

SUPERSWITCH™

第三代测序转录组文库构建试剂盒

使用手册

目录

I.	简介及操作要览	1
II.	试剂盒组分	3
III.	试验所需其它试剂	4
IV.	SUPER SWITCH™ cDNA 合成技术	5
	A. 第一链cDNA合成	6
	B. 全长cDNA	6
V.	注意事项	6
	A. SUPER SWITCH™ Reverse Transcriptase	6
	B. RNA分析	7
	C. 第一链cDNA合成所需的最小起始量	8
	D. LD PCR	8
VI.	SUPER SWITCH™第一链cDNA合成	9
VII.	LD PCR最佳循环次数的确定	10
VIII.	LD PCR产物的纯化	12
IX.	第一链cDNA合成和PCR扩增常见问题及解决方案	14
X.	参考文献	16

I. 简介及操作要览

A. 简介

SUPERSWITCH™ 第三代测序转录组文库构建试剂盒提供了一种基于 PCR 方式从纳克级总 RNA 合成高质量 cDNA 的方法。其 cDNA 合成技术是基于 RNA 转录 5'末端跳转机制 (Switching Mechanism at 5' End of RNA Template, SMART) 技术。SMART 技术非常适合起始样品量有限的材料, 能够以 2 ng 总 RNA (或极低浓度样本) 合成的高质量 cDNA, 用于杂交探针、“Virtual Northern” blots、cDNA 测序及其他应用。

B. 操作要览

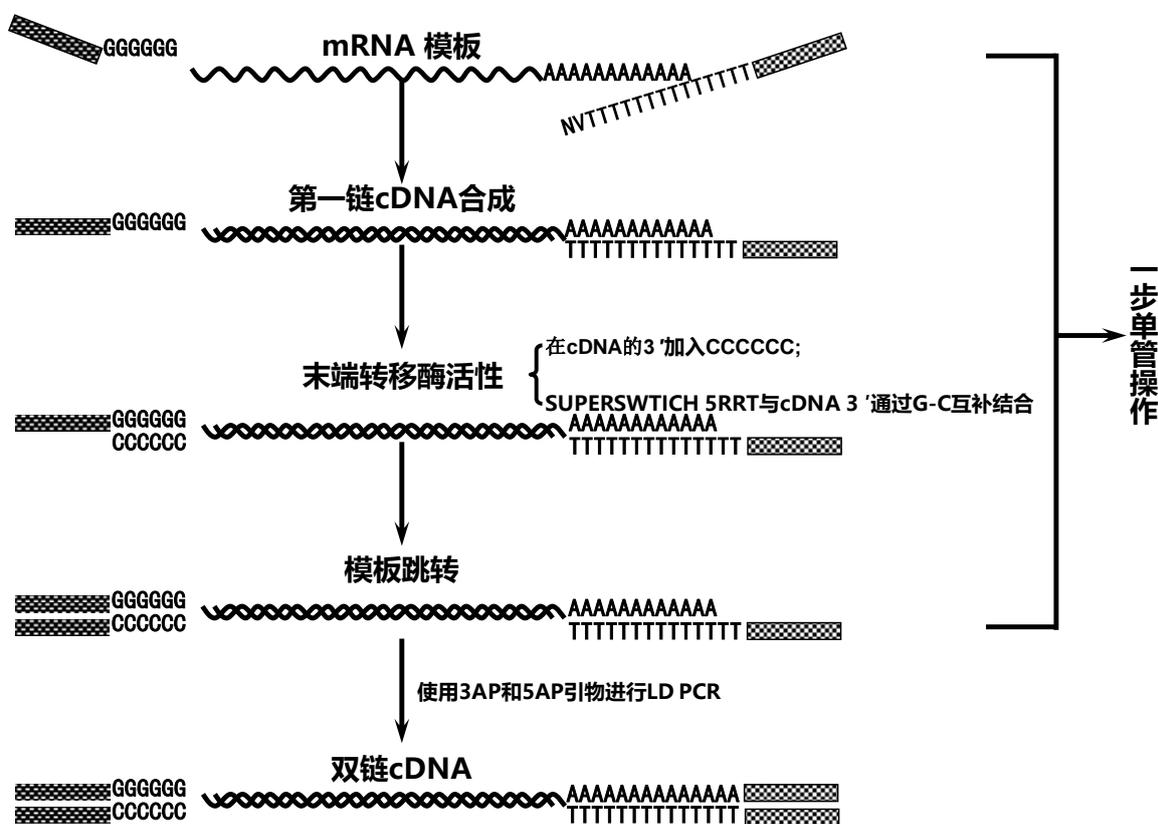


图1. SUPERSWITCH™ 技术的流程

第一链 cDNA 合成由优化的 oligo (dT) 引物起始。反转录到达 mRNA 模板末端时, 反转录酶所具有的末端转移酶活性会在 cDNA 3'端加入 dC 残基。而 SUPERSWITCH™ 5RRT 引物与 cDNA 3'端加入 dC 残基间的退火将为 SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase 的反转录过程提供一个可供延伸的模板。

