



AccelerRT® 5' RACE Kit

——用于 5' RACE 逆转录和扩增

Cat. No: PC060 (10 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城

掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@igenebio.com

网址: www.genecopoeia.com (英文)

www.igenebio.com (中文)

AccelerRT® 5' RACE Kit

- I. 产品描述
- II. 产品组分及存储
- III. 实验前准备
- IV. 实验过程
- V. 疑难解答
- VI. 使用许可与质量保证

I. 产品描述

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 即 cDNA 末端快速扩增技术, 是以部分区域已知序列为起点, 对未知基因的 cDNA 末端快速扩增技术。AccelerRT® 5' RACE Kit 以 10 ng -1µg 总 RNA 为模板高效逆转全长 cDNA, 并以 cDNA 为模板快速扩增其 5'末端。

进行 5' RACE 时, 利用反转录酶的模板转换活性 (Template-switching), 在 RNA 的 5' 末端添加接头, 无需 Adaptor 连接等步骤; PCR 扩增体系使用 2× PCR Amplification Mix, 具有扩增长片段或高 GC 含量等复杂片段扩增能力, 同时具有较高的特异性可减少 RACE 实验中的弥散现象。

本试剂盒包含优化后的 5' RACE 反应的所有试剂, 不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他的等效产品替换本试剂盒中组分, 以免获得不好的结果。如需替换, 请先进行验证。

产品优势

- 1) 操作方便, 不需要 Adaptor 连接步骤;
- 2) 5' RACE RT Mix 具有较强的反转录能力和模板转换活性, 可有效获得 5'RACE 片段;
- 3) 2× PCR Amplification Mix 具有较强的扩增能力和保真度, 可获得正确的目的片段;
- 4) 该产品可用于模板为 10ng~1µg 的总 RNA 或 poly A⁺ RNA。

II. 产品组分及存储

Cat. No: PC060 (10 reactions)

产品信息	组分	组分货号	规格	储存温度
PC060 (10 reactions)	5' RACE TS Oligo (20 µM)	PC060-01	10µl	-20℃ 保存 1 年
	RNase Inhibitor (25 U/µl)	PC060-02	10µl	
	5' RACE RT Primer	PC060-03	10µl	
	5× RACE RT Buffer	PC060-04	40µl	
	5' RACE RT Mix	PC060-05	10µl	
	5' Random Primer(20 µM)	PC060-06	10µl	
	2× PCR Amplification Mix	PC060-07	650µl	
	10× Universal Primer Mix	PC060-08	100µl	
	Short PCR Primer (10 µM)	PC060-09	50µl	
	dNTP Mix (25mM)	PC060-10	10µl	
	Dilution Buffer	PC060-11	1ml	
	ddH2O (RNase/DNase free)	QP006-07	1ml	

III. 实验前准备

■ 防污染要求

- 1) 试剂盒检测灵敏度高，需要避免实验交叉污染，建议 cDNA 合成与 PCR 反应的实验区域分开，并定期清洁实验区域。
- 2) 为了防止 RNA 降解，用于实验反应过程的溶液试剂、器具、枪头、离心管等尽量 DEPC 水处理，并在高压灭菌后再使用；做实验时戴上一次性手套，实验过程中避免说话。
- 3) 避免实验样品交叉污染，建议使用带滤芯的无核酸酶污染的枪头，吸取不同组分更换枪头，实验结束后用 75%乙醇擦拭移液枪和桌面。
- 4) 首次实验，避免环境污染导致结果出现假阳性，建议设计阴性对照。

■ 样本要求

RNA 样品

为了获得最佳结果，请使用高质量的 Poly(A) RNA 和完整性高且纯度高的总 RNA 样本。请确保 RNA 不含污染物，如残留的蛋白质、有机溶剂和盐，这些污染物会使 RNA 降解或者降低酶的活性和敏感性。实验前可用 Agilent RNA 6000 Pico Kit 对 RNA 完整性进行评估，琼脂糖凝胶电泳检测：观察是否有完整 rRNAs 条带，真核 RNA 的 28S:18S≥1 的 RNA；2100 检测：评估 RIN 值，建议使用 RIN≥7 的 RNA。有需求可购买 PC061AccelerRT® 5' RACE Control Kit 进行测试。

