

Code No. 6106

研究用

TaKaRa

3' -Full RACE Core Set
with PrimeScript™ RTase

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒原理	2
● 特异性引物设计的注意事项	3
● 试剂盒特点	3
● RNA 样品制备	3
● 试剂盒使用注意事项	4
● 使用 Control RNA 时的实验操作	4
● 使用实验样品 RNA 时的实验操作	6
● 实验例	8
● Q&A	8
● 参考文献	9

● 制品说明

本试剂盒是高灵敏度、高特异性扩增 cDNA 3' 末端全长的试剂盒。对 RNA 结构进行分析时，一般先通过 RT-PCR 反应扩增目的区域，然后再对扩增出的目的 DNA 片段进行克隆、序列分析等。一般的 RT-PCR 反应很难得到全长的 cDNA 片段，然而在基因工程研究中，分析遗传基因的全长 cDNA 序列又是十分重要的。RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法能有效地解决这一问题。3' -Full RACE Core Set with PrimeScript RTase 能够通过已知的 cDNA 序列，高灵敏度、高特异性地扩增 cDNA 的 3' 末端的全长序列。

本试剂盒中含有完成 3' -RACE 操作的主要试剂。试剂盒中使用的 PrimeScript Reverse Transcriptase 经过了本公司的特殊改良，反转录性能良好，无 RNase H 活性，大大增加了反转录性能。结合使用 *TaKaRa LA Taq*[®] (Code No. RR002A) 进行 PCR 扩增时，其 3' RACE 的扩增性能大大优于其他同类产品。本试剂盒应用了套式 PCR 原理，增加了 PCR 扩增的特异性与灵敏度，可以对少量样品或低丰度的基因进行 3' RACE 实验，并且对长片段的 3' RACE 扩增具有明显优势，我们曾经使用本试剂盒成功扩增了 8 kb 的 3' RACE DNA 片段。使用 *TaKaRa LA Taq* 扩增得到的 PCR 产物 3' 端附有一个“A”碱基，其产物可直接克隆于 T-Vector 中。反转录引物 3' RACE Adaptor Primer 含有由 Takara 特别设计的 dT 区域，反转录效率高。3' RACE Inner Primer 中含有 *Bam*H I 酶切位点，为克隆实验提供了方便。制品中的 Control RNA 及 Control Primer 可以用于 Control 实验。

● 制品内容

制品内容 1~9 为用于 3' RACE 实验的反转录用试剂，可用于 20 次反转录反应 (约 100 次 3' RACE PCR 反应)；10~12 为 Control 实验用试剂，可进行 5 次 Control 实验。

1. PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	10 μ l
2. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	10 μ l
3. 5 \times PrimeScript Buffer	40 μ l
4. dNTP Mixture (10 mM each)	20 μ l
5. 3' RACE Adaptor (5 μ M)	20 μ l
6. RNase Free dH ₂ O	1 ml
7. 1 \times cDNA Dilution Buffer II	1 ml
8. 3' RACE Outer Primer (10 μ M)	200 μ l
9. 3' RACE Inner Primer (10 μ M)	200 μ l
10. Control HL60 Total RNA (500 ng/ μ l) *	10 μ l
11. 3' RACE Control Outer Primer (10 μ M) *	10 μ l
12. 3' RACE Control Inner Primer (10 μ M) *	10 μ l

* 用于扩增 Human Prohibitin (PHB) 基因。

【各种引物序列】

引物名称	引物序列 (5' \rightarrow 3')
3' RACE Adaptor	含有由 Takara 特别设计的 dT 区域及 Adaptor Primer 部分
3' RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3' RACE Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
3' RACE Control Outer Primer	GAGTGCAGGACATTGTGGTAGGG
3' RACE Control Inner Primer	ATCTTTGACTGCCGTTCTCGACC

【实验时需要自备的其他试剂】

1. 扩增目的 DNA 片段的上游特异性引物。
2. PCR 用 DNA 聚合酶。我们推荐使用 *TaKaRa LA Taq* (Code No. RR002A)，也可以根据实验需要选用其他 PCR 用 DNA 聚合酶。