通常 cDNA 的合成方法均通过逆转录酶 (反转录) 将 mRNA 反转录成第一链的单链 cDNA (single-stranded cDNA, ss cDNA)。受限于反转录的效率, 基因的 5'端在反转录过程中常

常不能被转录，最终形成的 cDNA 的 5'端通常并不完整。在基因序列较长、mRNA 连续出现二级结构，特别是仅以 oligo (dT) 引物合成第一链 cDNA 的情况下，5'端 cDNA 链合成截短的现象尤为突出。以未降解的 RNA 构建的 cDNA 文库中，出现的截短的 cDNA 的分子就是因为反转录过程异常终止导致的。但无论如何，SUPERSWITCH™方法能够优先富集的全长 cDNA 片段。

SUPERSWITCH™可将多聚腺苷酸 mRNA 或总 RNA 反转录合成 cDNA。而反转录使用的引物均经过反复优化 (3' SUPERSWITCH™ 3RRT) (图 1)。第一链 cDNA 合成由优化的 oligo (dT) 引物起始，当反转录进行至基因 mRNA 的 5' 末端时，SUPERSWITCH™的末端转移酶的活性可在 cDNA 的 3'末端增加以胞嘧啶 C 为主的其他核苷酸。由于 SUPERSWITCH™ 5RRT 引物在其 3'末端富含胸腺嘧啶 G, 这样通过 C-G 之间的碱基配对为 SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase 的反转录过程提供一个可供延伸的模板，反转录的 cDNA 又以 5RRT 为模板进行延伸，直至 5RRT 引物的末端 (Chenchik et al , 1998)。最终产生的完整的单链 cDNA 包括完整的 5'端基因，以及与 SUPERSWITCH™ 5RRT 引物互补的序列。SUPERSWITCH™ 3AP 和 SUPERSWITCH™ 5AP 的引物扩增形成了 cDNA 的 5'末端至 3'末端的扩增。反转录过程进行至 mRNA 模板 5'末端中止前，全长 cDNA-RNA 分子间的碱基配对效率要远远高于 SUPERSWITCH™ 5RRT 与 RNA 分子的配对。因逆转录活性不完全形成的序列不完整的 cDNA 或是基因组 DNA 污染将以非指数型进行扩增。需要注意的是，如果初始的转录本中含有降解的 RNA 模板, 也会由于 SUPERSWITCH™试剂盒内 SUPERSWITCH™ 3AP 和 SUPERSWITCH™ 5AP 的扩增出现在最终构建的 PCR 产物中。

SUPERSWITCH™第三代测序转录组文库构建试剂盒也对 PCR 过程加以优化，增加了 PCR 扩增反应的灵敏性并降低了背景。因此，使用者可用很少的 mRNA 或是总 RNA 作为反转录的模板，构建全长 cDNA 文库。

C. SUPERSWITCH™ cDNA的下游应用

用于全长转录组的测序:

操作流程可与 PacBio 和 Oxford Nanopore 测序平台实现无缝对接。与相应测序平台的测序接头进行连接，并上机测序后，能够直接获得 RNA 分子从 5'端到 3'端的全长转录本，无需拼接组装即可精确发现新基因和转录异构体，鉴定可变剪接及基因融合现象。

用于 Virtual Northern Blot:

在 mRNA 或总 RNA 不足的情况下，合成 SUPERSWITCH™ cDNA 可通过杂交的方式来分析转录本的大小和表达模式。以 SUPERSWITCH™ cDNA 代替 mRNA 或总 RNA 进行“Virtual Northern” blot 也能提供与标准 Northern blot 类似的信息(Endege et al., 1999)。

用于 RACE:

SUPERSWITCH™ cDNA 非常适于扩增 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE; Matz et al., 1999)。SUPERSWITCH™ RACE 5'/3' Kits (ST01011,ST01021 & ST01031) 也可用于 mRNA 和总 RNA 起始合成 5'和 3'末端带有接头引物的第一链 cDNA。

