

微量RNA起始的完整5'末端/3'末端cDNA合成



SMARTer RACE 5'/3' Kit

<微量RNA起始的完整5'末端/3'末端cDNA合成的优势>

- ✓ 反转录起点的鉴定
- ✓ 启动子区域的分析
- ✓ 抗体可变区的分析
- ✓ 全长ORF (Open Reading Frame) 分析蛋白质
- ✓ LncRNA (long non-coding RNA)分析

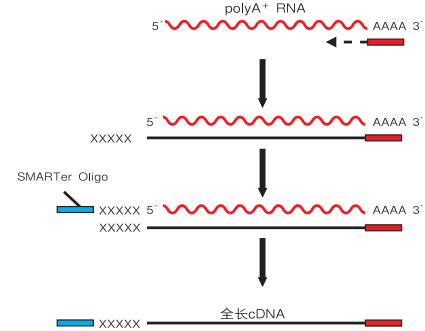


“RACE” 是能够对未知区域的序列进行分析的技术

RACE (rapid amplification of cDNA ends), 基于已知的部分序列, 通过PCR技术, 即可简便克隆得到cDNA末端的未知区域的序列, 整个过程不需要制备文库。克隆后通过测序能够进一步分析基因。在目标基因数不多的情况下, 与NGS相比, RACE更有效、更经济。

“SMARTer” 是高灵敏度合成全长cDNA的技术, 原理如下

SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Template) 技术, 利用反转录酶具有的cDNA末端转移酶活性, 通过模板转换功能, 进一步使DNA复制延续, 有效合成全长cDNA。与接头连接法等传统方法相比, 具有更高的添加效率。LCM样品及活体检测样品等的微量total RNA起始时, 也可以得到足够量的SMARTer cDNA, 用于多样的下游应用。



在不同应用领域, 使用SMARTer RACE 5'/3' Kit 的文献每年都在持续增长

更多文献可参考Takara官网 SMARTer RACE产品网页。

下拉至底部即可查找。

✓ ORF分析:

Finetti L. *et al.*, (2024) The octopamine receptor OA α 1 influences oogenesis and reproductive performance in *Rhodnius prolixus*. *PLoS One*. 18(12):e0296463.

Hanif MA. *et al.*, (2024) Hossen S, Choi CY, Kho KH. Cloning, characterization, and spatio-temporal expression patterns of HdhSPARC and its responses to multiple stressors. *Sci Rep*. 14(1):2224.

✓ 启动子分析:

Chen C. *et al.*, (2023) A Blue Light-Responsive Strong Synthetic Promoter Based on Rational Design in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Mol Sci*. 24(19):14596.

✓ LncRNA分析

Zhao Y. *et al.*, (2024) The long noncoding RNA LAL contributes to salinity tolerance by modulating LHCB1s' expression in *Medicago truncatula*. *Commun Biol*. 7(1):289.

Chen Z. *et al.*, (2023) HILPS, a long noncoding RNA essential for global oxygen sensing in humans. *Sci Adv*. 9(47):eadi1867.

✓ 抗体可变区分析:

Rong Y. *et al.*, (2024) An Engineered Mouse Model That Generates a Diverse Repertoire of Endogenous, High-Affinity Common Light Chain Antibodies. *Antibodies (Basel)*. 13(1):14.

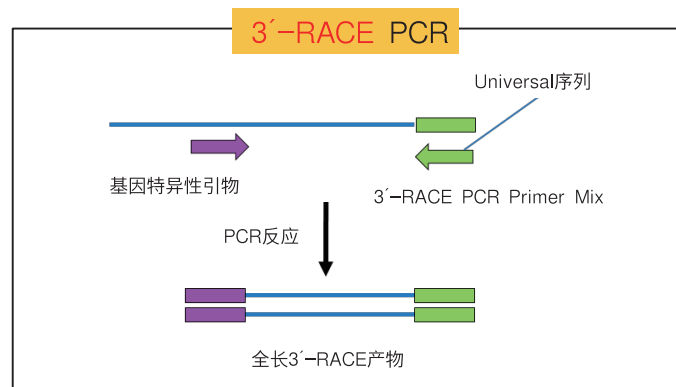
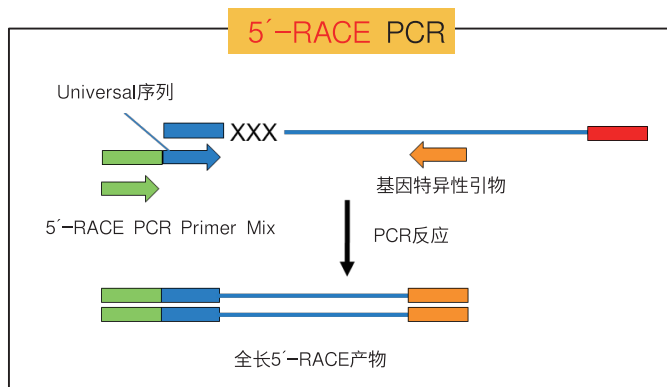
SMARTer RACE 5'/3' Kit

