天净沙系列

CAT#:221080

低温运输，-20℃保存

天净沙

染料法实时 RCA 试剂盒

SYBR Realtime RCA Kit

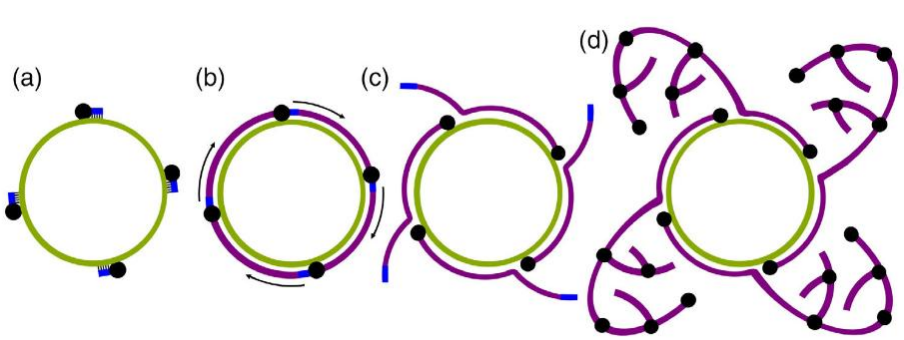
使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

RCA（Rolling Circle Amplification，滚环扩增）是利用 phi29 DNA 聚合酶的超长合成能力，在一定条件下（如随机引物、dNTP、Mg 离子存在时）能够以线状的超长基因组 DNA 或环化后的短 DNA 为模板进行全基因组扩增的技术。本产品是基于 RCA 技术，针对环状 DNA 为模板专门开发的 RCA 试剂盒。其示意图如下：



本产品具有下列特点：

1. 即开即用，十分简单方便，用户不需要辛苦摸索条件。
2. 直接使用纯化的环状单链 DNA 或环状双链 DNA 为模板。如果样本为线状 DNA，需要预先对其进行环化（本公司有单链 DNA 环化和双链 DNA 环化试剂盒）。
3. RCA 属于恒温扩增，操作简单，但如果要实时监测，需要荧光定量 PCR 仪器。如果没有，也可以电泳检测或 PCR 检测扩增效果。
4. 含荧光染料，可以实时监测 RCA 反应过程，不需要跑电泳检测，节约宝贵样品（因为进行 RCA 扩增的样品都非常珍贵）。
5. 实时检测使得反应可以在平台期后就可以结束，避免 phi29 DNA 聚合酶具有的强 3-5 外切酶活性降解已经合成的 DNA。
6. phi29 DNA 聚合酶具有的强 3-5 外切酶活性，故扩增具有高保真性。
7. 可以将模板 DNA 在几个小时到十几小时内扩增万倍左右。
8. 本产品足够 50 次 10 μL 体系的荧光染料实时 RCA 反应。
9. 得到的 DNA 可以直接用于测序、酶切或 PCR 等后续实验。

本产品只能用于科研。

规格及成分

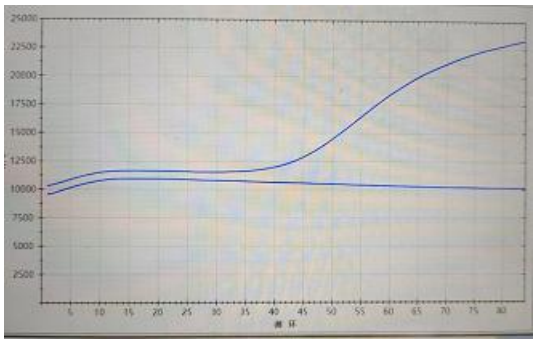
本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
4×染料法实时 RCA Mix（无酶无引物）	221080a	125 μL	0.5 mL 绿盖管
RCA 专用随机引物溶液	220225	100 μL	0.5 mL 白盖管
phi29 DNA 聚合酶，10 U/μL	221198	25 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	221080sc	1 份	无

运输及保存	低温运输，-20℃保存,有效期为一年。
自备试剂	环状单链 DNA 模板或环状双链 DNA 模板、超纯水。
使用方法	1. 按下表设置 10 μL 的环状 DNA RCA 反应：

成分	管 1 （样本）	管 2 （无模板对照）
环状 DNA，100 pg	1 μL	-
超纯水	4 μL	5 μL
RCA 专用随机引物溶液	2 μL	2 μL
4×染料法实时 RCA Mix （无酶无引物）	2.5 μL	2.5 μL
在 PCR 仪器上 95℃ 1 分钟，30 分钟内温度缓慢降到 25℃ 缓慢降低有利于引物与模板复性		
phi29 DNA 聚合酶，10 U/ μL	0.5 μL	0.5 μL
合计	10 μL	10 μL

2. 放荧光定量 PCR 仪器上，设置 30℃保温 16 小时，每 10 分钟设置成一个循环，采集一次 SYBR 通道的荧光信号。由于是可以实时检测反应，所以反应不一定要在设置时间到达后结束，可以在扩增曲线进入平台期后（已经没有新的 DNA 合成）结束。因为 phi29 DNA 聚合酶有很强的 3-5 外切酶活性，在聚合反应停止后，它可能会进入酶切模式，逐渐降解已经合成的 DNA。
3. 65℃保温 10 分钟灭活酶。由于 phi29 DNA 聚合酶有很强的 3-5 外切酶活性，因此必须灭活，否则它将逐渐降解已经合成的 DNA。
4. 典型实验结果。有扩增的样本将有平缓的 S 荧光曲线，无模板对照将没有此标准扩增曲线（见下图）或扩增曲线：



5. 如果没有荧光定量 PCR 仪器，则只能电泳检测或 PCR 检测是否有扩增。
6. 扩增所得 DNA 可以用于后续实验。

关联产品	RCA专用随机引物