天净沙系列

CAT#:45-10000

低温运输，-20℃保存

HBV cccDNA 选择性 WGA 试剂盒

HBV cccDNA Selective WGA Kit

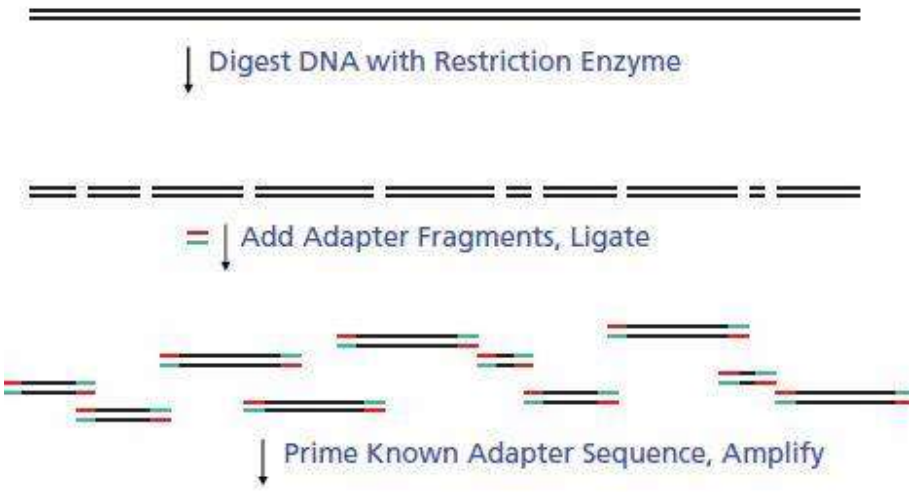
使用手册 0.5

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

Linker-Adapter PCR 是用限制性内切酶酶切基因组 DNA，产生 100-1500 bp 的片段，然后在其两端加上 Linker，最后用识别 Linker 的引物进行 PCR 扩增的一种全基因组 DNA 扩增技术。其原理示意图如下：



本产品就是根据此原理开发的针对 HBV cccDNA 进行选择性全基因组扩增的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，十分简单方便，用户不需要辛苦摸索条件。
2. 所有反应一管式完成，不会有 DNA 的丢失。
3. 适用于扩增没有降解的痕量样品、激光微切样品（Laser microdissection）、单细胞 DNA、单染色体或染色体片段。但不适合已经降解的 DNA。降解的 DNA 可选用本公司的 RCA 法全基因组扩增产品。
4. 含荧光染料，可以实时监控扩增反应过程，不需要实验结束后再跑电泳，节约宝贵样品（因为需要进行全基因组扩增的样品都非常珍贵）。
5. 可以将 HBV cccDNA 扩增上万倍。
6. 适用于探针标记，杂交，位点检测。但由于 Taq DNA 聚合酶的突变率较高，不推荐后续用于高通量测序。如果需要测序则建议使用 RCA 法扩增。
7. 本产品足够 50 次 50 μL 体系的 LA-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成份	编号	规格	包装
10×酶反应液	45-10000a	50 μL	0.5 mL 绿盖管
蛋白酶溶液	45-10000b	25 μL	0.5 mL 黄盖管
MseI 内切酶	45-10000c	25 μL	0.5 mL 橙盖管
HBV cccDNA 特异性引物 1	yw45-10000d	干粉	0.5 mL 白盖管

HBV cccDNA 特异性引物 2	yw45-10000e	干粉	0.5 mL 白盖管
ATP 溶液，10 mM	210807	50 μL	0.5 mL 紫盖管
T4 DNA 连接酶	11-220758	50 μL	0.5 mL 红盖管
2×染料法 qPCR MasterMix	990408	1.3 mL	1.5 mL 本色管
超纯水	210806	1.5 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	45-10000sc	1 份	无

注意：第一次使用需要向 HBV cccDNA 特异性引物 1 管中加入 55 μL 超纯水，向 HBV cccDNA 特异性引物 2 管中加入 110 μL 超纯水,震荡 30 秒混匀然后短暂离心。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期为一年。

自备试剂

纯化好的 DNA 模板、超纯水。

使用方法

1. 如果是纯化好的 DNA，则直接用在管中加入 4 μL DNA，0.5 μL 10×酶反应液，然后直接进入下表的加 0.5 μL MseI 内切酶进行酶切的步骤，后续步骤同。
2. 如果是含蛋白质的微量样品、单个细胞，单个染色体或染色体片段，则按下表进进行操作：

成分	管 1 （样本）	管 2 （无模板对照）
待处理样品	不超过 3.5 μL	-
10×酶反应液	0.5 μL	0.5 μL
蛋白酶溶液	0.5 μL	0.5 μL
加自备超纯水	到 4.5 μL	到 4.5 μL
42℃保温 15 小时后 80℃10 分种		
各加入 0.5 μL MseI 内切酶，总体积为 5 μL		
37℃保温 3 小时后 65℃ 5 分种 再加入下列成分		
HBV cccDNA 特异性引物 1	1.0 μL	1.0 μL
HBV cccDNA 特异性引物 2	1.0 μL	1.0 μL
超纯水	0.5 μL	0.5 μL
10×酶反应液	0.5 μL	0.5 μL
此时总体积为 8 μL。放 PCR 仪上，从 65℃降温到 15℃，每分钟降低 1℃。然后再加入下列成分		
ATP 溶液，10 mM	1 μL	1 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL	1 μL

此时总体积为 10 μL。15℃保温过夜。再加入下列成分		
超纯水	14 μL	14 μL
引物 2	1 μL	1 μL
2×染料法 qPCR MasterMix	25 μL	25 μL

按下列参数进行 5 步式 PCR:

第一步：68℃3 分钟。

第二步：（94℃ 40 秒，57℃ 30 秒，68℃ 1 分 30 秒，每增加 1 个循环加 1 秒）共 14 个循环。在 68℃采集 SYBR 通道的荧光信号。

第三步：（94℃ 40 秒，57℃ 30 秒，每增加 1 个循环加 1 秒，68℃ 1 分 45 秒，每增加 1 个循环加 1 秒）共 8 个循环。在 68℃采集 SYBR 通道的荧光信号。

第四步：（94℃ 40 秒，65℃ 30 秒，68℃ 1 分 53 秒，每增加 1 个循环加 1 秒）共 22 个循环。在 68℃采集 SYBR 通道的荧光信号。

第五步：68℃3 分钟。

3. 有扩增的将有平缓的 S 曲线，无模板对照见没有此曲线。

4. 所得扩增产物可以纯化后用于各种后续实验，包括再扩增。

关联产品	染料法实时RCA试剂盒（环状单链DNA模板专用）