

Version 1

Code No. AG12553

AG12554

AccuNext 单细胞全基因组扩增试剂盒

AccuNext HiPlex Single Cell WGA Kit

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	1
➤ 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. 细胞裂解	5
B. 预扩增反应	5
C. 扩增反应	6
D. 扩增产物质量检测	7
E. 文库制备	7
➤ 实验例	8
➤ 附录：磁珠纯化方法	9

➤ 产品概述

本产品是专门针对 1~10 Cells 或 15 pg~100 pg 基因组 DNA 等微量样本研发的无差别全基因组扩增 (Whole Genome Amplification, WGA) 试剂盒。经过优化的酶和 Buffer 体系, 可在 3 h 内完成细胞裂解、预扩增、扩增等步骤, 获得微克级别的扩增产物。本产品操作简单, 扩增获得的产物均一性好、重复性高, 可广泛适用于全基因组测序、外显子测序、拷贝数变异(CNV)分析、单核苷酸变异(SNV)分析、qPCR 分析、基因芯片分析、胚胎植入前遗传筛查 (PGS) 等应用。

➤ 产品组成

组分名称	AG12553 (12 rxns)	AG12554 (48 rxns)
Cell Lysis Buffer	60 μ l	240 μ l
Cell Lysis Enzyme	5 μ l	15 μ l
<i>AccuNext</i> Pre-Amp Buffer	96 μ l	384 μ l
<i>AccuNext</i> Pre-Amp Enzyme	24 μ l	96 μ l
<i>AccuNext</i> Amplification Buffer	300 μ l	1.2 ml
<i>AccuNext</i> Amplification Enzyme	36 μ l	144 μ l
Nuclease free water	1 ml	1 ml

➤ 保存及运输

保存温度: -20℃保存

运输温度: -20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 超高灵敏度: 能够以单细胞或者微量 DNA 为模板实现均匀地全基因组扩增。
2. 精心优化的反应体系, 单管操作简单, 可在 3 h 内获得均一性好、重复性高的微克级扩增产物。
3. 单管操作, 整个过程不需要纯化与转管, 减少过多的操作带来的样本损失与污染, 确保实验数据的准确性。
4. 扩增均一性好、灵敏度高等特点, 可广泛适用于全基因组和外显子测序、拷贝数变异 (CNV)分析、单核苷酸变异 (SNV)分析、qPCR 分析、基因芯片分析、胚胎植入前遗传筛查 (PGS) 等应用。

➤ 实验原理及流程

以哺乳动物单细胞或微量 gDNA 为模板，在细胞裂解液的作用下释放出 gDNA，然后利用含有固定序列的随机引物退火至基因组的多个位置，在预扩增酶（*AccuNext* Pre-Amp Enzyme）及 Buffer（含有引物）作用下对 gDNA 进行准线性预扩增，最后利用扩增酶（*AccuNext* Amplification Enzyme）及 Buffer（固定序列引物）进行指数扩增，获得大量且均一的扩增产物。如图 1 所示：

