HiScript-TS 5'/3' RACE Kit

RA101

使用说明书

Version 21.2

目 录 Contents

01/产品概述 ····· 02
02/产品组分 ····· 02
03/保存条件 ····· 02
04/适用范围 ····· 02
05/实验原理与流程概要 ····· 03
06/自备材料 ····· 05
07/注意事项 ····· 05
08/实验流程 ····· 05
- 08-1/实验前准备 ····· 05
- 08-2/第一链cDNA合成 ····· 06
- 08-3/cDNA末端的快速扩增（RACE） ····· 08
- 08-4/[可选]Nested PCR（巢式PCR）扩增 ····· 09
- 08-5/RACE 扩增产物纯化与检测 ····· 09
- 08-6/克隆转化 ····· 10

09/常见问题与解决方案 ····· 11

*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。

01/产品概述

HiScript-TS 5'/3' RACE Kit可以RNA为模板高效逆转全长cDNA，并以cDNA为模板快速扩增其5'末端或3' 末端。试剂盒包含5' RACE扩增和3' RACE扩增所需组分，可根据实验需求进行选择。本产品提供定向改造的具有Template-Switching活性的逆转录酶和高保真PCR扩增Mix，无需进行接头连接，产品Mix形式极大简化了操作流程。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了结果的稳定性。

02/产品组分

	组分	RA101-01 (10 rxns)
Box1	5' TS Oligo	10 μl
	Control 293 cell Total RNA(1 μg/μl)	5 μl
Box2	3' CDS Primer	20 μl
	5' CDS Primer	20 μl
	5 × FS Buffer	40 μl
	10 × Enzyme Mix	20 μl
	dNTP Mix	20 μl
	2 × PCR Mix	2 × 650 μl
	10 × Universal Primer Mix(UPM)*	400 μl
	5' Control GSP	10 μl
	3' Control GSP	10 μl
	5' Random Primer	20 μl
	Nested Primer	50 μl
	RNase-free ddH_2O	1 ml
	Dilution Buffer	1 ml

