

Discover-sc™ Single Cell Kit



Vazyme Biotech Co., Ltd

网站/Web: www.vazyme.com

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: sales@vazyme.com

技术支持/Support: support@vazyme.com

技术服务/Service: service@vazyme.com



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.








使用说明书

Version 5.1

目录 Catalog

产品组分	-----	02
储存方法	-----	02
使用范围	-----	02
安全信息	-----	02
产品概述	-----	03
产品特点	-----	05
研究范围	-----	05
用户自备仪器及试剂	-----	06
使用方案	-----	07
方案1 从单细胞中扩增基因组DNA	-----	07
方案2 扩增纯化的基因组DNA	-----	08
方案3 扩增血液样本中细胞基因组DNA	-----	09
方案4 扩增纸上的血迹中残留的基因组DNA	-----	10
方案5 扩增棉签上的口腔上皮细胞DNA	-----	11
方案6 从冰冻样本或者活检组织中扩增基因组DNA	-----	12
Discover-sc Single Cell Kit反应结果图例	-----	13
常见问题及解决方案	-----	14

产品组分

组分	N601-01 (24 rxn)	N601-02 (96 rxn)	
Discover-sc DNA Polymerase	48 μ l	192 μ l	
Discover-sc Reaction Buffer	750 μ l	3 \times 1 ml	
Buffer D	1 ml	2 \times 1 ml	
Buffer N	1 ml	2 \times 1 ml	
DTT, 1 M	1 ml	1 ml	
PBS	1 ml	2 \times 1 ml	
H ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml	

储存方式

Discover-sc Single Cell Kit于干冰中寄送，请在收到本试剂盒之后立即将所有组分储存于-20℃恒温冰箱中，避免储存在自动除霜冰箱，在正确的储存与操作下，本试剂盒质量保证6个月。如需更长期储存请-70℃以下存放。

使用范围

本产品仅用于分子生物学及其它科学研究目的，不能应用于临床诊断和治疗。

安全信息

使用本产品时请佩戴一次性手套及防护眼镜，穿着实验室服，避免试剂接触到皮肤及眼睛，如果不慎导致试剂接触到皮肤或者眼睛，请立即使用大量清水冲洗并及时就医。

产品概述

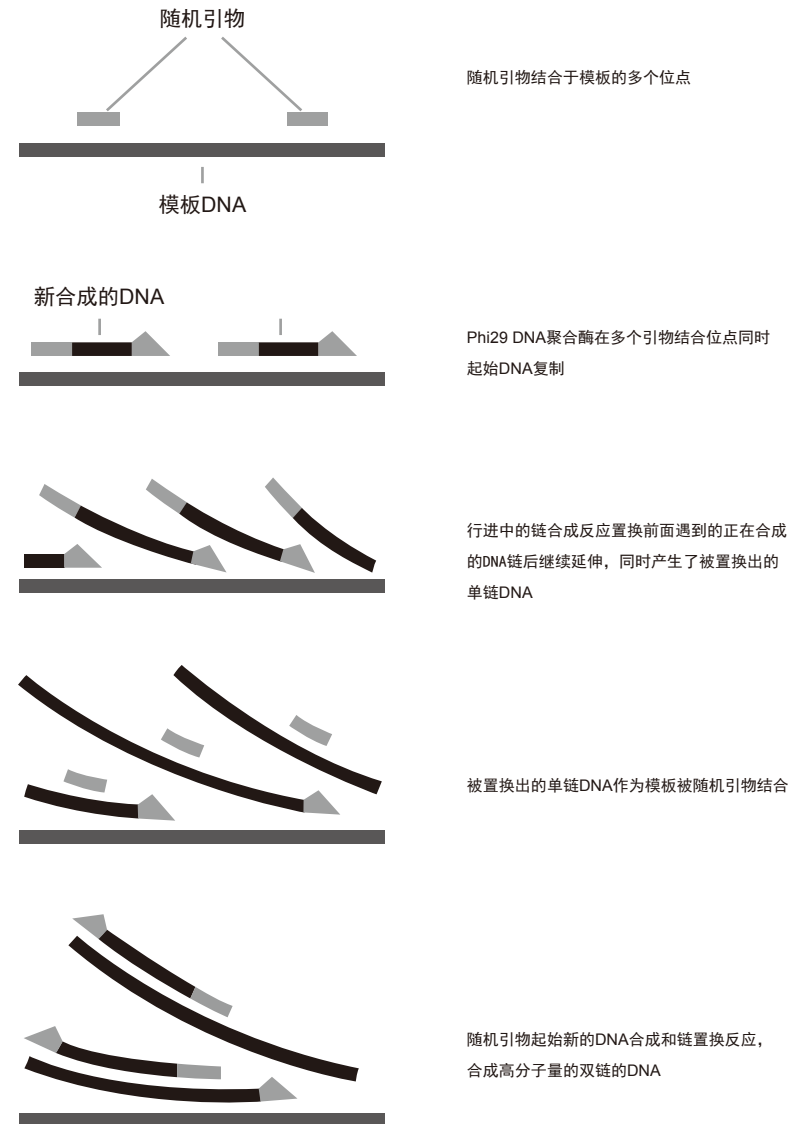
基于二代测序的全基因组测序技术极大的推进了快速的全基因组DNA序列分析和基因分型，但是全基因组序列分析需要大量的起始DNA，这就限制了使用二代测序技术在单细胞和其它微量样本基因组序列分析上的应用。单细胞或者微量样本需要首先进行全基因组扩增才能得到可以进行序列分析的大量基因组DNA。目前对全基因组进行扩增主要有基于PCR和MDA的两种方法。由于PCR的扩增具明显的序列偏好性，很多高GC含量以及形成复杂结构序列得不到有效扩增而在最终的扩增产物中得不到体现，导致最终扩增得到的产物基因组覆盖度比较低。基于多重链转换扩增(MDA)的扩增方式是目前公认的最好的全基因组扩增的方法，有效避免了PCR扩增的偏好性，使最终扩增产物的基因组覆盖度达到95%以上。并且基于MDA的恒温扩增操作简单，不需要特殊的仪器，可以在短时间内得到几十微克的全基因组扩增产物，足够进行大量的平行分析。