■ 自备材料

- 1) 5' GSP: PCR 5'基因特异引物;
- 2) 胶回收/纯化试剂盒: QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (货号#28704)、Omega 纯化试剂盒 E.Z.N.A®. Cycle-Pure Kit (货号 D6492) 或其他等效产品;
- 3) 克隆试剂盒: 本公司 SmartJoin™ 平末端靶点 PCR 克隆试剂盒 (GeneCopia # IC007) 或其他平末端克隆试剂盒;
- 4) 转化试剂: 本公司 DH5α 感受态细胞 (GeneCopia #CC001)或其他等效产品;
- 5) 其他材料: 0.2mL PCR 管、低吸附 1.5mL EP 管、ddH₂O;
- 6) RACE 扩增相关试剂: 本公司 2× UltraHiPF® PCR Mix (GeneCopia #PC033)或其他等效产品。

■ GSP引物设计原则

- 1) 引物长度: 建议使用长度为 23~28nt 的引物, 不建议超过 30 个核苷酸;
- 2) GC 含量: 在 50%~70%之间;
- 3) Tm 值: 保证特异性退火, 应保证引物 Tm 值≥65℃; 如果 Tm 值>70℃, 请使用 Touchdown PCR 程序进行 PCR, 如引物 Tm 值<65℃, 需要调整反应条件退火温度;
- 4) 较长转录本: 引物尽量靠近 5'端设计, 建议 PCR 扩增产物不超过 3kb;
- 5) GSP 引物应与 10× Universal Primer Mix 的 3'端不互补

Long primer:

5'-CATACATTCACATACGTAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Short primer:

5'-CATACATTCACATACGTAGGGC-3'

6) Nested gene specific primer(NGSP)设计原则

长度、GC 含量、Tm 值: 与 GSP 设计原则;

