天净沙系列

CAT#:220506

低温运输，-20℃保存

改良 3′ RACE 试剂盒

Modified 3′ RACE Kit

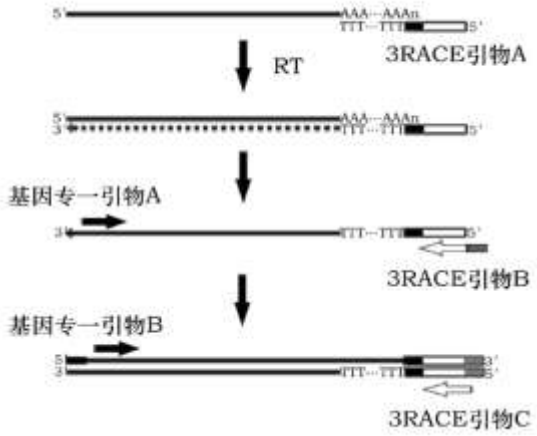
使用手册 V2.21

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。本试剂盒就是根据 RACE 技术改良后开发的确定 mRNA 3′末端的试剂盒，其原理如下:



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。
2. 非真核生物如没有 Poly A 尾巴则需自行加尾，可使用 RNA 加 polyA 尾试剂盒（编号 221185)。
3. 本产品足够 10 次 3′ RACE 实验。
4. 本产品只能用于科研

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
MMLV 逆转录酶-RI 混合液	220507a	20 μL	0.5 mL 红盖管
MMLV Buffer-dNTP 混合液	220507b	50 μL	0.5 mL 绿盖管
2×PCR MasterMix	990805	1 mL×2	2.0 mL 本色盖
3′ RACE 引物 A 干粉	Yw220506a	10 次	0.5 mL 黄盖管
3′ RACE 引物 B 干粉	Yw220506b	10 次	0.5 mL 紫盖管
3′ RACE 引物 C 干粉	Yw220506c	10 次	0.5 mL 白盖管
RNase-Free 水	980403	1 mL	2.0 mL 黄盖管
使用手册	220506sc	1 份	无

注意: 引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在 3′ RACE 引物 A 干粉离心管中加入 11

	μL 的 RNase-Free 水，在 3′ RACE 引物 B 干粉中加入 110 μL 的 RNase-Free 水，在引物 C 干粉中加入 110 μL 的 RNase-Free 水，充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。
自备试剂	mRNA（或总 RNA)、基因专一性引物 A、基因专一性引物 B、超纯水。
运输及保存	低温运输、-20℃保存、有效期一年。

使用方法

一：引物的设计和准备工作

利用已知道序列的区域设计基因专一性引物两条（A、B)，其中引物 B 和引物 A 比较，靠 3′端 10-30 个碱基，类似巢式 PCR 的引物设计。基因专一性引物的 Tm 最好跟 3′ RACE 引物 B 和引物 C 的一致，即 Tm 为 58℃。引物合成后加超纯水使其浓度为 10 μM，放冰上待用。

二：利用含 Oligo(dT)的 3′ RACE 引物 A 进行逆转录

注意：MMLV 酶使用前必须短暂离心，因为它含 50%甘油，及其粘稠，否则将取不到所需体积。如果可能，最好使用 Poly(A)RNA 作为模板。

1. 在一个 PCR 管中，加入以下组分：

成分	用量
mRNA（或总RNA)	0.2-2 μg（5 μg)
3′ RACE引物A（10 μM)	1 μL
MMLV Buffer-dNTP混合液	5 μL
RNase-Free水	补至18 μL
合计	18 μL

2. 65℃保温 5 分钟,展开 RNA 的二级结构，立即冰浴待用。
3. 在冰浴的 PCR 管中加入 2 μL MMLV 逆转录酶-RI 混合物。
4. 先 37℃保温 60 分钟，再 42℃保温 30 分钟进行逆转录反应，最后 50℃保温 10 分钟终止反应。
5. 加入 0.5 mL RNase-free 水稀释上步得到的 cDNA，冰浴待用。长期放置需要放-20℃保存。

三：利用基因专一性引物 A 和试剂盒提供的 3′ RACE 引物 B 进行第一轮 PCR

6. 用不同模板用量进行 4 个 RT 反应液（即稀释后的 cDNA 模板）设置 PCR，样品组需要设置模板用量梯度，单位：μL。

成分	梯度1	梯度2	梯度3	梯度4
稀释后的 cDNA	0 μL	1 μL	5 μL	15 μL
自备基因专一性引物 A(10 μM)	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL

3′ RACE 引物 B（10 μM）	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
98℃ 5 分变性 RNA-cDNA 杂交链，短暂离心后再加入下列成分				
2×PCR MasterMix	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL
RNase-free 水	20 μL	19 μL	15 μL	5 μL
合计	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

7. 按下列参数进行 cDNA 第二链的合成和 PCR:

   第 1 步，cDNA 第二链的合成：52-60℃ 2 分钟，72℃ 40 分钟（此步的目地是合成第二链的 cDNA，复性温度需要根据自备基因专一性引物 A 的 Tm 值决定，一般可以从 55℃开始）。

   第二步 PCR 循环 30 次：94℃ 1 分钟，52-60℃ 1 分钟，72℃ 3 分钟，循环 30 次后，最后 72℃延伸 15 分钟。PCR 扩增的复性温度需要根据自备基因专一性引物 A 的 Tm 值决定，一般可以从 55℃开始。

8. 取 5 μL PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳以确认 PCR 扩增产物。若得到目的扩增产物需要用于后续实验，请于-20℃保存；若没有得到目的扩增产物，可按下列步骤进行巢式 PCR 反应。

四：利用基因专一性引物 B 和试剂盒提供的 3′ RACE 引物 C 进行巢式 PCR 反应

9. 将上轮 PCR 产物（4 管）用水稀释约 20 倍（在 50 μL PCR 反应液中加入 1 mL 自备的超纯水），然后分别作为模板进行巢式 PCR 扩增。PCR 反应设置如下:

成分	1-4管
2×PCR MasterMix	各 25 μL
上步得到的 PCR 反应液（稀释 20 倍后）	4 种之一 1 μL
自备的基因专一性引物 B（10 μM）	2.5 μL
试剂盒提供的 3′ RACE 引物 C（10 μM）	2.5 μL
超纯水	补至 50 μL

10. PCR 反应。按下列条件进行 PCR:

    第 1-30 次循环：94℃ 1 分钟，52-60℃ 1 分钟，72℃ 3 分钟（复性温度需要根据自备基因专一性引物 B 的 Tm 值进行优化，一般可以从 55℃开始）。最后延伸：72℃ 15 分钟。

电泳检测。然后根据实验结果进行切胶回收并 TA 克隆，选 5-10 个单菌落进行测序。

关联产品	5′ RACE 试剂盒