Discover-sc Single Cell Kit是基于MDA的Phi29等温扩增体系。Phi29 DNA聚合酶是从噬菌体中克隆的DNA聚合酶，具有很强的链置换活性，可以实现对DNA复杂结构解链与复制。同时这种非常强的链置换活性也保证了Phi29 DNA聚合酶可以在体外进行不依赖于热循环的恒温DNA聚合反应。并且Phi29 DNA聚合酶具有很强的链亲和力，单次聚合反应可以实现长达100 kb的连续聚合延伸，使扩增产物适用于几乎所有下游基因组分析，比如大片段拷贝数变异分析。Phi29 DNA聚合酶还具有很强的3'-5'外切酶活性，这保证了DNA合成的高保真性，其保真度是Taq酶的1000倍，高于目前绝大多数高保真酶的保真度。这些特点都保证了Phi29 DNA聚合酶非常适合于全基因组的扩增。

本试剂盒利用优化的Phi29 DNA聚合酶反应体系实现全基因组DNA的恒温扩增，可以用单个细胞或者少量样本实现全基因组的无差别扩增，最终得到几十微克全基因组DNA。扩增产物大小在2-100kb之间，平均产物长度大于20 kb，广泛适用于二代测序，大片段拷贝数变异分析，微卫星分析，qPCR分析，基因芯片分析。

正常情况下Discover-sc Single Cell Kit一个反应可以产生30-40 μg高覆盖度的全基因组DNA，低质量的样品会影响最终的DNA产量，应尽量避免使用大量降解和片段化的DNA作为起始样本。