设计位置: NGSP 应设计在靠近 GSP 位置的 3'末端, 建议 NGSP 的 5'末端不与 GSP 引物重叠。

IV. 实验过程

实验原理

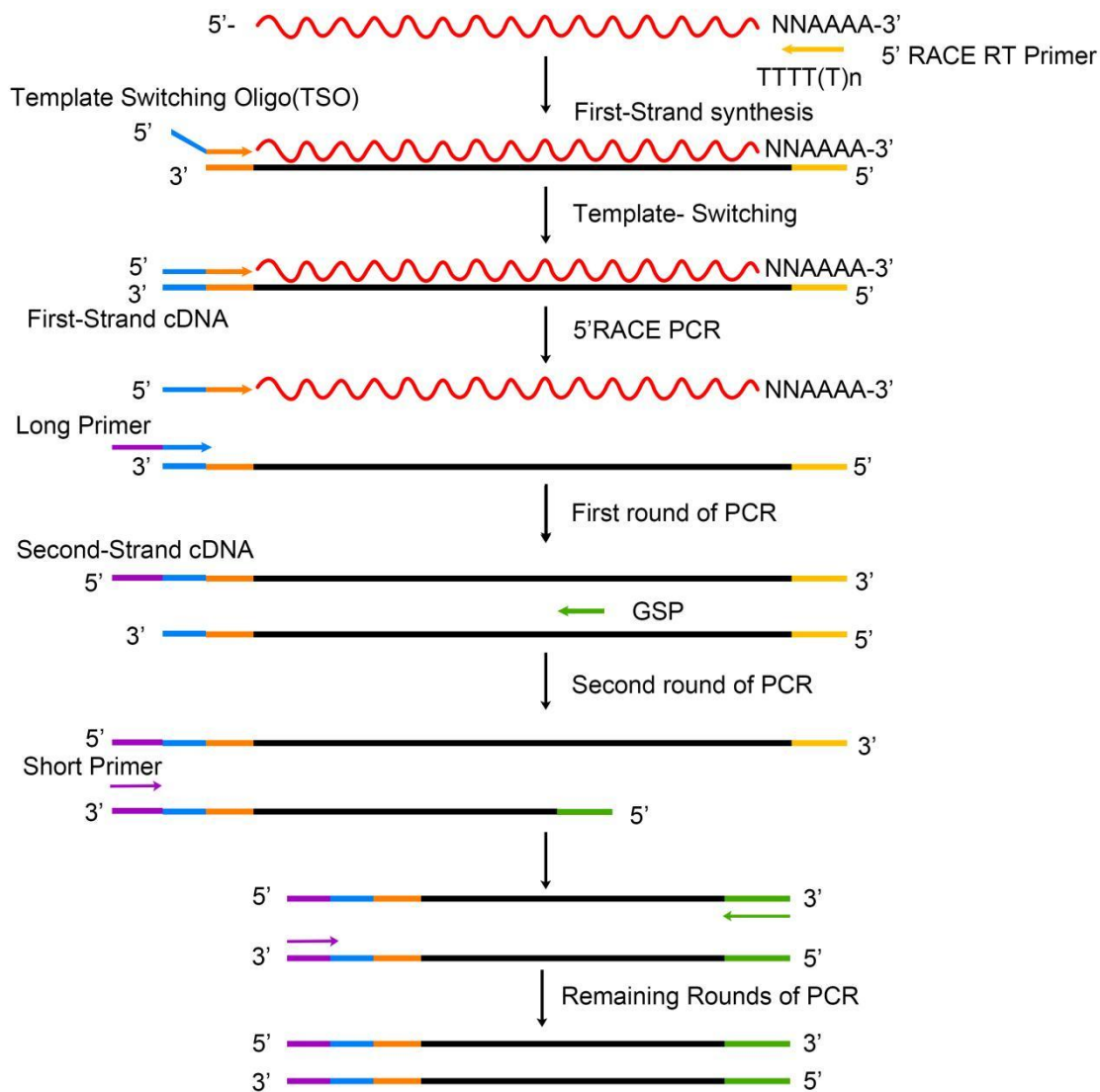


图 1. 5'RACE 扩增原理示意图

实验操作

1. 逆转录试剂配置

- 1) 将反应所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心收集后置于冰上。
- 2) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分，形成 **Mix1**。

组分	体积
RNA	10ng~1µg
5' RACE RT Primer ^{*a}	1µl
dNTP Mix (25mM)	1µl
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	add to 10 µl

^{*a} 如果转录本无 Poly (A)尾，使用 5' Random Primer 替换 5' RACE RT Primer

- 3) 混匀，瞬离。
- 4) 72℃孵育 3min，反应完成后立刻放在冰上。
- 5) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分，形成 **Mix2**。

组分	体积
5× RACE RT Buffer	4 µl
RNase Inhibitor (25 U/µl)	1 µl
5' RACE RT Mix	1 µl
5' RACE TS Oligo(20 µM)	1 µl
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	3 µl
Total	10 µl

- 6) 混匀，瞬离。
- 7) 将 **Mix2** 加入 **Mix1** 中，混匀离心。

2. 逆转录反应

按照以下条件进行孵育。

温度	时间
42℃	90 min
85℃	5 min
4℃	∞

◎暂停点：样本可在-20℃保存。

3. PCR 反应

- 1) 将反应所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心收集后置于冰上。
- 2) cDNA 稀释参考：

起始模板	cDNA 产物	Dilution Buffer ^{*b}
≤200ng RNA	10 µl	10 µl
>200ng RNA	10 µl	40 µl
Poly A RNA	10 µl	40 µl

*b 稀释倍数需要根据起始 RNA 量及目的基因丰度进行调整。

3) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分（所有操作在冰上进行）。

组分	5'RACE	UPM 单引物对照 (可选)	GPS 单引物对照 (可选)
2× PCR Amplification Mix	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
10× Universal Primer Mix	2.5 μl	2.5 μl	-
5' GSP (10 μM)	1 μl	-	1 μl
cDNA	2 μl	2 μl	2 μl
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	Up to 25 μl	Up to 25 μl	Up to 25 μl

