

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:220961-50  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

## 单链 DNA 模板易错 RCA 试剂盒

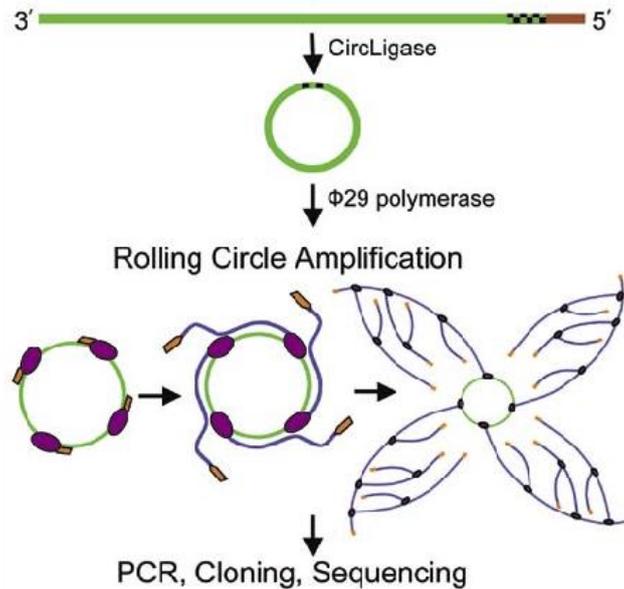
使用手册 1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6005850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

## 产品及特点

易错 RCA (Error-Prone Rolling Circle Amplification) 是利用 phi29 DNA 多聚酶在一定条件下 (如不同的 dNTP 浓度、不同的 Mg 浓度和 MnCl<sub>2</sub> 存在时) 能够按较高的机率引入随机引入突变。易错 RCA 弥补了易错 PCR 的巨大缺陷, 其中一个缺陷是易错 PCR 没法使用短的 DNA 片段, 因为 PCR 引物就占了 40 个 bp 左右, 故不适合小片段 DNA 突变。但任何短链 DNA 经过环化后, 均可进行易错 RCA, 故易错 RCA 可以对短的 DNA 片段进行突变。单链 DNA 模板易错 RCA 示意图如下:



本公司基于上述原理, 精心开发了本产品, 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. 配方经过精心优化, 突变率稳定, 一般能产生 3-5 个突变/kb。如果需要更高的突变率, 只需把上一次易错 RCA 的产物用作下一次易错 RCA 的模板即可。
3. 靶分子 DNA 可以是长度只有几十 bp 的小片段 DNA, 如启动子, 适配子, 酶活性区, 核糖体结合区等。
4. 含单链 DNA 环化试剂, 可将线状 DNA 环化。如果模板已经是环状 DNA, 则可选购不含单链 DNA 环化试剂的另一款关联产品 (产品编号为 221006)。
5. RCA 属于恒温扩增, 只需要水浴或金属浴, 不需要贵重的 PCR 仪器。
6. 本产品足够 50 次 100uL 体系的单链 DNA 环化反应, 50 次 20uL 体系的易错 RCA 反应。
7. 本产品只能用于科研。

<b>规格及成分</b>	本产品使用五孔盒包装																							
	成份	编号	规格	包装材料																				
	2×单链 DNA 环化预混液	221004a	250 uL	0.5mL 白盖管																				
	单链 DNA 环化终止液	221004b	50 uL	0.5mL 黄盖管																				
	4×易错 RCA 预混液 (待加酶)	221006a	200 uL	0.5mL 蓝盖管																				
	易错 RCA 专用 DNA 聚合酶	221006c	50 uL	0.5mL 红盖管																				
	易错 RCA 专用 MnCl <sub>2</sub>	221006b	50 uL	0.5mL 绿盖管																				
	使用手册	220961sc	1 份	无																				
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，有效期为一年。																							
<b>自备试剂</b>	引物、DNA 模板、超纯水。																							
<b>使用方法</b>	<p>1. 准备单链 DNA 模板：可以用自选的方法制备单链 DNA 模板，最简单的方式是直接人工合成单链 DNA，但必须将 5 端修饰为磷酸基团（合成 DNA 5 端的默认基团是-OH）。为了方便后续克隆，可以在待突变片段两端设计成专一的、不存在于其他位置的限制性内切酶位点。</p> <p>2. 单链 DNA 环化。将 50uL 5 端磷酸化的单链 DNA（终浓度为 100nM）在 95℃ 加热 5 分钟，然后冰浴 10 分钟，再加入 50 uL 2×单链 DNA 环化预混液，60℃ 保温 1 小时。最后加入 1uL 单链 DNA 环化终止液，37℃保温 12 小时或过夜。</p> <p>3. 设置易错 RCA 反应。第一次使用本产品时，先将易错 RCA 专用 DNA 聚合酶全部加入到 4×易错 RCA 预混液（待加酶）中，轻柔颠倒混匀。没有用完的 4×易错 RCA 预混液（已加酶）需要放-20℃。每个样品建议做三个模板浓度：</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成分</th> <th style="text-align: center;">N 个样品管</th> <th style="text-align: center;">易错 RCA 阳性对照管</th> <th style="text-align: center;">易错 RCA 阴性对照管</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">4×易错 PCR Mix (已加酶)</td> <td style="text-align: center;">5 uL</td> <td style="text-align: center;">5 uL</td> <td style="text-align: center;">5 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">易错 RCA 专用 MnCl<sub>2</sub></td> <td style="text-align: center;">1 uL</td> <td style="text-align: center;">1 uL</td> <td style="text-align: center;">1 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">环化 DNA 反应液</td> <td style="text-align: center;">1 uL</td> <td style="text-align: center;">5 uL</td> <td style="text-align: center;">10 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">补自备超纯水到</td> <td style="text-align: center;">20 uL</td> <td style="text-align: center;">20 uL</td> <td style="text-align: center;">20 uL</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 30℃保温过夜。</p> <p>5. 易错 RCA 结束后，各取 3uL 进行电泳检查。</p> <p>6. 如果没有 RCA 扩增产物，则需要分析原因。</p> <p>7. 如果有扩增产物，则进行 DNA 回收，再进行限制性内切酶切验证（所选酶由第 1</p>				成分	N 个样品管	易错 RCA 阳性对照管	易错 RCA 阴性对照管	4×易错 PCR Mix (已加酶)	5 uL	5 uL	5 uL	易错 RCA 专用 MnCl <sub>2</sub>	1 uL	1 uL	1 uL	环化 DNA 反应液	1 uL	5 uL	10 uL	补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL
成分	N 个样品管	易错 RCA 阳性对照管	易错 RCA 阴性对照管																					
4×易错 PCR Mix (已加酶)	5 uL	5 uL	5 uL																					
易错 RCA 专用 MnCl <sub>2</sub>	1 uL	1 uL	1 uL																					
环化 DNA 反应液	1 uL	5 uL	10 uL																					
补自备超纯水到	20 uL	20 uL	20 uL																					

	<p>步限制性内切酶位点决定)。如果得到预期大小的片段,则胶回收 DNA,再进行克隆和测序等后续操作。</p> <p>8. 易错 RCA 的扩增产品可以用水稀释 10 倍后,再进行全基因组扩增,得到更多的 DNA,然后再进行酶切,胶回收,克隆等后续操作。</p>
<b>关联产品</b>	环状DNA模板易错RCA试剂盒