

Single Cell WGA Kit

使用说明书

【产品名称】

Single Cell WGA Kit

【货号/规格】

KS001-A (24 rxns) ; KS001-B (96 rxns)

【产品简述】

Single Cell WGA Kit是单细胞全基因组扩增试剂盒，通过对单个细胞或微量样本进行细胞裂解、预扩增、扩增得到大量的全基因组产物。本品采用优质高效的细胞裂解酶、DNA聚合酶和反应缓冲液，可在3小时内完成单细胞的扩增，产物均一性好、重现性高，适用于高通量测序、SNP分型等。

【组成成分】

组分	KS001-A	KS001-B
Cell Lysis Buffer	120 μ l	480 μ l
Lysis Enzyme Dilution Buffer	120 μ l	480 μ l
Cell Lysis Enzyme	5 μ l	20 μ l
Pre-Amp Buffer	120 μ l	480 μ l
Pre-Amp Enzyme	5 μ l	20 μ l
Amplification Buffer	600 μ l	1.2 ml $\times$ 2
Amplification Enzyme	20 μ l	80 μ l
RNase-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml $\times$ 4

【储存条件】

-20℃保存。

【适用范围】

适用于以单个细胞或者微量样本为模板实现基因组的无差别扩增，可应用在二代测序、寡核苷酸aCGH、BAC aCGH和qPCR进行CNV分析、突变检测的目标富集或扩增子富集及SNP分型等研究领域。

【注意事项】

1. 请在正压的超净工作台中完成，勿与普通PCR操作平台交叉使用，避免样品DNA污染。
2. 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。
3. 在实验过程中建议设置阳性与阴性对照以验证体系是否正常工作。

4. 组分已做优化，使用中不建议改变反应体系。
5. 本品全基因组产物浓度较高，尽量避免将产物带回公共实验操作区，防止造成气溶胶污染。

【实验流程】

1. 样品准备

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。

15 - 100 pg纯化的真核、原核、真菌、病毒基因组DNA等。

完整的或片段化的DNA。

细胞培养基或样品中其他组分，例如肝素、EDTA、SDS、血红素、乙醇和苯酚等，可能会抑制扩增反应，请尽量减少不必要的样品体积以降低可能对反应体系带来的影响。用无菌的、无核酸酶的1 $\times$ PBS缓冲液(不含Mg²⁺、Ca²⁺和BSA)洗涤细胞，减少非细胞DNA污染。在反应的细胞裂解步骤中，所携带的PBS体积需不超过2.5 μ l。

2. 细胞裂解

1. 样品准备：通过添加适量的Cell Lysis Buffer，将细胞(1 - 10个)或DNA (15 - 100 pg)平衡至最终体积为5 μ l。如果从PBS中分离出单个细胞，PBS样品体积不要超过2.5 μ l，用Cell Lysis Buffer将体系补足至5 μ l。

细胞裂解：按照下表配制Cell Lysis Mix反应体系。

试剂	体积
Lysis Enzyme Dilution Buffer	4.8 μ l
Cell Lysis Enzyme	0.2 μ l
Total	5 μ l

配制所需反应次数所需Cell Lysis Mix体积的105%的量。混匀后放置冰上备用。

2. 将样品与Cell Lysis Mix混匀：

试剂	体积
准备好的样品	5 μ l
Cell Lysis Mix	5 μ l
Total	10 μ l

请勿使用移液器吹打混匀，以避免细胞样品粘附到移液器吸头上。

3. 短暂离心，将反应液收集至管底。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间
----	----

75°C	10 min
95°C	4 min
22°C	∞

程序达到22°C后，取出样品，短暂离心，将反应液收集在管底，继续进行预扩增反应。

3. 预扩增反应

1. 按照下表配制Pre-Amp Mix反应体系。

试剂	体积
Pre-Amp Buffer	4.8 μ l
Pre-Amp Enzyme	0.2 μ l
Total	5 μ l

配制所需反应次数所需Pre-Amp Mix体积的105%的量，混匀后放置冰上备用。

2. 将Pre-Amp Mix加入裂解后的样品中：

试剂	体积
裂解后的样品	10 μ l
Pre-Amp Mix	5 μ l
Total	15 μ l

3. 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	/
95°C	15 sec	12
15°C	15 sec	
25°C	50 sec	
35°C	30 sec	
65°C	40 sec	
75°C	40 sec	
22°C	∞	/

4. 扩增反应

1. 按照下表配制Amplification Mix反应体系。

试剂	体积
Amplification Buffer	25 μ l

Amplification Enzyme	0.8 μ l
RNase-free ddH ₂ O	34.2 μ l
Total	60 μ l

配制所需反应次数所需Amplification Mix体积的105%的量，混匀后放置冰上备用。

2. 将Amplification Mix加入预扩增后的产物中：

试剂	体积
预扩增后的产物	15 μ l
Amplification Mix	60 μ l
Total	75 μ l

3. 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	/
95°C	15 sec	10
65°C	1 min	
75°C	1 min	
22°C	∞	/

循环数可参照下表进行设置：

细胞数量	基因组DNA质量	扩增		
		预扩增循环数	扩增循环数	产出
1	15 pg	12	10	5-8 μ g
2-3	30 pg	12	10	8-10 μ g
5-6	60 pg	12	10	10-12 μ g
8-10	100 pg	12	10	10-12 μ g

5. 扩增产物分析

通过琼脂糖凝胶电泳进行分析，扩增产物大小在200 - 2,000 bp之间。

图1 KS001工作流程图

