

## 一种高效获取基因5'末端的RACE方法

罗聪<sup>1</sup>, 何新华<sup>1,2,\*</sup>, 陈虎<sup>1</sup>, 韦泳丽<sup>1</sup>, 李明娟<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广西大学农学院, 南宁530004; <sup>2</sup>广西作物遗传改良与生物技术重点实验室, 南宁530007

**摘要:** RACE技术是一种快速高效克隆基因5'末端和3'末端的方法, 是获取基因全长的主要手段之一, 但是RACE技术本身也存在一些缺点。我们在前人改良的RACE技术基础上进一步优化RACE技术, 获得了一种操作简单、快速、高效、成本低廉的改良RACE方法, 该方法适合于大量基因5'末端的获取, 可以在普通实验室推广应用。

**关键词:** RACE; TdT; 方法改良

## A High-Efficient Method of RACE Technique for Obtaining the Gene 5' End

LUO Cong<sup>1</sup>, HE Xin-Hua<sup>1,2,\*</sup>, CHEN Hu<sup>1</sup>, WEI Yong-Li<sup>1</sup>, LI Ming-Juan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; <sup>2</sup>Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China

**Abstract:** RACE technique is a rapid and effective method for cloning gene 5' end and 3' end, and one of main methods to obtain full-length genes. However, RACE technique has its own shortcomings. We further improved the previous RACE protocols and obtained a modified RACE technique which is simple, rapid, high-efficient and low-cost. Our modified RACE technique is suitable for obtaining large number of genes 5' end and can be used in ordinary laboratories.

**Key words:** RACE; TdT; modified method

RACE (rapid amplification of cDNA ends)技术是获得基因全长的有效方法, 广泛应用于全长基因的克隆。在RACE技术中, 获得基因3'端比较容易, 而获得基因5'末端则比较困难。基因5'末端的获得, 需要购买5'RACE试剂盒, 但不同公司研发的5'RACE试剂盒原理不尽相同, 而且购买试剂盒非常昂贵(段静波等2008)。为了有效快速获得基因的5'末端, 我们在前人改良的RACE技术基础上(唐慧等2001; 李关荣等2003; 邓雪柯等2007; 夏瑞等2008), 进一步优化基于TdT加尾的5'RACE技术, 简化操作步骤, 获得了一种高效获取基因5'末端的方法。目前本课题组应用该方法已经成功获得了芒果几十个不同基因的5'末端序列, 证明了该方法的高效性和实用性。

### 材料与方 法

#### 1 材料

采集广西大学农学院标本园中8年生的芒果品种‘四季芒’(*Mangifera indica* L. cv. ‘Chok Anand’)的果实、叶片、花、茎段, 置于-40℃冰箱保存备用。

PrimeScript逆转录酶、TdT、RNase H和

pMD18-T vector为宝生物工程(大连)有限公司产品; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、dCTP和dNTP购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成; Dream Taq酶购于Fermentas公司; 感受态为DH5 $\alpha$ 菌株, 购自北京全式金生物技术有限公司。

#### 2 方法与步骤

逆转录引物为AUP1: GGCCACGCGTTCGAC-TAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT; 锚定引物AP长: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCG-GGGGGGGGG, 通用上游接头引物AP短: AAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT; UDP木糖合成酶基因特异引物为5UDPd1: GAAAATCTGACCATT-AGCCCTTG, 5UDPd2: AACATCAATCGTTG-GCACCTCC; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPDH基因

收稿 2011-01-10 修定 2011-02-17

资助 广西高等学校优秀人才培养计划项目(桂教人201065)、广西大学博士后启动基金(20090042)、广西自然科学基金(2011GXNSFA018115)和广西教育厅研究生创新计划项目(105931001011)。

\* 通讯作者(E-mail: honest66222@163.com; Tel: 0771-3270184)。

的特异引物为5MGApd1: TTGCTGATAATGGGCTCATCCG, 5MGApd2: AGCATCAAGTAGCCTCTGGTC; *CDK*钙结合蛋白基因特异引物为5CDPKd0: TTGTTGGGCAGTAAGCCGTTTCCT, 5CDPKd1: TCCTTATCTACATCACCAGCATCCA, 5CDPKd2: GGCTTCTCTTAGTTCCTCAATCTCT; 所有引物均采用Primer5.0软件设计。