▲ 产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色。

*10 × Universal Primer Mix（UPM）包含Universal Primer-Long/Universal Primer-Short。

03/保存条件

Box 1， -85 ~ -65℃保存，干冰运输；

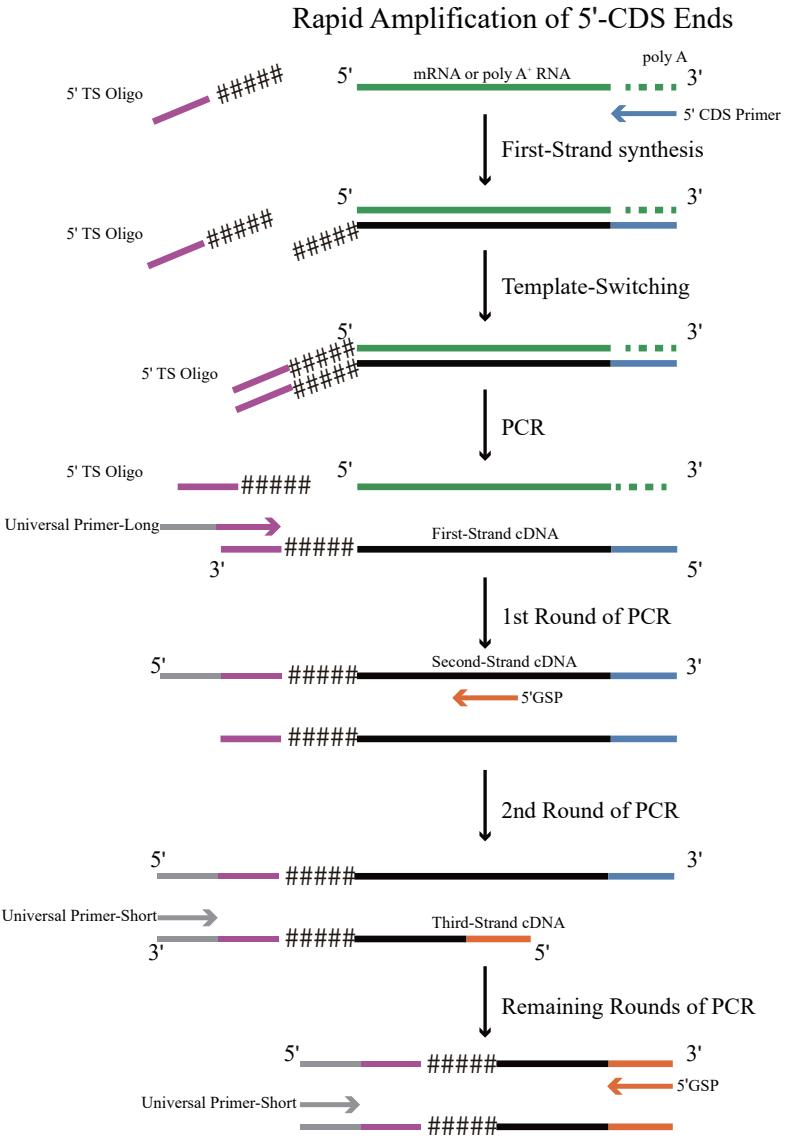
Box 2， -30 ~ -15℃保存，干冰运输。

04/适用范围

本产品适用于10 ng - 1 μg Total RNA或Poly A^+ RNA的5'/3' RACE技术扩增。

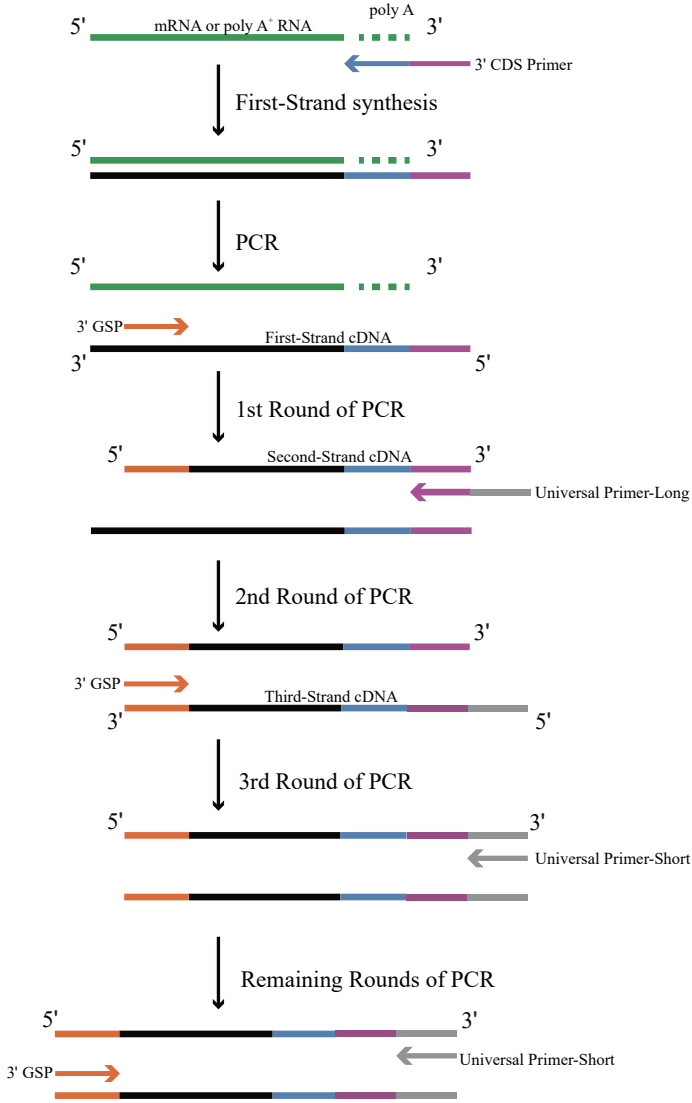
05/实验原理与流程概要

各引物/接头图例：



Vazyme
www.vazyme.com

Rapid Amplification of 3'-CDS Ends



06/自备材料

5'/3' GSP：5'/3'基因特异性引物(Gene Specific Primer)；
纯化试剂：FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit(Vazyme #DC301)或其他等效产品；
克隆试剂：5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit(Vazyme #C601)或其他等效产品；
菌检PCR试剂：2 × Taq Master Mix(Dye Plus)(Vazyme #P112)或其他等效产品；
转化试剂：Fast-T1 Competent Cell(Vazyme #C505)或其他等效产品；
其他材料：RNase-free PCR管、低吸附EP管、ddH_2O、PCR仪等。
RACE扩增相关试剂(可选)：如果扩增较多体系，需要更多RACE扩增试剂(10 × Universal Primer Mix(UPM)/2 × PCR Mix),可选购10 × Universal Primer Mix(UPM)(Vazyme #RA102)/HiScript-TS 2 × PCR Mix(Vazyme #RA103)。

