

描述: AccurPrime RCA Kit 与 TruePrime RCA Kit 工作原理相同, 采用引发酶 (Primase Pol) 来产生扩增引物。这种不使用 Random Hexamers (随机引物) 的扩增方式, 确保了对模板的精准扩增, 避免引物带入的不确定碱基。Primase Pol 结合在 ssDNA 上, 以 dNTP 为底物合成短的互补引物, 随后在高保真和持续合成能力极强的 Equi-phi29 DNA 聚合酶的作用下, 持续合成 ssDNA, 其新合成的 ssDNA 又可以作为 Primase Pol 的结合底物重新合成互补引物, 进而继续进行扩增, 形成 dsDNA。

该试剂盒中配备了 dsDNA 变性液 (Buffer D), 因此, 无论是 ssDNA 还是 dsDNA 均可以有效的作为扩增底物。以 1 ng 的环状质粒模板, 在 2h 内可以获得 3 µg 的扩增产物。以 10 ng 的 genomic DNA (100-200kb) 为模板, 可获得 1-2 µg 的产物。扩增终产物为大分子量的网状 dsDNA, 其可用于酶切、测序与再连接。

组分

名称	50T
10×phi29 Buffer	150 µl
Buffer D (变性液)	150 µl
Buffer N (中和液)	150 µl
Equi-phi29 DNA Pol(10U/µl)	50 µl
AccurPrimase Pol	50 µl
10mM dNTP	75 µl
RNase Free H2O	1 ml

储存: -20℃可保存 2 年。

注意: 10×phi29 Buffer、Buffer D (变性液)、Buffer N (中和液) 含有高浓度的盐, 实验时务必做好防护。皮肤和眼睛接触后, 立即大量清水清洗, 并就医。

操作方法

1. 模板变性与中和

Template DNA (0.01-10 ng/µl)	2.5 µl
Buffer D	2.5 µl

漩涡混合均匀后, 室温放置 3min 后, 立即加入 2.5µl Buffer N 进行中和 (此时总体积为 7.5µl)。

注意: (1) 模板 DNA 可以是纯化的质粒、gDNA、菌液、培养细胞。(2) 变性反应采用碱变性方法, 因此变性时间不宜超过 5min, 过长的时间会造成模板损伤。

2. 扩增反应

第一步中和产物	7.5 µl
10×phi29 Buffer	2.5 µl
10 mM dNTP	1.25 µl
AccurPrimase	1 µl
Equi-phi29 DNA Pol(10U/µl)	1 µl
RNase Free H2O	11.75µl
Total	25 µl

漩涡混合均匀后, 放置于 30℃恒温扩增 2h。必要情况下, 65℃10min 进行失活反应。产物 4℃短期保存 (<3 天), 或-20℃长期保存。

注意: 过长的孵育时间会增加产物量, 但同时可能会导致非特异扩增。