参照肖洁凝等(2003)的方法并进行改良, 用改良的SDS法提取‘四季芒’果实、老叶、嫩叶、花、老茎和嫩茎的混合RNA, 利用紫外分光光度计和电泳检测其浓度和完整性。

以1  $\mu\text{g}$ 总RNA为模版, 选用PrimeScript逆转录酶, 以逆转录通用引物AUP1为引物, 按照PrimeScript逆转录酶的使用说明书进行逆转录合成cDNA第1链, 同时逆转录6管, 每管体系为20  $\mu\text{L}$ 。逆转录完后, 用RNase H进行处理, 75  $\mu\text{L}$ 反应体系为: 逆转录产物20  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$ Hybrid RNA Degeneration Buffer 15  $\mu\text{L}$ 、RNase H (60  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、DEPC处理水39  $\mu\text{L}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h, 然后用PCR产物纯化试剂盒纯化RNase H酶解产物。产物纯化时, 将2管经过酶解的cDNA合并为1管进行纯化, 然后每管用20  $\mu\text{L}$ 洗脱液进行洗脱。

纯化后的cDNA 10  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$ TdT Buffer 10  $\mu\text{L}$ 、0.1% BSA 5  $\mu\text{L}$ 、100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dCTP 0.5  $\mu\text{L}$ 、TdT 1.5  $\mu\text{L}$ 、双蒸水23  $\mu\text{L}$ , 体系共50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  5 h进行TdT末端加尾, 同时加尾2管。加尾完后用PCR产物纯化试剂盒纯化处理产物, 2管加尾产物合并为1管进行纯化, 用30  $\mu\text{L}$ 洗脱液进行洗脱, 然后保存于 $-30^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

应用巢式PCR和降落PCR技术, 经过两轮PCR即可获得结果。第1轮PCR用AP长引物和特异引物d2。反应体系为: 加尾产物1  $\mu\text{L}$ , dNTP (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各1  $\mu\text{L}$ , Dream Taq酶0.15  $\mu\text{L}$ , Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 加超纯水18.85  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共2个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共2个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共2个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共30循环; 每轮PCR共36个循环。第2轮PCR以第1轮PCR为模板(第1轮产物稀释40倍, 用1  $\mu\text{L}$ 为第2轮PCR模板), 反应体系跟反应程序同第1轮PCR。

用1.2%的琼脂糖电泳检测PCR结果, 第2轮PCR一般会得到一条或者多条明显的条带, 选择较长、并且明亮的条带为目的条带, 用琼脂糖回收试剂盒回收目的条带, 将目的条带连接到pMD18-T vector载体、转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 经过PCR验证正确的阳性克隆送上海生工测序。

## 实验结果

### 1 RNA提取及其逆转录

采用改良SDS法提取的芒果总RNA如图1-A, 28S和18S条带完整并且边缘清晰, 说明提取的RNA完整性很好;  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.95$ ,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}=2.20$ , 浓度为0.8  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 说明提取的RNA质量非常好。采用PrimeScript逆转录酶对芒果总RNA进行逆转录的效果如图1-B, 逆转录产物在200 bp到2 000 bp均匀弥散, 说明逆转录效果良好。

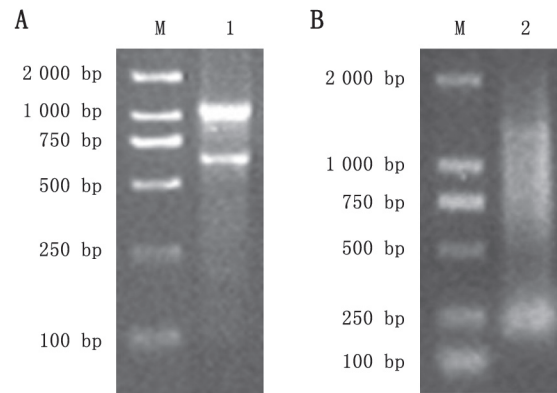


图1 RNA (A)和逆转录产物(B)

Fig.1 RNA (A) and reverse transcription product (B)