Phi29 DNA聚合酶介导的MDA示意图：



产品特点

高灵敏度：可以从单个细胞或者极微量的基因组样本中实现全基因组扩增。

高覆盖度：单细胞基因组经扩增后可达到95%以上的覆盖度。

高均一度：基于无偏好性MDA的扩增，可实现全基因组的均一扩增。

高保真度：Phi29 DNA聚合酶具有优于目前绝大多数高保真酶的保真度

高产率：6-8小时的反应可以产生30-40 μg的基因组DNA。

操作简单：仅需3步反应，操作时间少于10分钟。

设备要求低：只需水浴锅即可完成整个反应。

适用起始材料及研究范围

人和动物

干细胞研究

肿瘤进展研究

肿瘤干细胞分析

遗传工程动物基因分型

胚胎植入前遗传学诊断

母体循环中胎儿细胞分析

SNP, CNVs等生物标志研究

细菌

病原物分析

宏基因组学研究

微生物分型

植物

花粉分析

注：以植物为材料的反应须先去除细胞壁或者直接使用纯化的植物DNA

用户自备仪器及试剂

离心机

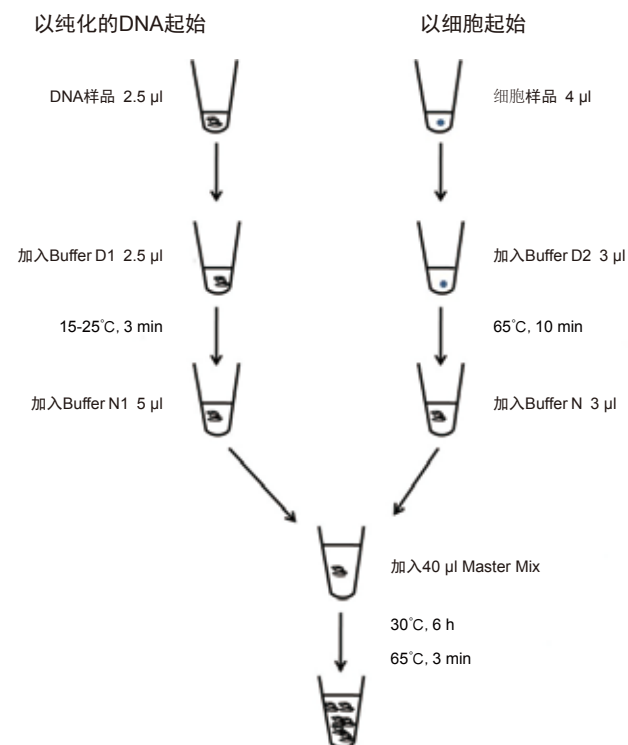
PCR管

水浴锅或者PCR仪

移液器及吸头

冰

操作流程示意图：



更多样品处理及操作过程请参考详细使用方案

使用方案1 从单细胞中扩增基因组DNA

本方案适用于使用1-1000个细胞作为起始, 请使用新鲜制备的细胞样品, 以保证起始基因组的完整性, 请勿使用已发生凋亡的细胞。

1. 准备Buffer D2(下表给出的Buffer D2体积足够12个反应, 一次实验不能完全用完可储存于-20°C, 但储存时间不能超过3个月)

成分	体积
DTT, 1M	4 μ l
Buffer D	36 μ l
总体积	40 μ l

2. 将4 μ l细胞样品(重悬于PBS中)加入到PCR管中。如果样品体积少于4 μ l, 请使用PBS补足4 μ l。

3. 加入3 μ l的Buffer D2, 轻弹管壁混匀并短暂离心。

注意: 请确保细胞没有粘附在管壁上, 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。

4. 65°C孵育10 min。

5. 加入3 μ l Buffer N, 轻弹管壁混匀并短暂离心。下步反应准备好之前请将样品置于冰上。

6. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μ l
Discover-sc Reaction Buffer	30 μ l
Discover-sc DNA Polymerase	2 μ l
总体积	40 μ l

注意: 请按顺序加入以上成分, 在加入H₂O和Discover-sc Reaction Buffer之后震荡混匀并短暂离心收集, 加入Discover-sc DNA Polymerase之后应立即使用。

7. 将40 μ l反应混合液加入到准备好的10 μ l DNA样品中(第5步), 混匀并短暂离心收集。

8. 30°C孵育6小时。

注: 孵育16小时可获得最高产量, 如有需要可延长孵育时间。

9. 65°C, 3 min失活Discover-sc DNA Polymerase。

10. 扩增产物是高浓度基因组DNA, 请用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验, 包括二代测序, 微卫星分析, qPCR分析, 基因芯片分析, Array CGH等。

使用方案2 扩增纯化的基因组DNA

本方案适用于从大于10 ng纯化的基因组DNA中进行全基因组扩增, 如果基因组完整性与纯度足够高, 更少的起始DNA也可以使用(真核生物基因组DNA 1-10 ng, 细菌基因组DNA 10-100 pg)。

