



盘点生物 RACE 实验进展报告

合同号: PG1-1601002

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 反转录及 cDNA 验证

1. 取 1ug 总 RNA 反转录成 cDNA, 步骤和体系按照说明书进行。
2. 以 cDNA 为模板, 用 Real-Time PCR 内参基因 β -actin 引物做 RT-qPCR 扩增, 验证 cDNA 的质量。

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. 利用 SMARTerRACE 5' /3' 试剂盒做 RACE 实验。具体步骤参考说明书。

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

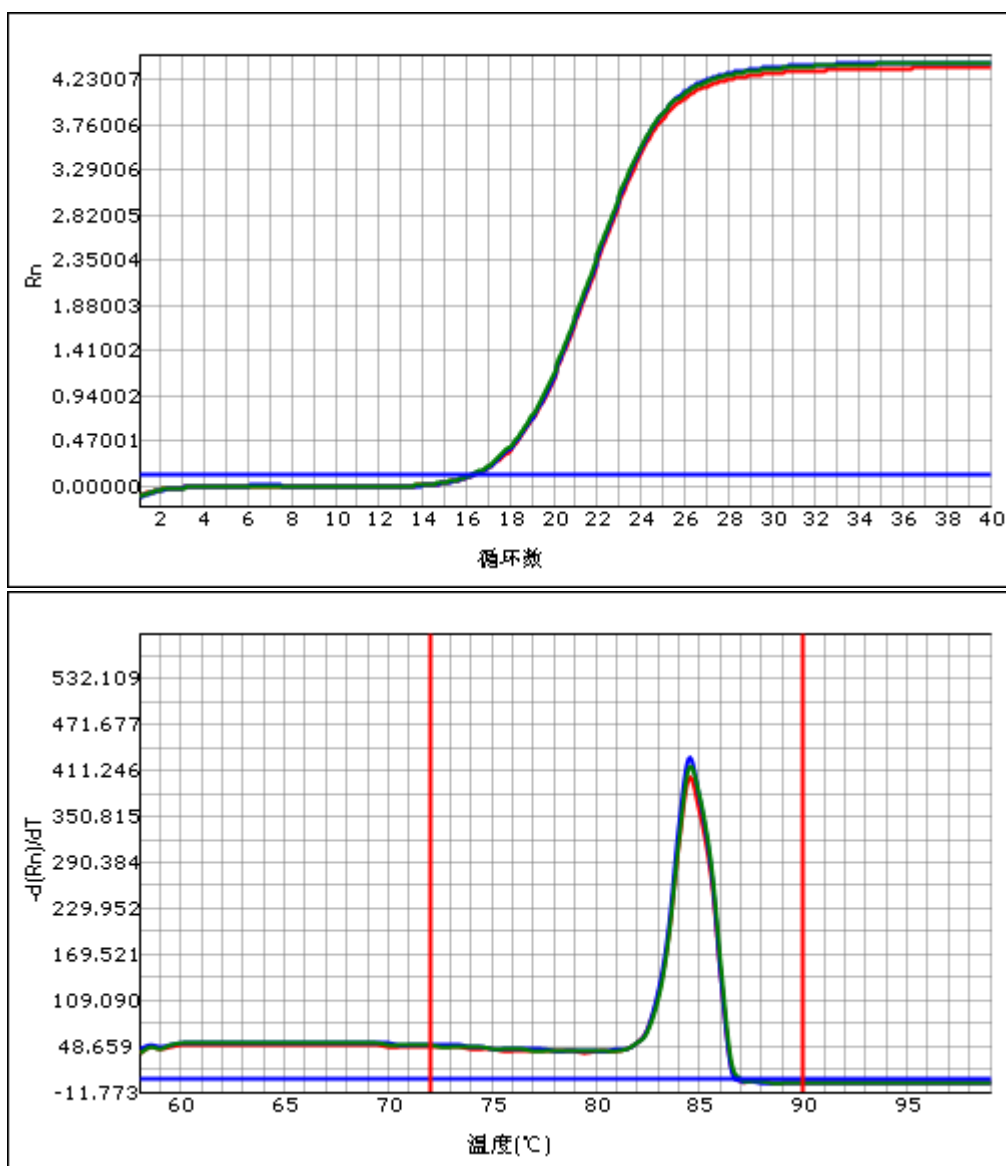
3.2 RT-qPCR 检测 cDNA 质量 (β -actin 基因):

β -actin Primers

Forward primer: TGAAGCCCAGAGCAAAGAGGTAT

Reverse primer: TGCTCCTCAGGGCTACTCTC

β -actin 检测 cDNA qPCR 的平均 CT 值: $(16.33 + 16.35 + 16.22) / 3 = 16.3$



3.3 RT-PCR 引物、凝胶电泳图片以及测序结果:

1. 第一次设计的两对引物:

97-H-5'-F1: AGGAGTTTGAGACCAGCCTAG

97-H-5'-R1: TCTTACTGTGTTGTCCAGGC

97-H-3'-F1: GCTCACGCCTGTAATCCCA

97-H-3'-R1: ATTCTCCTGTCTCAGCCTCC

以两对引物分别进行 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

M 5' 3'



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，条带模糊不成带，引物的特异性效果较差，因此需改变引物序列位置进行引物的重新设计。

