

描述: 滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 是新近发展起来的一种恒温核酸扩增方法。以环状 DNA 为模板, 通过一个短的 DNA 引物 (与部分环状模板互补), 在 phi29 DNA 聚合酶催化下将 dNTPs 转变成单链 DNA, 此单链 DNA 包含成百上千个重复的模板互补片段。这种方法不仅可以直接扩增 DNA 和 RNA, 还可以实现对靶核酸的信号放大, 灵敏度达到一个拷贝的核酸分子。

试剂盒配备的 Random Hexamers 为 6 碱基随机引物可对目标分子进行指数放大 (通常放大 100-10000 倍), 特殊的实验可自行搭配相关引物。

组分

名称	50T
10xphi29 Buffer	150 µl
Equi-phi29 DNA Polymerase (10 U/µl)	50 µl
Random Hexamer	500 µl
10 mM dNTP	75 µl
RNase Free H ₂ O	1 ml

储存: -20°C 可保存 3 年。

操作方法

1. 使用前注意事项 (必读)

(1) RCA 扩增是利用 phi29 DNA 聚合酶链置换活性和持续合成能力的特性, 对环状模板进行放大扩增。因此, 其最佳底物为环状 ssDNA 或 dsDNA 模板 (C-DNA)。除此外, 其对分子量较大的线性模板 (L-DNA) 同样可以持续合成和放大扩增, 如 genomic DNA, 此时其扩增放大比例弱于 C-DNA 的扩增。

(2) 由于 RCA 扩增中使用随机引物进行放大, 在加入高浓度的随机引物时, 容易导致引物自身的扩增 (假阳性)。因此, 建议针对不同类型、浓度的模板底物, 采用不同的引物扩增浓度和扩增时间来控制假阳性扩增。

(3) RCA 扩增还可应用于其它缺刻或诊断相应的实验, 此时 Random Hexamer 为非必须品。

2. 模板类型、浓度与引物用量、扩增时间的关系

	环状模板		线性模板	
	<1ng	>1ng	<10ng	>10ng
加入的模板量	<1ng	>1ng	<10ng	>10ng
Random Hexamer 用量	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
扩增循环数	44	35	44	35
扩增时间	4h	3h	4h	3h
产量 (µg)	0.5-2	2-10	0.5-2	2-10

3. 配制引物、模板退火体系

Template DNA	0.01-40 ng
10xphi29 Buffer	2 µl
10mM dNTP	1.2 µl
Random Hexamer	1-10 µl
ddH ₂ O Upto	19 µl

4. 引物和模板退火: 体系配制完毕后, 放置到 PCR 仪中, 95°C 3min, 25°C 3min。

5. 退火完毕后, 向退火产物中加入 1 µl Equi-phi29 DNA Polymerase (10 U/µl), 混合均匀。

6. 扩增反应

6.1 变温扩增

对于所有类型的模板, 在相同的时间条件下, 变温扩增, 始终具有更高的灵敏度和产量, 推荐使用变温扩增反应。在 PCR 仪上做如下设置:

【30°C 5min; 42°C 15s】循环 35 次 (约 3h) 或 44 次 (约 4h)。必要时, 反应结束后, 可于 65°C 10min 进行失活反应。

6.2 恒温扩增

对于变温反应不能满足扩增要求的实验类型, 仍然可以采用传统的 30°C 恒温扩增, 30°C 孵育 3-6h。过长的孵育时间会增加扩增产物量, 但同时可能会导致非特异扩增。