● 保存: -20℃。

● 试剂盒原理

进行 3' RACE 实验时, 首先由 PrimeScript Reverse Transcriptase 将 Poly(A)⁺ RNA 反转录成 cDNA, 然后再使用 *TaKaRa LA Taq* (Code No. RR002A), 以反转录的 cDNA 为模板, 进行套式 PCR 反应。3' RACE Adaptor Primer 作为反转录引物用于 cDNA 合成 (具体原理见图 1)。

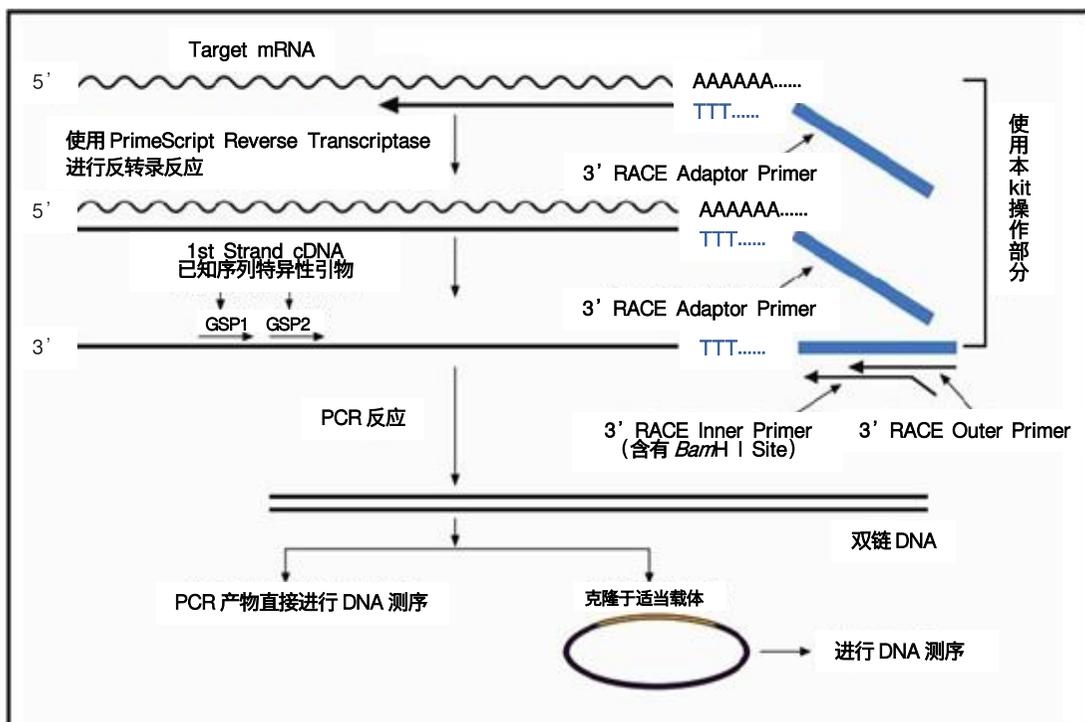
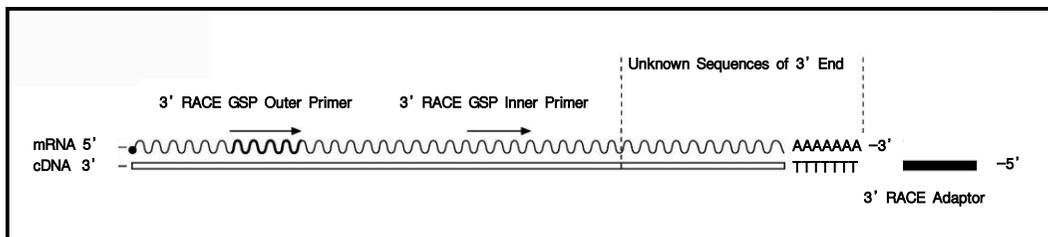


图 1. 3' -Full RACE Core Set with PrimeScript RTase 的实验原理图

1. 以 Total RNA 为模板, 使用 3' RACE Adaptor 引物进行反转录反应, 合成 1st Strand cDNA。
2. 使用上游外侧特异性引物 (GSP1) 和 3' RACE Outer Primer 进行 1st PCR 反应。如果 1st PCR 反应未能得到目的产物, 再使用上游内侧特异性引物 (GSP2) 和 3' RACE Inner Primer 进行 2nd PCR 反应。
3. PCR 产物可以直接进行 DNA 测序或 TA 克隆。如果使用含有 *Bam*H I 酶切位点的上游内侧特异性引物进行 2nd PCR 扩增时, 可以使用限制酶 (*Bam*H I) 对 PCR 产物进行酶切反应, 然后克隆至相关的载体中。

