

Version 2

Code No. AG12516

AG12517

AccuNext 单细胞全基因组 DNA 扩增 试剂盒 (MDA) Ver.2 *AccuNext* Single Cell WGA Kit (MDA) Ver.2

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.





目录

➤ 产品概述	1
➤ 产品组成	1
➤ 保存及运输	1
➤ 产品优势	2
➤ 实验原理及流程	2
➤ 实验前注意事项	3
➤ 实验前准备	4
➤ 操作方法	5
A. 纯化的基因组 DNA 扩增方法	5
B. 单细胞扩增方法	6
➤ 实验例	8
➤ 产品注意事项	8
➤ 附录：磁珠纯化方法	10

➤ 产品概述

本产品是对 1~1000 Cells 或 10 pg~10 ng 基因组 DNA 进行无差别的全基因组扩增 (Whole Genome Amplification, WGA) 试剂盒。基于多重置换扩增 (Multiple Displacement Amplification, MDA) 的等温扩增体系, 在 Phi29 DNA 聚合酶的作用下, 单细胞全基因组获得的扩增产物大小在 2~100 kb 之间, 平均产物大小约为 15 kb, 可广泛适用于全基因组和外显子测序、大片段拷贝数变异分析、微卫星分析、qPCR 分析、基因芯片分析等。

本产品中使用了超强扩增性能的 Phi29 DNA 聚合酶, 具有很强的链置换活性和链亲合力, 搭配优化的 Buffer 体系, 在 2~2.5 h 能扩增出高覆盖度的 DNA, 同样也适用于具有复杂结构的样本。同时, Phi29 DNA 聚合酶具有 3' - 5' 的外切酶活性, 保证了 DNA 合成的高保真性、准确性。

➤ 产品组成

组分名称	AG12516 (12 rxns)	AG12517 (48 rxns)
Buffer DLS ^{*1}	250 μl	1 ml
Stop Reaction Buffer ^{*2}	200 μl	800 μl
DTT (1 M) ^{*1}	50 μl	200 μl
10X BSA	60 μl	240 μl
<i>AccuNext</i> WGA Polymerase ^{*3}	24 μl	96 μl
<i>AccuNext</i> WGA Auxiliary Enzyme	30 μl	120 μl
4X WGA Reaction Buffer Ver.2	150 μl	600 μl
Nuclease free water	1 ml	1 ml X 2 pcs

*1: 扩增基因组 DNA 时, 需要将 Buffer DLS 配制成 Buffer D1 再使用; 扩增细胞时需要将 Buffer DLS 与 DTT 配制成 Buffer D2 再使用。具体的配制方法请参照<操作方法>。

*2: 扩增基因组 DNA 时, 需要将 Stop Reaction Buffer 配制成 Buffer N1 再使用; 扩增细胞时直接使用 Stop Reaction Buffer。具体的配制方法请参照<操作方法>。

*3: 该组分中含有 Phi29 DNA 聚合酶, 避免反复冻融。

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: -20°C 冰袋运输或干冰运输

➤ 产品优势

1. 室温（15~25℃）下的细胞裂解及基因组 DNA 变性，与高温变性相比，减少了 DNA 断裂次数，提高了全基因组扩增的均匀性。
2. 基于 Phi29 DNA 聚合酶的高保真性、超高 DNA 聚合活性及链置换活性，可得到较长的扩增片段（2~100 kb），有利于提高单细胞全基因组覆盖度。
3. 灵敏度高，可在单细胞及 10 pg 基因组 DNA 的水平上对全基因组进行非选择性扩增，较低的扩增偏好性，可获得准确的、均一性良好的、高覆盖度的扩增基因组序列。
4. 操作简单快捷，恒温（30℃）反应 2 h，即可获得大量的 DNA。

➤ 实验原理及流程

在碱性（Buffer DLS）条件下使细胞裂解，基因组 DNA 变性；然后加入中和缓冲液停止变性，再利用具有超强合成能力的 Phi29 DNA 聚合酶进行扩增：随机引物退火结合到模板 DNA 链多个位点上，在 Phi29 DNA 聚合酶的作用下，从多个位点同时扩增；当延伸到下一个引物结合位点时，在 Phi29 DNA 聚合酶链置换活性下，将下一条 DNA 模板置换下来，产生被置换的单链 DNA，再以单链 DNA 作为模板，引物与之结合，进行新 DNA 的合成及链置换，最终可获得大量的双链 DNA，原理如图 1 所示：

