 改进之四是采用热启动 PCR (hot start PCR) 技术和降落 PCR (touch down PCR) 提高 PCR 反应的特异性。

信诺金达提供 RACE 实验扩增此 cDNA 的 5'末端或 3'末端, 从而得到全长的 cDNA。其 5'和 3'RACE 的具体实施路线:



客户需提供目的基因表达量高的单一样品或完整度比较好的 RNA 样品，提供的已知序列能够长于 200 bp。我们将提供给客户 PCR 产物，电泳图及测序结果等。

RACE 实验常见问题分析

1. RT-PCR反应后，无PCR产物或出现Smear，怎么办？
此时请从提取的RNA样品的纯度和添加量、基因的表达丰度、基因的长度和GC含量、引物的设计情况、参考文献的可信度以及RT-PCR条件的设定等方面加以考虑。
2. PCR反应时，反转录反应液的使用量使用多少较为合适？
反转录反应液的使用量可控制在1 μ l~10 μ l的范围。
3. 3'RACE PCR扩增产物经电泳分析后，有时为什么出现多条带现象？
可能是因为未知序列信息不清楚导致了非特异性扩增；
扩增的基因为多基因家族的成员；
mRNA不同的拼接方式造成的。
4. Total RNA使用量是否可以增减？
可以。Total RNA使用2 μ g 时扩增效果较好，1 μ g时扩增稍弱。推荐RNA模板使用量为2 μ g。



5. RT-PCR反应时何时需要将RNA预变性?

RNA立体结构比较复杂, RNA不预变性时没有得到理想结果时需要将RNA预变性。

6. 5'RACE扩增的电泳结果出现多种条带, 为什么?

原因可能是: 扩增的基因为多基因家族的成员; 已知序列信息有限, 导致PCR扩增特异性差; mRNA 5'端剪切、拼接方式不同。

SinoGene Scientific

北京信诺金达生物科技有限公司

地址: 北京海淀区东北旺南路一号院北 321

电话: 010-62419956 传真: 010-62419956

www.sinogenesci.com info@sinogenesci.com