



LncRNA 3'及 5'RACE 实验

合同号: PG1-1601004

1. 实验步骤

1.1 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。

1.2 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 Promega 逆转录试剂盒说明书进行。
2. 以逆转录 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。

1.3 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

1.4 RACE 实验

主要是利用 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒原理进行 RACE 实验, 具体步骤如下:

1. RACE 逆转录, 步骤和体系按照试剂盒说明书
2. RACE-PCR 对 5'及 3'端未知片段进行扩增, 提前设计并合成 GSP primer

KOD 酶 PCR 反应体系如下:

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

PCR 反应程序如下:

分别进行 5'及 3'扩增		
95 °C	3 min	
95 °C	30s	} 45 cycles
58 °C	30s	
68 °C	50s	
68 °C	6 min	
4 °C	保存	

2.5 测序及克隆

产物纯化后测序并进行比对,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 浓度及纯度报告

纯度(A260/A280): 1.85

浓度: 0.208 ug/ul

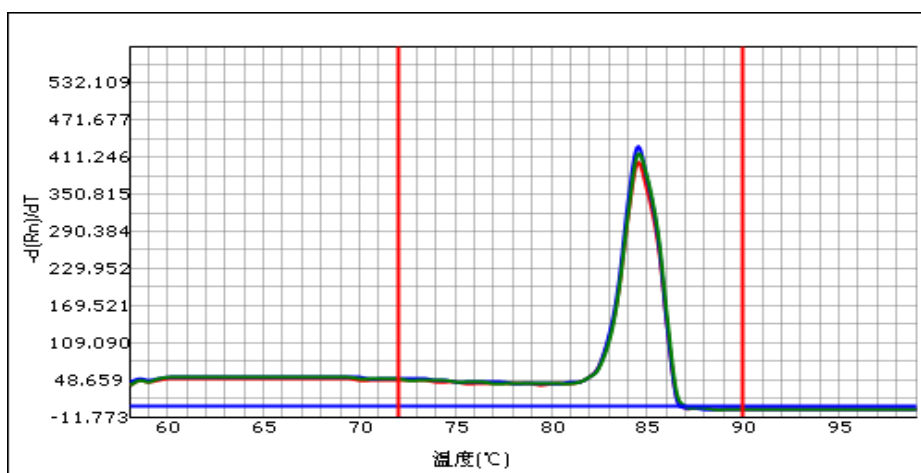
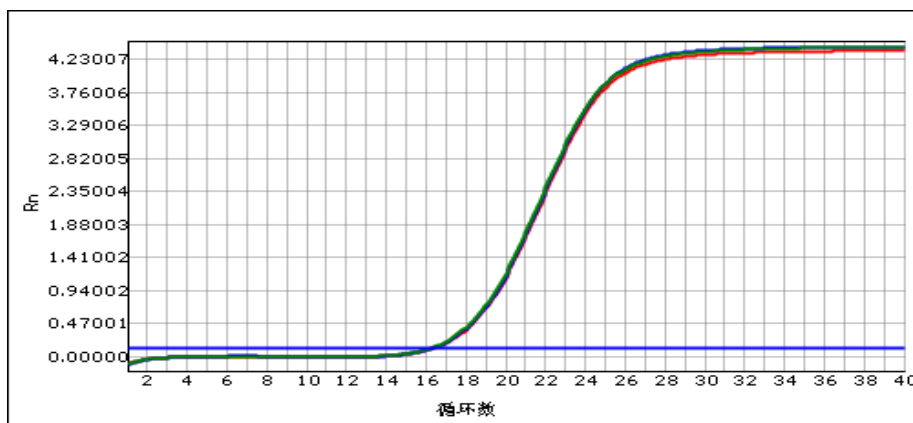
3.2 RT-qPCR 检测 cDNA 质量 (β -actin 基因):

β -actin Primers

Forward primer: GAGACCTTCAACACCCCAGG

Reverse primer: ATGTCACGCACGATTCCCC

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



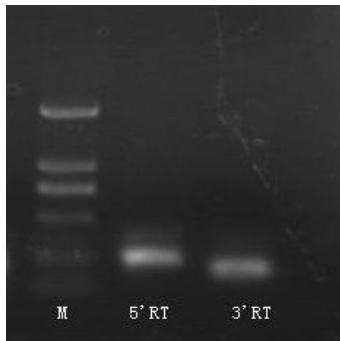
3.3 RT-PCR 引物、凝胶电泳图片以及测序结果:



1. 引物信息

Primer	Sequence	Size
mus-5'-out-F	ACTATACACCAGAGAGCCGG	266bp
mus-5'-out-R	GGCACACACTGAAAGTACTCG	
mus-3'-out-F	ACTGGTGATGTTTGTGCGTC	211bp
mus-3'-out-R	AGGCGACATTCCTTCATCGA	

