

RACE 技术

RACE 即 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends), 是一种基于逆转录 PCR 从样本中快速扩增 cDNA 的 5'端及 3'端的技术, 由 Frohman 等人于 1988 年发明。利用 RACE 可以通过已知的部分 cDNA 序列来得到完整的 cDNA 的 5'和 3'端。RACE 的特点是在仅已知单侧序列可供设计特异性引物时, 应用 RACE 技术仍能完成扩增, 因此 RACE 技术也成为单侧 PCR。

RACE 原理

RACE 包括 3'RACE 和 5'RACE, 分别用于 cDNA3'端和 5'端的扩增。根据已知序列设计特异性引物, 利用 3'RACE 获得 3'端序列(基因特异性引物→3'末端), 利用 5'RACE 获得 5'端序列(基因特异性引物→5'末端), 最终获得完整的 cDNA 序列。3'RACE 与 5'RACE 原理有所不同, 下面分别做一介绍。

3'RACE

RACE 的实验样本包括总 RNA, poly(A)+RNA 等。首先根据 mRNA3'末端天然存在的 Poly(A)尾部设计反转录引物逆转录获得第一条 cDNA 链。根据已知的 cDNA 序列设计基因特异性引物(gene specific primer,GSP)合成第二条 cDNA 链。随后以基因特异性引物(GSP)及正义链 3'末端引物作为一对引物, 对得到的 cDNA 链进行 PCR 扩增, 从而得到 cDNA 的 3'端序列(基因特异性引物→3'末端)。