II. 试剂盒组分

所有试剂均在-20℃保存。需要注意的是 SUPERSWITCH™ 第三代测序转录组文库构建试剂盒分为适用于 PacBio 的测序仪平台试剂盒和适用于 nanopore 的测序仪平台试剂盒。请根据构建文库使用的反转录引物是否需要带有 barcode，和测序仪器的不同情况购买相应的试剂盒，以达到最好的试验效果！

A. 贮存条件:

Tiosbio™ 200bp Cleaner 贮存于室温；

其他试剂均贮存于-20℃。

B. 试剂盒 1

目的	试剂		PacBio		Nanopore	
			SP0021		SN0021	
			M/10 次	L/20 次	M/10 次	L/20 次
反转录	1	● SUPERSWITCH™ 3RRT Oligonucleotide	12μL	24 μL	6μL	12μL
	2	● dNTP Mix (10 mM)	40 μL	80 μL	20 μL	40 μL
	3	● Deionized H ₂ O	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
	4	● 5X First-Strand Buffer (RNase-Free)	60 μL	120 μL	30 μL	60 μL
	5	● SUPERSWITCH™ Solution I	10 μL	20 μL	5 μL	10 μL
	6	● SUPERSWITCH™ Solution II	10 μL	20 μL	5 μL	10 μL
	7	● RNase Inhibitor (40 U/μL)	12 μL	25 μL	6 μL	12 μL
	8	● SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase (200 U/μL)	12 μL	25 μL	6 μL	12 μL
	9	● SUPERSWITCH™ 5RRT Oligonucleotide	12 μL	24 μL	6 μL	12 μL
PCR	10	● 5AP PCR Primer (12 μM)	100 μL	200 μL	100 μL	200 μL
	11	● 3AP PCR Primer (12 μM)	100 μL	200 μL	100 μL	200 μL
	12	● Marathon DNA Polymerase (1U/μL)	24μL	48μL	24 μL	48 μL
	13	● 2×PCR Buffer	765μL	1530 μL	765μL	1530 μL
	14	● 2.5 mM dNTP	160μL	320 μL	200 μL	400 μL

C. 试剂盒 2: Tiosbio™ 200bp Cleaner

目的	试剂		PacBio		Nanopore	
			M/30 次	L/60 次	M/30 次	L/60 次
PCR 产物 纯化	1	○ Buffer P5	7.5 mL	15 mL	15 mL	30 mL
	2	○ Wash Buffer	3.25 mL	6.5 mL	6.5 mL	13 mL

III. 试验所需其它试剂

A. Marathon DNA Polymerase (货号 BT0011)

强烈建议使用 Tiosbio® Marathon DNA Polymerase (货号 BT0011)。Tiosbio® Marathon DNA Polymerase 包括 DNA polymerase、Buffer、dNTP 等组分，只需添加引物和 DNA 模板即可进行 PCR 扩增。本产品所含的 DNA polymerase 是由基因工程改造的多种突变型 pfu DNA polymerase 混合而成，使用本产品扩增得到的 PCR 产物为平末端。酶中还混合了抑制 Polymerase 活性与 3'→5' Exonuclease 活性的 2 种单克隆抗体，具有快速、高灵敏度、抗干扰能力强等特点，可简便地进行高特异性的热启动 PCR，适于复杂模板快速 PCR 扩增，

可有效地扩增全长 cDNA。

Tiosbio® Marathon 2× PCR Buffer -20°C保存时为液体状态（不会冻结），-20°C以下保存时，可能会冻结，但不会影响品质，如 Tiosbio® Marathon 2× PCR Buffer 冻结，只需置于室温，待其融解后，充分混匀即可使用。Tiosbio® Marathon DNA Polymerase

B. Tiosbio® 总 RNA 提取系列试剂盒（货号 BT0031, BT0041, BT0051, BT0061, BT0071 & BT0081）

Tiosbio® 总 RNA 提取系列试剂盒提取试剂盒为客户提供了从动物组织、植物组织、培养细胞、细菌中小量纯化高质量、完整总 RNA 的解决方案。该试剂盒采用独特的细胞裂解系统，无需使用苯酚、氯仿等有害物质，通过离心柱硅基质膜高效、专一地吸附核酸分子，再经 DNA 酶处理去除基因组 DNA 的污染，最终得到高纯度的总 RNA。本产品具有高效、快速、方便的特点，单个样品的提取和纯化一般可在 30 min 内完成。使用该试剂盒纯化获得的 RNA，不但纯度高，而且基本无 DNA 和影响下游应用酶反应的杂质残留。

