Discover-sc®
Single Cell WGA Kit

N603

Vazyme

使用说明书

Version 22.1

Vazyme

目 录 Contents

01/产品概述 02
02/产品组分 02
03/保存条件 02
04/适用范围 02
05/自备材料 03
06/注意事项 03
07/样品准备 04
07-1/细胞样品准备 04
07-2/DNA样品准备 04
08/实验原理与流程概要 05
09/实验流程 06
09-1/单细胞中的基因组DNA扩增方案 06
09-2/纯化的基因组DNA扩增方案 07
10/扩增产物分析 08
11/常见问题与解决方案 09

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

Discover-sc Single Cell WGA Kit使用基于MDA的等温扩增体系，可以以单个细胞或者微量样本为模板实现全基因组的无差别扩增。单细胞基因组经扩增后可达到95%以上的覆盖度，扩增产物大小在2 - 100 kb之间，平均产物长度大于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。

本试剂盒使用的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，可以实现复杂结构的DNA解链与复制；同时Phi29 DNA聚合酶具有很强的链亲合力，单次聚合反应可以实现长达100 kb的连续聚合延伸，其扩增产物适用于几乎所有的下游应用；Phi29 DNA聚合酶还具有很强的3' - 5'外切酶活性，其保真度是Taq酶的1,000倍，从而保证了DNA合成的高保真性。

Discover-sc Single Cell WGA Kit中所有酶和缓冲液都经过了严格的质量控制和功能验证，优化的实验体系最大程度上提升了扩增均一性，保证了扩增的稳定性和重复性。

02/产品组分

组分	N603-01 (24 rxns)	N603-02 (96 rxns)
Discover-sc WGA Enzyme Mix	48 μl	192 μl
Discover-sc WGA Master Buffer	750 μl	3 × 1 ml
Buffer D	1 ml	2 × 1 ml
Stop Solution	1 ml	2 × 1 ml
DTT, 1 M	1 ml	1 ml
Cell Storage Buffer	1 ml	2 × 1 ml
Nuclease-free ddH_2O	1 ml	2 × 1 ml

▲产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色。

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。
如需更长期则-85 ~ -65℃保存 ， 干冰运输。

04/适用范围

Discover-sc Single Cell WGA Kit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，可广泛应用在多个研究领域。不适用于固定过的细胞及FFPE等低质量的样本。

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

◇ 嵌合研究

◇ 胚胎植入前遗传学诊断

◇ 循环胎儿细胞的分析

◇ 转基因动物分型

◇ 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

05/自备材料

◇ DNA评价：
Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit(Vazyme #EQ121)；

◇ 文库构建：
TruePrep DNA Library Prep Kit V2 for Illumina(Vazyme #TD502)或其他等效产品；
TruePrep Index Kit V2/V3 for Illumina(Vazyme #TD202/TD203)或其他等效产品；

◇ 纯化磁珠：
VAHTS DNA Clean Beads(Vazyme #N411)
或Agencourt AMPure XP Reagent(Beckman #A63880/A63881/A63882)；

◇ 其他材料：
离心机、显微镜、低吸附EP管、RNase-free PCR管、水浴锅或者PCR仪、qPCR仪等。

06/注意事项

1. 本产品检测灵敏度极高，实验操作应在正压的超净工作台中完成，请勿与普通PCR操作平台交叉使用，避免样品受外界因素干扰或DNA污染。
2. 本产品中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. 本产品中的细胞裂解方式不能有效裂解细胞壁，带有细胞壁的真核生物细胞需要在去除细胞壁之后再进行裂解，或者使用纯化后的DNA进行反应。哺乳动物细胞可直接用本方案进行裂解扩增。
4. 以低质量的样品为模板会影响最终的扩增产物质量，应尽量避免使用大量降解和片段化的DNA作为起始样本。