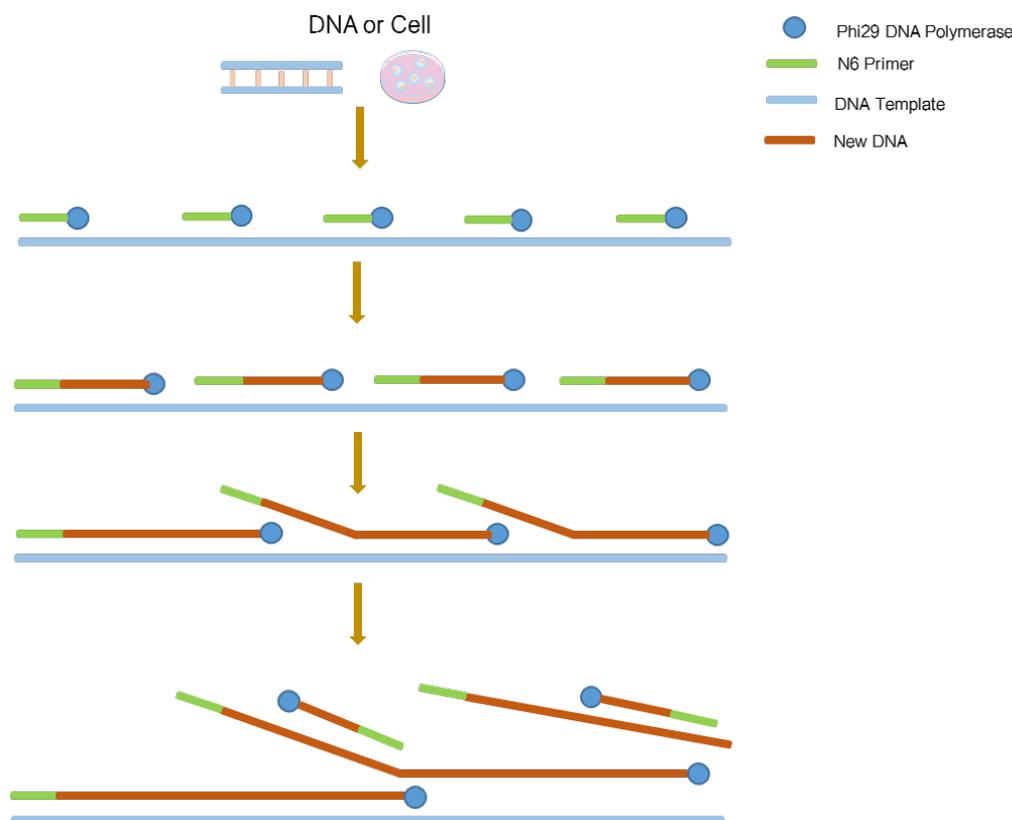
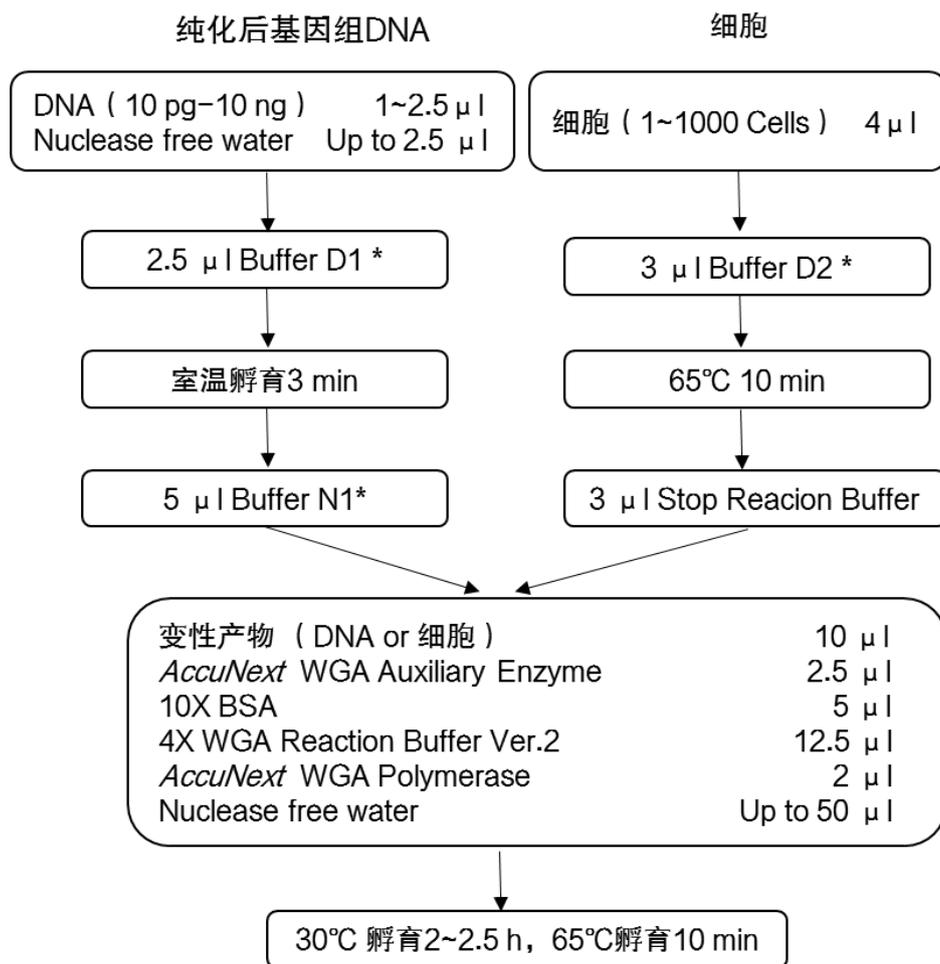