● 特异性引物设计的注意事项



1. 长度为 20~24 bases。
2. GC 含量 50%左右, 无二级结构等, 并且与 RACE Primer 不能形成复杂结构。
3. 应使用引物设计的专用软件进行设计。

● 试剂盒特点

RNA 模板	适用于所有 Poly (A) ⁺ RNA。
扩增片段大小	我们曾经扩增得到 8 kb 以上的 DNA 片段。
3' -RACE 法	RT 反应时使用 3' RACE Adaptor, PCR 反应时下游引物分别使用 3' RACE Outer Primer 和 3' RACE Inner Primer。
样品材料	也适用于目的基因丰度较低或者样品量较少的实验材料。

● RNA 样品制备

本试剂盒是将 RNA 反转录成 cDNA, 然后再对 cDNA 进行扩增的试剂盒。RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量, 而制备 RNA 的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此, 在实验中必须采取以下措施: 戴一次性干净手套, 使用 RNA 操作专用实验台, 在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿, 若用玻璃器皿时应在使用前按下列方法进行处理。

- (1) 用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12 小时。
- (2) 然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用, 不要用于其他实验。

【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂, 须使用干热灭菌 (180°C, 60 分钟) 或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器), 使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用, 避免混用后交叉污染。

【制备方法】

使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足于 RT-PCR 反应的 RNA (只需少量的 RNA 便可进行 RT-PCR 反应)。推荐使用 Takara RNAiso Plus 系列产品或其他 RNA 提取试剂、试剂盒进行 RNA 的提取。使用本试剂盒进行 RT-PCR 反应时, 每次反应所需的最适 Total RNA 量约为 1 μg。

● 试剂盒使用注意事项

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

- 1) 同时需要进行数次反转录反应或 PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液 (Master Mix; 其中包括 RNase Free dH₂O、Buffer、dNTP Mixture 等)，然后再分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验之间产生的误差。
- 2) 使用 PrimeScript Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor 等酶类时，应轻轻混匀，避免起泡，分取之前要小心地离心收集到反应管底部。由于酶保存液中含有 50% 的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
- 3) 酶制品应在实验前才从 -20℃ 中取出，使用后也应立即放回 -20℃ 中保存。
- 4) 为了防止 Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融。有条件的实验室建议保存于 -70℃ ~ -80℃。
- 5) 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip)，以防止样品间污染。

● 使用 Control HL60 Total RNA 时的实验操作方法

1. 反转录反应。反应体系及反应条件如下：

◆ 反应体系：

试剂	使用量
Control HL60 Total RNA (500 ng/μl)	1 μl
3' RACE Adaptor (5 μM)	1 μl
5×PrimeScript Buffer	2 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.25 μl
PrimeScript RTase (200 U/μl)	0.25 μl
RNase Free dH ₂ O	4.5 μl
Total Volume	10 μl

◆ 反应条件：

42℃, 60 min

↓

70℃, 15 min

反应结束后可以进行下一步实验或将反应液保存于 -20℃。

2. 套式 PCR 反应。

PCR 反应使用了 *TaKaRa LA Taq* (Code No. RR002A)。

① Outer PCR 反应。反应体系及反应条件如下：

◆ 反应体系：

试剂	使用量
上述 1 的反转录反应液	2 μ l
1 \times cDNA Dilution Buffer II	8 μ l
3' RACE Control Outer Primer (10 μ M)	2 μ l
3' RACE Outer Primer (10 μ M)	2 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Free)	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
灭菌水	28.75 μ l
Total Volume	50 μ l

◆ 反应条件：

94°C 3 min
 94°C 30 sec
 55°C 30 sec } 20 Cycles
 72°C 1 min
 72°C 10 min

② Inner PCR 反应。反应体系及反应条件如下：

◆ 反应体系：

试剂	使用量
1st PCR 产物	1 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Free)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μ l)	0.5 μ l
3' RACE Control Inner Primer (10 μ M)	2 μ l
3' RACE Inner Primer (10 μ M)	2 μ l
灭菌水	26.5 μ l
Total Volume	50 μ l