M: DL2000 marker; 1: RNA; 2: 逆转录产物。

### 2 PCR扩增结果检测

通过TdT加多聚dC尾巴, 用包含dG序列的AP长引物和基因特异引物d2进行第1轮PCR扩增, 把包含d2引物序列信息的基因特异扩增; 然后以稀释40倍的第1轮PCR产物为模板, 应用巢式基因特异引物d1和AP短引物继续特异扩增, 经过两轮PCR扩增, 使目的片段得以特异扩增。第2轮扩增电泳结果见图2, 木糖合成酶基因*UDP*经过5UD-Pd1特异引物向5'末端扩增了约1 000 bp的条带, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因*GAPDH*由特异引物5MGApd1向5'末端扩增了约700 bp的条带, 钙结合

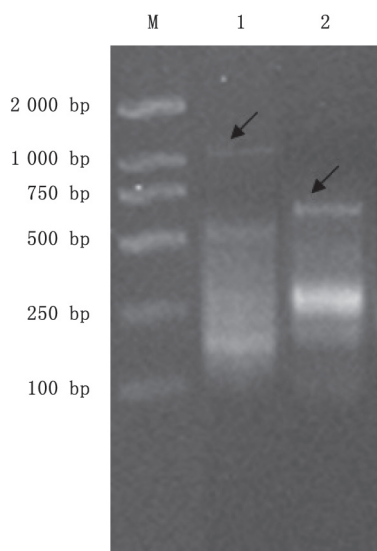


图2 *UDP*基因和*GAPDH*基因5'端第2轮PCR电泳图谱  
Fig.2 Electrophoresis pattern for 5' end products of genes *UDP* and *GAPDH* by the second PCR

M: DL2000 marker; 1: *UDP*基因第2轮PCR产物(1 016 bp); 2: *GAPDH*第2轮PCR产物(697 bp)。箭头所指为目的条带。

蛋白基因*CDK*由特异引物5CDPKd1扩增获得了长度约为500 bp的条带, 但经过序列比对发现特异引物5CDPKd1扩增长度应该达到1 250 bp的条带才可能获得完整的5'末端, 因此回收500 bp的条带测序, 然后在获得5'末端序列上继续设计特异引物5CDPKd0, 利用第1轮稀释产物为模板继续扩增, 获得了长度约为1 400 bp的条带, 钙结合蛋白基因*CDK*第2轮和第3轮电泳图谱见图3。

### 3 5'末端序列分析

经过克隆测序, 获得*UDP*基因5'末端序列长为1 016 bp, 其中未知序列长度为842 bp (图4); 获得*GAPDH*基因5'末端序列长度为697 bp, 其中未知序列长度为560 bp (图5)。*CDK*基因经过第2轮PCR扩增获得了长度为480 bp序列, 其中未知序列长度为400 bp, 在获得的未知序列上继续设计特异引物5CDPKd0, 经过第3轮PCR, 又成功获得了长度为1 395 bp的序列, 其中未知序列长度为1 260 bp (图6)。

## 讨 论

目前获得基因5'末端的方法有全长cDNA文库构建法、染色体步移法和5'RACE试剂盒等。全长cDNA文库构建法可以直接获得大量的基因全

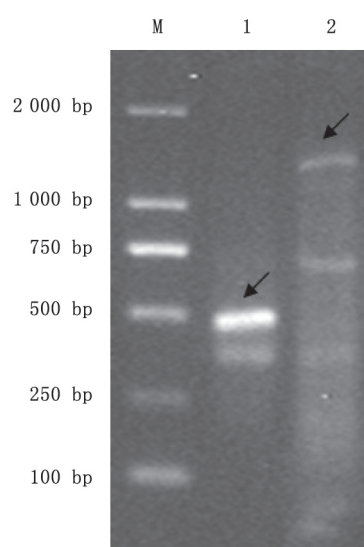


图3 *CDK*基因PCR电泳图谱  
Fig.3 PCR electrophoresis pattern of *CDK* gene

M: DL2000 marker; 1: 第2轮PCR扩增产物(480 bp); 2: 第3轮PCR扩增产物(1 395 bp)。箭头所指为目的条带。

长序列, 而不需获取基因的5'末端, 但该方法对技术要求高、过程复杂且费用较高(朱利军等2009)。染色体步移法是获得与已知序列相邻未知序列的方法, 该方法经济, 原理简单; 染色体步移法又包括几种方法, 如反向PCR技术、连接介导PCR技术、特异引物PCR技术等, 这些方法各有优缺点(刘博等2006; 洪登峰等2006; 梁成真等2009), 但选择合适的方法才可以获得基因的5'末端, 并且操作步骤比较繁琐。5'RACE技术因其技术成熟, 操作方便, 成功率高, 是目前应用最多的获得基因5'末端的方法, 但是购买5'RACE试剂盒需要大量的资金。目前应用较多的5'RACE试剂盒包括: Clontech公司开发的基于“模板跳转反转录”的SMART RACE技术; Invitrogen公司开发的基于“末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)加尾”的锚定RACE技术; TaKaRa公司开发的基于“去帽法”原理的环化RACE技术等, 这些5'RACE试剂盒方法又各有优缺点(王少丽等2004; 王燕等2005; 郝敏等2006; 郑阳霞等2008)。