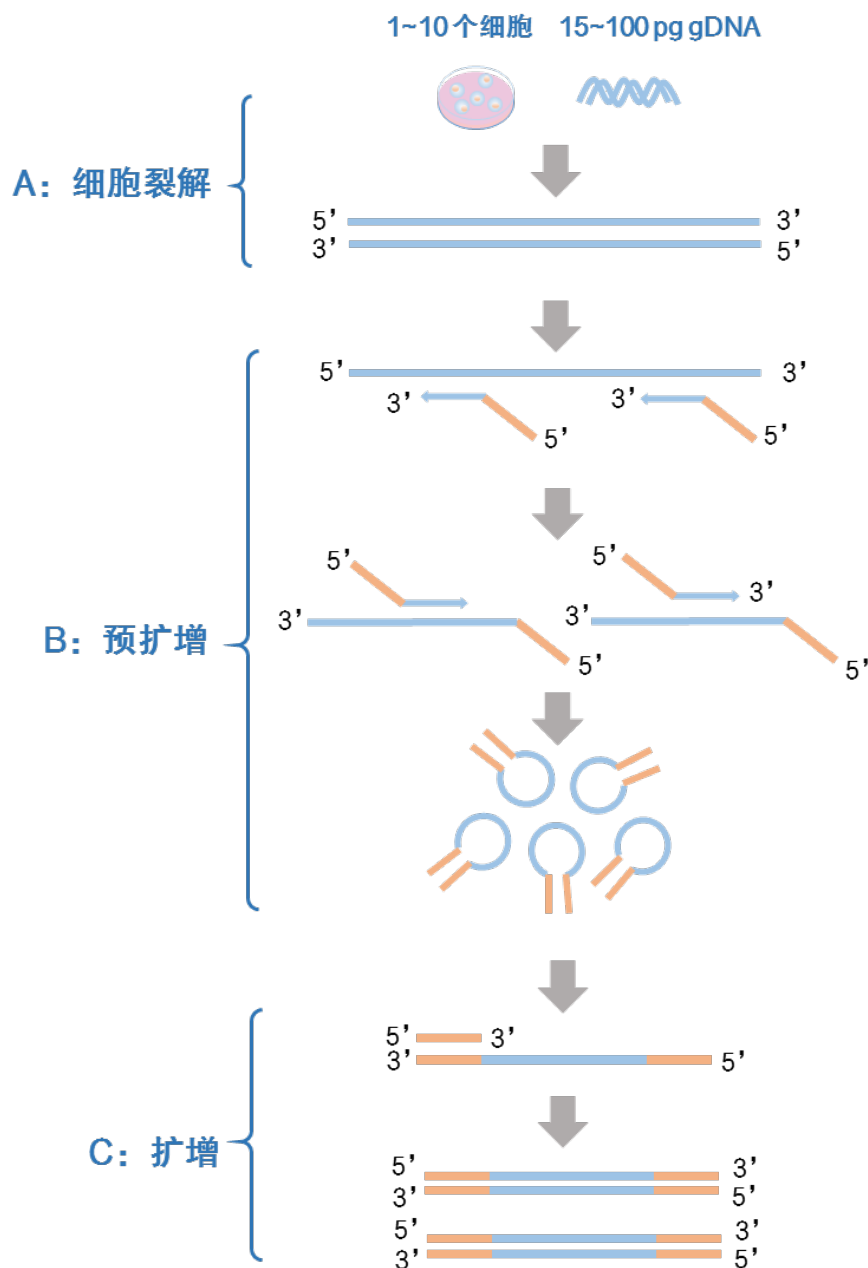
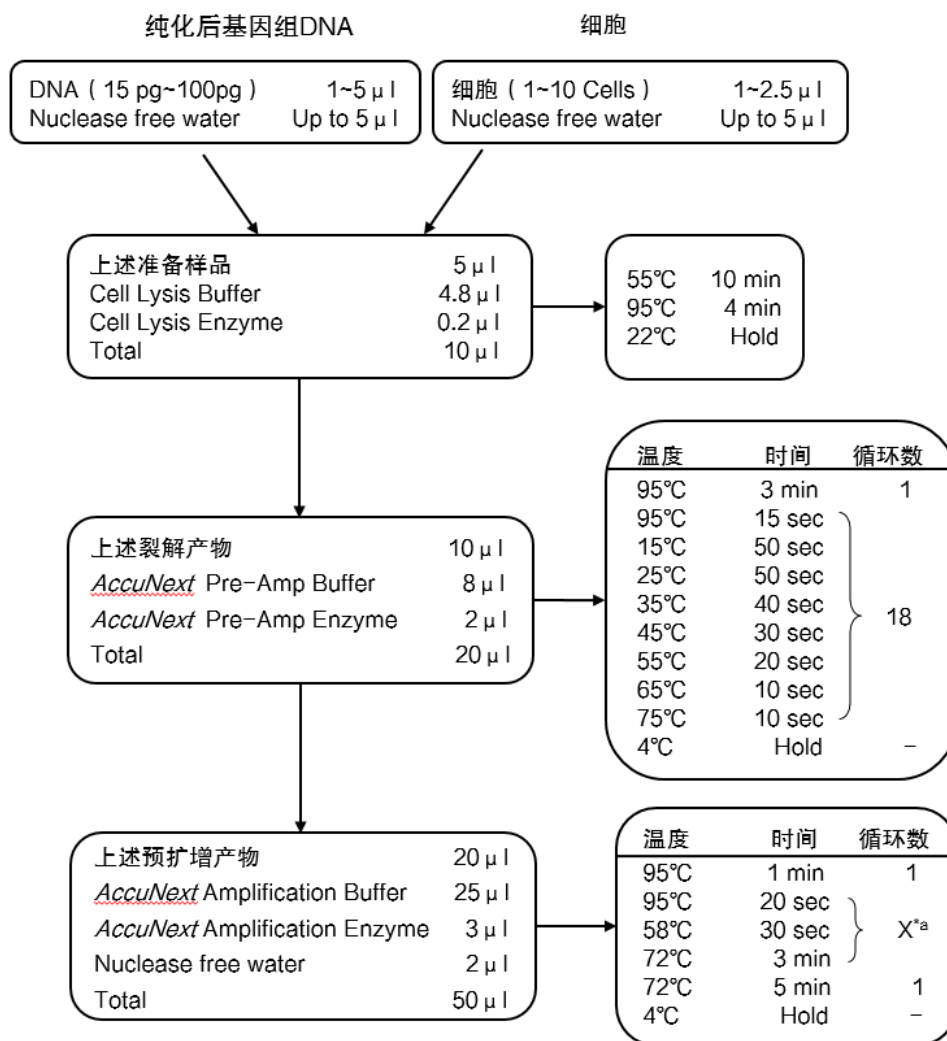