1. 准备Buffer D1和N1(下表给出的Buffer D1和N1体积足够12个反应, 一次实验不能完全用完可储存于-20°C, 但储存时间不能超过3个月)

准备Buffer D1

成分	体积
Buffer D	7 μ l
Nuclease-free H ₂ O	25 μ l
总体积	32 μ l

准备Buffer N1

成分	体积
Buffer N	9 μ l
Nuclease-free H ₂ O	51 μ l
总体积	60 μ l

2. 将2.5 μ l DNA样品加入到PCR管中, 如果样品体积少于2.5 μ l, 请用水或者TE补足到2.5 μ l。

3. 加入2.5 μ l的Buffer D1, 轻弹管壁混匀并短暂离心。

注: 请勿使用移液器吹打混匀, 以避免吹打影响DNA样品的完整性并将少量样本DNA粘附到移液器吸头上。

4. 15-25°C孵育3 min。

5. 加入5 μ l Buffer N1, 轻弹管壁混匀并短暂离心。下步反应准备好之前请将样品置于冰上。

6. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μ l
Discover-sc Reaction Buffer	30 μ l
Discover-sc DNA Polymerase	2 μ l
总体积	40 μ l

注意: 请按顺序加入以上成分, 在加入H₂O和Discover-sc Reaction Buffer之后震荡混匀并短暂离心收集, 加入Discover-sc DNA Polymerase之后应立即使用。

7. 将40 μ l反应混合液加入到准备好的10 μ l DNA样品中(第5步), 混匀并短暂离心收集。

8. 30°C孵育6小时。

注: 孵育16小时可获得最高产量, 如有需要可延长孵育时间。

9. 65°C, 3 min失活Discover-sc DNA Polymerase。

10. 扩增产物是高浓度基因组DNA, 请用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验, 包括二代测序, 微卫星分析, qPCR分析, 基因芯片分析, Array CGH等。

使用方案3 扩增血液样本中细胞基因组DNA

本方案适用于于血液中细胞基因组的扩增

1. 准备Buffer D2(下表给出的Buffer D2体积足够12个反应，一次实验不能完全用完可储存于-20℃，但储存时间不能超过3个月)

成分	体积
Buffer D	4 μl
Nuclease-free H ₂ O	36 μl
总体积	40 μl

2. 使用PBS将血液稀释3倍以上，震荡混匀并短暂离心收集。
3. 取4 μl稀释过的血液样本到PCR管中，加入3 μl Buffer D2，震荡混匀并短暂离心收集。
注：请勿使用移液器吹打混匀，以避免吹打影响DNA样品的完整性并将少量样本粘附到移液器吸头上。
4. 冰上孵育10分钟。
5. 孵育之后加入3 μl Buffer N震荡混匀并短暂离心收集。下步反应准备好之前请将样品置于冰上。
7. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μl
Discover-sc Reaction Buffer	30 μl
Discover-sc DNA Polymerase	2 μl
总体积	40 μl

注意：请按顺序加入以上成分，在加入H₂O和Reaction buffer之后震荡混匀并短暂离心收集，加入phi29 DNA Polymerase之后应立即使用。

8. 将40 μl反应混合液加入到准备好的10 μl DNA样品中(第5步)，混匀并短暂离心收集。
9. 30℃孵育6小时。
注：孵育16小时可获得最高产量，如有需要可延长孵育时间。
10. 65℃，3 min失活phi29 DNA Polymerase。
11. 扩增产物是高浓度基因组DNA，请使用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验，包括二代测序，微卫星分析，qPCR分析，基因芯片分析，Array CGH等。

使用方案4 扩增纸上的血迹中残留的基因组DNA

本方案适用于于从纸片上血迹残留的DNA中扩增基因组DNA，请注意由于样品本身的不完整性，不能保证扩增出所有的基因组序列。

1. 准备Buffer D2(下表给出的Buffer D2体积足够12个反应，一次实验不能完全用完可储存于-20℃，但储存时间不能超过3个月)