07/注意事项

1. Total RNA和Poly A^+ RNA的完整度和纯度是决定RACE成功的关键因素之一。降解的RNA会影响cDNA的产出和后续RACE扩增，并可能导致实验失败。进行反应操作前建议使用琼脂糖凝胶电泳或Agilent RNA 6000 Pico Kit评价RNA完整性。
2. GSP/NGSP引物设计应严格按照08-1所述要求进行设计，否则可能导致扩增产物非特异，甚至实验失败。
3. 针对同一待测转录本可设计多条GSP进行RACE扩增，以提高成功率。
4. 扩增目的转录本末端长度：建议不超过3 kb，若转录本较大，GSP/NGSP设计时尽量靠近已知序列末端。
5. 如果目的转录本丰度较低，可增加RNA投入量，建议不超过4 μg。
6. 如果目的转录本拷贝数较低，一链cDNA产物可不稀释，直接进行后续实验。
7. 如果转录本无poly A尾，研究其5'末端序列，可使用5' Random Primer替换5' CDS Primer，用法用量同5' CDS Primer。
8. 如果扩增产物无明显主条带，或者目的片段不特异，可采用巢式PCR方法进行二轮PCR扩增。
9. 建议实验全程在冰上操作。

08/实验流程

08-1/实验前准备

1. GSP(基因特异性引物)设计原则：
a. 引物长度：23 - 28个核苷酸，建议不超过30个核苷酸；
b. GC含量：50% - 70%；
c. Tm值：Tm≥65℃，Tm>70℃使用Touch Down PCR有助于提高产物特异性；
d. 对于较长(>10 kb)或丰度较低的待测转录本，建议GSP引物设计尽量靠近cDNA的末端(≤3 kb)。
e. 建议：针对同一待测转录本可设计多条GSP，进行RACE扩增以提高成功率。

2. NGSP（巢式基因特异性引物）设计原则：

a. 引物长度、GC含量、Tm值：同GSP（基因特异性引物）设计原则；

b. 设计位置：NGSP须设计在GSP的3'端，建议NGSP的5'末端与GSP的3'末端有5 - 15 nt的重叠，有助于提高二轮巢式扩增时的特异性。

3. Total RNA模板完整度检测：

a. 琼脂糖凝胶电泳检测：观察是否有完整rRNAs带型；

b. 2100检测：使用Agilent RNA 6000 Pico Kit评价RNA完整度。

08-2/第一链cDNA合成(请在超净台中操作)

1. 将第一链合成所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后轻弹混匀并短暂离心收集后置于冰上。

▲5 × FS Buffer可能会出现沉淀，使用前请复温溶解后充分混匀，置于冰上；

▲5' TS Oligo和10 × Enzyme Mix使用前请轻弹管壁混匀，勿涡旋。

▲推荐使用试剂盒提供的Control 293 cell Total RNA（1 μg/μl）作为阳性对照。

2. 样品准备

按照下表配制反应体系：

5' RACE扩增

组分	体积
RNA	10 ng - 1 μg
5' CDS Primer	2 μl
dNTP Mix	2 μl
RNase-free ddH_2O	up to 13 μl

使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

3' RACE扩增

组分	体积
RNA	10 ng - 1 μg
3' CDS Primer	2 μl
dNTP Mix	2 μl
RNase-free ddH_2O	up to 14 μl

使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

3. 在PCR仪中运行以下程序：

温度	时间
72℃	3 min
立即置于冰上	2 min

4. 按下表配制逆转录反应体系：

组分	5' RACE扩增	3' RACE扩增
步骤3产物	13 μl	14 μl
5 × FS Buffer	4 μl	4 μl
10 × Enzyme Mix	2 μl	2 μl
5' TS Oligo	1 μl	0 μl
Total	20 μl	20 μl