图 1：单细胞基因组 DNA 扩增原理图



*: Buffer D1、Buffer D2、Buffer N1 需要参照<操作方法>进行配制。

图 2: 操作流程

➤ 实验前注意事项

1. 防污染要求:

由于本产品检测灵敏度极高，防污染是非常有必要的。可从以下几个方面注意：

- ❖ 实验过程中，需要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ❖ 耗材方面，需要使用无菌无酶的耗材、器具，为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置正向气流）、模板添加区、PCR 扩增区、电泳检测区。
 - 1) 在试剂配制区进行以下操作：样品变性液、中和液以及 PCR 扩增试剂的配制；
 - 2) 在模板添加区加入模板；
 - 3) 在 PCR 扩增区进行扩增；

4) 在电泳检测区进行检测。

- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加DNA模板或细胞）实验。
- ❖ 在阴性对照中，可能会有DNA扩增条带，有以下两种可能性：
 - 1) 可能是反应中通过随机引物二聚体延伸产生的高分子量DNA产物，该DNA不会影响实际样品的质量，也不会在下游分析中给阳性结果，可正常进行后续应用。
 - 2) 可能存在其他DNA的交叉污染，导致阴性对照扩增出条带，建议更换可能污染的试剂及耗材，并对仪器、实验台及实验室等进行清洁。
- ❖ 实验后，经本产品扩增得到的产物是高浓度的DNA，尽量不要在公共实验区域开盖，以免造成气溶胶污染。

2. 样本要求

- ❖ 建议使用高质量的DNA，避免因使用降解严重或片段化的DNA，导致扩增产物质量低。若DNA降解，还可能会影响后续应用（例如，染色体等位基因丢失等）。同时，也要避免其他杂质DNA的污染。
- ❖ 本产品中配有的细胞裂解液不能有效裂解细胞壁。若是样本为带有细胞壁的细胞，如植物细胞、真菌等，建议先去除细胞壁或使用提取后的DNA为模板。哺乳动物细胞可直接使用本产品中的裂解液进行裂解。
- ❖ 本产品不适用于用福尔马林或其他交联剂处理的固定细胞（例如，从福尔马林固定的石蜡包埋组织中通过激光显微解剖获得的单细胞样品）。
- ❖ 本产品可从1~1000个细胞直接进行全基因组扩增，过多的细胞可能会对反应产生抑制。
- ❖ 细胞样本收集后，建议确认细胞活力，死细胞会发生明显的DNA降解断裂，导致实验失败。细胞培养基对实验可能有抑制，建议实验前用不含Mg²⁺、Ca²⁺等的PBS洗涤重悬细胞（可洗2~3次），反应体系中培养基等液体加入体积越少越好。
- ❖ 细胞样本若不立即进行反应，可先将单细胞分离并保存在PBS中，短期内可放在-80℃保存，取出后需立即进行后续反应，不建议细胞长期保存，避免DNA降解。

➤ 实验前准备

1. 试剂&耗材：

- 1) DNA评价：Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Code No. Q32854) 或其他等效产品。