5. 实验操作过程中，推荐同时设置阳性与阴性对照以验证体系是否正常工作。

6. 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气溶胶污染。

7. 试剂盒中所有组分均已做最佳优化，使用中请勿改变反应体系。

07/样品准备

细胞培养基或样品中其他组分可能会对反应产生抑制，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。

07-1/细胞样品准备

细胞数量：本产品可直接以1 - 1,000个细胞为起始样本进行全基因组扩增，过多的细胞会对反应产生抑制作用。

获取方式：由于细胞基因组的完整性直接影响到扩增产物的完整性，请确定细胞的获取方式对细胞活性的影响，我们建议在每次收集完细胞样品后对细胞活性进行鉴定，死亡的细胞其基因组可能存在降解从而导致实验的失败。鉴定合格后建议立即进行反应，不适当的保存条件会导致细胞中的基因组降解。

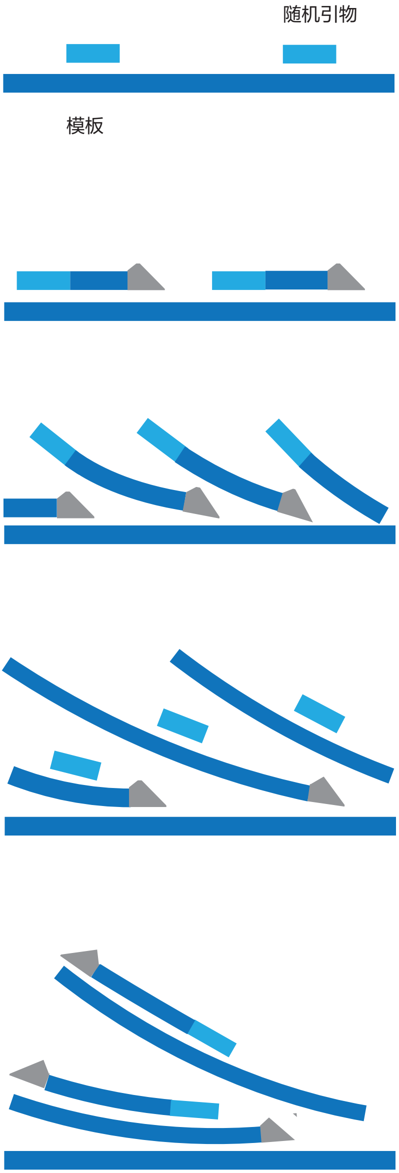
保存方式：细胞样品如果需要储存一定时间后再进行反应，可先将单细胞分离到4 μl的Cell Storage Buffer中，再将样品于-85 ~ -65℃或更低温度保存，取出后请立即进行后续的反应。分离得到的活细胞也可使用细胞冻存液冻存，在需要使用的时候复苏细胞，使用这种保存方案请在复苏后确认细胞是否存活，死亡的细胞会发生明显的DNA断裂并导致反应失败。

细胞培养基测试：对于培养的细胞，在实验前请测试并确认培养基对反应是否有抑制作用。可以将预计细胞样品携带的培养基加入到对照基因组反应中检测培养基是否抑制扩增反应。如无法确认培养基对反应的影响，请将细胞重悬于PBS后，再进行细胞分离及裂解反应。

