

# 操作手册

## iCloning

克劳宁(北京)生物科技有限公司

**产品名称：**MCRCA DNA 扩增试剂盒

**Cat #：**PPK-100, PPK-200

**储存条件：**-20℃保存

### 制品说明：

MCRCA DNA扩增试剂盒是专门用于DNA测序模板制备的新产品。如图1所示，MCRCA (rolling circle amplification) 方法利用噬菌体Phi29 DNA聚合酶滚环复制性质，指数扩增单链或双链环状DNA模板。该等温扩增方法可在数小时内将DNA的量由原始的沙克级扩增到微克级。

微量传统的质粒或M13噬菌体DNA模板体外扩增，可不必再进行细胞过夜培养、质粒提取及纯化工作。Phi29 DNA聚合酶的校对活性使DNA复制的高保真性大大增强。

初始扩增模板可以是菌液、单克隆(平板)、质粒、M13噬菌体及任何环状DNA样本。可将琼脂糖培养皿挑取单个细菌克隆，直接加到MCRCA反应液中，或者取数微升菌液或甘油菌加入MCRCA反应液中，30℃恒温温育4个小时。MCRCA反应产物为高分子量的双链环状多联体。

注意：如果模板是M13克隆，MCRCA产物是双链DNA且即可用正向引物又可用反向引物测序。用MCRCA方法进行DNA扩增，产物不需要纯化即可直接用于测序。

### 操作步骤：

#### (一) 扩增前准备(制备2×反应液)：

1、100ul MCRCA mix中加入2ul Phi29 DNA聚合酶(10U/ul)，混匀，置冰上；现用现配，可根据实验用量要求按此比例配比增加或减少混合液体积。

#### (二) 样本制备：

2、在PCR反应管中加9ul lysis buffer，瞬离至管底，加1ul DNA样本(纯化的质粒DNA、大肠杆菌菌液或单菌落的水悬浮液)，震荡10秒钟混匀，瞬离至管底，至PCR仪98℃反应5分钟变性，然后室温放置10分钟自然冷却；

#### (三) 模板扩增：

3、变性后，加10ul 2×MCRCA mix反应液(含Phi29)，震荡混匀，瞬离至管底，30℃孵育5小时；至PCR仪96℃反应5分钟使Phi29变性。

#### (四) 磁珠纯化：

4、震荡使Bigdye Cleaning Bead (BCB) 重新悬起；

5、向每个样品中加入10ul BCB；

6、加入85%的乙醇到每个样品，充分吹打混匀。根据下面的方程添加乙醇： $85\% \text{乙醇体积 (ul)} = 2.077 \times (10 + \text{样品体积 (ul)})$