- 2) 磁珠纯化: AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881)或其他等效产品。
- 3) 文库构建: 可搭配以下 DNA 文库制备试剂盒或其他等效产品。
AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 100 ng 模板量) (Code No. AG12518、AG12519)。
AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 50 ng 模板量) (Code No. AG12520、AG12521)。
AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 5 ng 模板量) (Code No. AG12522、AG12523)。
AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 1 ng 模板量) (Code No. AG12524、AG12525)。
- 4) 其他材料: 0.2 ml RNase-free PCR 管, 1.5 ml 离心管等。

2. 仪器:

PCR 仪 (或 30°C 恒温水浴锅)、Qubit 4 Fluorometer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机等。

➤ 操作方法

A. 纯化的基因组 DNA 扩增方法

- ✚ 本方法适用于从 10 pg~10 ng 纯化后的基因组 DNA 进行无差别的扩增。
- ✚ 将 *AccuNext* WGA Polymerase、*AccuNext* WGA Auxiliary Enzyme 短暂离心, 用移液枪轻柔吹打混匀放在冰上备用; 其余组分可放在室温融化, 短暂离心, 涡旋混匀后放置在冰上备用。

1. 按照下表配制 **Buffer D1**, 涡旋混匀, 放在冰上备用 (下表配制的 Buffer D1 足够做 10 个反应, 若未使用完, 可放置于 -20°C 保存, 但保存时间不要超过 3 个月):

组分	体积
Buffer DLS	6 μ l
Nuclease free water	20 μ l
Total	26 μ l

2. 按照下表配制 **Buffer N1**, 涡旋混匀, 放在冰上备用 (下表配制的 Buffer N1 足够做 10 个反应, 若未使用完, 可放置于 -20°C 保存, 但保存时间不要超过 3 个月):

组分	体积
Stop Reaction Buffer	9 μ l
Nuclease free water	51 μ l
Total	60 μ l

- 将 2.5 μ l Buffer D1 加入到 PCR 管中，然后加入 2.5 μ l DNA 样品^{*a}，轻弹管壁混匀并短暂离心^{*b}。

*a: 2.5 μ l DNA 样品是指将 DNA 模板稀释至合适的浓度，取 2.5 μ l 进行实验，若 DNA 模板体积不足 2.5 μ l，可用 Nuclease free water 补齐至 2.5 μ l。

*b: 确保 DNA 没有粘附在管壁上，请勿使用移液器吹打，避免将少量样本吸附在枪头上影响扩增。

- 室温孵育 3 min。
- 加入 5 μ l Buffer N1，轻柔涡旋混匀并短暂离心。然后将样品放置在冰上备用。
- 按照下表配制 Master Mix:

组分	体积
Nuclease free water	18 μ l
4X WGA Reaction Buffer Ver.2	12.5 μ l
10X BSA	5 μ l
<i>AccuNext</i> WGA Auxiliary Enzyme	2.5 μ l
<i>AccuNext</i> WGA Polymerase	2 μ l
Total	40 μ l

- 立即将配制好的 40 μ l Master Mix 加入至步骤 5 的 10 μ l DNA 反应液中，用移液枪轻柔吹打混匀或轻弹管壁混匀（避免溅到管盖上），短暂离心。
- 放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下:

温度	时间
30°C ^{*a}	2.5 h ^{*b}
65°C	10 min
4°C	Hold

*a: 建议反应温度设置为 30°C，过高的温度会影响 *AccuNext* WGA Polymerase 酶活，如果 PCR 仪可设置热盖温度，建议 PCR 仪热盖温度设置为 75°C 或者更低。

*b: 推荐反应时间为 2.5 h，如果扩增产量较低或扩增复杂样本的 DNA，可适当延长反应时间，在 2~16 h 调整。

- 扩增产物是高浓度的 DNA，进行后续应用前可使用 Nuclease free water 或 TE Buffer 稀释到所需浓度，扩增产物放于 -20°C 保存。
- 长期保存建议将产物进行纯化后 -20°C 保存。若用于全基因组测序建库，建议将产物使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 进行纯化，纯化方法可参考附录：磁珠纯化方法。

B. 单细胞扩增方法

- 本方法适用于从 1~1000 Cells 无差别扩增基因组 DNA。请使用新鲜制备的细胞样品

以保证起始基因组的完整性。

- ✚ 将 *AccuNext* WGA Polymerase、*AccuNext* WGA Auxiliary Enzyme 短暂离心，用移液枪轻柔吹打混匀放在冰上备用；其余组分可放在室温融化，短暂离心，涡旋混匀后放置在冰上备用。