图 1. 实验原理



*a: X 表示扩增循环数，需要根据加入的模板量或细胞数进行调整，可参考 <表 1. PCR 循环数推荐表>。

图 2. 实验操作流程

➤ 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，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、产物纯化区和电泳检测区。

- 1) 在试剂配制区进行以下操作：Cell Lysis Mix、Advanced Pre-Amp Mix、Amplification Mix 配制；
- 2) 在模板添加区加入模板；
- 3) 在 PCR 扩增区进行扩增；
- 4) 产物纯化区进行磁珠纯化；
- 5) 在电泳检测区进行检测。

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ❖ 本产品所有组分应储存于无核酸污染的环境中，以免试剂发生污染导致实验失败。
- ❖ 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。
- ❖ 实验过程中应小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅导致样品丢失。
- ❖ 本产品单个扩增反应得到的全基因组浓度较高，应尽量避免将产物带回公共实验操作区，防止对其他实验造成交叉污染。

2. 细胞样本要求

- ❖ 本产品可以使用广泛来源的哺乳动物细胞(1 ~ 10 个细胞)，例如卵裂球、极体、滋养叶细胞、羊水细胞、循环肿瘤细胞、培养的细胞和流式分选的细胞等。
- ❖ 细胞培养基或样品中的其他组分可能对扩增反应有抑制作用，实验前应使用不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 BSA 的 1X PBS 缓冲液洗涤重悬细胞，以减少非细胞 DNA 的污染。在**细胞裂解**反应步骤中，PBS 体积应不超过 2.5 μ l。

3. DNA 样本要求

- ❖ 少量纯化的基因组 DNA (15 ~ 100 pg) 也可以作为本产品的起始样本，如纯化的真核、原核、真菌或病毒 DNA 等，样本的最大体积为 5 μ l。

4. 扩增循环数的选择

- ❖ 本产品可以对单细胞进行稳定可重复的扩增，对于多个细胞，应适当减少循环数。建议在正式实验前，对循环数进行优化。下表为不同模板起始量推荐的循环数，可用于参考。

表 1. 扩增反应循环数推荐表

gDNA 起始	Cell 起始	预扩增循环数	扩增循环数
100 pg	10 Cells	18	6
60 pg	–	18	7
30 pg	–	18	8
15 pg	–	18	9
–	1 Cell	18	10

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- 1) DNA 评价：AcuQ 1X dsDNA HS Assay Kit (Code No. AG12549 \ AG12550) 或其他等效产品。
- 2) 磁珠纯化：MagSpherix DNA Beads (Code No. AG12546 \ AG12547 \ AG12548) 或其他等效产品
- 3) DNA 建库试剂盒：如 AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 100 ng 模板量) (Code No. AG12518 \ AG12519) 或其他等效产品。