C. Tiosbio™ 200bp Cleaner（货号 BT0112）

一种用于从 PCR 产物或多种 DNA 反应体系中纯化和回收 DNA 的试剂盒。适用于 PCR 反应后去除引物、酶、矿物油、甘油、盐等杂质；也同样适用于酶切、连接、磷酸化、补平或切平、随机引物等反应后的 DNA 纯化。纯化所得 DNA 可直接用于酶切、连接、转化细菌、测序、PCR、杂交等后续操作。本试剂盒适用于纯化 200bp ~ 10kb DNA，长至 200 个碱基的产物也可以被完全去除。

D. TE 缓冲液（10mM Tris-HCl [pH8.0], 0.1mM EDTA）

E. β-巯基乙醇（Sigma 目录号 M6250）

F. DNA size markers (1 kb DNA ladder)

G. 50×TAE 或 10×TBE 电泳缓冲液

IV. SUPERSWITCH™ cDNA 合成技术

A. 第一链 cDNA 合成 (详见第VI节)

SUPERSWITCH™ 第三代测序转录组文库构建试剂盒合成的cDNA是以改进过的锚定oligo (dT) 引物 (SUPERSWITCH™ 3RRT Oligonucleotide) 和SUPERSWITCH™ 5RRT Oligonucleotide 反转而成, 具有延长的5'末端, 可用于全长转录组文库的构建, 获得5'-RACE和3'-RACE cDNA。SUPERSWITCH™ 3RRT Oligonucleotide在其3'端有两个兼并的核苷酸, 与经典的oligo (dT) 引物相比可降低3'结合的非均质性 (Borson et al , 1992)。

图2显示了 SUPERSWITCH™ LD PCR 反应中所使用的扩增引物与双链 cDNA 的相对关系。

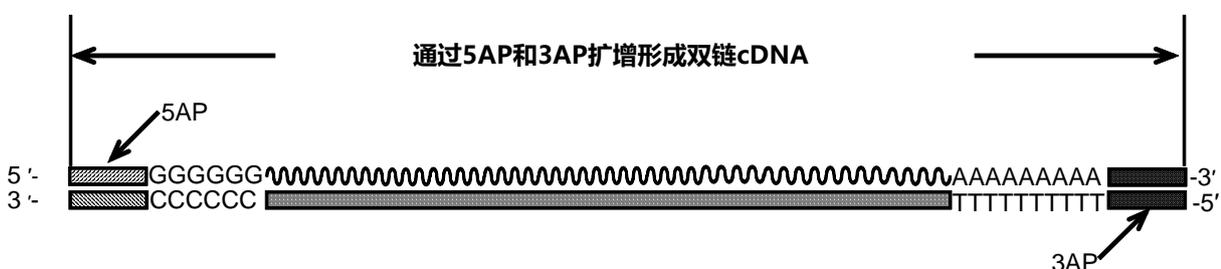


图2. SUPERSWITCH™ LD PCR反应中所使用的扩增引物与双链cDNA的关系

B. 全长 cDNA

没有任何一种 cDNA 合成的方法可以保证一定得到全长的 cDNA, 尤其是 5'末端。确定 5'末端的真实性需要结合 RNase 保护分析、引物延伸分析和/或 cDNA 或是基因组的序列信息。大多数的 SUPERSWITCH™ RACE cDNA 包括具有全长的 5'末端的 cDNA, 但是在某些情况下如果具有复杂的二级结构 RNA 或是 cDNA 将会阻断反转录或 PCR 过程。与传统 RACE 或是文库的方法获得的 cDNA 相比, SUPERSWITCH™ RACE 全长 cDNA 的比例更高。

V. 注意事项

A. SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase

SUPERSWITCH™ 技术所需的模板跳转过程需要使用 *M-MLV* RNase H⁻点突变的反转录酶。SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase 是一种遗传修饰的 *M-MLV* 反转录酶, 该酶具有

RNA 和 DNA 依赖的聚合酶活性，但是缺乏 RNase H 活性（该活性区域点突变），不能降解第一链 cDNA 合成时形成的 RNA-DNA 复合物中的 RNA，因而可获得全长的 cDNA。在 42~55°C 范围内 SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase 均有酶活性，因此适合逆转录具有较多二级结构的 RNA 分子。

B . RNA 分析

无论您以何种目的使用该试剂盒，高品质 cDNA 合成的决定因素是起始材料中总 RNA 和 poly A+ RNA 的完整性和纯度。

以下预防措施可有效避免总 RNA 的污染和降解，如试验全程使用口罩和手套，以新超纯水（如 MilliQ 级）替代 DEPC (diethyl pyrocarbonate)处理的水，160~180°C 烘烤玻璃制品 4~9 h，使用一次性的无核酸酶的吸头及离心管。另外，如果 RNA 样品中残留有机物、金属离子、盐或核酸酶，在 cDNA 合成时会抑制酶活或降解 RNA，严重影响 cDNA 下游的使用。因此，进行 cDNA 合成前需要检测 RNA 的稳定性和完整性，以确保 RNA 样品没有受到污染。如果 RNA 样品来源于植物样品或是其它色素含量较高的样品，一定要特别留意避免多糖或色素的污染。多糖或色素很难被去除，也不能被凝胶电泳检测出。这些糖蛋白可能会在第一链 cDNA 合成的过程中干扰引物与 RNA 的结合，从而降低 cDNA 的产量。

