



马岗鹅 RACE 实验进展报告

合同号: PG1-1511004

1. 实验材料

1.1 主要实验仪器

名称	厂家	型号
电泳仪	北京六一仪器厂	DYY-6C
定量 PCR 反应扩增仪	ABI	7900HT
NanoDrop 2000	Thermo	ND-2000
超微量分光光度计		
离心机	Eppendorf	5424 R

1.2 主要实验试剂

名称	厂家	货号
TRIzol	Invitrogen	15596018
cDNA 第一链合成试剂盒	Promega	M1701
SMARTerRACE 5' /3'	Clontech	634858

2. 实验步骤

2.1 RNA 提取

1. 利用 TRIzol 提取 RNA。具体步骤可以参考试剂盒说明书。
2. NanoDrop 检测其浓度和纯度。

2.2 RNA 反转录

1. 取 1ug 总 RNA 反转录成 cDNA, 步骤和体系按照说明书进行。

2.3 RT-PCR 产物测序

1. RT-PCR 并且凝胶电泳验证
2. RT-PCR 产物纯化后测序

2.4 RACE 实验

1. 主要是利用 SMARTerRACE 5' /3' 试剂盒原理做 RACE 实验。具体步骤如下:



1) RACE 逆转录, 步骤和体系按照逆转录试剂盒说明书。

2) RACE PCR (KOD plus Polymerase)

a) 提前设计并合成 GSP primer

b) KOD 酶 pcr 反应体系 (50ul):

10*KOD buffer	5ul
dNTPs	4ul
MgSO ₄	3ul
KOD Polymerase	1ul
CDNA 模板	1ul
10*UPM	5ul
F/R	1ul
补水至 50ul	

c) PCR 程序:

选择 3' 或 5' 端引物进行扩增:

95 °C	3 min*	
95 °C	30s	} 45 cycles
60 °C	30s	
68 °C	50s	
68 °C	6min	
4 °C		

2. 产物纯化后测序

3. 若产物纯化后测序结果不是杂峰, 会进一步进行平端连接, 挑克隆, 测序。

3. 实验结果及分析

3.1 RNA 浓度和纯度报告:

纯度: (A260/A280): 1.85

浓度: 0.208ug/ul

3.2 RT-PCR 引物、凝胶电泳图片以及测序结果:

1. 第一次设计引物序列:

MyD88-5'-F1: GAACGGAGCTGTTTGATGCC

MyD88-5'-R1: AATGACGACCACCATCCTCC

MyD88-3'-F1: GACCTCCAGTTTGTCCAGGA

MyD88-3'-R1: TCATGGCTTTGCACTTCACG

NFKB1-5'-F1: ACAACCCAGGACTCTTGGTG

NFKB1-5'-R1: CTCTTCCCCTCCTGTTACGC

NFKB1-3'-F1: TGGCAGTAATCACAAAGCAGG

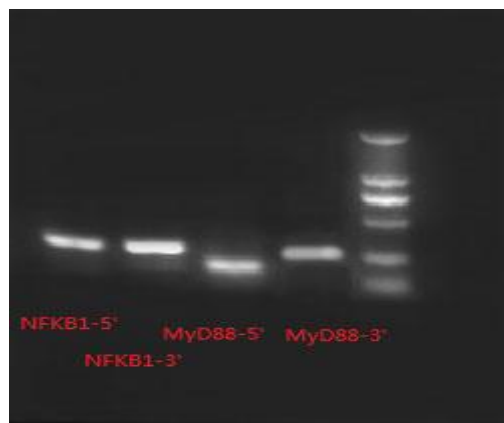
NFKB1-3'-R1: GCAATGCAGTTCGTCCAGAT

以两端引物分别进行 RT-PCR，凝胶电泳检测结果如下，参数设置：

胶浓度：1%

电压：120V

电泳时间：20min

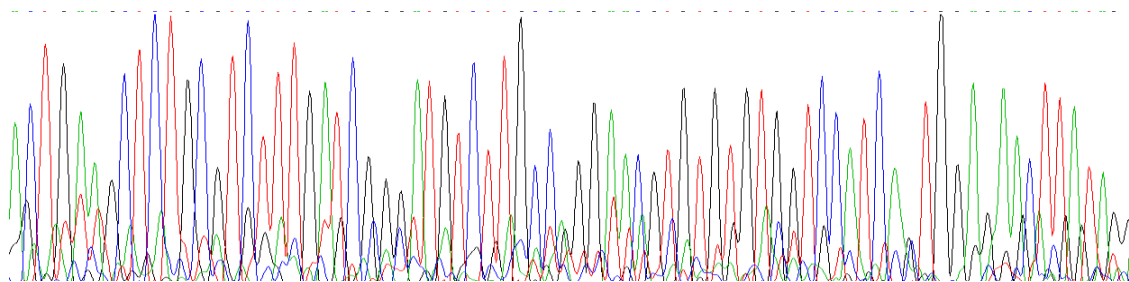


注：Marker 采用 DL2000,大小从下到上分别为：100、250、500、750、1000、1500、2000bp

总结：以所设计引物进行 RT-PCR 扩增，从电泳检测结果来看，条带单一清晰

3.3 RT-PCR 测序峰图及序列

MyD88-5'



