

TransScript[®] 5'/3' RACE Kit

5'/3' RACE扩增试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 2.0



目录号: AR101

保存: 5' RACE TS Oligo II于-70℃及其以下温度下保存两年, 其他组份-18℃及其以下温度下保存两年。

产品说明

TransScript[®] 5'/3' RACE Kit是以RNA为模板, 高效逆转录全长cDNA并以此为模板对基因的5'/3' 端进行高效特异扩增的试剂盒。该试剂盒包含热稳定性高、合成速度快, 且具有模板置换活性的逆转录酶和高保真快速扩增Mix, 并可根据实验需求自行选择5' RACE或3' RACE实验组分。

特点

- 各步骤反应时间短, 操作方便, 保存方便。
- 可以逆转录长达20 kb的转录本模板。
- 适用于表达量低至1.4 TPM (Transcripts Per kilobase Million) 的转录本模板。

适用范围

不同物种、不同表达量的基因特异性片段扩增。

产品组成

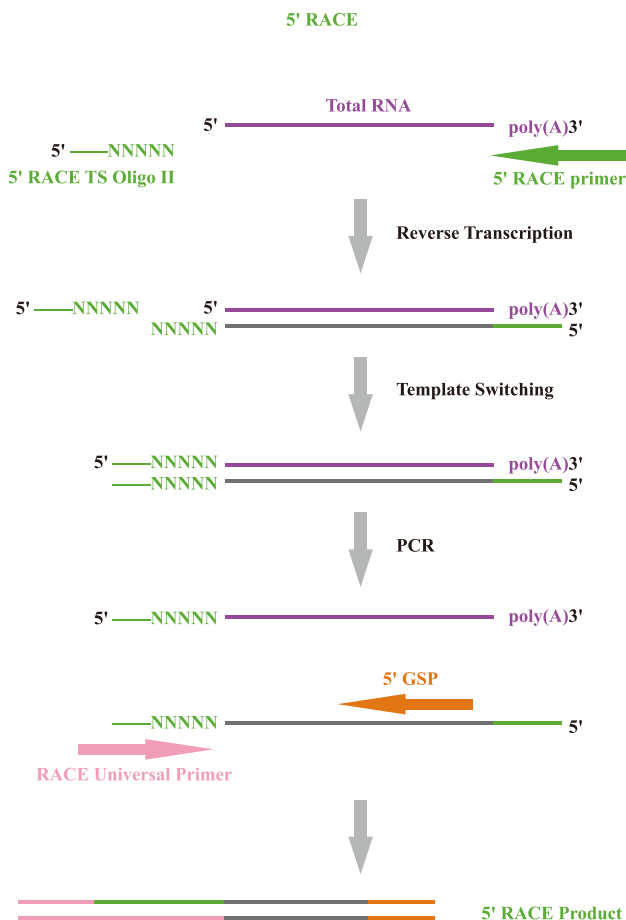
Component	AR101-01 (12 rxns)
5×RACE RT Buffer	96 µl
<i>TransScript</i> [®] RACE Reverse Transcriptase	48 µl
3' RACE Primer	24 µl
5' RACE Primer	24 µl
5' RACE TS Oligo II	12 µl
RACE Universal Primer	600 µl
RACE Nested Primer	240 µl
<i>TransStart</i> [®] RACE Amplification SuperMix II (2×)	2×1 ml
Dilution Buffer	1 ml
RNase-free Water	2×1 ml

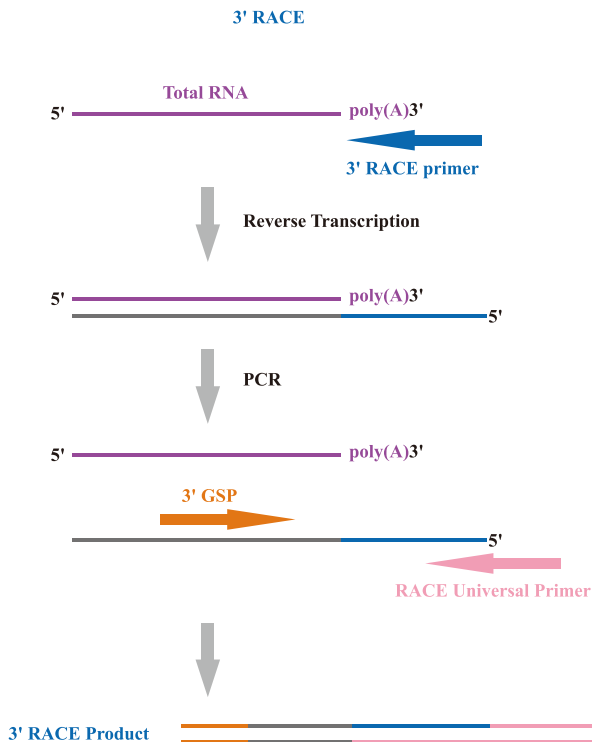
起始材料要求

推荐使用10 ng - 1 µg Total RNA进行5'/3' RACE扩增。



实验原理示意图





推荐自备试剂

- 5'/3'基因特异性引物 (5'/3' GSP)。
- 胶回收/纯化试剂: *EasyPure*[®] Quick Gel Extraction Kit (TransGen, EG101)。
- 克隆试剂: *pEASY*[®]-Blunt Cloning Kit (TransGen, CB101)。
- 转化试剂: *Trans1*-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell (TransGen, CD501) ; Ampicillin (TransGen, GG101) ; *TransCult*[®] LB Agar Plate (Ampicillin) (TransGen, CP111)。
- 菌液PCR试剂: *2×EasyTaq*[®] PCR SuperMix (+dye) (TransGen, AS111)。



