天净沙系列

CAT#:220507

低温运输，-20℃保存

改良 5′ RACE 试剂盒

Modified 5′ RACE Kit

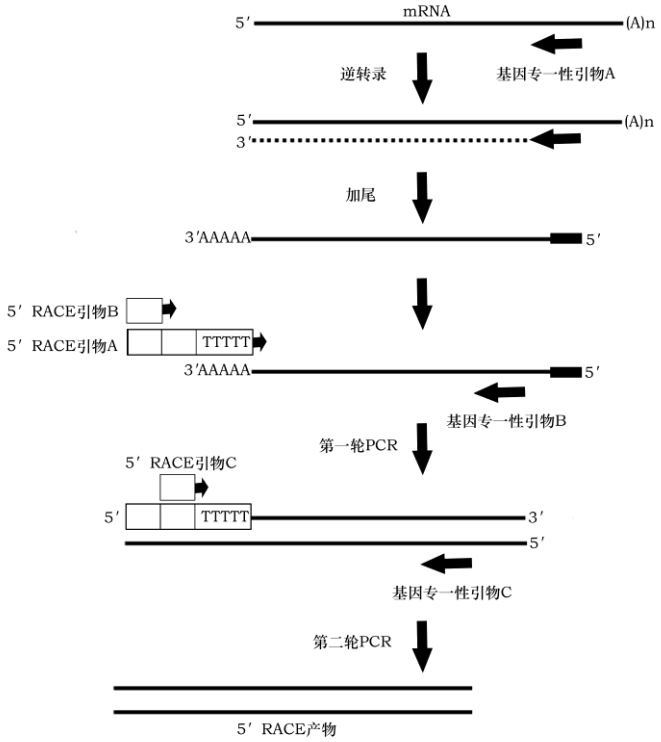
使用手册 V1.02

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 发明的 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 技术开发的确定 mRNA 5′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，不用准备其他试剂。
2. 反应条件经过精心优化，不需要用户辛苦摸索条件。
3. 本产品足够 10 次 5′ 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 蓝盖管
MMLV Buffer-dNTP 混合液	220507b	50 μL	0.5 mL 黄盖管
微量核酸沉淀剂	220313	400 μL	0.5 mL 绿盖管
2×TdT Buffer（含 dATP）	220507c	200 μL	0.5 mL 橙盖管
TdT（末端转移酶）	220507d	10 μL	0.5 mL 红盖管

	2×PCR MasterMix | 990805 | 1 mL×2 | 1.5 mL 本色管 5′ RACE 引物 A-引物 B 混合干粉 | Yw220507ab | 10 次 | 0.5 mL 紫盖管 5′ RACE 引物 C 干粉 | Yw220507c | 10 次 | 0.5 mL 白盖管 RNase-Free 水 | 980403 | 1 mL | 1.5 mL 蓝盖管 使用手册 | 220507sc | 1 份 | 无 注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在 5′ RACE 引物 A-引物 B 混合液干粉离心管中加入 220 μL 的 RNase-Free 水，在 5′ RACE 引物 C 干粉离心管中加入 220 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、B、C、75%乙醇。注意：自备的基因专一性引物 A，B，C 的相对位置必须跟本手册产品介绍中的示意图一致。
运输及保存	低温运输、-20℃保存、有效期一年。
使用方法	1. 变性模板 RNA:将 1 μg mRNA 或 5 μg 总 RNA 加入到一个 RNase-Free 的塑料管中，补 RNase-Free 水到 11 μL，65℃保温 5 分钟打开 RNA 的二级结构后短暂离心，立即放冰上待用。如果 RNA 浓度偏低，加 RNase-Free 水之前体积就已超过 10 μL,则需要使用核酸浓缩剂（需另购）浓缩到所需的体积。 2. 在塑料管中按顺序加入:2 μL 自备的基因专一性引物 A(浓度为 10 μM),5 μL MMLV Buffer-dNTP 混合液，2 μL MMLV 逆转录酶-RI 混合液，总体积为 20 μL，轻柔吹打混匀。 3. 37℃保温 60 分钟，42℃保温 30 分钟，50℃保温 10 分钟，最后 75℃保温 10 分钟使逆转录酶变性，短暂离心 5 秒后待用。 4. 在塑料管中加入 40 μL 微量核酸沉淀剂（含不溶的核酸助沉剂，用前需要充分摇匀再取用)，震荡混匀。 5. 室温 12000×g 离心 15 分钟，沉淀即为 cDNA。小心吸弃上清。此步沉淀可以去除多余的 dNTP，它们会严重干扰后续的 TdT 加尾反应。 6. 加入 1 mL 自备 75%乙醇，室温 12000×g 离心 5 分钟，小心吸弃上清。此步洗涤可以洗去逆转录反应中残留的 dNTP，它们会严重干扰后续的 TdT 加尾反应。 7. 短暂离心数秒，小心吸弃残留液体（约 50 μL)，晾干 2 分钟。 8. 加入 20 μL RNase-Free 水，充分吹打溶解 cDNA 沉淀。注意：为保证加尾效率，溶解 cDNA 的 RNase-Free 水最好不要超过 20 μL，否则 cDNA 模板浓度太稀。 9. 在两个塑料离心管中按下表设置加尾反应: 成分 | 加尾样品管 | 加尾阴性对照管