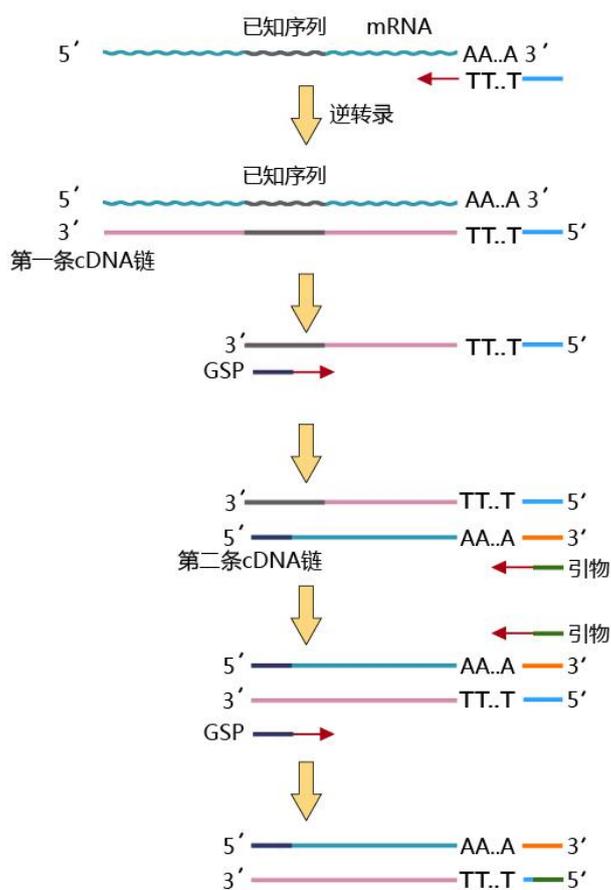


图 1 : 3'RACE 扩增流程

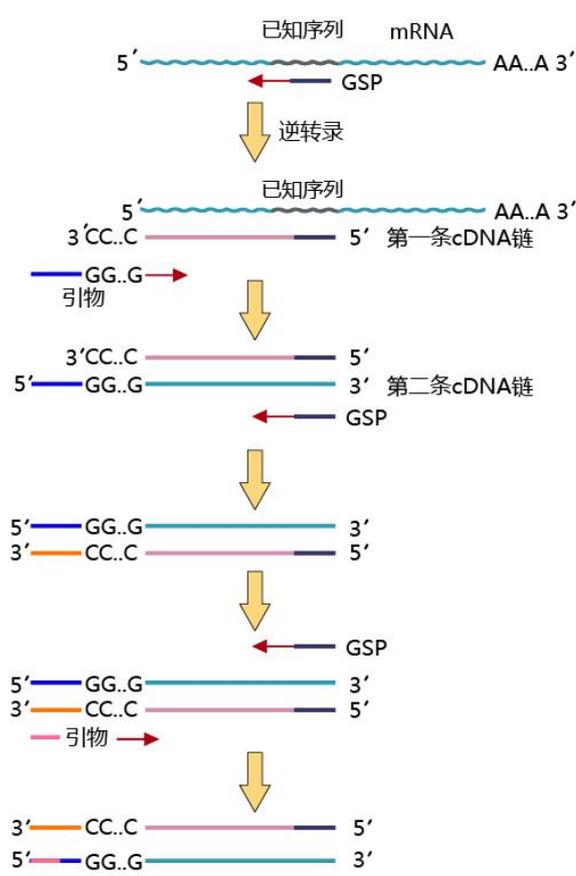


图 2 : 5'RACE 扩增流程

5'RACE

根据已知的 cDNA 序列设计基因特异引物(GSP), 逆转录获得第一条 cDNA 链, 同时用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)在 cDNA 3'端加 Poly(C)尾。依据 Poly(C)尾设计特定引物合成第二条 cDNA 链。随后以第二条 cDNA 链为模板利用基因特异性引物合成双链 cDNA。最后以基因特异性引物(GSP)及反义链 3'末端引物为一对引物进行 PCR 扩增获得 cDNA 5'端序列 (基因特异性引物→5'末端)。

在实际操作中, 为了提高结果的特异性实际操作步骤会比上述原理复杂, 此处只做原理性讲解, 具体提高特异性的方法下文会有描述。

RACE 的意义

由于某些 mRNA 模板过程或模板二级结构含量过高，仅利用 poly(A)尾来获得全长 cDNA 比较困难，甚至无法实现。因为长的 mRNA（或二级结构含量过高）的反转录过程往往会提前终止，导致合成的 cDNA 第一链不完整，最终产生大量的非特异性产物。同时实验操作繁琐，在 RACE 技术出现之前，获得 mRNA 的全长反转录物 cDNA 往往需要数周甚至数月才可以完成。RACE 技术为 cDNA 克隆方法开辟了新纪元，使用 RACE 技术可在 1-2 天内获得 cDNA 全长序列，同时特异性大大提高。

RACE 技术的优点

RACE 技术相对于其它克隆全长 cDNA 的方法（如转座子标签技术、图谱克隆技术、mRNA 差异显示技术等）具有价廉、简单和快速等特点。用 RACE 获得 cDNA 克隆只需几天的时间，而且对低丰度的起始反应物质，也能迅速反馈是否有目的产物生成。RACE 所使用的起始总 RNA 或 mRNA 仅需 ng 级别，可扩增出丰度低于 0.00001% 的 RNA 样本，甚至仅有几个 RNA 分子亦可被检测出来。

RACE 技术的局限性

尽管 RACE 的方法很有实用价值，但是要成功的应用该技术还是比较困难的，尤其是 5'RACE，反转录、加尾、PCR 这三个连续的酶促反应任一步骤的操作失误都会引起实验的失败，即使酶促反应步骤能顺利进行，也有可能产生大量的非特异性产物。要做好 RACE 实验并不容易，实际操作中存在不少困难，需要采取多种措施以提高产物的特异性。

RACE 提高特异性方法

传统 RACE 技术存在诸多缺点，其特异性低，产物可能是单一产物、多个产物，甚至是不能分辨的连续条带。为了提高扩增的特异性，需要在传统 RACE 技术基础上进行改进。RACE 技术的改进主要涉及引物的设计及 PCR 技术的改进两部分。

引物设计的改进

- 使用锁定引物(lock docking primer)：在 oligo(dT)引物的 3'端引入两个简并的核苷酸 MN (结构为 5'-oligo(dT)16-30MN-3', M=A/G/C ; N=A/T/C/G)。使用锁定引物可使引物定位在 poly(A)起始位点, 消除了合成第一条 cDNA 链时 oligo(dT)与 poly(A)尾的任何部位结合所带来的影响。
- 3'RACE 以 3'末端的 poly(A)序列设计逆转录引物时, 使用 oligo(dT)和一段接头序列作为引物(图 1), 这样就在 cDNA 末端接上了一段特殊的接头序列, 在得到第一条 cDNA 链之后, 依据接头序列设计基因特异性引物, 如此则后续的 PCR 扩增中一对引物均为基因特异性引物, 可以有效提高扩增的特异性。
- 5'RACE 在以第一条 cDNA 链 3'末端的 poly(C)计扩增引物时, 使用 poly(G)和一段接头序列作为引物(图 2), 在第二条 cDNA 链后接入一段特殊的接头序列。依据接头序列设计基因特异性引物, 并用此引物与根据已知 cDNA 序列设计的基因特异性引物作为一对引物进行 PCR 扩增。