注意：此之前步骤可以将磁珠与酒精预混合，可4℃保存一周。

7、将样品板放到96孔的磁性板上，作用3分钟，或直至溶液清亮。

8、弃去上清液(在磁性板上操作)。

9、每孔加入100ul 85%的乙醇，反应30秒钟。

iCloning  
克劳宁(北京)生物科技有限公司

## iCloning

克劳宁(北京)生物科技有限公司

注意：一定要在磁性板上操作。不要重新悬浮珠粒。

### 10、弃去乙醇。

注意：一定要在磁性板上操作。乙醇含有污染物，必须将乙醇完全弃除。

### 11、重复步骤9和10。

注意：亦可选择用酒精洗涤一次。

### 12、室温下放置3-5分钟，利用空气晾干样品。不要过分干燥，会降低荧光染料的亮度。

注意：晾干时，样品板可以放在磁性板上，也可以拿下。

### 13、建议加入25-60ul ddH<sub>2</sub>O（或者稀释一千倍的Elution Buffer（0.1 mM EDTA，pH 8.0）），吹打混匀。室温孵育5分钟。

注意：洗脱时，样品板必须从磁性板上拿下。确保将珠子重新悬起。

### 14、将样品板放到96孔的磁性板上，作用3分钟，或直至溶液清亮。保持样品板在磁性板上，转移部分上清液到一个新的样品板。

注意：孔内剩余5-10 ul液体，防止转移珠子引起干扰。一旦珠子也被转移，将样品移回原来的板上，重新作用，吸取上清转移到另一块新的样品板。

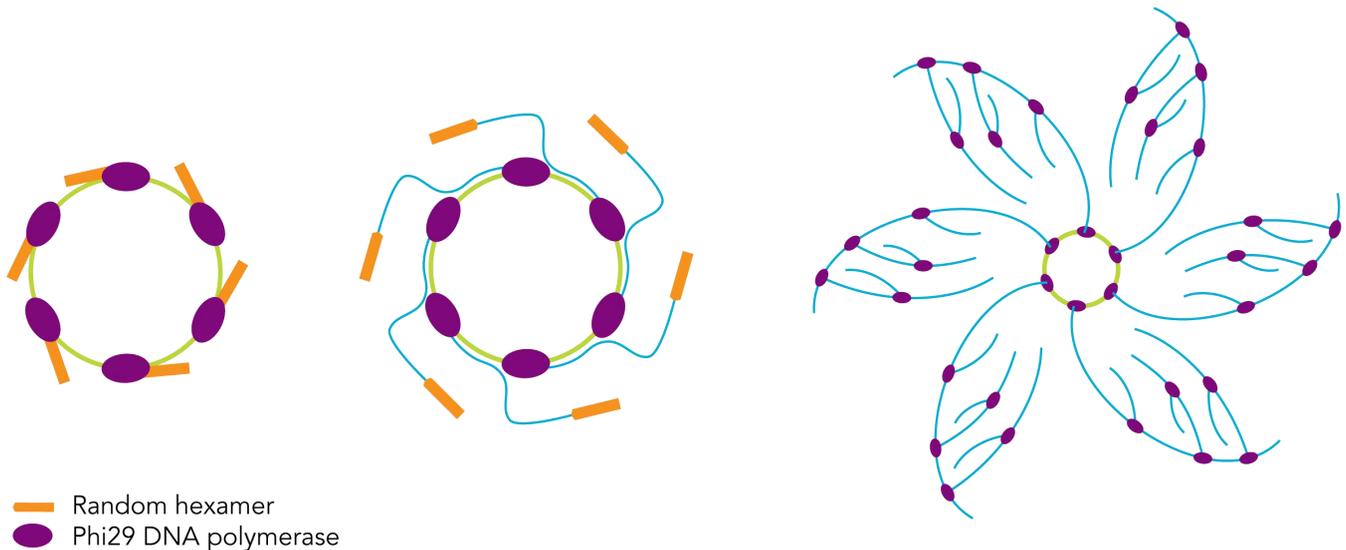


图1：MCRCA过程的示意图。六聚体随机引物与环状DNA模板多个位点结合。Phi29 DNA聚合酶可延伸每一条结合的引物。当Phi29 DNA聚合酶延伸到下游一引物，则发生链置换。被置换的单链被释放出来并和其他引物退火结合，继续进行链置换。此过程是连续的、产物成指数增长并且是恒温扩增。