ACGTAGCTAAATACTTCGTTTGTCTGAGGAGATGATCAGAGAGCTGGAACAAACAG
AGTTCAAACCTGAAGCTCTGCGTCTTTGATCGGGATGTCTTGCCAGGAACGTGTGT
GTGGTCCATCACTGGAGAACTTATAGAAAGGAGGTGTCGGAGGATGGTGGTCGT
CATTATACCTGATAGCACAGATGCATTGCCAAGTGTTCGGTGACCTCGGTGAGG
GAGGATGGTGGTCTGTCATTAAGGCAGAAAATGGCCGCGGTCCTTGGTGATGGGG
TGC GCGTCTAGAATCCGTTGGTTGTCTGAGCTAATGGATGCAATCAAAGATTAGG
ATCTGTTCCGTCATTAGGAAGGGCGGGGTTGGGTCTTTCGCCGAAGGGGGGAATG
GGTGCAATCGAATAGGGGGGCGGGGGATATTGTGAGCCTGACCATGGTGAAGGA



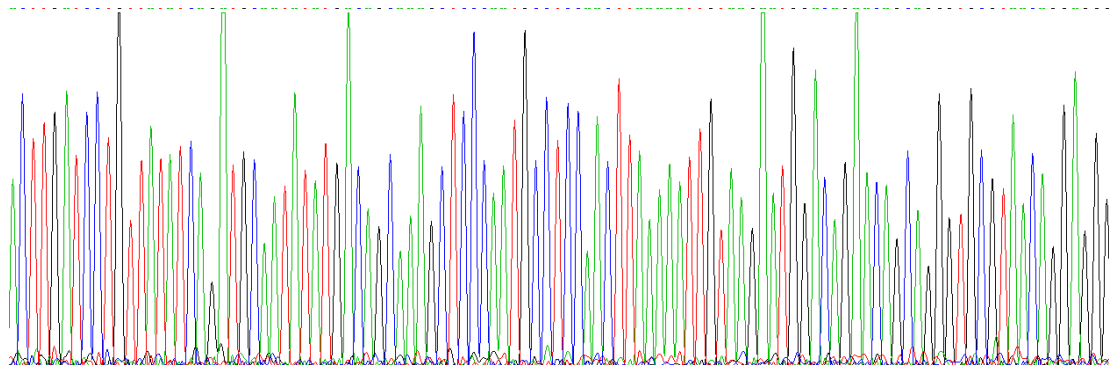
GCGGCAGGTGCGGGCCATGAATGATTGCGAGGGAGATAAT

PREDICTED: Anser cygnoides domesticus myeloid differentiation primary response 88 (MYD88), mRNA
Sequence ID: [ref|XM_013182382.1](#) Length: 4138 Number of Matches: 1

Range 1: 331 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
270 bits(146)	2e-68	153/156(98%)	2/156(1%)	Plus/Plus
Query 14	CTTC-GTTTGT-CAGGAGATGATCAGAGAGCTGGAACAAACAGAGTTCAAAGCTC	71		
Sbjct 331	CTTCAGTTTGTCCAGGAGATGATCAGAGAGCTGGAACAAACAGAGTTCAAAGCTC	390		
Query 72	TGCGTCCTTTGATCGGGATGCTTGGCAGGAACGTGTGTGTGGTCCATCACTGGAGAACTT	131		
Sbjct 391	TGCGTCCTTTGATCGGGATGCTTGGCAGGAACGTGTGTGTGGTCCATCACTGGAGAACTT	450		
Query 132	ATAGAAAGGAGGTGTCGGAGGATGGTGGTCGTCATT	167		
Sbjct 451	ATAGAAAGGAGGTGTCGGAGGATGGTGGTCGTCATT	486		

NFKB1-5'



CCCCGTCAATCCATCTGCAGGCAGAGGATGCGGAGACAGACAGCTAACTGAACG
AGAAAGAGAAATTATTCGTCAGGCAGCAGTACAGCAGACTAAAGAAATGGATCT
CAGTGTGGTGCCTTATGTTTACAGCCTTTCTCCCCGACAGCAATGGCAGTTTCA
CACGGAAACTTGATCCTGTTATATCAGATGCAATATATGACAGCAAAGCTCCCAA
TGCCTCCAACCTTAAAAATTGTAAGAATGGACAGAACAGCAGGGTGCCTAACAGG
AGGGGAAGAGAACAACTCGGCTTCGGCTACTGTTCTTTTACCAGCCTCAATCTC
ATCTTTCTTTTTGCTTTCTGATTCGATAGATGGTTGAACGGTCTCACGTCGTATGG
CAACTTGGTTAAATGGATCAATGGCCCCGAGGACAGAGTTGAGCATTGTCATCAT
TATCATCCCGAAGTTGCGGATCATTCTGATTCTGAAGAAATTAATGAAAAGCAGC
GATTATTGGTTTTTAGTGTTTTGATCCATTCTTTAAATCCAACAACCTTTATTAACA
AGGTC

