天净沙系列

CAT#:230222

常温运输和保存，有低温成分

包埋法 eccDNA 纯化及扩增试剂盒

eccDNA Purification and Amplification Kit

使用手册 V1.11

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

本产品是包埋法 eccDNA 纯化及扩增试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，起始材料最好为贴壁或悬浮培养细胞、实体组织、白细胞。如果是实体组织或冷冻组织，效果稍差。
2. 采用包埋法纯化，极大程度抑制了细胞核 DNA 的污染。
3. 适合基因组较大物种的 eccDNA 纯化，基因组大小在 50 kb 以下的不合适。
4. 采用沉淀法纯化，避免采用磁珠和过柱纯化，防止了短 eccDNA 的丢失。
5. 采用酶切去除人线粒体 DNA，降低其对 eccDNA 分析的干扰。
6. 采用荧光染料法滚环扩增 RCA 试剂盒，进一步富集 eccDNA。
7. 使用非生物源性的核酸助沉剂，避免了外源核酸对 RCA 和测序的干扰。
8. 足够 25 次 eccDNA 纯化和扩增实验，一次纯化可以处理 2E7 个细胞。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，编号 230222pt1，大扁盒包装，常温运输和保存

名称	编号	规格	包装
包埋法 eccDNA 纯化溶液 A	230222a	75 mL	125 mL 本色瓶
包埋法 eccDNA 纯化溶液 B	230222b	5 mL	5 mL 本色瓶
包埋液	230222c	25 mL	30 mL 本色瓶
去蛋白溶液 A	230222f	17.5 mL	30 mL 棕玻瓶
去蛋白溶液 B	230222g	7.5 mL	10 mL 棕玻瓶
微量核酸沉淀剂 V2.0（无生物源性）	221231	35 mL	60 mL 本色瓶
使用手册	230222sc	1 份	无

本产品第二部分，编号 230222pt2，十孔盒包装，低温运输，-20℃保存

名称	编号	规格	包装
蛋白酶 K 溶液，10 mg/mL	220137	500 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
10×人 mtDNA 内切酶缓冲液	230222h	0.5 mL	0.5 mL 绿盖管
人 mtDNA 内切酶	230222i	25 μL	0.5 mL 红盖管
RCA 专用随机引物干粉	220225	25 次	0.5 mL 本色管
Phi29 DNA 聚合酶，10 U/μL	11-221198a	13 μL	0.5 mL 橘黄管
10×Phi29 DNA 聚合酶缓冲液	11-221198b	25 μL	0.5 mL 紫盖管
dNTP-染料混合液	221080a	37.5 μL	0.5 mL 白盖管

	使用手册	230222sc	1 份	无

运输及保存	第一部分需要常温运输和保存，第二部分需低温运输和-20℃保存，有效期一年。
自备试剂	自备 PBS、琼脂糖，75%乙醇
使用方法	整个过程所需溶液和设备（Dounce 玻璃匀浆器）均需提前半小时将其放冰上预冷，下面的步骤所述溶液均是预冷液。 **一、培养细胞的预处理** 1. 用自备 PBS 洗涤生长中的培养细胞 3 次。 2. 用无菌的塑料刮片将细胞收集（或胰酶消化后离心收集）至一个小体积 PBS 内，用细胞计数器计算细胞数，再加入适量包埋法 eccDNA 纯化溶液 A（以下简称溶液 A）使细胞终浓度为 2E7 个细胞/mL。 **二、新鲜组织样品的预处理** 3. 在干净的容器内（如培养皿），用干净刀片将新鲜组织切割成芝麻大小的小粒(1~2 mm^3)，放入装有 PBS 的 Dounce 玻璃匀浆器中匀浆。此步将使得细胞脱落，但也有很多细胞被机械裂解。 4. 经两层纱布过滤除去结缔组织块。 5. 用 PBS 洗悬浮涤细胞 3 次，用少量溶液 A 重悬细胞，用细胞计数器计算细胞数，再加入适量溶液 A 使细胞终浓度为 2E7 个细胞/mL。 **三、冰冻组织样品** 6. 用-70℃预冷的研钵将冰冻组织研成粉末，然后混悬在 PBS 中。 7. 经两层纱布过滤除去结缔组织连块。 8. 用 PBS 洗涤悬浮细胞三次，用少量溶液 A 重悬细胞，用细胞计数器计算细胞数，再加入适量溶液 A 使细胞终浓度为 2E7 个细胞/mL。 **四、血液白细胞样品的制备** 9. 用自选方法从全血中粗分出白细胞。 10. 再用自备的红细胞裂解液将白细胞层中残留的红细胞裂解。 11. 将白细胞重悬在 PBS 中，细胞终浓度为 2E7 个细胞/mL。 **五、包埋块及包埋提取液的制备** 12. 在配制琼脂糖电泳胶所用的制胶托盘上，按常规方法以超纯水或去离子水为缓冲液灌制 2%琼脂糖凝胶，厚度为 0.5 cm 左右，待其凝固后，以直尺 0.5 cm 刻度为参照用干净刀片将还在制胶托盘中的琼脂糖凝胶切出 10 个 0.5

cm×0.5 cm 大小的孔，也可以用蓝枪头修剪后按压，形成体积相似的圆形孔，挑出其中的胶块。将这个制胶托盘和上面的带 10 个小孔的凝胶放 42℃金属浴上待用。