◆ 反应条件：

94°C 3 min
 94°C 30 sec
 55°C 30 sec } 30 Cycles
 72°C 1 min
 72°C 10 min

● 使用实验样品 RNA 时的实验操作方法

1. 反转录反应。反应体系及反应条件如下：

◆ 反应体系：

试剂	使用量
RNA*	X μ l*
3' RACE Adaptor (5 μ M)	1 μ l
5 \times PrimeScript Buffer	2 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.25 μ l
PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	0.25 μ l
RNase Free dH ₂ O	5.5-X μ l
Total Volume	10 μ l

* 一般情况下, Total RNA的使用量为1 μ g, Poly(A)⁺ RNA的使用量为50 ng。增加模板RNA的使用量有时会使反应性能下降, 不建议使用大于1 μ g 的Total RNA。

◆ 反应条件*：

42°C, 60 min

↓

70°C, 15 min

反应结束后可以进行下一步实验或将反应液保存于-20°C。

* 对于立体结构复杂的基因, 可以先将 RNA 变性后再进行反转录反应。具体操作为: 首先将 RNA 和引物的混合物 70°C 变性 10 分钟, 冰上急冷, 然后再加入反转录反应的其余试剂, 进行 42°C、60 分钟的延伸反应。

2. 套式 PCR 反应。

使用 *TaKaRa LA Taq* (Code No. RR002A) *1 进行 PCR 反应时的实验操作如下。

① Outer PCR 反应。反应体系及反应条件如下：

◆ 反应体系：

试剂	使用量
上述 1 的反转录反应液	X μ l*2
1 \times cDNA Dilution Buffer II	10-X μ l
Gene Specific Outer Primer (10 μ M)	2 μ l
3' RACE Outer Primer (10 μ M)	2 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Free)	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
灭菌水	28.75 μ l
Total Volume	50 μ l

- *1 也可以选用保真性能高的 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A)、以及 *TaKaRa Ex Taq[®]* Hot Start Version (Code No. RR006A) 等。我们一般推荐使用 *TaKaRa LA Taq* (Code No. RR002A), 可以得到良好的实验结果。
- *2 一般情况下, “上述 1 的反转录反应液” 的使用量为 2 μ l~5 μ l。使用量小于 2 μ l 时, 扩增产物量降低; 使用量大于 5 μ l 时, PCR 扩增性能有可能下降。

◆ 反应条件:

94°C	3 min	}	20~30 Cycles*3
94°C	30 sec		
55°C*1	30 sec		
72°C	1 min/kb*2		
72°C	10 min		

注) *1 可根据实际情况适当地提高或降低退火温度 (37°C~65°C)。

*2 一般情况下, 延伸时间为 1 min/kb。特殊情况时可以适当增加延伸时间。

*3 循环圈数: 若基因丰度较高且不需要进行 2nd PCR 时, Cycles 设定为 30 时能得到较好的实验结果; 若基因丰度较低或样品量较少, 需要进行 2nd PCR 时, 1st PCR Cycles 设定为 20, 2nd PCR Cycles 设定为 30 时能得到较好的实验结果。

② PCR 反应结束后, 取 5~10 μ l 的 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 扩增产物。如果此 PCR 扩增产物需要用于以后实验, 请于 -20°C 保存。若没有得到目的扩增产物, 可进行 Inner PCR 反应。

③ Inner PCR 反应。反应体系及反应条件如下:

◆ 反应体系:

试剂	使用量
1st PCR 产物	1 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Free)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μ l)	0.5 μ l
Gene Specific Inner Primer (10 μ M)	2 μ l
3' RACE Inner Primer (10 μ M)	2 μ l
灭菌水	26.5 μ l
Total Volume	50 μ l

◆ 反应条件:

94°C	3 min	}	30 Cycles
94°C	30 sec		
55°C*1	30 sec		
72°C	1 min/kb*2		
72°C	10 min		

*1 可根据实际情况适当地提高或降低退火温度 (37°C~65°C)。

*2 一般情况下, 延伸时间为 1 min/kb。特殊情况可适当增加延伸时间。

3. 琼脂糖凝胶电泳。

取 5~10 μl 的 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 3' RACE PCR 扩增产物。

4. 测序分析。

电泳分析的 3' RACE PCR 扩增产物有时为一条带，也有可能是数条带。如果有数条电泳带时建议先取最长的那条 DNA 电泳带进行测序分析。测序时可以采用下述方法：