本研究是在基于“末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)加尾”的锚定RACE技术上进行优化改良, 结合巢式PCR技术和降落PCR技术而获得的一种可高效获得基因5'末端的方法。本方法操作简单, 成本非

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGGAACCAAAAACCAACT  
 CTATTTCTCTCCCTCGTTATTCCATATTCTCGACAGAAGTTCGTCGTTTGCACCGACTC  
 GCACGAAACAGAGTTTACAGTTTACTTGTCTGCAACGGCAATGGCGACGGCAGCCGT  
 GAGATTGGATCTTGATGGGAGACCGATATAGCCA[ATG]ACGATATGCATGATCGGTGCA  
 GGAGGCTTCATCGGCTCTCACCTCTGCGAGAAGATTCTCTCTGAGACGCCTCACAAA  
 ATTCTGGCGCTCGATGTTTATAATGACAAGATCAAGCACTTACTTGAGCCGGAGTCTG  
 CTAATTGGGCCGACCGGATCCAGTTCACCGACTCAACATTAAGCACGATTTCGCGTCT  
 CGAAGGCCCTATTAGGATGGCAGATCTGACGATTAATCTAGCGGCGATCTGTACGCCG  
 GCTGATTACAACACGCGTCTCTTGACACGATCTACAGTAACTTTATCGACGCGCTCC  
 CTGTTGTTAAATACTGTTCCGGAGAACAACAAGCGTCTGATTCACTTCTACTTGTGA  
 AGTTTATGGGAAAACCTATTGGAAGCTTCTTCCCTAAAGACAGCCCACTTCGTCAGGAT  
 CCTGCCTATTATGTAATAAAGAAGATGCCTCCCCCTGCATTTTTGGCCCCATTGAGAA  
 GCAGCGGTGGTCATATGCTTGTGCCAAACAATTGATTGAGAGGCTCATTATGCCGAG  
 GGTGCTGAGAATGGTCTTGAATCACCATTGTGAGACCTTTTAACTGGATTGGACCAA  
 GGATGGATTTCACTCCTGGCATTGATGGTCCAAGTGAGGGTGTTCCTAGGGTTCTGGC  
 ATGCTTTAGTAAT[AATCTCCTACGTCGTCAGCCTCTCAAGCTTGTGGATGGTGGCCAAT  
 CTCAGAGAACTTTTGTATATAAAGGATGCGATTGAAGCTGTTCTATTGATGATTGAA  
 AATCCAGCAAGGGCTAATGGTCAGATTTTC]

图4 *UDP*基因5'端序列Fig.4 The 5' end sequence of *UDP* gene

下划线为引物序列; 方框为已知序列; 方框内的ATG为起始密码子。

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGTTCCTCCATAATCAAC[ATG]G  
 CTTCGGCTACTTTCTCTGTAGCCAAACCATCACTTCAGGCTAATGGAAAGGGATTAC  
 AGATTTCTCTGGTCTGCGCAACTCAGCAAGCCTTCCCTTTTCCAGGAAAACCTCTGAG  
 GATTTCTTTTCAAGTATTGCTTTCCAGACCTCTGCGGTGGGAAACAGTGGATACAGGA  
 AAGGTGCAGCTGAGGCAAAGCTAAAGGTGGCCATAAACGGGTTTGGTAGAATTGGC  
 AGAACTTCTTGAGGTGCTGGCACGGACGCAAGGACTCCCCCTTGATGTCAATTGCC  
 ATCAATGACACCGGAGGTGTCAAGCAAGCCTCCACCTTCTAAAGTATGATTCCACTC  
 TAGGCATCTTTGATGCCAATGTTAAACCTGTTGGTGACAATGCCATCTCCGTAGACGG  
 CAAGGTAATCAAGGTTGCTACTAACCACAACCCCTTGATCTACCCTGGGGGGACTT  
 GGGTGTGGATCTTGTATAGAAGGGACTGGAGTGTGTTGTAGATAGGGATGGTGCAGG  
 CAAGCACATTCAAGCAGGTGCC[AAGAAGGTGCTCATCACTGCCCTGGCAAGGGTG  
 ACATTCCAACCTATGTTGTTGGAGTTAATGCTGATGCTTACAACCCGGATGAGCCCAIT  
 ATCAGCAA]

