

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:101104-10  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

**3' -RACE 试剂盒**

**3' -RACE Kit**

**使用手册 V2.0**

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

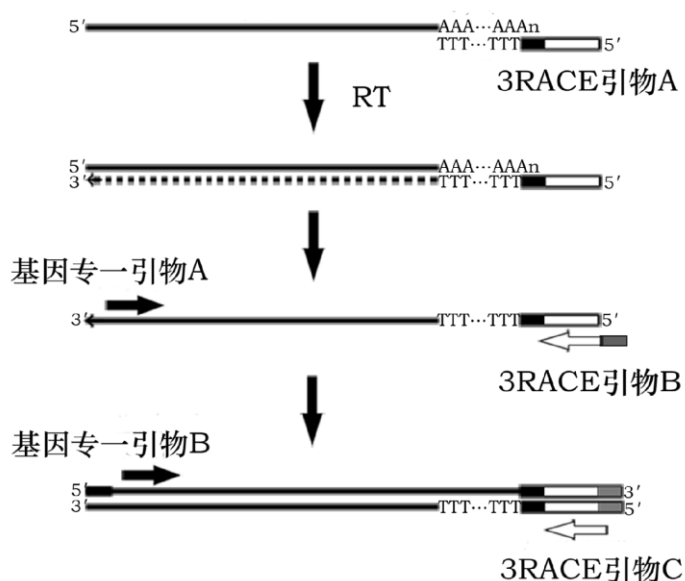
网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

## 产品及特点

研究真核基因的最基础的工作之一就是确定其转录终止位点，目前最常用的方法是 3' -RACE 法，RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 是 Frohman 发明的、通过 PCR 快速克隆 cDNA 末端的技术，它在不建立 cDNA 文库的前提下，利用已知 cDNA 序列设计引物，通过往两端延伸和扩增获得其 3' -端序列。本试剂盒就是根据 3' -RACE 原理而开发，它具有下列特点：

1. 即开即用，客户不需要单独准备各种材料。
2. 反应条件经过精心优化，包括使用无 RNase H 活性的 MMLV 和优化的引物。

3' -RACE 的原理如下图：



## 规格及成分

成分	编号	小扁盒包装
MMLV 逆转录酶-RI 混合物	101104a	10 $\mu$ L(红盖)
RT Buffer (含 dNTP)	60906	50 $\mu$ L(白盖)
PCR MagicMix 3.0	90805	1 mL*2(红盖)
3' -RACE 引物 A (10 $\mu$ M)	yw373	10 $\mu$ L(蓝盖)
3' -RACE 引物 B (10 $\mu$ M)	yw374	100 $\mu$ L(绿盖)
3' -RACE 引物 C (10 $\mu$ M)	yw375	100 $\mu$ L(本色盖)
RNase-Free 水	80403	1 mL(亮黄盖)
使用手册	101104sc	1 份

## 自备试剂

Poly(A) RNA (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 $^{\circ}$ C 保存、有效期一年。

## 使用方法

### 一：引物的设计和准备工作

利用已道序列的区域设计基因专一性引物三条 (A、B)，其中引物 B 和 A 引物比较，靠 3' 端 10-30 个碱基，类似巢式 PCR 的引物设计。自备的基因专一性引物的  $T_m$  最好跟 3' -RACE 引物 B 和引物 C 的一致，即  $T_m$  为 58°C。引物合成后加超纯水使其浓度为 10  $\mu\text{M}$ ，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。

1. 在一个 PCR 管中，加入以下组分：

成分	用量
Poly(A) RNA (或总RNA )	0.2-2 $\mu\text{g}$ (5 $\mu\text{g}$ )
3' -RACE引物A (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
MMLV Buffer (含dNTP溶液)	5 $\mu\text{L}$
RNase-Free水	补至19 $\mu\text{L}$
合计	19 $\mu\text{L}$

注意：如果可能，最好使用Poly(A) RNA作为模板。

2. 65°C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 1  $\mu\text{L}$  MMLV 逆转录酶-RI 混合物。

4. 先 37°C保温 60 分钟，再 42°C保温 30 分钟进行逆转录反应，最后 50°C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°C保存。

### 三：利用基因专一性引物 A 和 3' RACE 引物 B 进行第一轮 PCR

6. 用不同量的 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： $\mu\text{L}$ 。

成分	梯度1	梯度2	梯度3	梯度4
稀释后的 cDNA	1	5	10	15
基因专一性引物 A (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	2.5	2.5	2.5
3' RACE 引物 B (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	2.5	2.5	2.5
98°C 5 分变性 RNA-cDNA 杂交链，短暂离心后再加入下列成分				
PCR MagicMix 2.0	25	25	25	25
RNase-free 水	19	15	10	5

合计	50	50	50	50
----	----	----	----	----

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°C 2 分, 72°C 40 分 (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 T<sub>m</sub> 值决定, 一般可以从 55°C 开始)。

第二步 PCR 循环: 94°C 1 分钟, 52-60°C 1 分, 72°C 3 分 (此步为 PCR 扩增, 复性温度需要根据自备基因专一性引物 A 的 T<sub>m</sub> 值决定, 一般可以从 55°C 开始)。

最后延伸: 72°C 15 分

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°C 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 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 50μL PCR 反应液中加入 1mL 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
PCR MagicMix 3.0	各 25 μL
上步得到的 PCR 反应液 (稀释 20 倍后)	4 种之一 1 μL
基因专一性引物 B (10 μM)	2.5 μL
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°C 1 分钟, 52-60°C 1 分, 72°C 3 分 (复性温度需要根据自备基因专一性引物 B 的 T<sub>m</sub> 值进行优化, 一般可以从 55°C 开始)。最后延伸: 72°C 15 分。

11. 电泳检测。然后根据实验结果进行 DNA 测序或 TA 克隆。

**关联产品**

5' -RACE 试剂盒 (CAT#: 101105)