4) 其他材料：低吸附枪头、低吸附 tube 管，RNase-free PCR 管。

2. 仪器：

1) PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➤ 操作方法

A. 细胞裂解

1. 试剂准备：将所需用的试剂在冰上融化，Cell Lysis Buffer 轻柔涡旋混匀，Cell Lysis Enzyme 用移液器轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。

2. 按下表在冰上配制 Cell Lysis Mix：

组分	体积
Cell Lysis Buffer	4.8 μ l
Cell Lysis Enzyme	0.2 μ l
Total	5 μ l

3. 按下表将 Cell Lysis Mix 加入至稀释后的细胞或 gDNA 溶液中^a：

组分	体积
Cell Lysis Mix	5 μ l
DNA (15~100 pg) 或 Cell (1~10 Cell) ^b	5 μ l
Total	10 μ l

*a：加 Cell Lysis Mix 时，移液器枪头尽量不要接触管中液体；勿使用移液器吹打混匀，避免造成样品丢失。加入溶液后，轻弹管壁混匀，短暂离心将反应液收集至管底。

*b：如果从 PBS 中分离稀释细胞，PBS 体积不要超过 2.5 μ l，用 Nuclease free water 将体系补足至 5 μ l。同时，注意确保细胞不要粘附在管壁上。

4. 在 PCR 仪中运行以下程序：

温度	时间
55°C	10 min
95°C	4 min
22°C	Hold

B. 预扩增反应

1. 将所需用的试剂在冰上融化，AccuNext Pre-Amp Buffer 轻柔涡旋混匀，AccuNext Pre-Amp Enzyme 用移液器轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。

2. 按下表在冰上配制 Advanced Pre-Amp Mix^a：

组分	体积
上述裂解产物	10 μ l
<i>AccuNext</i> Pre-Amp Buffer	8 μ l
<i>AccuNext</i> Pre-Amp Enzyme	2 μ l
Total	20 μ l

*a: 在冰上配制 Advanced Pre-Amp Mix。

*b: 可将这 2 个组分配制成 mix, 然后取 10 μ l 加入至上述裂解产物中, 轻柔混匀。

3. 使用移液器轻柔混匀, 短暂离心后置于冰上。

4. 在 PCR 仪中运行以下反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
95°C	15 sec	18
15°C	50 sec	
25°C	50 sec	
35°C	40 sec	
45°C	30 sec	
55°C	20 sec	
65°C	10 sec	
75°C	10 sec	
4°C	Hold	-

5. 反应结束后取出预扩增产物放置于冰上, 备用。

C. 扩增反应

1. 将所需用的试剂在冰上融化, *AccuNext* Amplification Buffer 轻柔涡旋混匀, *AccuNext* Amplification Enzyme 用移液器轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。

2. 按下表在冰上配制 Amplification Mix^{*a}:

组分	体积
上述预扩增产物	20 μ l
<i>AccuNext</i> Amplification Buffer	25 μ l
<i>AccuNext</i> Amplification Enzyme	3 μ l
Nuclease free water	2 μ l
Total	50 μ l

*a: 在冰上配制 Amplification Mix。

*b: 可将这 3 个组分配制成 mix, 然后取 30 μ l 加入至上述预扩增产物中, 轻柔混匀。

3. 在 PCR 仪中运行以下反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	20 sec	X ^a
58°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	–

*a: 根据模板起始量, 调整扩增循环数, 下表为推荐的扩增循环数, 实验前建议对扩增循环数进行摸索。

扩增反应循环数推荐表

gDNA 起始	Cell 起始	预扩增循环数	扩增循环数
100 pg	10 Cells	18	6
60 pg	–	18	7
30 pg	–	18	8
15 pg	–	18	9
–	1 Cell	18	10

4. 扩增产物可放置于–20°C保存或立即进行纯化, 产物纯化方法可参考[附录 1: 磁珠纯化方法](#)。

D. 扩增产物质量检测

1. 取 2 µl 扩增产物, 使用 Qubit 4 Fluorometer 荧光计, 使用 *AccuQ 1X dsDNA HS Assay Kit* (Code No. AG12549 \ AG12550)或其他等效产品检测 PCR 产物浓度。具体操作请参照上述产品的说明书。
2. 取 5 µl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。
3. 成功的实验反应会产生 3~ 7 µg 的扩增产物, 片段大小分布于 200 ~ 2000 bp, 阴性对照无扩增产物。