图5 *GAPDH*基因5'端序列Fig.5 The 5' end sequence of *GAPDH* gene

下划线为引物序列; 方框为已知序列; 方框内的ATG为起始密码子。

常低廉, 对实验室条件要求不高, 而且能够满足获得大量基因5'末端的要求。

本实验方案的改良之处及其细节如下。

(1)引物设计部分。引物设计的合理是PCR扩增成功的关键。在本方案中, 获得一个基因的5'末端只需要两对特异引物即可。特异引物设计的最

佳参数为: 引物长度在22~25 bp之间, GC含量在45%~60%之间, 引物 $T_m$ 值控制在59~65 °C之间。

(2)逆转录部分。由mRNA反转录合成完整的第1链cDNA是RACE技术中最关键的一步, 尤其对于基因5'末端的获取。因此, 对RNA要求较高, 要求没有明显降解, 电泳条带清晰。本方法采

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGGAAGTCTCTGGGAAAGAT  
GTTTGACTCTCTCTGTGGTCCTTCTTCTTCTATAATCTTTACACGCTAAATTCTG  
CCTCTCATTCTCATCCCCTAATTTCTTTCCATATATTCCTTTGTTTCTCCTCCATTT  
TCTCCATATCTTTTTGTTTTCTCTCACTTTCTGGGATTGCTTTTATTTTTGGGAAATTT  
TAAATCTTCATCGTAATTTGAACTTTTGCTTTTTATTAACAAATAGGTTGTCTCTTCAT  
CTGGGTTTGAATCAAATTTTAAATTTGGAAGTACTGATCCTGAGGTTTTTATTTTTCTCTT  
CTGTTTGATTTTAAAGGTAGTTTTTTCGTGTTTTGTTTAGGAAGATAAGATTTTGATTTT  
ATTGGTTTTGTTTCGTTAATTTTGAGACCCATTTTAGCTTTTTGTTGATTCAACGTT**ATG**  
GGTAGTTGCTGCACAACCCCGAAAACCTGACCATGAAGAGAACCGGAAGAAACACAA  
GGAGAAACCAAACCCGTTTTCAATTGATTATGGGGCGAACTATCAGAACGGTGGCCAT  
AAACTCTCTGTTTTGAAGGAGCCAACGGGACGGGAAATTGAGCAGAGGTACGAGCT  
GGGACGGGAACTGGGGCGTGGTGAATTCGGTGTGACATACTTGTGTACGGACAAAGA  
AAGTGGTGAGACATATGCATGCAAAAGCATTCTAAGAAGAAGTTGAGGACTGCTAT  
TGATATAGAGGACGTGAGGAGAGAAGTTGAGATTATGAGGCAATTGCCAAAGCATCC  
AAATATTGTTAGCTTAAAAGATACTTATGAGGATGATAATGCTGTTTCATTGGTGATGG  
AGCTTTGTGAGGGAGGCGAATTGTTTGATAGGATTGTGGCCAGAGGTCATTATACAGA  
GAGGGCTGCGGCTGTGGTCACAAAGACTATTGTGGAAGTTGTTTCAGATGTGCCACAA  
GCACGGTGTAATGCACCGGATCTCAAACAGAGAACTTTTTATTTGCAGACAAGAA  
GGAAACATCACCTCTGAAGGCTATTGATTTGGACTCTCAGTTTTTTTTAGGCCTGGT  
GAAATATTTACTGAGATAGTTGGCAGCCCTTACTACATGGCTCCTGAGGTGCTTAAAA  
GGAATTATGGCCAGAAGTAGATGTCTGGAGTGCTGGTGTATCCTATACATCTTACTT  
TGTGGTGTTCCTCCTTTTTGGGCAGAACTGAGCAGGGTGT**GCACAGGCAATTATTC**  
GGTCTGTTATAGATTTTAAGAGGGATCCTTGCCAAAAGTTTCTGATAATGCAAAAAGA  
CCTTGTCCGGAAGATGCTTGACCCTGATCCGAGGAAACGGCTTACTGCCAACAAAGT  
GCTGGAACATCCTTGTTGCAAAACGCAAGAAGGCTCCAAATGTTTCATTAGGTGA  
AACTGTCAGAGCAAGGCTCAAGCAGTTCTCAGTAATGAACAACTCAAGAAAAGAG  
CTCTTAGGGTAATTGCTGAGATTTTATCCTTGAGGAAGTTGCTGGCATAAAGGAGGG  
ATTCCAAGTATGATGATACATCAAATAGGGGCAAGATAAACATTGAAGAGCTCAAAGT  
TGGGTTGCACAAGCTTGCAATCA**GATCCTTGATGCAAATCTTCAAATCTAATGGATGC**  
TGGTGATGTAGATAAGGATGGATATCTTGACTACAGTGAGTATGTGGCCATTTCTGTTACC  
TAAGAAAGATGGGTAATGATGAGCATCTCCGCAAAGCCTTGCATTCTTTGATCAAAACCAA  
AGCGGATATATAGAGATTGAGGAACTAAGAGAAGCCTTAGCTGATGAAGTTGACACCAGTG  
AAGAAGTTATTAATGCCATTATGCATGATGTTGACACAAATAAGGATGGACAGATAAGTTATG  
ATGAGTTTGCAGCAATGATGAAGGCAGGTAAGTATTGGAGGAAAGCTTCAAGGCAGTATTC  
ACGAGAGCGGTTCAATAGTCTGAGTTTGAAGTACTGATGAAAGATGGATCATTGCCGTTGAAC  
AATGGGGGTAGA**TGA**TGACTCAACAAAGGTAA