① PCR 产物直接测序。

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收后，直接进行 DNA 测序。若 PCR 产物直接测序无法进行时，建议将 DNA 片段克隆后再进行测序。

② DNA 片段克隆测序。

将 PCR 扩增产物克隆至合适载体后再进行 DNA 测序。

● 实验例

按照实验操作方法，分别以三种 Total RNA（亚洲玉米螟 Total RNA、大连紫海胆 Total RNA、HL60 Total RNA）为实验材料，进行了 3' RACE 实验，具体实验过程说明如下，实验结果见图 2。

1. 以亚洲玉米螟 Total RNA 为实验材料，对二种低丰度基因（几丁质合成酶和几丁质水解酶）进行了 3' RACE 实验，分别扩增了 4.8 kb（几丁质合成酶）和 1 kb（几丁质水解酶）的 3' RACE DNA 片段。
2. 以大连紫海胆 Total RNA 为实验材料，对其主要卵黄蛋白基因进行了 3' RACE 实验，扩增了 2.6 kb 的 3' RACE DNA 片段。
3. 以 Control HL60 Total RNA 为实验材料，对其人抑制素基因（PHB）进行了 3' RACE 实验，扩增了 850 bp 的 3' RACE DNA 片段。

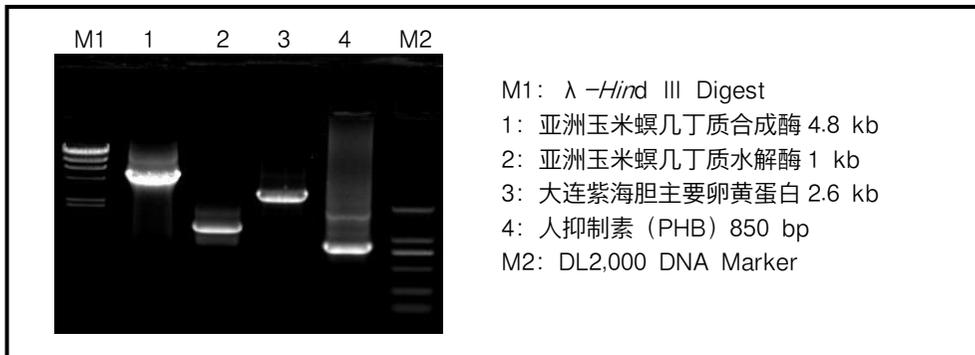


图 2. 3' RACE 实验结果图

● Q&A

Q1. RT-PCR 反应后，无 PCR 产物或出现 Smear，怎么办？

A1. 首先请按说明书要求进行 Control 反应，如果 Control 反应情况正常，那说明实验操作没有问题。此时请从提取的 RNA 样品的纯度和添加量、基因的表达丰度、基因的长度和 GC 含量、引物的设计情况、参考文献的可信度以及 RT-PCR 条件的设定等方面加以考虑；如果 Control 反应不正常，应从实验操作的准确性以及实验器具处理等方面进行考虑。

Q2. RT 反应后的 Outer PCR 反应体系中不用加 dNTP Mixture，为什么？

A2. 在 1 \times cDNA Dilution Buffer II 和 RT 反应液中均含有 dNTP Mixture，可以足够满足 PCR 反应的需要，所以不需再添加 dNTP Mixture。

- Q3. PCR 反应时，反转录反应液的使用量使用多少较为合适？
A3. 反转录反应液的使用量可控制在 0.5 μ l~10 μ l 的范围。
- Q4. 3' RACE PCR 扩增产物经电泳分析后，有时为什么不是单一条带？
A4. 原因 1：可能是因为 mRNA 不同的拼接方式造成的；
原因 2：可能是因为多种 Poly(A)⁺位点的存在造成的；
原因 3：可能是因为扩增的基因为多基因家族的成员；
原因 4：可能是因为未知序列信息不清楚导致了非特异性扩增。

● 参考文献

- 1) Kawasaki, E. S. and Wang, A. M. (1989) *PCR Technology* (Erlich, H. A. ed), Stochton Press, 89–97.
- 2) Lynas, C., Cook, S. D., Laycock, K. A., Bradfield, J. W. B. and Maitland, N. J. (1989) *J. Pathology*, 157, 285–289.
- 3) Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998–9002.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da