▲5' TS Oligo和10 × Enzyme Mix使用前请轻弹管壁混匀，勿涡旋。

使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

5. 在PCR仪中运行以下程序：

温度	时间
42℃	90 min
70℃	15 min
4℃	Hold

▲反应产物可暂时保存在4℃，放置时间请勿超过12 h；长期保存可在-20℃条件下保存3个月。

6. 产物稀释：使用Dilution Buffer进行稀释。

因待测转录本丰度不同，且不同样品Total RNA中各转录本的含量差异较大，所以会直接影响稀释倍数，首次稀释取10 μl产物按下表参考倍数稀释，剩下10 μl产物可以在-20℃下保存3个月。

稀释倍数参考：

起始模板	上一步产物体积	Dilution Buffer
≤200 ng Total RNA	10 μl	0 μl
>200 ng Total RNA	10 μl	10 μl
poly A^+ RNA	10 μl	60 μl

▲可根据目的转录本丰度高低及首次实验结果进行后续稀释倍数调整。

如果起始模板为Total RNA，建议Dilution Buffer：产物不高于5：1，即10 μl产物最多加入50 μl Dilution Buffer进行稀释。

所得产物即为5' /3' RACE-Ready cDNA,可以在-20℃下保存3个月。

08-3/cDNA末端的快速扩增(RACE)

1.按照下表配制PCR扩增反应体系：

5' RACE扩增：

组分	5' RACE	UPM单引物对照（可选）	GSP单引物对照（可选）
5' RACE-Ready cDNA	2.5 μl	2.5 μl	2.5 μl
5' GSP(10 μM)	1 μl	0 μl	1 μl
■ 10 × Universal Primer Mix(UPM)	5 μl	5 μl	0 μl
■ 2 × PCR Mix	25 μl	25 μl	25 μl
ddH_2O(自备)	16.5 μl	17.5 μl	21.5 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

▲使用UPM/GSP单引物对照有助于区分非特异扩增背景产物。

使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

3' RACE扩增：

组分	3' RACE	UPM单引物对照（可选）	GSP单引物对照（可选）
3' RACE-Ready cDNA	2.5 μl	2.5 μl	2.5 μl
3' GSP(10 μM)	1 μl	0 μl	1 μl
■ 10 × Universal Primer Mix(UPM)	5 μl	5 μl	0 μl
■ 2 × PCR Mix	25 μl	25 μl	25 μl
ddH_2O(自备)	16.5 μl	17.5 μl	21.5 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

▲使用UPM/GSP单引物对照有助于区分非特异扩增背景产物。

使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

2.在PCR仪中运行以下程序：

▲如果GSP Tm>70℃使用以下PCR程序Ⅰ：

温度	时间	循环数
98℃	1 min	
98℃	10 sec	5
72℃	3 min[a]	
98℃	10 sec	5
70℃	15 sec	
72℃	3 min[a]	
98℃	10 sec	20（Poly A^+ RNA）or 25（Total RNA）[b]
68℃	15 sec	
72℃	3 min[a]	
72℃	5 min	
4℃	Hold	

a.如果扩增片段≤3 kb，延伸时间设置为3 min即可；如果扩增片段>3 kb，每增加1 kb，延伸时间延长30 sec。

b.如果扩增产物条带较弱，可适当增加最后扩增阶段的循环数。

▲如果GSP Tm为 60～70℃，使用以下PCR程序 II：

温度	时间	循环数
98℃	1 min	
98℃	10 sec	20（Poly A+ RNA） or 25（Total RNA）[b]
68℃	15 sec	
72℃	3 min[a]	
72℃	5 min	
4℃	Hold	

a.如果扩增片段≤3 kb，延伸时间设置为3 min即可；如果扩增片段>3 kb，每增加1 kb，延伸时间延长30 sec。
b.如果扩增产物条带较弱，可适当增加扩增阶段的循环数。

08-4/【可选】Nested PCR（巢式PCR）扩增

如果上一轮PCR扩增没有扩增出理想的特异产物，或者产物非特异条带较多时，可选择使用试剂盒内提供的Nested Primer与自己设计的Nested GSP进行“Nested PCR（巢式PCR）”，对于产物较弱，非特异条带较多的情况，此方法可以提高特异性和产量。

