天净沙系列

CAT#:221071

低温运输，-20℃保存

# 环状 RACE 试剂盒（PCR 法）

# Circular RACE Kit (PCR Method)

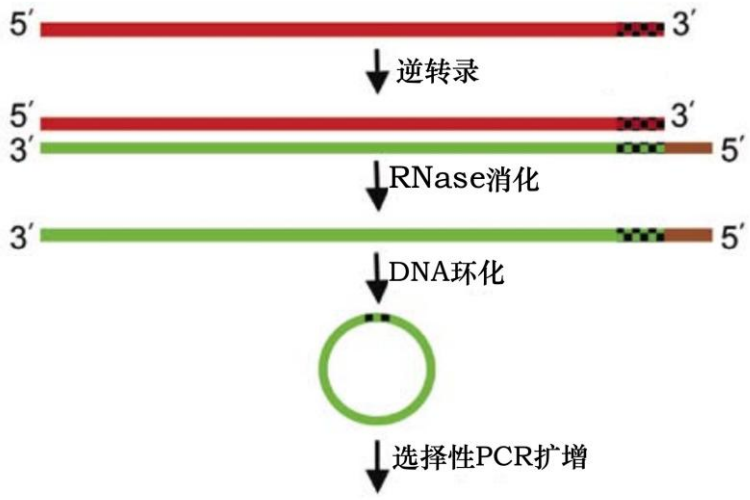
## 使用手册 V1.2

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

确定基因的转录起始位点和终止位点是研究基因结构和功能的最重要工作之一，最通用的方法是 Frohman 发明 Rapid Amplification of cDNA Ends。其用于确定转录起始位点的方法叫 5′ RACE 法，用于确定转录终点的方法叫 3′ RACE 法。它们是通过 PCR 快速克隆 cDNA 末端，在不建立 cDNA 文库的前提下，利用已知 cDNA 序列设计引物，通过向 mRNA 两端延伸和扩增获得两个末端的序列。但是要确定 RNA 两端的序列需要做两次 RACE，为克服此缺点，本公司开发了环状 RACE 试剂盒，其原理如下：




克隆、测序及分析

本产品具有下列特点：

1. 即开即用，客户只需要准备总 RNA（或 mRNA）和专一性引物，不需要单独准备其他试剂。
2. 一次实验可以同时获得 mRNA 两端的序列。
3. 通过适配子进行 cDNA 自连，不但效率高，而且测序时知晓哪里是自连位点。
4. 本产品足够 10 次环状 RACE 实验（10 次双链 cDNA 合成反应，20 次环化反应，100 次 PCR 反应）。
5. 起始材料为纯化后的 mRNA，用户需要准备两套 PCR 引物。
6. 本产品只能用于科研。

## 规格及成分

本产品采用十一孔盒加大塑料袋包装

| 成分 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 环状 RACE 溶液 A | 221071a | 20 μL | 0.5 mL 绿盖管 |
| 环状 RACE 溶液 B | 221071b | 10 μL | 0.5 mL 白盖管 |
| 环状 RACE 溶液 C | 221071c | 10 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 环状 RACE 溶液 D | 221071d | 160 μL | 0.5 mL 白盖管 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 环状 RACE 溶液 E | 221071e | 40 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 环状 RACE 溶液 F | 221071f | 10 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 微量核酸沉淀剂 | 220313 | 1.6 mL | 5 mL 本色瓶 |
| 环状 RACE 溶液 G | 221071g | 400 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 环状 RACE 溶液 H | 221071h | 40 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 2×染料法 qPCR MasterMix | 990408 | 3 mL | 5 mL 本色瓶 |
| 超纯水 | 210806 | 6 mL | 10 mL 本色瓶 |
| 使用手册 | 221071sc | 1 份 | 无 |