成分	体积
DTT, 1M	50 μl
Buffer D	450 μl
总体积	500 μl

2. 将少量带血迹的纸剪成小的碎片(3mm*3mm)，如果处理多个样品，请注意用同一个器械剪多个样品的时候可能带来的交叉污染。
3. 将剪碎的纸片置于1.5 ml EP管中，加入40 μl的 Buffer D2。
4. 冰上孵育10分钟。
5. 孵育之后加入40 μl Buffer N震荡混匀并短暂离心收集，取6 μl的裂解后的样本加入到一个新的PCR管中，并加入4 μl水将体积补足到10 μl。
6. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μl
Discover-sc Reaction Buffer	30 μl
Discover-sc DNA Polymerase	2 μl
总体积	40 μl

注意：请按顺序加入以上成分，在加入H₂O和Discover-sc Reaction Buffer之后震荡混匀并短暂离心收集，加入Discover-sc DNA Polymerase之后应立即使用。

7. 将40 μl反应混合液加入到准备好的10 μl DNA样品中(第5步)，混匀并短暂离心收集。
8. 30℃孵育6小时。
注：孵育16小时可获得最高产量，如有需要可延长孵育时间。
9. 65℃，3 min失活Discover-sc DNA Polymerase。
10. 扩增产物是高浓度基因组DNA，请使用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验，包括二代测序，微卫星分析，qPCR分析，基因芯片分析，Array CGH等。

使用方案5 扩增棉签上的口腔上皮细胞基因组DNA

本方案适用于从棉签上粘附的口腔上皮细胞中扩增基因组DNA，推荐使用新取的口腔上皮细胞，以保证基因组的完整性，已存放的细胞不能保证扩增出所有的基因组序列。

1. 准备Buffer D2(下表给出的Buffer D2体积足够12个反应，一次实验不能完全用完可储存于-20°C，但储存时间不能超过3个月)

成分	体积
DTT, 1M	50 μ l
Buffer D	450 μ l
总体积	500 μ l

2. 将粘附有口腔上皮细胞的棉签头取下置于1.5 ml EP管中。

3. 加入40 μ l的 Buffer D2。

4. 冰上孵育10分钟。

5. 孵育之后加入40 μ l Buffer N震荡混匀并短暂离心收集，取6 μ l的裂解后的样本加入到一个新的PCR管中，并加入4 μ l水将体积补足到10 μ l。

6. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μ l
Discover-sc Reaction Buffer	30 μ l
Discover-sc DNA Polymerase	2 μ l
总体积	40 μ l

注意：请按顺序加入以上成分，在加入H₂O和Discover-sc Reaction Buffer之后震荡混匀并短暂离心收集，加入Discover-sc DNA Polymerase之后应立即使用。

7. 将40 μ l反应混合液加入到准备好的10 μ l DNA样品中(第5步)，混匀并短暂离心收集。

8. 30°C孵育6小时。

注：孵育16小时可获得最高产量，如有需要可延长孵育时间。

9. 65°C，3 min失活 Discover-sc DNA Polymerase。

10. 扩增产物是高浓度基因组DNA,请使用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验，包括二代测序，微卫星分析，qPCR分析，基因芯片分析，Array CGH等。

使用方案6 从冰冻样本或者活检组织中扩增基因组DNA

适用于从冰冻样本或活检的组织细胞中扩增全基因组DNA，请使用新鲜组织或者保存状态好的组织作为起始，组织保存不当导致基因组降解后不能扩增出所有的基因组序列。

1. 准备Buffer D2(下表给出的Buffer D2体积足够12个反应，一次实验不能完全用完可储存于-20°C，但储存时间不能超过3个月)

成分	体积
DTT, 1M	15 μ l
Buffer D	135 μ l
总体积	150 μ l

2. 将冰冻或者活检组织样本(小于2 mm³)置于PCR管中。加入10 μ l TE缓冲液(10 mM Tris-HCl;1 mM EDTA, pH 8.0)。

3. 加入10 μ l的 Buffer D2。

4. 冰上孵育30分钟。

5. 孵育之后加入10 μ l Buffer N震荡混匀并短暂离心收集，取10 μ l的裂解后的样本加入到一个新的PCR管中。

6. 准备反应混合液。

成分	体积
H ₂ O	8 μ l
Discover-sc Reaction Buffer	30 μ l
Discover-sc DNA Polymerase	2 μ l
总体积	40 μ l