1. 取5 μl上一轮PCR扩增产物，加入至245 μl ddH_2O中，振荡混匀。

2. 按照下表配制巢式PCR扩增反应体系：

组分	Nested PCR	Nested Primer 单引物对照（可选）	Nested GSP 单引物对照（可选）
步骤1稀释PCR产物	5 μl	5 μl	5 μl
Nested GSP(10 μM)	1 μl	0 μl	1 μl
■ Nested Primer	1 μl	1 μl	0 μl
■ 2 × PCR Mix	25 μl	25 μl	25 μl
ddH_2O（自备）	18 μl	19 μl	19 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

▲使用Nested Primer/Nested GSP单引物对照有助于区分出非特异扩增背景产物。

3. 扩增程序参考08-3/cDNA末端的快速扩增（RACE）PCR程序 II 。

08-5/RACE 扩增产物纯化与检测

推荐使用FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit（Vazyme #DC301）或其他等效产品，具体步骤流程见其说明书。

08-6/克隆转化

1. 克隆推荐使用5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit（Vazyme #C601）或其他等效产品，具体步骤流程见其说明书。

   ▲如果目的扩增产物条带较弱，建议进行多管PCR扩增富集产物纯化后进行克隆，有助于提高克隆阳性率。

2. 转化

   本产品兼容多种常规感受态，转化推荐使用Fast-T1 Competent Cell（Vazyme #C505）或其他等效产品，具体步骤流程见其说明书。

3. 阳性克隆鉴定

   菌落/菌液PCR鉴定：推荐使用2 × Taq Master Mix（Dye Plus）（Vazyme #P112）或其他等效产品，具体步骤流程见其说明书。

4. 测序分析

   选取经鉴定的阳性单克隆进行一代测序鉴定，测序引物可选择载体通用引物或自行设计引物（推荐至少挑取8 - 10单克隆进行测序）。

09/常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
无扩增产物或产物弥散	RNA提取物中无目的转录本	设计已知转录本区域的qPCR或PCR引物进行目的产物检测。
	RNA降解	进行实验前检测RNA完整程度，可通过RNA琼脂糖凝胶电泳观察是否有完整rRNAs带型进行评价； 也可使用Agilent RNA 6000 Pico Kit评价RNA完整度。
	目的转录本表达丰度低	增加RNA模板投入量（不超过4 μg）； 增加cDNA投入量，减少cDNA稀释倍数（50 μl PCR反应体系，未稀释cDNA投入不超过10 μl）； 增加GSP投入量（视各转录本具体情况而定，50 μl PCR反应体系，GSP（10 μM）加入不超过5 μl）； 设计Nested GSP，进行多轮Nested PCR（不超过三轮），富集产物片段的同时保证了扩增产物特异性。
	待扩增目的片段过长	提高PCR延伸时间，产物每增加1 kb延伸时间提高30 sec。
	设计GSP Tm过低	设计GSP Tm≥65℃，Tm>70℃使用Touch Down PCR更有助于提高产物特异性。
产生复杂带型	RNA前体具有可变剪接形式	进行数据库比对，针对特异性区段序列设计GSP。
	目的基因属于多基因家族	
	扩增非特异	设计额外的NGSP，进行多轮Nested PCR（不超过三轮）； 将目的片段产物进行切胶回收，再次进行PCR扩增。
无poly A^+ RNA的5' RACE	不能使用5' CDS Primer进行一链cDNA合成	使用5' Random Primer进行一链cDNA合成（试剂盒内提供）。
		使用GSP进行一链cDNA合成，建议下一步PCR扩增时，使用巢式GSP进行扩增，特异性和阳性率会提高。
无poly A^+ RNA的3' RACE	不能使用3' CDS Primer进行一链cDNA合成	可通过Poly（A）Polymerase进行加A处理后进行实验，或通过其他3'末端转移酶进行寡聚加A尾处理后进行实验。
无阳性克隆	目的片段投入量不足	进行多管PCR扩增富集产物纯化后进行克隆；扩大克隆体系，增加目的片段投入量。

Vazyme Biotech Co., Ltd.
Web: www.vazyme.com
Tel: 400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com
Service: service@vazyme.com

www.vazyme.com