**运输及保存**

低温运输、-20℃保存、有效期一年。

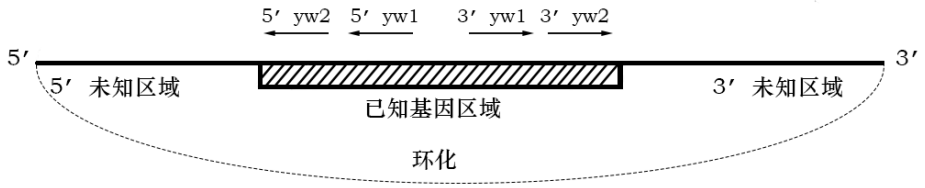
**自备试剂**

目标 RNA、基因专一性引物至少 4 条、75%乙醇。

**使用方法**

**一：引物的设计和准备工作**

1. 利用已知道序列的区域设计基因专一性引物两套，方向向外（跟常规 PCR 向反），其中在距离 5’端 10-30 个碱基设计的基因专一性引物叫 5yw2，其下游 100 多个碱基设计的另外一对引物叫 5yw1，两者同向，均向外扩增。在距离 3’端 10-30 个碱基设计的基因专一性引物叫 3yw2，其下游 100 多个碱基设计的另外一对引物叫 3yw1，两者同向，均向外扩增。Tm 最好为 58℃。引物合成后需加超纯水溶解，使其浓度为 10 μM，然后 1：1 混合后，放冰上待用。没有用完的放-20℃保存。5yw1 和 3yw1 混合得第 1 轮 PCR 引物混合液，5yw2 和 3yw2 混合得第 2 轮 PCR 引物混合液。其相对位置图如下：




**二：逆转录制备 cDNA（**需使用本试剂盒提供的步骤和试剂进行 cDNA 制备，不能使用自己制备的 cDNA**）**

2. 在一个 PCR 管中，加入以下组分：

| 成分 | 用量 |
|---|---|
| 自备样品 mRNA 或 RNA | 6 μL（0.5-2 μg） |
| 环状 RACE 溶液 A | 2 μL |
| 环状 RACE 溶液 B | 1 μL |

| | |
|---|---|
| 70℃ 2 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心 | |
| 加入环状 RACE 溶液 C | 1 μL |
| 轻柔吹打混匀后 42℃保温 90 分钟 | |
| 超纯水 | 49 μL |
| 环状 RACE 溶液 D | 16 μL |
| 环状 RACE 溶液 E | 4 μL |
| 共 79 μL。吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时，加入环状 RACE 溶液 F 1 μL，总体系 80 μL，16℃保温 5 分钟，70℃保温 5 分钟 | |

**三：沉淀法回收 cDNA**

3. 加入 160 μL 微量核酸沉淀剂，颠倒 10 次混匀后，15000×g 离心 10 分钟后小心弃上清。
4. 加入 1 mL 自备的 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，15000×g 离心 3 分钟后小心弃上清。
5. 再短暂离心 10 秒，小心吸弃残留上清（约 50 μL）。
6. 加入 40 μL 超纯水溶解 DNA 沉淀，所得溶液即为待环化 cDNA 溶液。将此溶液分成两个管，每管 20 μL，一管标为环化样本，另一管标为非环化对照。

**四：cDNA 的环化**

7. 在上述两管中（各含有 20 μL cDNA 溶液）加入以下组分：

| 成分 | 环化样本管 | 非环化对照管 |
|---|---|---|
| 超纯水 | 68 μL | 70 μL |
| 环状 RACE 溶液 G | 10 μL | 10 μL |
| 环状 RACE 溶液 H | 2 μL | 不加 |

8. 16℃保温 16 小时，65℃10 分钟，最后得环化样本原液和非环化样本原液。

**五：第 1 轮 PCR 扩增**

9. 在 3 个 PCR 管中，分别加入以下组分：

| 成分 | 1 号<br>环化模板 | 2 号<br>非环化样模板 | 3 号<br>无模板 |
|---|---|---|---|
| 超纯水 | 6 μL | 6 μL | 8 μL |
| 第 1 轮 PCR 引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| 上步所得环化样本原液 | 2 μL | - | - |
| 上步所得非环化样本原液 | - | 2 μL | - |
| 2×染料法 qPCR MasterMix | 10 μL | 10 μL | 10 μL |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 合计 | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

10. 按下列条件进行 qPCR（注：应根据自备引物的 Tm 值选择适当的退火温度，下面的参数仅仅供参考）。

    第 1 步：94℃ 5 分，48-52℃ 2 分，72℃ 4 分，设置一次循环

    第 2 步：94℃ 40 秒，52-60℃ 1 分，72℃ 3 分，设置 40 次循环，在复性步骤采集 SYBR 通道的荧光信号。

11. 如果 SYBR 荧光信号呈现倒 S 型，则在其刚达到平台时终止 PCR，即使循环数还没到设置的 40 次循环。如果 SYBR 通道没有荧光信号或到 40 次循环时荧光信号还没有到达平台，则按设置的 40 次循环进行 PCR，按时结束。