SMARTer RACE 5'/3' Kit的优势 (Code No. 634858/59)

- ✓ 利用SMART技术, 即使是微量RNA起始也能够获得完整的5'末端或3'末端cDNA
- ✓ 以10 ng的总RNA为起始, 也成为可能
- ✓ 不需要接头连接, 可以直接以1st strand cDNA起始进行RACE PCR
- ✓ 长片段或GC Rich区域也能够进行反应
- ✓ 包含所有需要的试剂【一站式克隆试剂盒】 (除基因特异性引物外)
 - In-Fusion® Snap Assembly Master Mix
 - SeqAmp DNA Polymerase
 - 线性化克隆载体
 - Stellar Competent Cells
 - NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (纯化试剂盒)

SMARTer RACE 5'/3' Kit的流程 (Code No. 634858/59)

- 不需要RNA的前处理: 即使有gDNA混入时, 也不需要使用DNase进行前处理。
- 1st strand cDNA合成开始至RACE片段的克隆, 只需8小时即可完成。2天可完成DNA的回收。

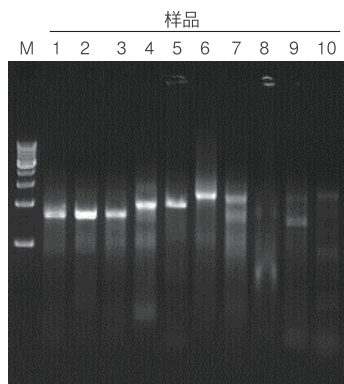


只需要准备目的基因的特异性引物, 然后与试剂盒中附带的5'/3'-RACE PCR Primer Mix (UPM) *进行PCR反应, 即能够得到全长RACE产物。

* 由Long Primer (其中带有SMARTer Oligo universal序列) 和short Primer组成的混合物。

对于长链或GC Rich等难扩增的序列, 也能够实现高性能PCR扩增

针对10种样品 (目的基因的mRNA全部10 kb以上), 按照SMARTer RACE 5'/3' Kit的user manual设计引物, 进行RACE PCR。然后, 使用本kit对PCR产物进行克隆, 利用Sanger法测序。(红字: 发现了之前未被报道过的序列的碱基数)



样品	目的基因	转录产物长度 (bp)	GC含量 (%)	RACE产物长度 (bp)	PCR产物 (有/无)	新发现序列 (bp)
1	MAP1A	10,537	54.56	1,591	有	13
2	MAP1B	11,996	42.35	1,795	有	0
3	SPTBN1	10,238	42.8	1,633	有	32
4	SLC1A2	12,021	42.2	2,014	有	73
5	DYNC1H1	14,361	47.06	1,999	有	36
6	PKD1	14,135	63.16	2,329	有	21
7	PLEC	14,668	63.68	1,516; >2,000	有	16
8	NRXN1	10,626	35.78	2,110	无	N/A
9	PCLO	22,288	33.82	2,269	有	59
10	HOOK3	14,460	40.55	2,318	有	0