注意：请按顺序加入以上成分，在加入H₂O和Discover-sc Reaction Buffer之后震荡混匀并短暂离心收集，加入Discover-sc DNA Polymerase之后应立即使用。

7. 将40 μ l反应混合液加入到准备好的10 μ l DNA样品中(第5步)，混匀并短暂离心收集。

8. 30°C孵育6小时。

注：孵育16小时可获得最高产量，如有需要可延长孵育时间。

9. 65°C，3 min失活 Discover-sc DNA Polymerase。

10. 扩增产物是高浓度基因组DNA，请使用水或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。扩增产物可广泛应用于下游实验，包括二代测序，微卫星分析，qPCR分析，基因芯片分析，Array CGH等。

Discover-sc Single Cell Kit反应结果图例:

图1. Discover-sc Single Cell Kit 扩增产物电泳结果。

Discover-sc Single Cell Kit扩增产物平均长度大于20 kb。M: marker; C:单细胞扩增产物; D: 基因组扩增产物; G: 未经扩增的基因组DNA。

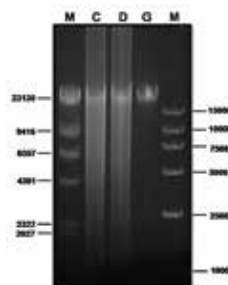


图1

图2. Discover-sc Single Cell Kit全基因组扩增产物均一度与覆盖度检测结果。

使用分布于不同染色体的8对引物通过多重PCR检测Discover-sc Single Cell Kit全基因组扩增产物均一度与覆盖度。扩增产物显示与未扩增基因组一致的均一度与覆盖度。M: marker; C: 单细胞扩增产物; D: 基因组扩增产物; G: 未经扩增的基因组DNA; NC: 阴性对照。

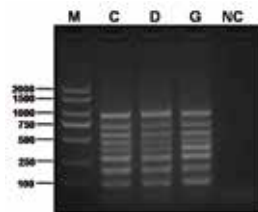


图2

图3.以单个细胞为起始模板的Discover-sc Single Cell Kit扩增产物积累曲线。

通过不同的反应时间，单个细胞通过Discover-sc 单细胞试剂盒扩增可以得到10-40 μg的全基因组扩增产物。

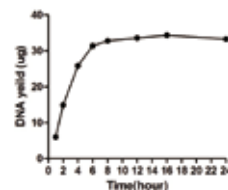


图3

图4.以10 ng纯化基因组DNA为起始模板的Discover-sc Single Cell Kit扩增产物积累曲线。

通过不同的反应时间，10 ng纯化基因组DNA通过Discover-sc Single Cell Kit扩增可以得到10-40 μg的全基因组扩增产物。

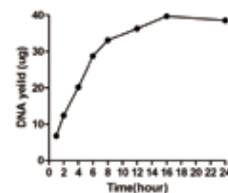


图4

常见问题

1. 没有扩增产物

A.基因组DNA样本中含有反应抑制成分

纯化或者稀释DNA样品。如果样品纯化过程中有乙醇沉淀或漂洗步骤，样品中残留的酒精会抑制反应，纯化过程中要让酒精充分挥发。

B.反应温度过高

反应温度应控制在30°C，过高的温度会使聚合酶失活，如果使用具有热盖功能的PCR仪进行反应，请将热盖温度设为70°C。

2. 扩增产生10 – 40 μg DNA，但检测到部分染色体座位或等位基因丢失。

A.对于以基因组DNA为起始模板的反应:

基因组DNA存在降解，使用完整的DNA作为模板；使用更多量的DNA做为模板。

B.对于以细胞作为起始的反应:

细胞存在凋亡或者细胞被固定过导致DNA降解；细胞存在难以被裂解的细胞壁(如植物细胞)不适合直接作为起始材料。

3. 阴性对照扩增产生10 – 40 μg DNA，但下游检测结果为阴性(如qPCR)

无模板的阴性对照反应中，由引物的随机聚合延伸产生的高分子量DNA产物，这种产物不影响目的产物的质量及下游分析。

4. 阴性对照扩增产生10 – 40 μg DNA，且下游检测结果为阳性(如qPCR)。

反应被外源DNA污染，由于本反应对微量DNA非常敏感，替换掉所有可能被DNA污染的试剂及用品。