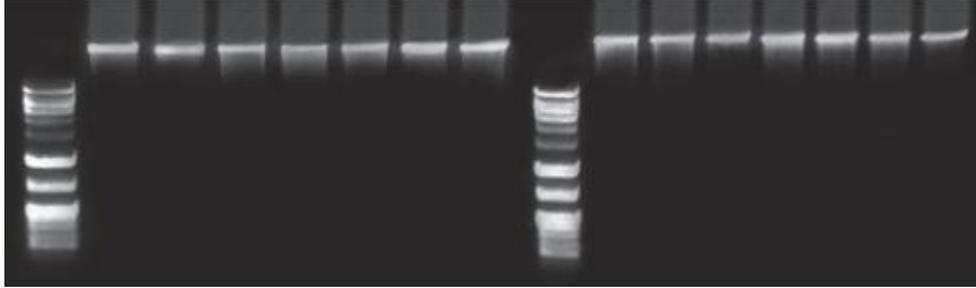


图2: MCRCA 2×Mix 扩增的模板电泳检测结果

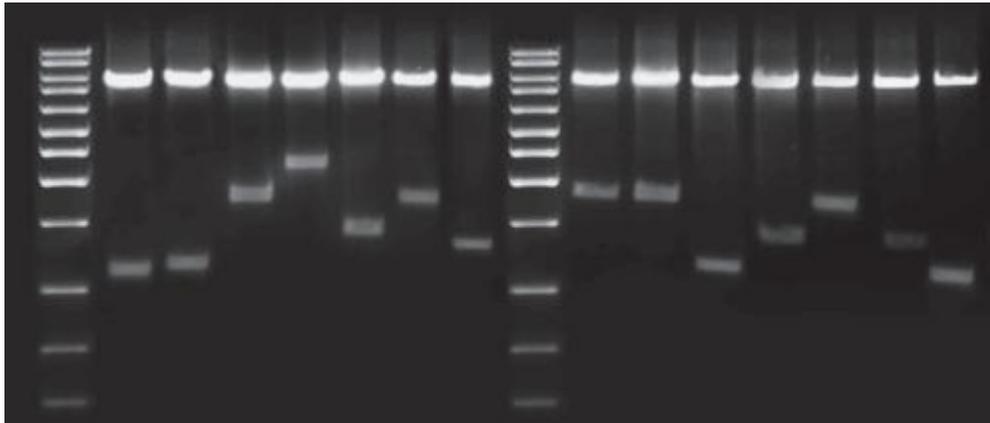


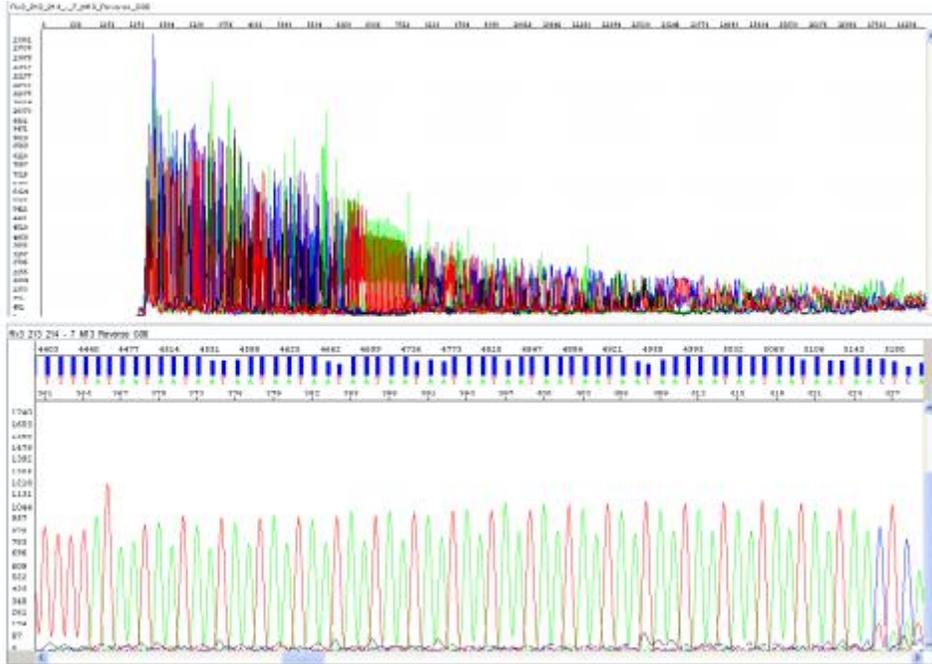
图3: 酶切消化MCRCA 2×Mix 扩增的模板电泳检测结果

### MCRCA产物测序数据

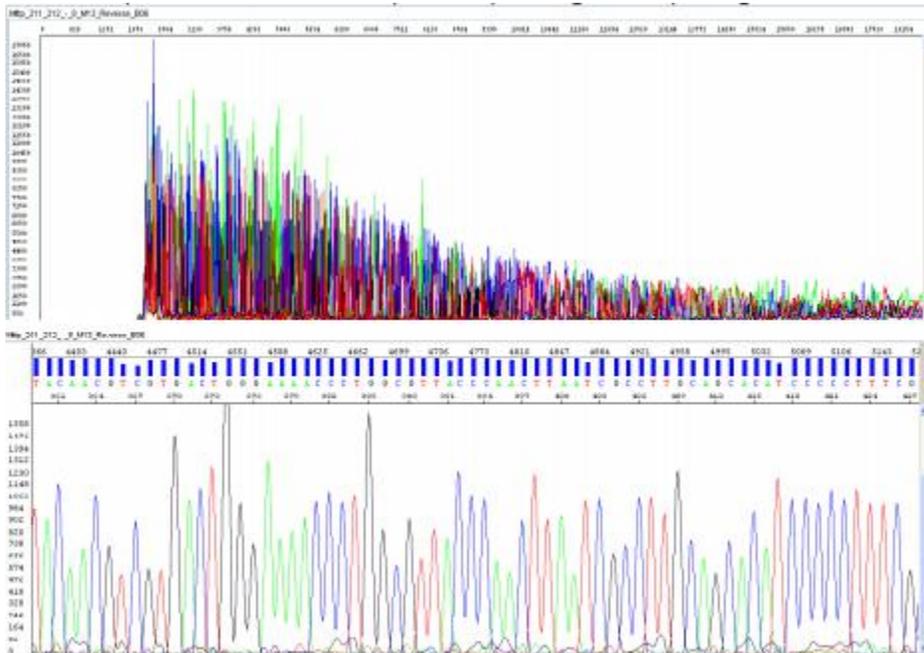
#### 1、MCRCA 2×Mix 扩增的模板的测序电泳结果

## iCloning

克劳宁(北京)生物科技有限公司



### 2、没有扩增的DNA标准品的测序电泳结果



# 操作手册

---

## iCloning

克劳宁（北京）生物科技有限公司

### 参考文献：

1. Dean, F. et al., Genome Research 11, 1095–1099 (2001).
2. Lizardi, P. et al., Nat. Genet. 19, 225–232 (1998).
3. Estaban, J. A. et al., J. Biol. Chem. 268, 2719–2726 (1993).

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。

---

克劳宁（北京）生物科技有限公司  
北京市海淀区中关村西区天创科技大厦407A  
邮编：100080  
China

电话：0086-10-62698317  
传真：0086-10-62698352  
电邮：icloning@icloning.cn  
网站：www.icloning.cn

**iCloning**

克劳宁（北京）生物科技有限公司