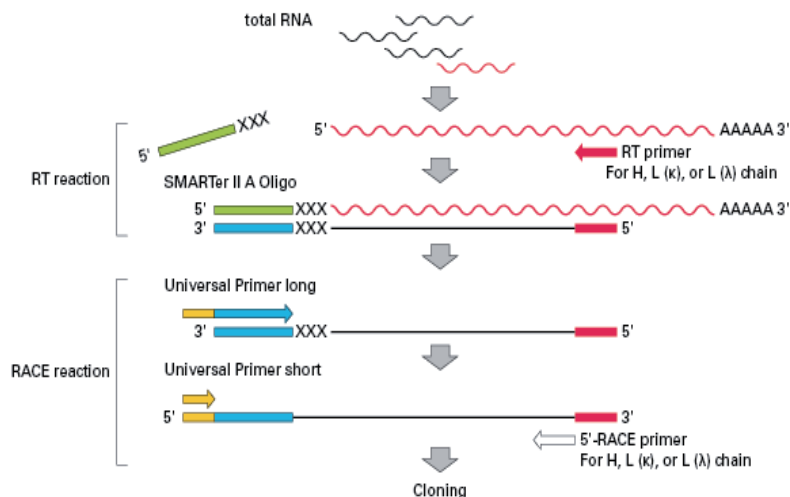
● 快速克隆小鼠杂交瘤IgG抗体ORF

在克隆小鼠杂交瘤抗体基因之前，首先根据NCBI核酸数据库注册的小鼠IgG的序列，设计了针对H链，L (κ)链，或L (λ)链的反转录引物 (RT Primer) 以及RACE PCR所需的反向引物 (5' RACE Primer)。通过SMARTer RACE方法从total RNA合成了第一链cDNA后，直接进行5'-RACE PCR，这样不仅可以获得5'端序列，还可以获得带有可变区全部序列的cDNA片段。

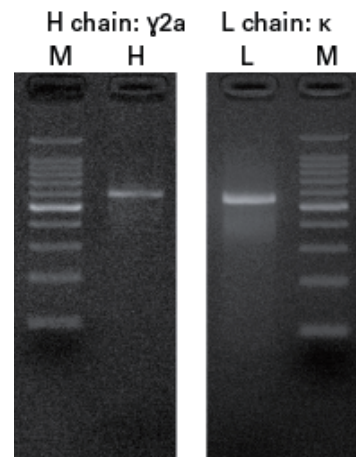
培养并确认小鼠杂交瘤细胞分泌由γ2a型重链和κ型轻链组成的单克隆抗体。提取total RNA，按照说明书protocol进行第一链cDNA合成和5'-RACE PCR，取一部分PCR反应液进行琼脂糖凝胶电泳确认。

克隆扩增产物至pUC118后测序。确认序列包含单克隆抗体H链和L链N端氨基酸序列对应的ORF。

<使用SMARTer RACE Kit扩增抗体可变区的实验流程>



<小鼠杂交瘤抗体基因成功扩增的确认>



★ 使用SMARTer RACE 5'/3' Kit的用户心声

Q1. 决定使用SMARTer RACE 5'/3' Kit的理由是什么？

- 考虑到序列提交时，全长的序列更好。(T大学 T先生)
- 为获得抗体基因。(T公司 M先生)
- 为使用Real Time PCR对未知序列的成花相关基因的全长cDNA进行表达分析。(T大学 H先生)
- 相比于NGS RNA-Seq，可以进行更合理的分析。(H大学 T先生)
- 哺乳动物、病毒mRNA的全长序列的确定。(K大学 H先生)
- 为获知3'末端一侧的序列。(T大学 K先生)

Q2. 请写一下使用后的感想及对未使用人的建议

- 按照Protocol操作能得到好的结果。(T大学 T先生)
- 对于N末端未知的抗体基因的获取很便利。(T公司 M先生)
- 非常简单，易于使用。(T大学 H先生)
- Takara的产品性能让人满意。(H大学 T先生)
- 比其他公司的RACE试剂盒效率好。(K大学 H先生)
- PCR后，可以得到漂亮的条带。(T大学 K先生)

让您的RACE实验，SMARTer起来!

SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit，包含了RACE实验全部核心试剂：

1. SMARTer first-strand cDNA synthesis reagents——高效合成cDNA；
2. SeqAmp DNA Polymerase——有效扩增长片段&GC-rich模板；
3. In-Fusion Cloning reagents——快速、准确、无缝克隆至载体；
4. NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit——柱型PCR产物纯化产品；
5. Linearized pRACE vector——PCR产物克隆线性载体；
6. Stellar Competent cells——高效感受态细胞。



◆ SMART法合成cDNA相关试剂列表

制品名称	概要	包装量	Code No.
SMARTer [®] RACE 5'/3' Kit	获得5'RACE和3'RACE片段，包含SeqAmp PCR酶、In-Fusion克隆试剂、感受态细胞和SMART-Scribe反转录酶	10 次	634858
		20 次	634859
SMARTer [®] RACE 5'/3' Kit (no competent cells)	634859不含感受态细胞的包装形式	20 次	634499
SMARTer [®] PCR cDNA Synthesis Kit*1	获得全长cDNA	10 次	634925
		20 次	634926
Advantage [®] 2 Polymerase Mix	经过验证优化的PCR酶	100 次	639201
		500 次	639202
Advantage [®] 2 PCR Kit		100 次	639206
		30 次	639207

*1: 该产品不包含PCR酶，推荐使用Clontech的Advantage 2 PCR Kit。

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<https://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页上记载的产品信息是2024年4月1日的信息，最新信息请参考公司官网。