操作步骤

1、基因特异引物的设计原则

- (1) 引物长度：23 - 28个核苷酸，较长的引物会提高扩增产物的特异性。
- (2) 引物GC含量为50% - 70%； T_m 值 $\geq 65^\circ\text{C}$ ，若 $> 70^\circ\text{C}$ 使用Touch Down PCR。
- (3) 针对同一待测转录本可设计多条GSP，以提高扩增成功率。
- (4) 建议RACE扩增产物不超过2kb，尤其是对于较长($> 10\text{ kb}$)或表达量较低的转录本，GSP尽量靠近cDNA末端。
- (5) 当同一转录本有多条GSP时，可以选择更靠近cDNA末端的GSP为NGSP（巢式GSP）。若扩增效果仍然欠佳，则让NGSP的5'末端与GSP的3'末端有~10 nt的重叠，以提高二轮巢式扩增时的特异性。
- (6) 设计完成的GSP/NGSP经Blast比对无法匹配到其他基因序列。

2、RNA完整度的鉴定

使用琼脂糖凝胶电泳检测或2100等方式检测total RNA的完整度。

3、全长cDNA合成

- (1) 提前取出所有cDNA合成的逆转录组分，完全化冻后置于冰上暂存。

注意：5' RACE TS Oligo II完全化冻后轻弹管壁混匀，不要涡旋。

- (2) 冰上加入以下体系。

5' RACE逆转录体系：

Component	Volume
Total RNA	10 ng - 1 μg
5' RACE Primer	2 μl
5' RACE TS Oligo II	1 μl
5 $\times$ RACE RT Buffer	4 μl
<i>TransScript</i> [®] RACE Reverse Transcriptase	2 μl
RNase-free Water	up to 20 μl
Total volume	20 μl

3' RACE逆转录体系：

Component	Volume
Total RNA	10 ng - 1 μg
3' RACE Primer	2 μl
5 $\times$ RACE RT Buffer	4 μl
<i>TransScript</i> [®] RACE Reverse Transcriptase	2 μl
RNase-free Water	up to 20 μl
Total volume	20 μl

- (3) 移液枪吹吸混匀，最后点甩离心。

- (4) 置于PCR仪中反应，程序如下。

50 $^\circ\text{C}$ 60 min

85 $^\circ\text{C}$ 5 sec

4 $^\circ\text{C}$ Hold



(5) 产物稀释。根据自行需求（如扩增的基因表达量较高等），用试剂盒自带的Dilution Buffer对cDNA产物进行稀释。稀释梯度可以自行调整，如1 µg Total RNA对应的cDNA产物建议稀释10倍后作为下一步的模板使用。

4、cDNA末端快速扩增（RACE）

(1) 冰上加入以下体系*。

Component	Volume
5' RACE-cDNA / 3' RACE-cDNA（上步产物）	2.5 µl
5' GSP / 3' GSP（10 µM）**	1 µl
RACE Universal Primer	5 µl
TransStart® RACE Amplification SuperMix II（2×）	25 µl
RNase-free Water	16.5 µl
Total volume	50 µl

*可以添加GSP / RACE Universal Primer单引物对照组，以区分非特异扩增产物。

**注意区分cDNA来源。5' RACE-cDNA对应5' GSP；3' RACE-cDNA对应3' GSP。

(2) 移液枪吹吸混匀，最后点甩离心。

(3) PCR扩增程序如下。

GSP的T_m值为60-70℃：

98℃ 1 min
 98℃ 10 sec
 68℃ 15 sec
 72℃ 30 sec*
 72℃ 5 min
 4℃ Hold

25 cycles**

GSP的T_m值≥70℃：

98℃ 1 min
 98℃ 10 sec
 72℃ 30 sec*
 98℃ 10 sec
 70℃ 15 sec
 72℃ 30 sec*
 98℃ 10 sec
 68℃ 15 sec
 72℃ 30 sec*
 72℃ 5 min
 4℃ Hold

5 cycles
 5 cycles
 25 cycles**

*当目的扩增产物 > 3 kb时，可以将72℃延伸时长调整至1分钟。

**如若目的条带较弱，可以适当延长循环数。

(4) 巢式PCR（可选）：如一次扩增效果不好，可以用NGSP进行巢式PCR。冰上加入以下体系。注意巢式PCR最好为1次，不要超过2次。

Component	Volume
上一轮扩增产物	1 µl
5' NGSP / 3' NGSP（10 µM）	1 µl
RACE Nested Primer	1 µl
TransStart® RACE Amplification SuperMix II（2×）	25 µl
RNase-free Water	22 µl
Total volume	50 µl



吹吸混匀且点甩离心后，置于PCR仪中反应，程序请参照上一轮PCR。

5、目的条带的纯化、鉴定

推荐使用*EasyPure*[®] Quick Gel Extraction Kit (TransGen, EG101) 或其他等效产品对目的片段进行胶回收纯化，之后对纯化的产物进行一代测序鉴定。具体操作步骤详见其说明书。

注意事项

- 一定要按引物设计原则设计引物，否则很难扩增出理想条带。
- 需对设计的GSP/NGSP进行Blast比对，若匹配其他基因序列易造成非特异扩增。
- 建议一开始使用100 ng total RNA进行尝试。
- 操作前必须检测RNA的完整度，一定要使用完整度很高的total RNA为起始模板。
- 5' RACE和3' RACE在逆转录环节使用的引物完全不同，颜色有区分，请勿错拿。
- 5' RACE TS Oligo II在加样完应立即合盖并尽快放回-70℃保存。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202606

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