4) 短暂离心，确保反应液中无气泡且均置于 PCR 反应管底部。

5) 根据下表设置 PCR 程序进行反应（以 Takara PCR 仪推荐的反应程序为例）。

程序 1: GSP 的 T_m 值为 60~70℃

温度	时间	循环数
98℃	2 min	1
98℃	10 sec	20~25 ^{*d}
63~68℃ ^{*e}	10 sec	
72℃	3min ^{*c}	
72℃	5 min	1
4℃ ∞		

程序 2: GSP 的 T_m 值≥70℃ (Touchdown PCR)

温度	时间	循环数
98℃	2 min	1
98℃	10 sec	5
72℃	3min ^{*c}	
98℃	10 sec	5
70℃	10 sec	
72℃	3 min ^{*c}	
98℃	10 sec	20~25 ^{*d}
68℃	10 sec	
72℃	3 min ^{*c}	
72℃	5 min	1
4℃ ∞		

*c: 如果扩增片段≤3kb, 延伸时间设置为 3min 即可, 如果扩增片段>3kb, 每增加 1kb, 延伸时间增加 1min.

*d: 如果扩增目的条带较弱, 可适当增加最后扩增的循环数。

*e: 如果特异引物 T_m 值小于 65℃, 程序 1 的退火温度 68℃需要适当调整, 退火温度不能超过 T_m+3℃, 若购买了 PC061 AccelerRT® 5' RACE Control Kit, 程序 1 的 T_m 设为 63℃。

4. Nested PCR 反应（可选）

如第一轮扩增结果没有目的片段或片段模糊时，可用 NGSP 进行巢氏 PCR，获取特异性和产物量更高的目的条带。

1) 将反应所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心收集后置于冰上。取 5 µl 第一轮 PCR 产物到 1.5mL EP 管，再加入 245 µl ddH₂O，振荡混匀。

2) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分（所有操作在冰上进行）。

组分	Nested PCR	Short PCR Primer 单引物对照（可选）	NGPS 单引物对照 （可选）
2× PCR Amplification Mix	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
10× Universal Primer Mix	2.5 µl	2.5 µl	-
5' GSP (10 µM)	1 µl	-	1 µl
1st PCR 稀释产物	2 µl	2 µl	2 µl
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	Up to 25 µl	Up to 25 µl	Up to 25 µl

3) 扩增程序参考第一轮 PCR 程序

5. RACE PCR 产物纯化

扩增产物建议通过克隆和测序方法进行验证，如果条带单一，可使用 Omega 纯化试剂盒 E.Z.N.A®. Cycle-Pure Kit(货号 D6492)进行纯化；如果扩增条带不单一，可用 QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit（货号#28704）进行纯化。

6. 克隆转化

1) 2x PCR 扩增产物是平末端产物，可直接用本公司 SmartJoin™ 平末端靶点 PCR 克隆试剂盒（GeneCopia # IC007）或其他等效产品，具体实验步骤流程见产品说明书。

2) 转化：常规 *E.coli* 感受态均可使用，可使用本公司产品 DH5α 感受态细胞（GeneCopia #CC001），具体实验步骤流程见产品说明书。

3) 阳性克隆子筛选：挑选单菌落进行菌落 PCR 筛选，可使用本公司 2× UltraHiPF® PCR Mix（GeneCopia #PC033），具体实验步骤流程见产品说明书，建议挑选 8~10 个单克隆以获得最大的 5'端序列。

4) 测序分析，确认目的片段已插入到载体中后进行一代测序鉴定，测序引物可选用 SmartJoin™ 平末端靶点 PCR 克隆试剂盒（GeneCopia # IC007）提供的载体引物，也可以使用自己设计引物。

