

GenSeq® RCA DNA Amplification Kit

GS-MB-002

Instruction Manual Version 1.0

(Updated, July 2023)

试剂盒组分	GS-MB-002S (25 次反应)	GS-MB-002L (100 次反应)	保存条件
10 x RCA Buffer	50 μ L	200 μ L	-20°C
dNTP	50 μ L	200 μ L	-20°C
Random Primer	50 μ L	200 μ L	-20°C
RCA Enzyme	50 μ L	200 μ L	-20°C
Nuclease-free Water	500 μ L	2 mL	4°C / -20°C

自备材料

-
- ✓ 环状 DNA 模板
 - ✓ 移液器及吸头(无核酸酶)
 - ✓ 0.2mL 无核酸酶 PCR 管
 - ✓ PCR 仪

产品简介

染色体外环状 DNA (eccDNA, extrachromosomal circular DNA) 指在各类真核生物中广泛存在的, 染色体外的环状结构 DNA。染色体外环状 DNA 以特殊的方式参与生理或病理过程, 是一类新型癌基因。天然的环状 DNA 在细胞内含量很低, 不易检测。

GenSeq® RCA DNA Amplification Kit 通过基于 phi29 DNA 聚合酶的滚环扩增反应 (RCA, Rolling Circle Amplification), 可以连续地放大环状 DNA 的信号, 生成带有多个环状 DNA 重复拷贝的长链 DNA 分子, 便于后续检测。本试剂盒包含了滚环扩增反应所需的全部试剂, 除了可用于 eccDNA 的扩增, 也可用于细菌质粒 DNA 等其它单链或双链环状 DNA 的扩增。

实验流程

起始样品类型

建议使用纯化富集后的环状 DNA 进行 RCA 扩增。

注意事项

RCA 扩增产物可以稀释后直接用基于荧光染料的方法 (如 Qubit® Fluorometer) 进行定量, 或纯化后通过基于核酸光吸收的方法 (如 Nanodrop®) 进行定量。

1. RCA 反应

- 1) 将 PCR 仪预热到 95°C (>100°C 热盖)。
- 2) 在 PCR 管中配置如下反应体系, 振荡混匀, 短暂离心使液体位于管子底部。

试剂	体积
环状 DNA 模板 (>200 pg)	X μ L
10 x RCA Buffer	2 μ L
dNTP	2 μ L
Random Primer	2 μ L
Nuclease-free Water	To 18 μ L

- 3) 将步骤 2) 中的样品放入 95°C 预热的 PCR 仪中孵育 3 分钟, 然后将 PCR 管放置在室温冷却 5 分钟。
- 4) 将 PCR 管转移至冰上, 加入 2 μ L RCA Enzyme, 用移液枪轻柔吹打混匀, 短暂离心使液体位于管子底部。

- 5) 将 PCR 管转移到 PCR 仪中运行 RCA 反应程序：
 - (1) 30°C, 16 hours*; (*: 可延长至 48 hours)
 - (2) 65°C, 10 min;
 - (3) 4°C, Hold;
- 6) RCA 产物可稀释后直接用于 Qubit 定量或 PCR 等反应, 也可以通过 Ampure 磁珠纯化后用于 Nanodrop 定量或其它下游反应。

2. RCA 产物纯化 (可选)

- 1) 将 AMPure XP Beads 提前 30 min 从 2 ~ 8°C 取出, 静置使其平衡至室温。
 - 2) 颠倒或涡旋振荡使 AMPure XP Bead 充分混匀, 吸取 36 μ l (1.8 \times) 加入到 RCA 产物中, 使用移液器轻轻吸打 10 次充分混匀。
 - 3) 室温孵育 10 min, 使 DNA 结合到磁珠上。
 - 4) 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心移除上清。
 - 5) 保持样品处于磁力架上, 加入 200 μ l 80%乙醇(新鲜配制)漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠),
 - 6) 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
 - 7) 重复步骤 6)一次。
 - 8) 保持样品处于磁力架上, 在室温下开盖干燥磁珠约 5 - 10 min。
 - ▲加入 80%乙醇时不要吹散磁珠。
 - ▲最后移除上清时需要使用 10 μ l 移液器将残留液体吸干净。
 - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
 - 9) 将样品从磁力架上取出, 加入 21.5 μ L 去离子水, 使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置 2 min 后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心吸取 20 μ L 上清至一个新的 PCR 管中。纯化后样品立即用于后续实验或 -20°C 保存待用。
-

FAQs

.....

1. RCA 产物量低原因及解决方案？

原因一：RCA 反应的起始模板量太低。

解决方案：增加起始模板量或延长 RCA 反应时间。

原因二：起始 DNA 模板质量不佳。

解决方案：确保使用完整的，环形的 DNA 模板进行 RCA 反应，勿使用降解的 DNA 样品。

原因三：起始 DNA 模板中有抑制 RCA 反应的抑制物。

解决方案：将起始 DNA 充分稀释后再进行 RCA 反应。或将起始 DNA 进行柱纯化或是磁珠纯化，去掉杂质后再进行 RCA 反应。

原因四：实验操作不当。

解决方案：可以使用完整的 DNA 质粒做为阳性对照，平行地进行 RCA 反应。