RNA 稳定性的检测需要将 RNA 吸出一部分，在 37°C 孵育 2 h，比较孵育的样品与 -70°C 保存的样品凝胶电泳的差异。如果甲醛变性凝胶电泳显示孵育的 RNA 样品 28S:18S 的比例低于未孵育的样品，或是孵育的 RNA 样品呈现出明显的拖尾，证明 RNA 样品残留了核酸酶。

RNA 完整性的检测也需要借助仪器、甲醛/EtBr/琼脂糖凝胶电泳进行。

使用 Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, CA)分析 RNA 样品会提供 2100 峰图、样品浓度、28S/18S、RIN 值、峰面积、模拟胶图等信息。峰图中需重点查看基线是否平整，有无降解杂峰，28S 与 18S 峰形及比值。28S 和 18S 比值（28S/18S）是评估样品完整性的另一项指标，真核生物的比值大于等于 1.5 表示 RNA 完整性较好，如比值逆转，则表明 RNA

降解。原核生物 23S/16S 数值大于等于 1.2 表明 RNA 完整性较好。而 RNA Integrity Number (RIN) 数值大小可反应样品完整性情况，数值越接近 10 表明样品完整性越高，反之 RIN 值越小完整性越差。特殊样品需结合 2100 峰图一起评估。一般，用于**转录组文库构建的总 RNARIN 值要求 ≥ 8.0** 。

RNA 电泳胶图主要需查看以下几方面：1) 看目的条带是否明亮清晰；2) 看泳道内是否有降解弥散区；3) 看胶孔处有无蛋白污染；4) 看有无 DNA 污染；5) 看有无外源物种核酸污染。如果总 RNA 条带明亮清晰，泳道无弥散区，无蛋白和 DNA 污染，表明样品质量较好。哺乳动物的总 RNA 28S 和 18S 带电泳条带接近于 4.5 kb 和 1.9 kb 分子量的 Marker。28S 与 18S 的比值接近于 1.5~2.5: 1。完整的哺乳动物 mRNA 电泳显示为分布于 0.5~12 kb 间的弥散条带，并伴有微弱的 28S 和 18S rRNA 条带。非哺乳动物（如植物、昆虫、酵母和两栖动物）的 mRNA 电泳则可能在 0.5~3 kb 间弥散分布。EB 染色的甲醛变性 RNA 琼脂糖凝胶对上样的样品量有要求，而 SYBR Green II 或 SYBR Gold (Invitrogen, CA)能检测到低至 1 或 2 ng 的 RNA（分别使用 SYBR Gold 和 SYBR Green II）。在样品受限的情况下，这类染料可对低含量的 RNA 进行有效检测。

由于 mRNA 不含有明显的核糖体 RNA 的条带，因此 mRNA 电泳时会呈现介于呈现 0.5~6 kb 的弥散条带。弥散条带在 1.5~2 kb 的区域含量比较高，分子量具体的大小与组织及物种特异性有关。平均分子量小于 1.5 kb 的 mRNA 通常是降解的。

C . 第一链 cDNA 合成所需的最小起始量

SUPERSWITCH™试剂盒所优化的操作步骤适用于总 RNA 和 mRNA 模板。第一链 cDNA 合成所需的最小起始量为 50 ng 的总 RNA 或是 25 ng 的 mRNA。但是如果样品 RNA 的取材不受限制，为了能够反转录并扩增到全长的低丰度表达基因，我们强烈建议每 25 μ L 反转录体系以 3-4 μ g 左右的总 RNA 或是 1 μ g 的 mRNA 起始第一链的 cDNA 合成。

D . LD PCR

PCR 的循环参数设置已在自动热盖的 PCR 仪中反复优化，但是仍需根据您的 PCR 仪和模板优化试验循环参数的设置。为使 PCR 反应管中的试剂混合均匀，须轻柔吸打溶液，并瞬时离心，使反应液沉积于 PCR 反应管底部。**LD PCR 的长度与您的样品中转录组的平均长度有关，但不同的扩增温度也会造成产物长度的偏好性。**