E. 文库制备

1. 文库制备可根据测序平台选择合适的文库构建试剂盒, 如选择 illumina 平台测序, 推荐使用 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 100 ng 模板量) (Code No. AG12518 \ AG12519) 或其他等效产品。

➤ 实验例

1. 采用本产品以 HL60 Cell Genomic DNA (100 pg、60 pg、15 pg) 和 HL60 Cell (10 Cells 和 1 Cell) 为模板进行扩增。扩增产物电泳结果如下：

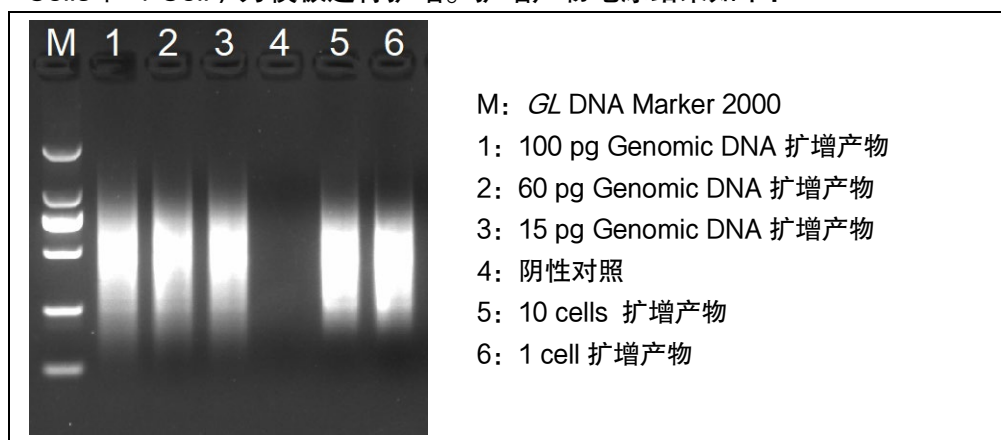


图 3. 扩增产物电泳结果

2. 使用本产品扩增 100 pg 人标准品 gDNA (18 号染色体缺失及 21 三体)，并使用 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, 100 ng 模板量) (Code No. AG12518) 对扩增产物进行 DNA 文库构建，散点分布图结果显示：reads 在基因组各部位分布的比较均匀，SD 值低于 3.5，表明本产品扩增均一性好。

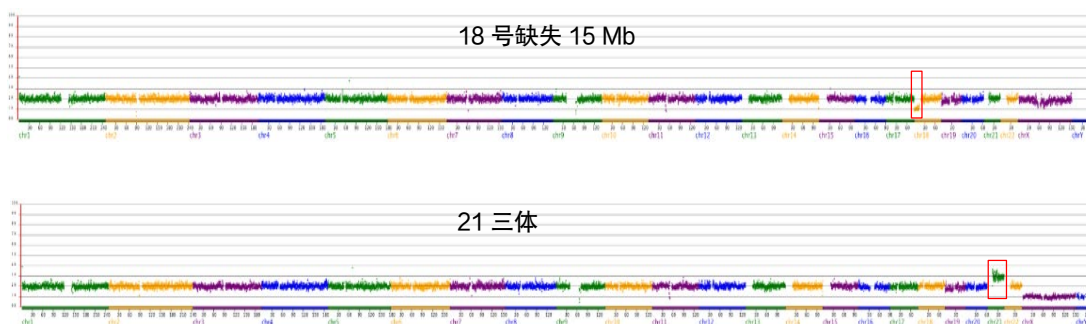


图 4. 扩增产物全基因组拷贝数散点分布图

➤ 附录 1：磁珠纯化方法

使用磁珠纯化 DNA 时，一般推荐使用 1.2X（磁珠量：样品量 = 1.2：1）的磁珠比例进行 DNA 纯化。以 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 \ AG12547 \ AG12548）按照 1.2X 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 60 μl 的已恢复室温的磁珠至上述 50 μl DNA 中（按照磁珠：样品 = 1.2：1 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。