13. 用水浴加热试剂盒提供的包埋液，80℃水浴融化后摇匀，取 1 mL 到一新的离心管中，放 42℃金属浴孔中待用。
14. 将 1 mL 细胞悬液（2E7 个细胞/mL）加热到 42℃。
15. 在琼脂糖胶上掏空的每个孔中分别加入 0.1 mL 包埋液，然后加入 0.1 mL 细胞悬液，用枪头轻柔搅动让细胞和包埋液充分混匀。重复此操作，直到 10 个孔中都装满包埋液和细胞悬液的混合液。
16. 将制胶托盘（包括托盘里的凝胶）在 4℃放 30 分钟，10 个孔中的包埋液-细胞混合液将凝结成包埋块。
17. 用刀片切掉包埋块周边的琼脂糖凝胶，小心将 10 个包埋块分别转移到 1 个 5-10 mL 的塑料离心管中。
18. 分别加入 2 mL 新鲜制备的包埋块 eccDNA 提取液（制备 2 mL 裂解液的方法：溶液 A 2 mL，溶液 B 200 μL，蛋白酶 K 溶液 20 μL，混匀后即可）。
19. 用脱色摇床在 50℃轻柔摇晃 12 小时后用移液枪小心收集包埋块外的 eccDNA 提取液，共约 2 mL，平均分到 4 个 1.5 mL 塑料管中，命名为 eccDNA 初提液。

六、eccDNA 初提液去蛋白

20. 由于 eccDNA 初提液中有高浓度的蛋白酶，因此需予以去除，否则会严重干扰后续实验。故在 4 管初提液中，分别加入 0.5 mL 去蛋白溶液 A，再涡旋震荡 2 分钟。
21. 再加入 0.2 mL 去蛋白溶液 B，再涡旋震荡 2 分钟。
22. 常温 13000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中。
23. 在上清中加入 1 mL 的微量核酸沉淀剂（取用前需要颠倒混匀后取用），颠倒混匀，常温 15000×g 离心 15 分钟，小心弃上清后加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次，常温 15000×g 离心 3 分钟，小心弃上清后短暂离心 30 秒。去掉残留的液体（约 50 μL）。
24. 敞开盖子 3 分钟后，各加入 50 μL 超纯水，吹打重悬，汇集在一起得 eccDNA 再提液 200 μL，用 NanoDrop 或 PicoGreen 法 DNA 定量试剂盒测试

eccDNA 再提液浓度。取 20 μL eccDNA 再提液留样作为后续实验的对照。

七：线粒体 DNA 酶切

注意：本步只限人线粒体 DNA。如果用生物信息学的手段排除线粒体 DNA 对测序数据的干扰，可以跳过此步。材料不是人细胞的也可以跳过此步。

25. 在一个 PCR 管中设置如下反应：

成分	加入量
10×人 mtDNA 酶切缓冲液	20 μL
eccDNA 再提液	180 μL
人 mtDNA 内切酶	1 μL

26. 37℃保温 4 小时。
27. 加入 0.2 mL 去蛋白溶液 A，再涡旋震荡 2 分钟。
28. 再加入 0.1 mL 去蛋白溶液 B，再涡旋震荡 2 分钟。
29. 常温 15000×g 离心 5 分钟，溶液将呈两层相。将含有 DNA 的上层转移到一个新的离心管中。
30. 在上清中加入 0.4 mL 的微量核酸沉淀剂（取用前需要颠倒混匀后取用），颠倒混匀，常温 15000×g 离心 15 分钟，小心弃上清后加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次，常温 15000×g 离心 3 分钟，小心弃上清后短暂离心 30 秒。去掉残留的液体后，开盖放置 3 分钟。
31. 加入 20 μL 超纯水，吹打溶解沉淀，得到去蛋白后的 eccDNA 精提液。用 NanoDrop 或 PicoGreen 法测试所得 eccDNA 的浓度。

九：去除人线粒体 DNA 效果检测

32. 可以用自备的线粒体 PCR 试剂盒，以 eccDNA 再提液留样和 eccDNA 精提液为模板进行扩增，检测去除线粒体 DNA 的效果。本试剂盒不含人线粒体 DNA 检测试剂盒，用户需要另外购买。本步也可以跳过。

九：RCA 扩增

33. 按下表设置 RCA 反应，注意：一定要设置一个阴性对照 NC。首次使用本产品时，需要在 RCA 专用随机引物干粉管中加入 25 μL 超纯水，涡旋震荡溶解引物，再短暂离心 10 秒。没有用完的引物需要放置在-20℃保存。

成分	样本管	NC 管
eccDNA 精提液	5.5 μL	-
超纯水	-	5.5 μL

RCA 专用随机引物溶液	1 μL	1 μL
dNTP-染料混合液	1.5 μL	1.5 μL
10×phi29 DNA 聚合酶缓冲液	1 μL	1 μL
合计	9.5 μL	9.5 μL

34. 95℃ 5 分钟变性 DNA，立即放冰上。

35. 分别加入 0.5 μL 的 phi29 DNA 聚合酶。

36. 30℃保温 16 小时。如果使用荧光定量 PCR 仪保温，则设置每 10 分钟一个循环，每次循环采集一次 SYBR 通道的荧光信号。样本管应该有标准的扩增曲线，而阴性对照管将没有扩增曲线。如果阴性对照有扩增，则在出峰时需要停机，已经出峰的样本管的扩增产物可以使用。

37. 70℃10 分钟变性灭活酶，所得扩增后的 DNA 可以用于各种后续实验。

关联产品 饱和型 LAMP 荧光染料