图6 CDK基因 cDNA 全长序列

Fig.6 The full-length cDNA sequence of CDK gene

下划线为引物序列; 斜体为已知序列; 方框为第2轮5'PCR获得序列; 其余为第3轮5'PCR获得序列; 方框内的ATG为起始密码子, TGA为终止密码子。

用通用引物进行逆转录获得的逆转录产物既可以用于基因3'末端的克隆又可以进行基因5'末端的克隆; 逆转录用的RNA是各个组织的混合RNA, 避免了某些基因由于表达差异而无法克隆的缺

点。逆转录酶采用TaKaRa公司生产的PrimeScript逆转录酶, 该酶具有极强的延伸能力, 可以获得更多的全长cDNA。逆转录后用RNase H对逆转录产物中剩余RNA进行消化, 然后用PCR产物纯化

试剂盒进行纯化, 去除逆转录产物中多余的逆转录引物和dNTP, 防止其对TdT加尾效率的影响。

(3) TdT加尾。末端脱氧核糖核酸转移酶法(TdT)是在基因的3'末端加上一个多聚尾巴, 然后用接头引物跟基因特异引物进行PCR扩增获得目的条带的方法。但是TdT加尾的效率却比较低, 非常容易导致实验的失败(唐慧等2001; 王燕等2005; 郝敏等2006)。本实验采用纯化后的具有较高浓度的cDNA进行加尾, 浓度为100 mmol·L<sup>-1</sup>的dCTP 0.5 μL, 加尾时间由试剂说明书上的30 min延长到5 h; 通过增加cDNA浓度、dCTP浓度和延长加尾时间, 从而提高加尾的效率。本实验采用PCR产物纯化试剂盒纯化TdT加尾产物, 10 min即可完成纯化, 这样既减少了操作步骤, 又节约了实验时间。2管加尾产物合并为1管进行纯化, 增加加尾产物的浓度。因此, 第1轮PCR仅需要1 μL模板就可以完成。

(4) PCR扩增。采用巢式PCR和降落PCR相结合的方法来获得基因的5'末端。第1轮PCR使基因特异产物得以初步积累, 第2轮PCR使基因的产物得以特异扩增, 但获得的第2轮PCR产物通常不是单一条带, 这是由于同聚物加尾反应过程中, TdT加尾时不能区分cDNA是否是全长, 非全长的cDNA分子也被加尾, 在后续的PCR中同样被扩增, 从而产生一些长短不一的条带。因此在选择条带进行克隆时, 需要选择条带较长、清晰、明亮的条带进行回收测序。两轮PCR扩增程序均一样, 经过3个循环的降落PCR, 每次退火温度降低2℃, 每次2个循环, 退火温度从62℃降到56℃, 然后恒定在56℃下30个循环, 较高的退火温度可以减少非特异条带的扩增。