PCR 技术的改进

- 提高反转录的温度：mRNA 反转录成首链 cDNA 决定了 5'RACE 的成败, 由于靠近 mRNA 的 5'端 GC/AU 比率较高, 可能形成稳定的二级结构从而导致在反转录时产生切短的 cDNA 片段。这些片段不但可以与完整的 cDNA 片段进行同样的加尾反应, 而且在后面的 PCR 中还会被优先扩增, 从而产生大量的非特异性产物。因此, 可以采用提高逆转录温度的方式降低反转录过程中 mRNA 二级结构的稳定性。
- 采用巢式 PCR：[巢式 PCR](#) 是指使用两对或两对以上的引物进行 DNA 扩增的技术, 即先设计一对特异性引物(GSP1、GSP2)进行第一轮扩增, 随后使用在第一对引物内部的第二对特异性基因(GSP3、GSP4)进行第二轮扩增(根据需要也可设计第三对引物 GSP5、GSP6, 进行第三轮扩增)。利用巢式 PCR 可提高 PCR 扩增的特异性。

常见的 RACE 技术

随着分子生物学技术的发展 科学家结合其它的分子生物学技术对最初的 RACE 技术进行了改进 从而丰富了 RACE 技术的类型。目前使用的 RACE 技术包括 经典 RACE、Adapter-Ligated RACE、RLM-RACE、Cap-switching RACE 和环形 RACE 等等。

Adapter-Ligated RACE

Adapter-Ligated RACE 是 Adapter-Ligated PCR 技术与 RACE 技术的结合。利用 T4 连接酶将接头与 cDNA 两端连接，在 PCR 循环的退火步骤中，由于短 cDNA 退火温度低，两端接头容易发生退火，形成锅柄状结构，两端接头结合阻止引物与模板结合，终止 PCR 反应。长 cDNA 的退火温度高，不易形成锅柄结构，因此引物可以与接头结合，实现延伸。Adapter-Ligated RACE 可以让长片段 cDNA 的克隆在扩增反应中占主导，从而尽可能多地得到目的基因的序列信息。

RLM-RACE

利用断裂的 mRNA 5'端没有帽子结构的特点，事先加入牛小肠碱性磷酸酶(CAP)将断裂 mRNA 5'末端暴露的磷酸基团切除。再加入烟草酸焦磷酸酶(TAP)，TAP 具有切除 mRNA 帽子结构的催化活性，能够使 mRNA 5'端暴露一个磷酸基团，接着在 T4 连接酶的催化下将接头与经过活化的 mRNA 5'端链接。经过钝化的 mRNA 是不能与接头链接的。经过这样处理后，便可以扩增目的 mRNA 5'端片段。

Cap-switching RACE

第一步以 poly(T)作为引物对 mRNA 3'端克隆。当新合成 cDNA 延伸到 mRNA 5'帽子结构时，加入莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV)在 cDNA 3'端加入若干胞嘧啶 poly(C)。MMLV 所催化的加尾反应需要依赖模板和帽子结构的存在，因此只有完整的 cDNA 末端才会加上胞嘧啶残基，接着加入特异性引物，该引物在 3'末端含有含有多聚鸟嘌呤核苷酸 poly(G)可与 cDNA 末端新添加的多聚胞嘧啶核苷酸 poly(C)退火，在 DNA 聚合酶的催化下以新添加的引物为模板实现接头转化，从而向 cDNA 3'端引入特异性序列，最后再进行 PCR。

环形 RACE

环形 RAC 利用 poly(T)引物进行[逆转录 PCR 反应](#)扩增第一条 cDNA。经 RNaseH 降解模板后加入 T4 连接酶，加入 T4 连接酶时会发生环化反应或串联反应。无论是环化反应或是串联反应的产物都可以根据已知序列设计新引物来补充第二条链。环状分子或串联分子产生第二条 cDNA 链后，在未知区域的两侧设计一对引物将未知区域置换到已知序列中间，进行普通 PCR。

需要说明的是，RACE 技术种类繁多，但目前没有任何一种 RACE 技术能完美地扩增多有类型的 RNA，每一种 RACE 技术都有其适合扩增的 RNA 种类，比如经典 RACE 适合扩增多有 poly(A)尾结构的 RNA，Cap-switching RACE 技术适合于扩增多有 5'端帽子结构的 RNA。

RACE 与抗体测序

将 RACE 扩增得到的 cDNA 片段克隆至载体中，使用仪器对克隆后的质粒进行测序，最终得到该 cDNA 的序列。

德泰生物提供[杂交瘤细胞测序服务](#)，可对抗体的可变区、重链、轻链及全长进行测序。

更多阅读

[荧光定量 PCR](#)

[降落 PCR](#)