1. 按照下表配制 **Buffer D2**，涡旋混匀，放在冰上备用（下表配制的 Buffer D2 足够做 12 个反应，若未使用完，可放置于 -20°C 保存，但保存时间不要超过 3 个月）：

组分	体积
Buffer DLS	36 μl
DTT	4 μl
Total	40 μl

2. 将 3 μl Buffer D2 加入到 PCR 管中，然后加入 4 μl **细胞样品**^{*a}，轻弹管壁混匀并短暂离心^{*b}。

^{*a}: 4 μl 细胞样品是指用 PBS（不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ）将细胞样品稀释至合适浓度，取 4 μl 进行实验，若细胞体积不足 4 μl ，可用 PBS 或 Nuclease free water 补齐至 4 μl 。

^{*b}: 确保细胞没有粘附在管壁上，请勿使用移液器吹打，避免有细胞吸附在枪头上。

3. 65°C 孵育 10 min。
4. 加入 3 μl Stop Reaction Buffer，轻柔涡旋混匀并短暂离心。然后将样品放置在冰上备用。
5. 按照下表配制 Master Mix：

组分	体积
Nuclease free water	18 μl
4X WGA Reaction Buffer Ver.2	12.5 μl
10X BSA	5 μl
<i>AccuNext</i> WGA Auxiliary Enzyme	2.5 μl
<i>AccuNext</i> WGA Polymerase	2 μl
Total	40 μl

6. 立即将配制好的 40 μl Master Mix 加入至**步骤 4**的 10 μl DNA 反应液中，用移液枪轻柔吹打混匀或轻弹管壁混匀（避免溅到管盖上），短暂离心。
7. 放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下：

温度	时间
30°C^{*a}	2 h ^{*b}
65°C	10 min
4°C	Hold

*a: 建议反应温度设置为 30°C, 过高的温度会影响 *AccuNext* WGA Polymerase 酶活, 如果 PCR 仪可设置热盖温度, 建议 PCR 仪热盖温度设置为 75°C 或者更低。

*b: 推荐反应时间为 2 h, 如果扩增产量较低或扩增复杂细胞的 DNA, 可适当延长反应时间, 在 2~16 h 调整。

8. 扩增产物是高浓度的 DNA, 进行后续应用前可使用 Nuclease free water 或 TE Buffer 稀释到所需浓度, 扩增产物放于 -20°C 保存。
9. 长期保存建议将产物进行纯化后 -20°C 保存。若用于全基因组测序建库, 建议将产物使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 进行纯化, 纯化方法可参考附录: [磁珠纯化方法](#)。

➤ 实验例

1. 以 HL60 Cell (1000 Cells、10 Cells、1 Cell) 和 Human 基因组 DNA (10 ng、100 pg、10 pg) 为模板, 采用本产品扩增全基因组 DNA, 所得产物的电泳分析结果显示, 模板投入量低至 1 个细胞和 10 pg 时均可扩增出明显条带。

电泳结果如下图 3 所示:

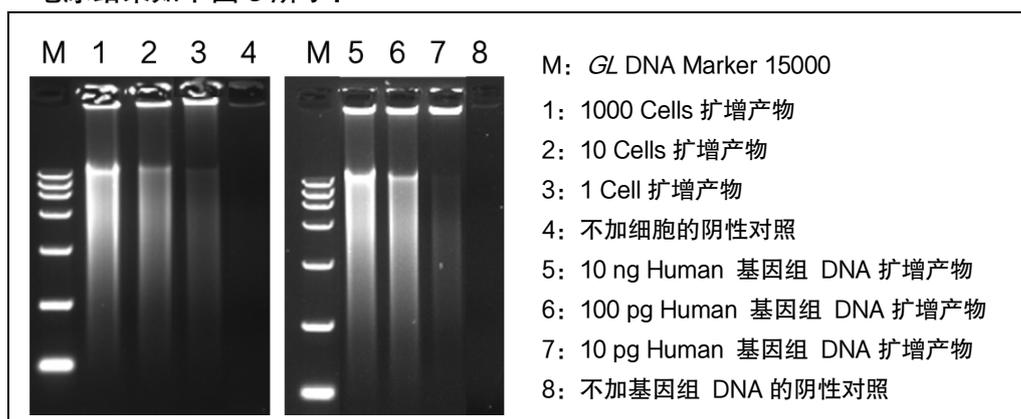


图 3: 不同模板扩增产物电泳图

➤ 产品注意事项

1. 防污染措施:

由于本产品检测灵敏度极高, 防污染是非常有必要的。可从以下几个方面注意:

- ✚ 实验过程中, 需要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ✚ 耗材方面, 需要使用无菌无酶的耗材、器具, 为避免样品交叉污染, 推荐使用带滤芯的枪头, 吸取不同样本时请更换枪头。
- ✚ 本产品中的试剂, 应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中, 避免试剂被污染。
- ✚ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区: 试剂配制区 (建议设置正向气流)、模板添加区、PCR 扩增区、电泳检测区。

- 1) 在试剂配制区进行以下操作：样品变性液、中和液以及 PCR 扩增试剂的配制；
 - 2) 在模板添加区加入模板；
 - 3) 在 PCR 扩增区进行扩增；
 - 4) 在电泳检测区进行检测。
- ✦ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。
 - ✦ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 DNA 模板或细胞）实验。
 - ✦ 在阴性对照中，可能会有 DNA 扩增条带，有以下两种可能性：
 - 1) 可能是反应中通过随机引物二聚体延伸产生的高分子量 DNA 产物，该 DNA 不会影响实际样品的质量，也不会在下游分析中给出阳性结果，可正常进行后续应用。
 - 2) 可能存在其他 DNA 的交叉污染，导致阴性对照扩增出条带，建议更换可能污染的试剂及耗材，并对仪器、实验台及实验室等进行清洁。
 - ✦ 实验后，经本产品扩增得到的产物是高浓度的 DNA，应尽量避免在公共试验区域开盖，以免造成气溶胶污染。

2. 样品准备：

- ✦ 对于 DNA 样品，应尽量避免杂质的污染，并且保证基因组的完整性，降解或片段化的 DNA 作为起始样本可能会导致实验失败。
- ✦ 细胞样本收集后，建议确认细胞活力，死细胞会发生明显的 DNA 降解断裂，导致实验失败。细胞培养基对实验可能有抑制，建议实验前用不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等的 PBS 洗涤重悬细胞（可洗 2~3 次），反应体系中培养基等液体加入体积越少越好。

3. PCR 扩增：

- ✦ *AccuNext* WGA Polymerase 是等温扩增的 Phi29 DNA 聚合酶，反应温度 30°C，不耐高温，所以在扩增过程中建议使用能调节热盖温度的 PCR 仪，并将热盖设置为 70°C 或更低。
- ✦ 若阴性对照有一定的产出，将阴性对照的产出进行下游检测（如 qPCR），检测结果为阴性，则说明不会影响目的产物的质量及下游应用及分析。
- ✦ 若阴性对照有产出，将阴性对照的产出进行下游检测（如 qPCR），检测结果为阳性，则说明存在污染，可以采用紫外将环境照射 0.5 h，保证环境的无污染。
- ✦ 可根据不同的样本适当的调整反应时间。

➤ 附录：磁珠纯化方法

使用磁珠纯化 DNA 时，一般推荐使用 1.8X（磁珠量：样品量 = 1.8：1）的磁珠比例进行 DNA 纯化。以 AMPure XP Reagent（Beckman Coulter Life Sciences, Code No.A63881）按照 1.8X 磁珠比例纯化方法为例，步骤如下：

实验前准备：

1. 首次使用，可根据实际需求将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
2. 实验前，可根据实验量，配制新的 80%乙醇溶液（每个样品需要 400 μl）。
3. 实验前，将磁珠恢复至室温（室温静置约 30 min），并轻柔涡旋至充分混匀（约 5 min）。

操作步骤：

1. 添加 90 μl 的已恢复室温的磁珠至上述 50 μl DNA 中（按照磁珠：样品 = 1.8：1 添加）。涡旋混匀 5 sec 或使用移液器吸打 10 次，充分混匀，短暂离心。
2. 将磁珠 / DNA 混合物在室温下孵育 5 min，让 DNA 与磁珠结合。
3. 将样品放在磁力架上至少 3 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠，小心地去除上清液，注意不要打散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μl 新配制的 80%乙醇溶液（**注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠**），室温孵育 30 sec，小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 用桌面离心机短暂离心，然后将 PCR 管放在磁力架上约 30 sec，然后用 10 μl 移液器除去剩余的乙醇溶液。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 5 ~ 10 min 至无乙醇溶液残留；
【注意：无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。】
8. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μl RNase free Water 覆盖磁珠，使用移液器吸打混匀磁珠，室温孵育 2 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
9. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直至溶液澄清（约 5 min）。
10. 小心吸取 20 μl 上清转移到新的低吸附 Tube 管中（勿吸到磁珠），即可获得 DNA 纯化产物，-20℃ 保存。