V. 疑难解答

问题	造成原因	建议
扩增无目的条带 或产物弥散	RNA 中无目的基因转录本	设计目的基因转录本已知区域的 PCR 引物进行验证。
	RNA 降解或有其他杂质污染	RNA 提取后需进行 RNA 纯度和完整性检测（完整性使用琼脂糖凝胶电泳评价或 Agilent 仪器检测）。
	目的基因丰富度较低	增加 RNA 投入量，但不超过 4 μ g; 增加 cDNA 投入量，减少 cDNA 稀释倍数，未稀释 cDNA 投入体积不能超过 PCR 反应体系 1/10; 增加 GSP 投入量，GSP(10 μ M)投入体积不能超过 PCR 反应体系 1/10; 设计 Nested GSP，进行多轮 Nested PCR(不超过三轮); 增加扩增循环数，扩增循环数不超过 40 个，Touchdown PCR 循环数不超过 50 个。
	设计 GSP Tm 过低	设计 GSP Tm $\geq$ 65 $^{\circ}$ C，Tm>70 $^{\circ}$ C 使用 Touchdown PCR，GSP Tm<65 $^{\circ}$ C,降低退火温度，退火温度不能高于 Tm+3 $^{\circ}$ C，摸索合适的退火温度。
	GSP 引物不合适	重新检查设计的引物，多设计几条新的 GSP 引物进行尝试。
	无 Poly(A) RNA 的 RACE 产物	使用试剂盒提供的 5' Random Primer 进行第一链 cDNA 合成; 使用 GSP 引物进行第一链 cDNA 合成，设计巢氏 GSP 引物进行扩增。
	PCR 扩增片段过长	增减 PCR 延伸时间，每增减 1kb 延伸时间增加 1min; GSP 引物尽量设计靠 5'端位置。
扩增产物有多条带	多个转录本	目的基因存在不同剪切方式，产生多个转录本，分析不同转录本序列的信息，重新设计有针对特异性的 GSP 引物。
	非特异扩增	测序结果不是目的序列，重新设计 GSP 引物，并用 BLAST 分析引物特异性，且 GSP 引物 Tm $\geq$ 65 $^{\circ}$ C，重新测试。
无阳性克隆	目的片段浓度低	增加 PCR 扩增管数，多管 PCR 产物富集纯化，提高目的产物浓度，扩大克隆体系，增加目的片段的投入量。

VI. 有限使用许可和保证

有限保证

GeneCopoeia 保证该产品 (AccelerRT® 5' RACE Kit) 符合产品手册上的说明。如果证明该产品与产品说明信息不符, 购买方须将该产品在 5 个工作日内返还回给 GeneCopoeia, 而 GeneCopoeia 将免费替换该产品。如果不能提供替换产品, GeneCopoeia 将退款或 credit 给购买方。此保证仅限于产品的原始购买者, 且不得延伸至原始购买者以外的使用者。GeneCopoeia 的责任仅限于替换, 退款或 credit (指选择不退款, 剩余款项用于后续购买产品的支付) 该产品, 且退款或 credit 只限于实际的购买价格但不包括寄送费用。GeneCopoeia 不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损失所产生的后果负责。

GeneCopoeia 提供此唯一保证。GeneCopoeia 对于产品的适销性以及任何特定使用用途不再提供任何其他保证。

有限使用许可

购买方需同意接受以下有限使用许可条款。GeneCopoeia 的产品仅限于购买方内部研究使用, 不可以任何方式转让给第三方; 不可用于包括人类或诊断及治疗在内的其他用途。未经 GeneCopoeia 的书面批准, 不得对此产品进行更改、重新包装、转售或用于制作商业化产品。此产品须按 NIH 指南用于 DNA 重组和基因研究。对此产品任何使用都构成对以上条款的承诺和接受。

PC060-101525

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。



GeneCopoeia 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果您对我们的产品有任何问题和担忧, 请与我们联系:
020-28069233。地址: 广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器F区F801 邮编: 510663
客服电话: 020-28069233 E-mail: support@igenebio.com 网址: www.igenebio.com