参考文献

- [1]. 徐焯，刘雅婷等.几种主要的 RACE 技术及应用[J].中国农业科技导报，2012，14（2）:81-78;
- [2]. 邓雪柯，殷建华等.3 中 5'RACE 技术的比较与优化[J].成都医学院院报，2007，2，1:20-23;
- [3]. 陈启龙.RACE 技术的研究进展及其应用[J].2006，6，3：95-98；

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

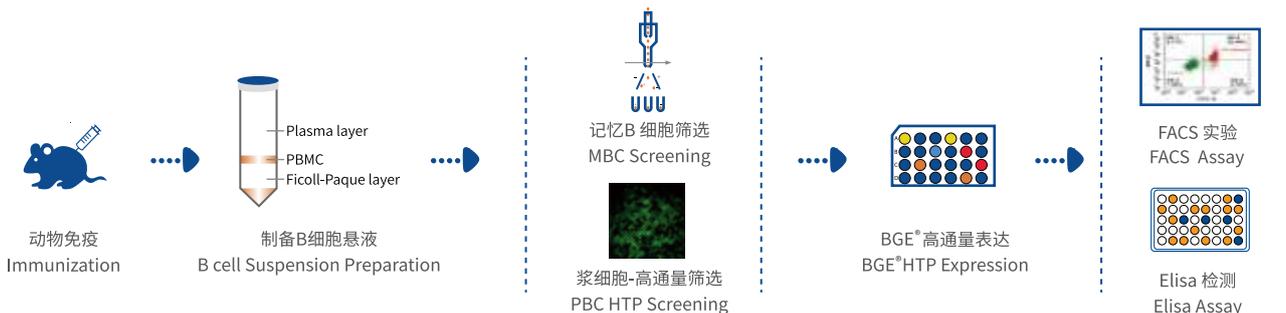
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

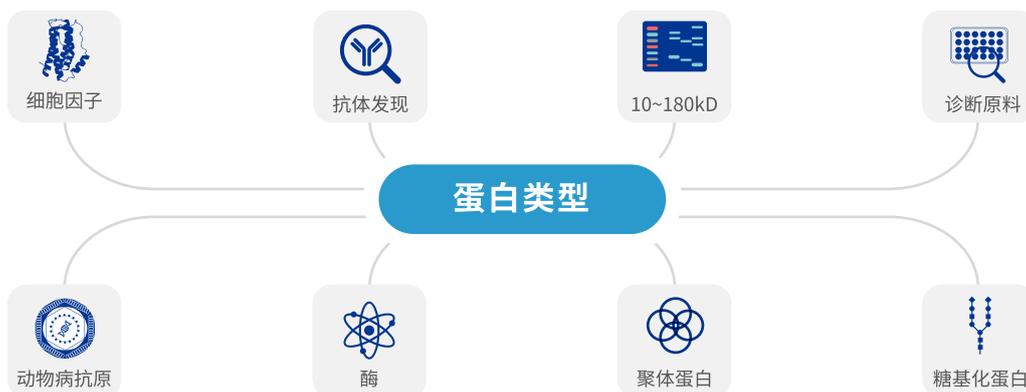


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

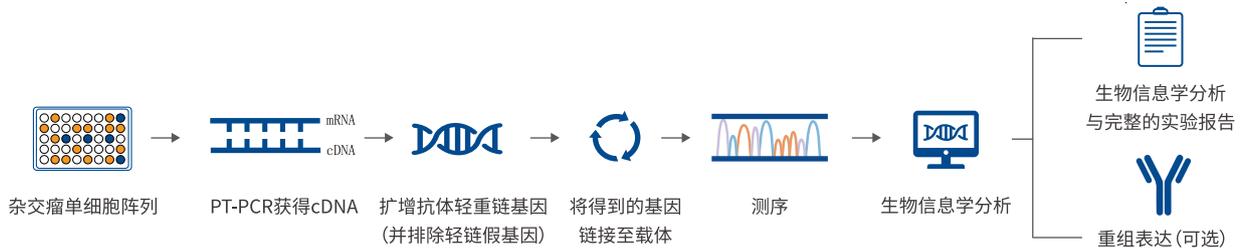
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



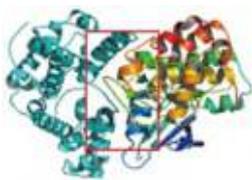
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

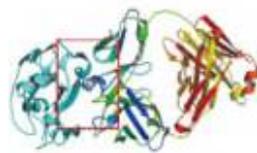
检测范围



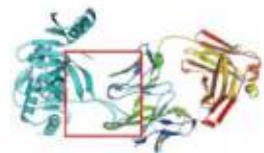
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



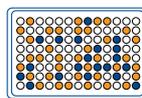
基因合成&质粒抽提



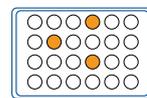
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L