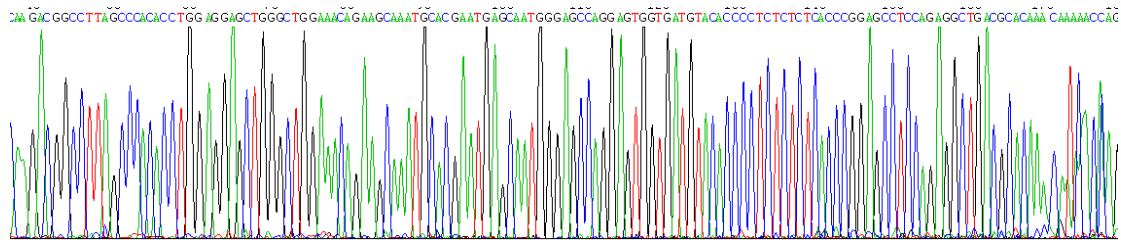
2. 以 5'及 3'端引物进行 RT-PCR，凝胶电泳检测结果如下：



注：Marker 大小从上到下依次为 2000、1000、750、500、250、100bp

3.测序峰图及序列信息及比对结果

A. 3'引物 RT-PCR 测序结果、序列及比对结果分别如下：



GCGCGGTACAGCTAGGGGCTGACATACATCAGAAAGCAAGACGGCCTTAGCCCA
CACCTGGAGGAGCTGGGCTGGAAACAGAAGCAAATGCACGAATGAGCAATGGG
AGCCAGGAGTGGTGATGTACACCCCTCTCTCTCACCCGGAGCCTCCAGAGGCTGA
CGCACAAACAAAAACCAGTTAAA

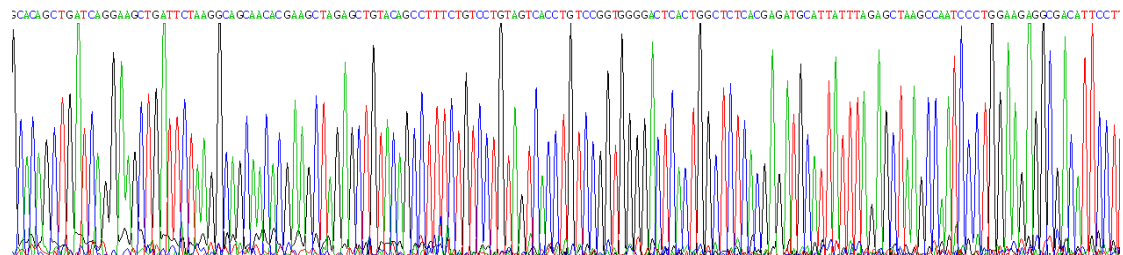
[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC105242739 (LOC105242739), ncRNA
Sequence ID: [reflXR_861982.1](#) Length: 751 Number of Matches: 1

Range 1: 512 to 674 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
294 bits(159)	3e-76	162/163(99%)	1/163(0%)	Plus/Plus
Query 11	GCTAGGGGCTGAC-ATACATCAGAAAGCAAGACGGCTTAGCCACACCTGGAGGAGCTG	69		
Sbjct 512	GCTAGGGGCTGACAATACATCAGAAAGCAAGACGGCTTAGCCACACCTGGAGGAGCTG	571		
Query 70	GGCTGGAACAGAAAGCAAAATGCACGAATGAGCAATGGGAGCCAGGAGTGGTATGTACAC	129		
Sbjct 572	GGCTGGAACAGAAAGCAAAATGCACGAATGAGCAATGGGAGCCAGGAGTGGTATGTACAC	631		
Query 130	CCCTCTCTCTCACCCTGGAGCTCCAGAGGCTGACGCACAAACA	172		
Sbjct 632	CCCTCTCTCTCACCCTGGAGCTCCAGAGGCTGACGCACAAACA	674		

B. 5'引物 RT-PCR 测序结果、序列及比对结果如下:



GCAGGTGTGCGCCTACTGGTTCGACGAGTACTTTATAAATGCCTACACATCCGTA
GGCACAGCTGATCAGGAAGCTGATTCTAAGGCAGCAACACGAAGCTAGAGCTGT
ACAGCCTTTCTGTCTGTAGTCACCTGTCCGGTGGGGACTCACTGGCTCTCACGA
GATGCATTATTTAGAGCTAAGCCAATCCCTGGAAGAGGGCGACATTCCTTCATCGA
GTACTTTAAATGTGTGCCCCAAA

PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC105242739 (LOC105242739), ncRNA
Sequence ID: [reflXR_861982.1](#) Length: 751 Number of Matches: 1