PREDICTED: Anser cygnoides domesticus nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1), mRNA
Sequence ID: [ref|XM_013195752.1](#) Length: 3148 Number of Matches: 1

Range 1: 700 to 972 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
497 bits(269)	8e-137	272/273(99%)	1/273(0%)	Plus/Plus
Query 13	ATCTGCAGGCAG-AGGATGCGGAGACAGACAGCTAACTGAACGAGAAAGAGAAATTTTC	71		
Sbjct 700	ATCTGCAGGCAGAGGATGCGGAGACAGACAGCTAACTGAACGAGAAAGAGAAATTTTC	759		
Query 72	GTCAGGCAGCAGTACAGCAGACTAAAGAAATGGATCTCAGTGTGGTGGTCTTATGTTTA	131		
Sbjct 760	GTCAGGCAGCAGTACAGCAGACTAAAGAAATGGATCTCAGTGTGGTGGTCTTATGTTTA	819		
Query 132	CAGCCTTTCTCCCCGACAGCAATGGCAGTTTCACACGGAAACCTGATCCTGTTATATCAG	191		
Sbjct 820	CAGCCTTTCTCCCCGACAGCAATGGCAGTTTCACACGGAAACCTGATCCTGTTATATCAG	879		
Query 192	ATGCAATATATGACAGCAAGCTCCCAATGCCCTCAACTTAAAAATTGAAGAATGGACA	251		
Sbjct 880	ATGCAATATATGACAGCAAGCTCCCAATGCCCTCAACTTAAAAATTGAAGAATGGACA	939		
Query 252	GAACAGCAGGGTGCCTAACAGGAGGGGAGAGA	284		
Sbjct 940	GAACAGCAGGGTGCCTAACAGGAGGGGAGAGA	972		

[Related In](#)
[Gene - ass](#)

3'端结果依次同上

3.4 5'及 3' RACE 实验的 PCR 扩增结果

1. 以所设计的 5'及 3'特异性引物及对应通用引物进行 RACE 实验的扩增，并将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，检测结果如下，检测参数设置如下：

胶浓度：1% 电压：120V 电泳时间：20min

NFKB1-5' NFKB1-3' M MyD88-5' MyD88-3'



注：Marker 采用 DL2000,大小从下到上分别为：100、250、500、750、1000、1500、2000bp

从电泳检测结果来看，RACE 扩增后条带弥散模糊，不能看到完整的条带。

以第一次扩增的 race 产物为模板，重新进行 RACE-PCR，得到的仍然是弥散的条带。

4. 重新设计引物序列如下：

MyD88-F2: GGAGCTGTTTGATGCCTTCA

MyD88-R2: GAATCAGCCGCTTGAGACG

NFKB1-5'-F2: ACAACCCAGGACTCTTGGTG

NFKB1-5'-R2: ACCCTGCTGTTCTGTCCATT

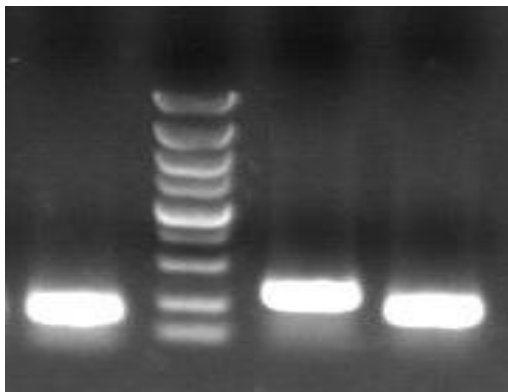
NFKB1-3'-F2: ACATGGTGGTGATGGCAAAC

NFKB1-3'-R2: TGCTGCTTTGAGAACTGCTG

注：MyD88 基因保守片段较短，理论上可采用一对引物进行扩增。

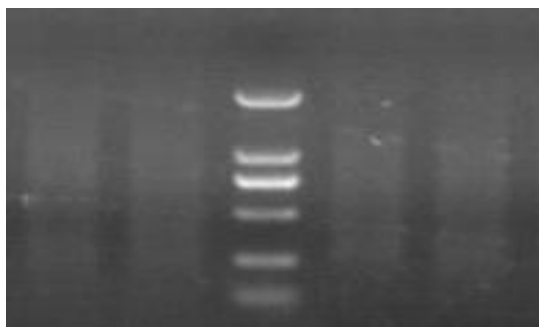
4.1 RT-PCR 扩增结果如下：

MyD88 M NFKB1-5' NFKB1-3'



4.2 利用此次设计引物进行 RACE-PCR，检测结果如下：

NFKB1-5' NFKB1-3' M MyD88-5' MyD88-3'



两次 RACE 实验尝试，均未得到完整聚合的条带，目前已经重新设计引物，进行再次的尝试。