

3' RACE 扩增试剂盒

Cat: DTT013

1. 产品简介

快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 是一种当 RNA 转录本的序列仅部分已知时, 以 RNA 为模板高效逆转全长 cDNA, 并将 cDNA 作为模板快速扩增其 3' 末端。试剂盒包含 3' RACE 扩增所需组分, 可根据实验需求进行选择。

2. 产品组分

试剂名称	体积 (μl)	储存条件
dNTPs	20	-20°C
3' Primer A	10	-20°C
Murine RNase Inhibitor	4	-20°C
DTT	10	-20°C
Reverse Transcriptase	4	-20°C
2 × PCR Mix	250	-20°C
RNase- Free water	1000	-20°C
10 × UPM	50	-20°C
TS Primer	10	-80°C
5 × RT Buffer	48	-80°C

3. 自备材料

- 1) 总 RNA 或者 mRNA 样本;
- 2) 振荡器、瞬时离心机, PCR 仪等;
- 3) 3' GSP Primer;

4. 试验步骤

4.1 RNA 变性

将相关试剂从冰箱中取出, 在冰上进行融化, 待融化后涡旋混匀, 瞬时离心。

序号	组分名称	体积 (μl)
1	dNTPs	2.0
2	3' Primer A	1.0
3	RNA	总 RNA 10pg-500ng/mRNA 1pg-100ng
4	RNase- Free water	补至 10μl

按照上表配制反应液，轻轻涡旋混匀，瞬时离心。

待 PCR 仪温度升至 72°C，进行反应，程序如下所示：

序号	温度	时间
1	72°C	3min
2	立即置于冰上	不少于 3min

4.2 cDNA 第一链合成

按照下表配制 cDNA 第一链合成反应体系（所有试剂均在冰上融化操作），具体如下：

序号	组分名称	体积 (μl)
1	5 × RT Buffer	4.0
2	DTT	1.0
3	Murine RNase Inhibitor	0.4
4	TS Primer	1.0
5	Reverse Transcriptase	0.4
6	RNase- Free water	2.6
7	上一步产物	10.0
8	总体积	20.0

注：1、TS Primer、Reverse Transcriptase 轻弹混匀，瞬时离心，勿涡旋；

2、5 × RT Buffer、TS Primer 于 -80°C 保存，如多次使用请分装，尽量避免反复冻融。

使用振荡器轻轻涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。待 PCR 仪温度升至 42°C，放入 PCR 板，程序如下所示：

序号	温度 (°C)	时间
1	42°C	90 min
2	70 °C	15 min
3	4 °C	Hold

反应结束后可将产物于 -20°C 保存或直接进行下一步扩增，

4.3 cDNA 末端快速扩增 (5'RACE/3'RACE)

按照下表配制 RACE 扩增反应液（所有步骤均在冰上操作）

序号	组分名称	体积 (μl)
1	2 × PCR mix	25.0
2	3' GSP Primer	1.0
3	10 × UPM	5.0
4	3'-RACE-Ready cDNA	2.5
5	RNase- Free water	16.5
	总体积	50.0

将上表混合液轻轻涡旋混匀，瞬时离心。在 PCR 仪上反应，具体反应程序如下：

序号	程序	温度 (°C)	时间	循环数
1	预变性	95	5min	1
2	变性	95	10s	30-35
3	退火	59*	15s	
4	延伸	72	1min	
5	延伸	72	5min	1
6	保存	4	hold	1

注：*GSP 退火温度较高，建议使用降落 PCR 探索最适温度；T_m 值如果小于 70℃，建议使用推荐温度进行扩增；样本>3kb 时，每 kb 建议延伸时间添加 1min。

待反应结束后，瞬时离心，然后将 PCR 产物放置于冰上备用或于 -20℃ 保存。

5. 注意事项

- 1) PCR 操作均在冰上进行；
- 2) 所有 PCR 试剂及耗材需无酶无菌；

感谢您选择德泰生物，我们竭诚为您服务！

For Research Use Only!