Range 1: 286 to 509 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

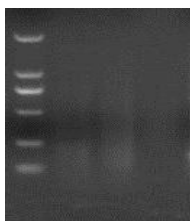
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
390 bits(211)	5e-105	220/224(98%)	1/224(0%)	Plus/Plus
Query 15	ACTGGTT-CGACGAGTACTTTATAAATGCCTACACATCCGTAGGCACAGCTGATCAGGAA	73		
Sbjct 286	ACTGGTTAAGACGAGTACTTTATAAATGCCTACACATCCGTAGGCACAGCTGATCAGGAA	345		
Query 74	GCTGATTCTAAGGCAGCAACACGAAGCTAGAGCTGTACAGCCTTTCTGTCTGTAGTCAC	133		
Sbjct 346	GCTGATTCTAAGGCAGCAACACGAAGCTAGAGCTGTACAGCCTTTCTGTCTGTAGTCAC	405		
Query 134	CTGTCCGGTGGGACTCACTGGCTCTCACGAGATGCATTATTTAGAGCTAAGCCAATCCC	193		
Sbjct 406	CTGTCCGGTGGGACTCACTGGCTCTCACGAGATGCATTATTTAGAGCTAAGCCAATCCC	465		
Query 194	TGGAAGAGGCGACATTCCTTCATCGAGTACTTTAAATGTGTGCC	237		
Sbjct 466	TGGAAGAGGCGACATTCCTTCATCGAGTACTTTAAATGTGTGCC	509		

总结: RT-PCR 扩增后,可以得到条带单一,与预期大小相符的条带,产物进行测序后,在 NCBI 上进行比对后,可以看到与小鼠预测非编码 RNA 序列比对得上,证实序列在物种中的存在。

4. 5'及 3'RACE 扩增检测结果

1. 分别以 5'端及 3'端特异性引物及对应接头引物进行 RACE 实验,扩增结果如下:

M 5' 3'



注：Marker 大小从上到下依次为：2000、1000、750、500、250、100bp

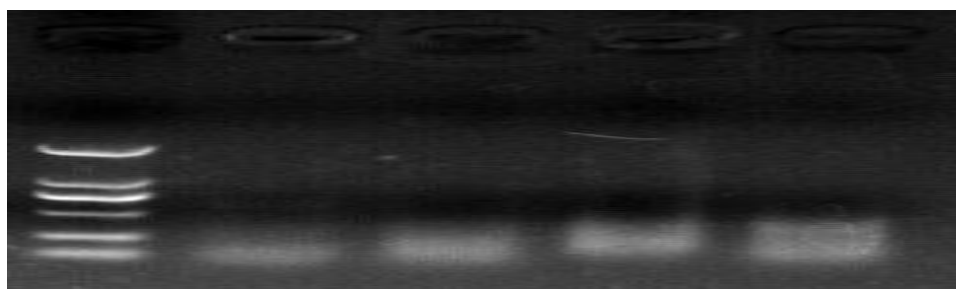
总结：采用基因特异性引物及对应的通用引物的进行 RACE 扩增实验，从电泳检测结果可以看到没有单一聚集的条带出现，整体比较弥散，亮度较弱，可能的原因在于 lncRNA 在初次扩增过程中的表达量太低导致的。

3. 在此对引物的基础上，分别在 5' 及 3' 端各设计一对内引物，利用内引物进行巢式 PCR，引物序列如下：

Primer	Sequence	Size
mus-3'-in-F	ACATCAGAAAGCAAGACGGC	155bp
mus-3'-in-R	ACTGGTGATGTTTGTGCGTC	
mus-5'-in-F	GGGACTAAAGGTGTGTGCCA	206bp
mus-5'-in-R	CAGGGATTGGCTTAGCTCTAA	

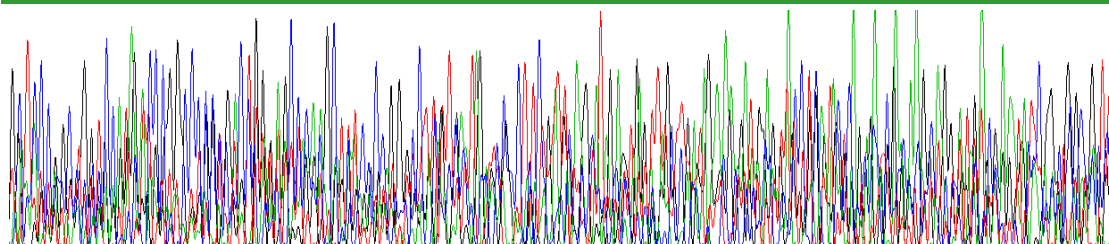
4. RACE 实验扩增检测结果如下：

M 5'-out 5'-in 3'-out 3'-in



注：Marker 大小从上到下依次为：2000、1000、750、500、250、100bp

5. 将 RACE-PCR 产物分别进行回收送测序，并对测序结果进行分析，5'-out 的测序峰图如下，其余三个结果类似：



总结：从凝胶电泳结果可以看到，以外引物进行第一轮 RACE 扩增，再以内引物进行巢式 PCR 扩增后，扩增产物的表达量有所提高，但测序结果较乱，可能的原因在于 lncRNA 本身的 poly 结构及不正常的 GC 含量，导致扩增过程中片段的中断，多条片段的非特异性扩增等情况。

5. 下一步安排

1. 将 3'及 5'RACE-PCR 产物进行转化连接，挑克隆进行测序，验证扩增序列的正确与否