VI. SUPERSWITCH™第一链cDNA合成

未注明的情况下，所有操作均在冰上进行。

进行说明书中有明确温度要求的操作时，应该在PCR仪的反应模块温度与设置温度一致后，再将PCR反应管放在PCR仪的反应模块上。反应体系中的酶需要最后添加，并轻柔吸打溶液，使酶与反应体系中的其他组分充分混匀。反应体系中的各组分均经过反复优化，酶和模板的量请勿随意增减。

1. 每个样品及对照均在200 μL 或500 μL PCR反应管内添加下列组分，吸打混匀，并瞬时离心。

RNA 样品*	1~6 μL	1~12 μL
● SUPERSWITCH™ 3RRT Oligonucleotide	0.5 μL	1 μL
● dNTP Mix(10 mM of each dNTP)	1.5 μL	3 μL
补足无 RNA 酶、DNA 酶去离子水至总体系	8 μL	16 μL (推荐)

* (0.025~1 μg mRNA或0.05~5 μg 的总RNA)。

2. 70°C 孵育5 min，立即冰浴3 min。瞬时离心使溶液收集于PCR反应管管底。在无核酸酶PCR反应管中继续添加下列组分 **(注意，添加的组份可配制Mix，也可单独添加，但每一组份加入后均需马上吸打混匀，以保证各组份发挥最佳的效果!)**。吸打混匀，避免产生气泡，瞬时离心收集溶液。

● 5×SUPERSWITCH™ First-Strand Buffer	2.5 μL	5 μL
● SUPERSWITCH™ Solution I	0.25 μL	0.5 μL
● SUPERSWITCH™ Solution II	0.25 μL	0.5 μL
● RNase Inhibitor	0.5 μL	1 μL
● SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase	0.5 μL	1 μL
补足水至总体系	至 12 μL	至 24 μL (推荐)

3. 42°C 孵育30 min后，25 μL反转录体系加入1 μL ● SUPERSWITCH™ 5RRT Oligonucleotide (12.5 μL反转录体系加入0.5 μL ● SUPERSWITCH™ 5RRT Oligonucleotide)，并吸打混匀，瞬时离心，42°C继续孵育1 h。

注意：若使用水浴或无热盖的PCR仪进行42°C孵育，须在PCR反应管中添加矿物油以避免溶液挥发。

4. 70°C 孵育10 min，降至4°C后，将PCR反应管从PCR仪取出，置于冰上，终止第一链cDNA合成。

如果直接进行PCR步骤，吸取12 μL的cDNA至一干净、冰浴的200或500 μL PCR反应管中作为模板进行后续的PCR反应。如果您在第一链cDNA合成为避免挥发使用矿物油，在吸取溶液时应小心避免吸入矿物油。如果第一链cDNA合成的产物不立即使用的话，应该进行每管12 μL cDNA的分装，将分装后的cDNA保存于4°C。该产物可于4°C保存1个月。

VII. LD PCR最佳循环次数的确定

1. 按照表1所示的体系，将试剂加入适宜的PCR反应管。

● Tiosbio® Marathon DNA Polymerase	0.4 μL	1 μL
● 2×PCR Buffer	12.5 μL	25 μL
● 2.5 mM dNTP	5 μL	10 μL
第VI部分获得的cDNA*	1 μL	12 μL
● 5AP PCR Primer (12 μM)	0.5 μL	1 μL
● 3AP PCR Primer (12 μM)	0.5 μL	1 μL
补足水至总体系	25 μL	50 μL (推荐)

*每50 μL扩增体系加入≤300 ng总RNA的转录产物。

2. 在具有热盖功能的PCR仪上设置PCR的程序。

初始变性：94°C 3 min;

11个循环: { 98°C 10 sec
68°C 30 sec
68°C 6~8 min

最终延伸: 68°C 5 min。

完成初始11个循环后, 吸取5 μL的68°C下扩增的PCR反应液, 至一个标有“18”的新PCR管内。

3. 将剩下的45 μL PCR反应物重新放回PCR仪中, 并继续进行三个循环的扩增。

3个循环: { 98°C 10 sec
68°C 30 sec
72°C 6~8 min

吸取5 μL的68°C下扩增的PCR反应液, 至一个标有“13”的新PCR管内。

4. 重复步骤C, 进行13-15个循环的扩增。请注意, cDNA的起始模板量会影响PCR的循环次数, 不同的样品需要进行PCR循环数的调整。
5. 在琼脂糖凝胶或Bioanalyzer®仪器上分析不同循环数下的PCR产物, 观察ds cDNA的分布, 确定LD PCR反应的最佳循环次数。