12. PCR 结束后，电泳检测。如果有清晰的、RACE 专一的扩增产物（只有 1 号管有，而 2 号和 3 号管没有的 DNA 条带），则直接胶回收、克隆、选 10 个转化子进行质粒测序。如果有多条清晰的、RACE 专一的扩增产物条带，则优先选择分子量最大的条带。如果没有 RACE 专一的扩增产物条带，则再进入下步。

**六：第 2 轮 PCR 扩增**

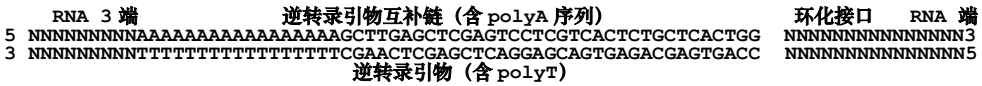
13. 在 3 个 PCR 管中设置如下反应：

| 成分 | 4 号管 | 5 号管 | 6 号管 |
|---|---|---|---|
| 超纯水 | 6 μL | 6 μL | 6 μL |
| 第 2 轮 PCR 引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| 第 1 轮 PCR 1 号管反应液 | 2 μL | | |
| 第 1 轮 PCR 2 号管反应液 | | 2 μL | |
| 第 1 轮 PCR 3 号管反应液 | | | 2 μL |
| 2×染料法 qPCR MasterMix | 10 μL | 10 μL | 10 μL |
| 合计 | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

14. 按下列参数进行 PCR：94℃ 2 分钟，(94℃ 30 秒，50℃ 30 秒，68℃ 2 分) 40 个循环，在复性步骤采集 SYBR 通道的荧光信号。

15. 如果 SYBR 荧光信号呈现倒 S 型，则在其刚达到平台时终止 PCR，即使循环数还没到设置的 40 次循环。如果 SYBR 通道没有荧光信号或到 40 次循环时还没有到达平台，则按设置的 40 次循环进行 PCR，按时结束。

16. PCR 结束后，电泳检测。如果有清晰的、RACE 专一的扩增产物条带（只有 4 号管有，而 5 号和 6 号管没有的 DNA 条带），则直接胶回收、克隆、选 10 个转化子进行质粒测序。如果有多条清晰的、RACE 专一的扩增产物条带，则优先选择分子量最大的条带。如果没有 RACE 专一的扩增产物条带，则需要将第一

| | |
|---|---|
| | 轮 PCR 得到的 3 管 PCR 产物分别稀释 10 倍，100 倍，1000 倍后，再取 2 μL 为模板进行巢式 PCR，共 9 个扩增。然后寻找 RACE 专一的扩增产物条带。<br>17. 得到专一条带克隆和测序结果后，再进入下一步。<br>**七：序列分析**<br>18. 测序得到的结果同时包含了目标 RNA 的 3 端序列、逆转录引物序列和目标 RNA 的 5 端序列，故需要根据已知的逆转录引物序列和它们的相对位置关系，先将三者分开。它们的相对位置关系如下：<br><br><br>19. 上图逆转录引物互补序列（含 polyA）左侧的区域到 3yw1 和 3yw2 引物结合位点之间的这段区域为目标 RNA 的 3 端序列。不排除逆转录引物跟 RNA 中间的富含 A 的区域结合，这样得到的序列不一定是 RNA 的 3 端，但这种情况只占少数。由于是对多个克隆进行测序，因此大多数序列还是目标 RNA 的 3 端序列。<br>20. 上图断裂处为环化位点，该位点右侧直到 5yw1 和 5yw2 引物结合位点之间的这段区域为目标 RNA 5 端的序列。<br>21. 将每个克隆得到的目标 RNA 3 端和 5 端序列跟目标 RNA 的已知序列（设计引物所使用的序列）、用户设计的 4 条 RACE 引物序列、RNA 对应的基因组 DNA 序列（如果有的话）等一起进行多重比对，确定它们彼此的相对位置和同源序列。<br>22. 如果有必要，可以用得到的新的 RNA 序列再设计新的 RACE 引物，继续用本试剂盒克隆未知区域的序列。 |
| **关联产品** | 5′ RACE 试剂盒 |