天净沙系列

CAT#:221071-3（原 221088）
低温运输，-20℃保存

天净沙

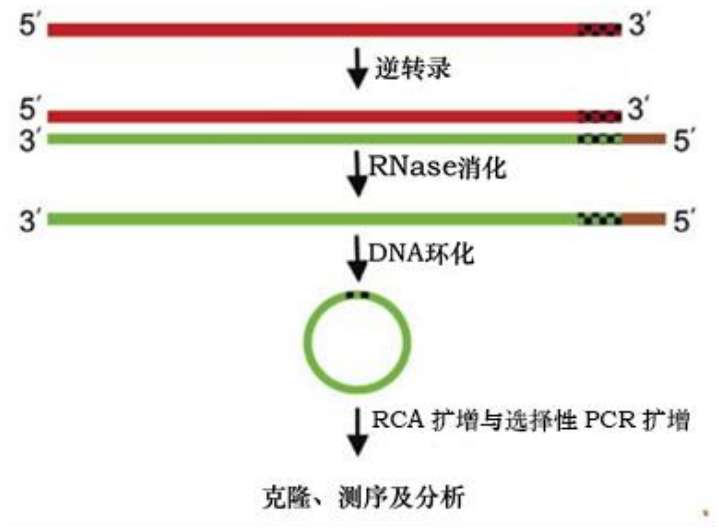
环状 RACE 试剂盒（RCA-PCR 法）
Circular RACE Kit（RCA-PCR）

使用手册 V1.0

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

本产品是在环状 RACE 基础增加滚环扩增（Rolling Circle Amplification，RCA）步骤而成，它极大提高了靶分子在后续 PCR 扩增中的成功率。滚环扩增 RACE 的原理示意图如下：



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 和一对专一性 PCR 引物。
2. 通过 RCA 对环化 cDNA 进行扩增富集，极大地提高了实验成功率。
3. 一举两得，一次实验可以同时获得已知序列 5 端和 3 端的未知序列。
4. 每次实验需要至少 3 μg 总 RNA 或 0.3 μg mRNA。RNA 靶分子必须含 polyA 尾巴。如果不含，则需要用 polyA 加尾酶预先处理（本试剂盒不含相关试剂，但可以从本公司另购）。
5. 本产品足够 10 次环状 RACE 实验（10 次 cDNA 合成，20 次 DNA 环化，20 次 RCA，100 次 PCR）。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品成份采用带 Logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
221071-3 第 1 部分	221071-3pt1	1 套	11 孔盒
微量核酸沉淀剂	220313	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	221071-3sc	1 份	无

221071-3 第 1 部分，11 孔盒包装，保存温度为-20 摄氏度

成分	编号	规格	包装
MMLV（含 RI）	960906a	10 μL	0.5 mL 红盖管
4×RT Buffer（含 dNTP）	960906b	50 μL	0.5 mL 绿盖管

RCA-RACE 专用 RT 引物	Yw221071-3	10 T	0.5 mL 黄盖管
大肠杆菌 RNase H	221186	10 μL	0.5 mL 红盖管
DNA 环化反应液 A	221004a	200 μL	0.5 mL 蓝盖管
DNA 环化反应液 B	221004b	25 μL	0.5 mL 红盖管
DNA 环化酶	221004c	20 μL	0.5 mL 紫盖管
phi29 DNA 聚合酶	221198	25 μL	0.5 mL 红盖管
4×染料法实时 RCA MasterMix	221080a	125 μL	0.5 mL 绿盖管
RCA 专用随机引物	220225	20 T	0.5 mL 白盖管
2×染料法 qPCR MasterMix	990408	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	221071-3sc	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 2 条、75%乙醇、超纯水。

使用方法

一：逆转录制备 cDNA

1. 利用已知序列设计基因专一性引物 F 和 R，引物方向均朝外，跟常规 PCR 引物相反。引物的 Tm 最好为 58℃。使用前加自备超纯水溶解使其浓度为 10 μM，并按 1：1 混合得引物 FR 混合液。引物 F，引物 R 和引物 FR 混合液均放冰上待用。没有用完的引物需要放-20℃保存。
2. 制备 RCA-RACE 专用 RT 引物：首次使用本试剂盒时，需要短暂离心装有本引物干粉的离心管，加入 50 μL 自备超纯水，涡旋 30 秒混匀，发冰上待用。没有用完的引物需要放-20℃保存。
3. 制备 RCA 专用随机引物：首次使用本试剂盒时，需要短暂离心装有本引物干粉的离心管，加入 100 μL 自备超纯水，涡旋 30 秒混匀，发冰上待用。没有用完的引物需要放-20℃保存。
4. 在一个 PCR 管中，加入 3 μg 总 RNA 或 0.3 μg mRNA、5 μL RCA-RACE 专用 RT 引物、补自备超纯水使最后体积为 14 μL。70℃ 5 分钟后放冰上 2 分钟。再加入 5 μL 4×RT Buffer（含 dNTP)、1 μL MMLV 逆转录酶（含 RI)，轻柔吹打混匀后 42℃逆转录 90 分钟，70℃保温 10 分钟终止反应。最后再加入 1 μL 大肠杆菌 RNase H，37℃保温 20 分钟。

二：cDNA 回收及环化

5. 在上步反应管中加入 100 μL 微量核酸沉淀剂（用前颠倒摇晃 10 次混匀，溶液可能浑浊，可以放心使用)，涡旋震动 10 秒混匀，14000×g 离心 10 分钟，用