最佳的合成效果琼脂糖凝胶分析方法为: 150 μL第一次PCR产物经Tiosbio™ 200bp Cleaner纯化至50μL后【纯化产物浓度一般为10~25ng/μL】, 4μL纯化产物电泳显示为均匀Smear条带, 产物分子量介于0.2~8Kb之间【不同的样品分子量上限可能会有较大差别】。

6. 确定好最佳循环次数后, 按照如下体系合成双链cDNA:

● Tiosbio® Marathon DNA Polymerase	0.4 μL	1 μL
● 2×PCR Buffer	12.5 μL	25 μL
● 2.5 mM dNTP	5 μL	10 μL
第VI部分获得的cDNA*	1 μL	12 μL
● 5AP PCR Primer (12 μM)	0.5 μL	1 μL
● 3AP PCR Primer (12 μM)	0.5 μL	1 μL

补足水至总体积	25 μ L	50 μ L (推荐)
---------	------------	-----------------

* \leq 相当于300 ng的总RNA的转录产物。

初始变性: 94°C 3 min;

11-15个循环:	{	98°C	10 sec
		68°C	30 sec
		68°C	6~8 min

最终延伸: 68°C 5 min。

7. 每50 μ L的反转录体系可进行3次PCR扩增, 若第一次PCR产物纯化后的双链cDNA产量不足以进行后续试验, 可按照如下体系进行二次PCR, 以获得足量的双链cDNA。

● Tiosbio® Marathon DNA Polymerase	0.4 μ L	0.8 μ L
● 2 \times PCR Buffer	12.5 μ L	25 μ L
● 2.5 mM dNTP	5 μ L	10 μ L
第VI部分获得的双链cDNA*	0.5 μ L	1 μ L
● 5AP PCR Primer (12 μ M)	0.5 μ L	1 μ L
● 3AP PCR Primer (12 μ M)	0.5 μ L	1 μ L
补足水至总体积	25 μ L	50 μ L (推荐)

* \leq 相当于15-25 ng的双链cDNA纯化产物。

初始变性: 94°C 5 min;

8~12个循环:	{	98°C	10 sec
		68°C	30 sec
		68°C	6~8 min

最终延伸: 68°C 5 min。

VIII. LD PCR产物的纯化

PCR产物直接纯化试剂盒储存于室温 (15~25°C), 可在两年内保持使用性能无明显变化; 如果将产品储存于2~8°C, 可延长产品的有效期至两年以上。本试剂盒采用了柱纯化核

酸的原理，适合从PCR扩增的反应液中清洁回收多至8 μg 高纯度DNA (0.2 ~ 10kb)，回收效率在75% ~ 90%之间，清洁后的DNA中不含引物、酶蛋白、单核苷酸、荧光染料或放射性同位素标记的单核苷酸。适用于各种要求的分子生物学实验。

用户需自备无水乙醇、1.5mL离心管、移液器及吸头、一次性手套、纸巾及防护用品和台式离心机（可配离心1.5mL离心管和2mL离心管的转子）。可能需要使用3 M NaOH。如果离心机有制冷功能，请将温度设置到25°C。根据试剂瓶标签上的指示在Wash Buffer中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。

1. PCR产物中加入5倍体积的Buffer P5，勿弃吸头，直接用移液器吸打几次混匀，并将混合液转移到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于2mL收集管中），盖上管盖。

* 比如需要清洁100 μL PCR 产物，则需要加入500 μL Buffer P5。

* Buffer P5 中所添加的染料可指示pH值，加入Buffer P5后混合溶液应为橙红色。如果加入Buffer P5后混合溶液变为黄色，则说明需要清洁的DNA溶液酸性过强，应加入1 ~ 5 μL 3MNaOH，使混合溶液恢复至原来的橙红色，否则将影响200 bp以下DNA片段的去除效果。

2. 12000 rpm 离心30 sec，弃2 mL收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 mL收集管中。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将2 mL收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

3. 在核酸纯化柱中加入700 μL Wash Buffer，盖上管盖，12000 rpm离心30 sec。弃2 mL收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 mL收集管中。

* 确认在Wash Buffer中已经加入无水乙醇。

*如果对产物纯化要求较高，可在核酸柱加洗涤液Wash Buffer时，吸取洗涤液Wash Buffer，在核酸纯化柱管口沿着管壁一圈清洗下去，并开盖静置5 ~ 10min。期间，如核酸纯化柱内的Wash Buffer大部分缓慢滴落至收集管，可补加1次Wash Buffer至700 μL ，将会大大提高产物的洗涤效果。

4. 14000 rpm 离心1 min。弃2 mL 收集管。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2 min。