2. 重新设计引物序列如下：

97-H- 5'-F2: AACGTGGAAGTGACTCCGTA

97-H-5'-R2: TTCTCCTGCCTCAGTCTCTG

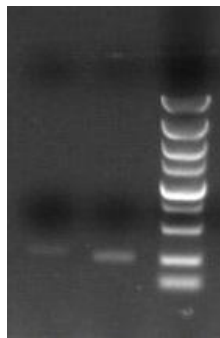
97-H-3'-F2: AGCCTGGACAACACAGTAAGA

97-H-3'-R2: TTCCGGGTTACGCTATTCT

以两对引物分别进行 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

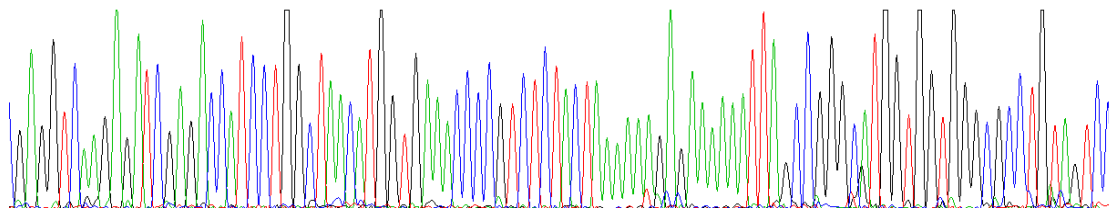
5' 3' M



注：Marker 采用 DL5000,大小从下到上分别为：100、250、500、750、1000、1500、2000、

3000、5000bp

3. RT-PCR 测序峰图及序列



CCATCAATTATATATAAAGCATTTGGCTGGGCGTGGTGGCTCACTGCCTGTAATC
CCAGCACTTTGGGAGGTCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACC
ATCCTGGCTAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAAAGAGAAAAAATTAGC
CGGGCATGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGACAGGA
GAATAGCGTGAACCCGGAAAAA

4. RT-PCR 测序结果 Blast 比对结果:

将 RT-PCR 测序结果进行比对, 结果如下:

Download GenBank Graphics					
TPA: Homo sapiens long non-coding RNA OTTHUMT00000437541.1 (RP11-473M20.16 gene), lincRNA Sequence ID: tpe HG507672.1 Length: 748 Number of Matches: 1					
Range 1: 516 to 746 GenBank Graphics					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	388 bits(210)	2e-104	225/232(97%)	2/232(0%)	Plus/Plus
Query	6	AATTAT-ATATAAAGCATTTGGCTGGGCGTGGTGGCTCACTGCCTGTAATCCAGCACTT	64		
Sbjct	516	AATAATAATAAAAAAGAAATTGGCCGGGCGTGGTGGCTAC-GCCTGTAATCCAGCACTT	574		
Query	65	TGGGAGGTCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGCTAACATG	124		
Sbjct	575	TGGGAGGTCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGCTAACATG	634		
Query	125	GTGAAACCCCGTCTCTACTTAAAAAGAGAAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGTGGGCGCCT	184		
Sbjct	635	GTGAAACCCCGTCTCTACTTAAAAAGAGAAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGTGGGCGCCT	694		
Query	185	GTAGTCCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGACAGGAGAATAGCGTGAACCCGGAA	236		
Sbjct	695	GTAGTCCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGACAGGAGAATAGCGTGAACCCGGAA	746		

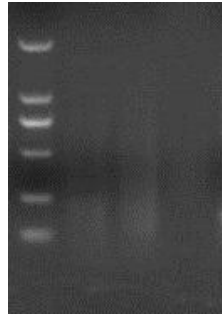
总结: 以第二次设计的 5'及 3'引物进行 RT-PCR 扩增, 从电泳检测结果来看, 5'及 3'均有条带单一且符合目的的大小的条带, 验证了引物的特异性, 可以此设计引物进行 5'及 3'RACE 实验的扩增。

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

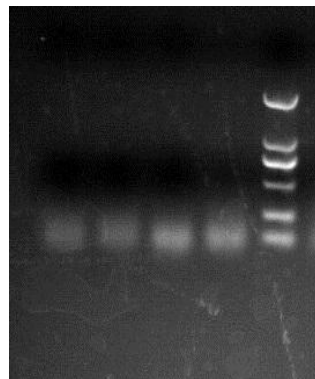
M 5' 3'



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，可能是由于 lncRNA 的扩增表达量太低导致的。

2. 以第一次扩增的 PCR 产物，稀释后为模板，进行第二轮 PCR 实验的扩增，经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测结果如下：

5'-1 5'-2 3'-1 3'-2 M



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

总结：以第一次扩增产物进行第二次的 PCR 扩增，可以看到比较集中的条带，扩增表达量得到明显提高，但根据条带大小来看，第二次 PCR 扩增结果都在 100-250bp 之间，这与所设引物的大小不甚对称，不是所需目的条带，需要重新进行调整，可能的原因在于 lncRNA 序列本身的 poly 结果及不正常的 GC 含量，导致在扩增过程中，由于碱基的错配或扩增条件的不合适等原因导致扩增终止，不能得到正确的未知序列信息。