cDNA溶液（上步所得）	9 μL	9 μL
2×TdT Buffer（含dATP）	10 μL	10 μL
RNase-Free水	不加	1 μL
TdT酶	1 μL	不加

10. 37℃保温 15 分钟进行加尾反应，然后 75℃保温 3 分钟灭活末端转移酶。
11. 在两个反应管中各加入 0.5 mL RNase-Free 水稀释样品，此 250 倍稀释液将作为下步 PCR 的模板。
12. 第一轮 PCR：按下表分别使用不同体积的样品稀释液设置四个 50 μL 的 PCR 反应，客户还需要按下表设置四个以阴性对照稀释液做模板的 PCR 反应，只是将表中的样品管稀释液改成阴性对照稀释液。共 8 个 PCR 样品。

成分	梯度1	梯度2	梯度3	梯度4
PCR MasterMix	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL
自备基因专一性引物 B（10 μM）	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
5′ RACE 引物 A-引物 B 混合液	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
样品管稀释液	1 μL	5 μL	10 μL	15 μL
RNase-Free 水	19 μL	15 μL	10 μL	5 μL

13. 按下列条件进行 PCR(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)。自备引物需遵循通用标准，如无二聚体，无连续的 G 等，但 Tm 最好与提供的 5′ RACE 引物 A-引物 B（Tm 为 57℃）接近，不超过 2 度。
14. 第 1 次循环：94℃ 5 min，48-52℃ 2 min，72℃ 4 min
    第 2-30 次循环：94℃ 40 sec，52-60℃ 1 min，72℃ 3 min
    最后延伸：72℃ 15 min
15. 直接取 20 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳检查 PCR 结果(样品组 4 个样，阴性对照组 4 个样)。如果样品有一条清晰的扩增条带，并且阴性对照在相应的位置没有扩增产物，则可以不做后续的第二轮 PCR，直接进行 DNA 测序或切胶克隆。如样品没有任何一条清晰的扩增条带，则进入第二轮 PCR。
16. 第二轮 PCR：从 8 管 PCR 产物中各取 1 μL 分别加入到 20 μL RNase-Free 水中进行稀释 20 倍，再各取 1 μL 分别作为第二轮 PCR 的模板，再加入 25 μL PCR MasterMix，2.5 μL 5′ RACE 引物 C（Tm 为 57℃），2.5 μL 自备基因专一性引物 C（10 μM），补水到共 50 μL。
17. 按下列条件进行 PCR：第 1-30 次循环(94℃ 40 sec，52-60℃ 1 min，72℃ 3 min)，最后延伸：72℃ 15 min

	18. 直接取 20 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳，一般会有至少一个样品有清晰的条带出现，则可以直接进行 DNA 测序或 TA 克隆。
关联产品	改良 3′-RACE 试剂盒