* 此步骤高速空离是为了去除残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的核酸中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

5. 将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 mL 离心管中，室温放置1-2 min后，在纯化柱的膜中央加入30~50 μ L的超纯水，盖上管盖，室温静置1 min，12000 rpm离心30 sec，洗脱DNA。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，建议将洗脱DNA的条件改为8000 rpm 离心1 min，以防止1.5 mL离心管管盖脱落而损伤离心机。

* 不要用低于30 μ L的超水洗脱DNA，以避免因纯化柱的膜没有被充分湿润，影响DNA的回收效率。

*用超水洗脱DNA时，但应确保所使用的超纯水pH值在7.0~8.5，以免影响DNA的洗脱效率。

6. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

IX. 第一链cDNA合成和PCR扩增常见问题及解决方案

SUPERSWITCH™ 试剂盒中附带的SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase等，均可实现反转录过程的模板跳转。SUPERSWITCH™ 技术所需的模板跳转过程需要使用M-MLV RNase H⁻点突变的反转录酶。SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase是一种遗传修饰的M-MLV反转录酶，该酶具有RNA和DNA依赖的聚合酶活性，但是缺乏RNase H活性（该活性区域点突变），不能降解第一链cDNA合成时形成的RNA-DNA复合物中的RNA，因而可获得全长的cDNA。在42~55 $^{\circ}$ C范围内SUPERSWITCH™ Reverse Transcriptase均有酶活性，因此适合逆转录具有较多二级结构的RNA分子。如果LD PCR产物较小（小于3 kb），产量较低，或无PCR产物须检查以下步骤以确定反转录步骤的正确性。

A. RNA可能在贮存和（或）第一链合成的过程中发生降解。起始反应物中低品质的RNA将会降低全长cDNA合成的能力。RNA须于-70 $^{\circ}$ C贮存。工作区域、设备及溶液中都不能含有RNase

- A.
- B. 操作过程中可能使用了不适宜的孵育温度或是遗漏了某一或某些重要组分。仔细检查操作过程并重复第一链cDNA合成和PCR反应。
- C. 需优化PCR的条件及参数。基于不同的PCR仪、聚合酶或是RNA样品应该修正PCR的循环次数。如果PCR反应的平台期出现在35个循环或之后，说明PCR的反应条件并非最佳，需进行调整，并以新制备的0.5 μL（或其整数倍的）第一链产物重复PCR步骤。
- D. PCR产物量较低，或是得到的PCR产物较短。通常RNA样品浓度较低或是降解时会出现这样的结果，此外，样品中含有抑制第一链cDNA合成的物质也会产生这种现象。如果样品来源于非哺乳动物，该物种可能的确会出现类似的PCR产物。如果RNA样品来源于非哺乳动物，显然截短的PCR产物可能与该物种RNA正常大小的分布有关。以昆虫为例，正常的RNA分布就是小于2~3 kb。因此有必要在甲醛变性胶中检测试验样品RNA的含量及完整性。
- E. 样品中RNA含量较低，但品质很好时，可以通过增加反转录过程中RNA模板的含量，或是增加PCR过程中的循环次数进行优化。
- F. 在合成第一链之前的时候样品就（因含有RNA酶）存在部分降解时，需重新制备RNA，并吸取一小部分在42℃孵育2 h，再通过甲醛变性胶电泳比较样品孵育前后的状态。如果RNA在孵育过程中发生降解，也将影响第一链的cDNA合成。因而需要以其它方式重新分离RNA。多次的酚：氯仿抽提可以显著增加RNA的稳定性。
- G. 若样品中含有抑制cDNA合成的成份，以80%的乙醇洗涤两次可以除去某些水溶性成份，如果这一方法仍不奏效，需要以其它技术或RNA分离试剂盒提取RNA。
- H. 如果纯化后的双链cDNA的总量不满足后续建库要求，请按照“VII.LD PCR最佳循环次数的确定”中提供的二次PCR扩增体系进行二次PCR，以满足试验要求。
- I. 双链cDNA合成完毕后，如果在一周之内就会完成后续试验，可将双链cDNA暂存于4℃，可避免反复冻融产生的降解。

X. 参考文献

Borson, N. D., Sato, W. L. and Drewes, L. R. (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Applic.* 2:144–148.

Chenchik, A., Zhu, Y. Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. & Siebert, P. D. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR* (BioTechniques Books, MA), pp. 305–319.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. and Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695–5699.

Freier, S. M., Kierzek, R., Jaeger, J. A., Sugimoto, N., Caruthers, M. H., Neilson, T. and Tumer, D. H. (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373–9377.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).