(5) 较长基因5'末端的克隆。通常情况下RACE技术获得的5'末端长度小于1 000 bp, 小于500 bp的5'末端比较容易获取。如果一个基因的5'末端长度大于1 000 bp, 就需要进行3轮或者4轮5'RACE实验来获得其完整的5'末端。步骤如下: 首先按照本实验方法进行两轮PCR扩增, 在第2轮PCR电泳时回收最大的条带进行测序, 在测序正确后进行序列拼接, 然后继续在其5'末端设计一个特异引物, 以第1轮PCR的稀释产物为模板继续

PCR, 回收目的条带测序。这样通过3轮或者4轮5'RACE实验即可获得较长基因的5'末端, 本实验中我们以芒果钙结合蛋白基因CDK为例, 经过3轮5'RACE PCR成功获得了其5'末端序列。

本实验方法不仅适用于普通基因5'末端的获取, 并且对于5'末端比较长的基因也适用, 一次TdT加尾, 就可以获得大量基因的5'末端。本方法不需要购买昂贵的5'RACE试剂盒, 一次实验只需要近百元, 同时本实验方法简单, 步骤简略, 在TdT加尾纯化后, 1 d内就可以获得实验结果。因此, 本方法是一种高效、简便、廉价、快速、适用于不同丰度、不同长度基因5'末端的快速获取方法, 具有广阔的应用前景。目前本课题组成功应用该技术从芒果的cDNA加尾产物中获取了几十个不同基因的5'末端序列, 并且最近本课题组又从龙眼的cDNA加尾产物中也成功获取了几十个不同基因的5'末端, 证明了该方法的高效性和实用性。

## 参考文献

- 邓雪柯, 殷建华, 曹毅(2007). 3种5'RACE技术的比较与优化. 成都医学院学报, 2 (1): 20~25
- 段静波, 白方文, 白林含(2008). cDNA末端快速扩增试剂盒研发进展. 生命的化学, 28 (5): 641~645
- 郝敏, 谷守芹, 韩建民, 董金皋(2006). cDNA末端扩增技术的研究进展. 河北林果研究, 21 (2): 157~161
- 洪登峰, 万丽丽, 杨光圣(2006). 侧翼序列克隆方法评价. 分子植物育种, 4 (2): 280~288
- 李关荣, 鲁成, 夏庆友, 向仲怀(2003). cDNA末端快速扩增技术(RACE)的优化与改良. 生命科学研究, 7 (3): 189~197
- 梁成真, 张锐, 郭三堆(2009). 染色体步移技术研究进展. 生物技术通报, 10: 75~87
- 刘博, 苏乔, 汤敏谦, 袁晓东, 安利佳(2006). 应用于染色体步移的PCR扩增技术的研究进展. 遗传, 28 (5): 587~595
- 唐慧, 陈善娜, 鄢波, 马志刚, 黄兴奇(2001). 一种cDNA 5'末端的克隆方法. 云南大学学报, 23 (3): 238~240
- 王少丽, 盛承发, 乔传令(2004). cDNA末端快速扩增技术及其应用. 遗传, 26 (3): 419~423
- 王燕, 刘艳艳, 杨永清, 崔建美(2005). cDNA末端快速扩增技术研究进展. 生命科学研究, 9 (4): 31~36
- 夏瑞, 陆旺金, 李建国(2008). 一种改良的扩增cDNA 5'末端的方法. 园艺学报, 35 (10): 1533~1538
- 肖洁凝, 黄学林, 黎茵, 黄霞, 李筱菊(2003). 富含多糖和次生物质的芒果子叶总RNA的提取. 中国生物工程杂志, 23 (11): 83~86
- 郑阳霞, 李焕秀, 严泽生(2008). RACE技术及其在植物基因研究中的应用. 安徽农业科学, 36 (7): 2674~2676
- 朱利军, 长孙东亭, 罗素兰(2009). 全长cDNA文库构建方法及应用研究. 海南大学学报(自然科学版), 27 (2): 185~189