移液枪小心吸去上清，不要吸走微小的管底沉淀。

6. 在管中加入 1 mL 自备的 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，14000×g 离心 3 分钟后用移液枪小心弃上清。
7. 短暂离心 10 秒，用移液枪小心吸弃残留上清（约 50 μL）。
8. 加入 40 μL 超纯水吹打溶解 cDNA 沉淀，然后分别取 12.75 μL cDNA 溶液转入到两个新的 1.5 mL 离心管，分别标注为 1 号（环化反应用）和 2 号（线性对照用）。
9. 设置环化反应：在 1 号管中加入 10 μL DNA 环化反应液 A，1.25 μL DNA 环化反应液 B、1 μL DNA 环化酶。在 2 号管中，除用 1 μL 自备超纯水替代 DNA 环化酶外，其余相同。将两个反应管 60℃保温 1 小时，80℃保温 10 分钟，放冰上待用。

三：环化 DNA 回收及 RCA

10. 在反应管中各加入 100 μL 微量核酸沉淀剂，涡旋震动 10 秒混匀，14000×g 离心 10 分钟，用移液枪小心吸去上清，不要吸走微小的管底沉淀。
11. 在管中加入 1 mL 自备的 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，14000×g 离心 3 分钟后用移液枪小心弃上清。
12. 短暂离心 10 秒，用移液枪小心吸弃残留上清（约 50 μL）。
13. 各加入 40 μL 超纯水到两个管中溶解 DNA 沉淀，放冰上待用。
14. 设置 RCA 反应：在标注为 3 号和 4 号的两个管中各加入 5 μL 自备超纯水、4 μL RCA 专用随机引物、5 μL 4×染料法 RCA MasterMix、1 μL Phi29 DNA 聚合酶。最后在 3 号管中加入 1 号管样本 5 μL，在 4 号管中加入 2 号管样本 5 μL。
15. RCA 扩增：将 3 号和 4 号两个反应管放荧光定量 PCR 仪器上 30℃保温 16 小时，每 1 分钟采集 1 次 SYBR 通道的荧光信号作为参考。反应结束后 65℃保温 10 分钟灭活酶。注意：由于 phi29 DNA 聚合酶有很强的 3-5 外切酶活性， 因此 RCA 反应结束后必须 65℃灭活此酶，否则它将逐渐降解已经扩增的 DNA。
16. RCA 结果分析：如果 3 号管的扩增曲线有增高，而 4 号管的扩增曲线是平线，说明 RCA 扩增成功，可以进入后续实验。如果 3 号管没有扩增曲线或/和 4 号管有扩增曲线，均属于异常，需要分析原因或跟厂家联系，找到原因后才能继续后续实验。
17. 稀释 RCA 产物：标记 E1、E2、直到 E5 共五个离心管，各加入 45 μL 超纯水，将 5 μL 3 号管的 RCA 反应液加入到 E1 管中，涡旋振荡 30 秒，得到

RCA 产物的 10 倍稀释液。再将 5 μL E1 管中的 10 倍稀释液加入到 E2 管中，涡旋振荡 30 秒，得到 RCA 产物的 100 倍稀释液。重复此操作直到得到 E5 管中的稀释液。此为环状模板 RCA 产物梯度稀释液。放冰上待用。线状模板 RCA 只作为 RCA 对照，其作用已经完成，不需要稀释。

四：PCR 扩增

18. 每个 RCA 产物稀释液均需要用 F、R 和 FR 引物进行 PCR，故共有 6×3=18 个 PCR 反应。由于空间有限，下面以原液和 E1 稀释液为例说明反应的设置：

成分	原 F	原 R	原 FR	E1F	E1R	E1FR
超纯水	7 μL	77 μL	6 μL	7 μL	7 μL	6 μL
F 引物	1 μL	-	1 μL	1 μL	-	1 μL
R 引物	-	1 μL	1 μL	-	1 μL	1 μL
2×染料法 PCR Mix	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
RCA 原液	2 μL	2 μL	2 μL	-	-	-
E1 稀释液	-	-	-	2 μL	2 μL	2 μL
合计	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

19. 将 18 个 PCR 管放入荧光 PCR 仪器中，按下列条件进行 qPCR。

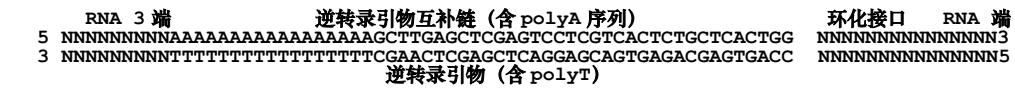
    第 1 轮 PCR：94℃ 5 分，48℃ 2 分，72℃ 4 分，设置一次循环。

    第 2 轮 PCR：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。本处只列出复性温度范围，具体多少应根据自备的 PCR 引物的 Tm 值决定，一般选择 Tm-5。

20. 电泳回收：选择只有 FR 引物管才出现的特异扩增条带进行胶回收和克隆，同时在只加 F 或 R 引物出现的 PCR 片段均为非特异扩增。如果有多个特异扩增条带，优先选择分子量最大的。克隆后选 10 个转化子进行质粒测序。

五：序列分析

21. 特异性的 PCR 产物将由 3 端未知区、5 端未知区和逆转录引物序列组成，故可利用此引物序列进行定位。它们的相对位置关系如下：



22. 将每个克隆得到的 3 端序列和 5 端序列跟已知序列（设计引物所使用的序列）、用户设计 F 和 R 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。由于逆转录引物可能会跟位于 RNA 中间的富含 A 的区域结合进行逆转录，故需要挑选多个克隆来进行测序比对来重点排除这些假 3 端序列。
关联产品	环状 RACE 试剂盒