07-2/DNA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作为起始样本会导致实验失败。

08/实验原理与流程概要



随机引物结合于模板的多个位点

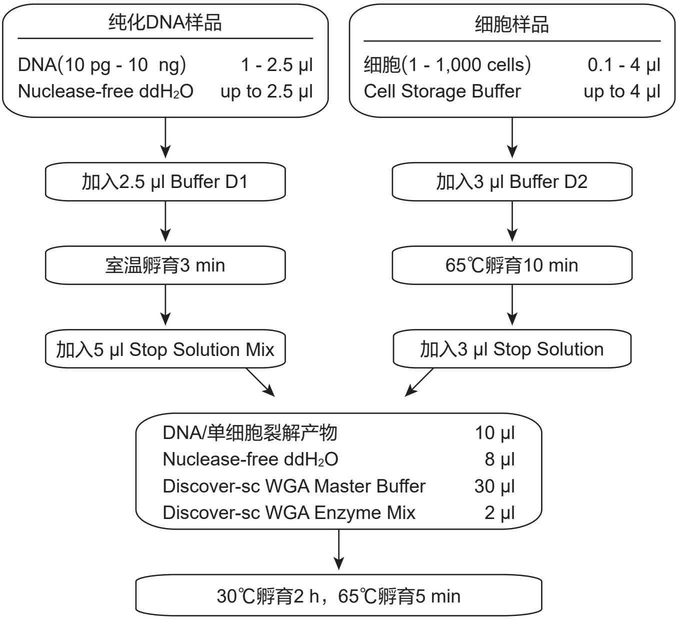
Phi29 DNA聚合酶在多个引物结合位点同时起始DNA复制

行进中的链合成反应置换前面遇到的正在合成的DNA链后继续延伸反应，同时产生了被置换出的单链DNA

被置换出的单链DNA作为模板被随机引物结合

随机引物引起新的DNA合成和链置换反应，合成高分子量的双链DNA

Phi29 DNA聚合酶介导的MDA示意图



Discover-sc Single Cell WGA Kit 单细胞基因组扩增流程图

09/实验流程

09-1/单细胞中的基因组DNA扩增方案

本方案适用于使用1 - 1,000个细胞为模板进行全基因组的无差别扩增。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，一次实验未完全用完可储存于-30 ~ -15℃，但保存时间不超过3个月)。

组分	体积
DTT, 1 M	4 μl
Buffer D	36 μl
Total	40 μl

2. 将4 μl细胞样品(重悬于Cell Storage Buffer中)加入到PCR管中。如果样品体积少于4 μl，请使用Cell Storage Buffer补足到4 μl。
3. 加入3 μl Buffer D2，轻弹管壁混匀并短暂离心收集。

   ▲请确保细胞没有粘附在管壁上，请勿使用移液器吹打，避免细胞样品粘附到移液器的吸头上。
4. 65℃孵育10 min。
5. 加入3 μl Stop Solution，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。

组分	体积	
Nuclease-free ddH_2O	8 μl	□
Discover-sc WGA Master Buffer	30 μl	■
Discover-sc WGA Enzyme Mix	2 μl	■
Total	40 μl	

▲请按顺序加入以上组分，在加入Nuclease-free ddH_2O和Discover-sc WGA Master Buffer之后振荡混匀并短暂离心收集至管底，加入Discover-sc WGA Enzyme Mix之后应立即使用。

7. 立即将40 μl反应混合液加入到准备好的10 μl DNA样品中(第5步)，轻弹管壁混匀并短暂离心收集。
8. 30℃孵育2 h。
9. 65℃孵育5 min失活Discover-sc WGA Enzyme Mix。
10. 扩增产物是高浓度基因组DNA，请使用Nuclease-free ddH_2O或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。其扩增产物可广泛应用于全基因组和外显子测序、微卫星分析、qPCR分析、基因芯片分析、Array CGH等。

09-2/纯化的基因组DNA扩增方案

本方案适用于以纯化的基因组DNA为模板进行全基因组的无差别扩增，如基因组完整性与纯度足够高，更少的起始DNA也可使用。(建议：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Stop Solution Mix(下表给出的Buffer D1和Stop Solution Mix体积足够12个反应，一次实验未完全用完可保存于-30 ~ -15℃，但储存时间不超过3个月)。

准备Buffer D1

组分	体积	
Buffer D	7 μl	■
Nuclease-free ddH_2O	25 μl	□
Total	32 μl	

准备Stop Solution Mix

组分	体积	
Stop Solution	9 μl	■
Nuclease-free ddH_2O	51 μl	□
Total	60 μl	

2. 将2.5 μl DNA样品加入到PCR管中，如果样品体积少于2.5 μl，请使用Nuclease-free ddH_2O或者TE补足到2.5 μl。
3. 加入2.5 μl Buffer D1，轻弹管壁混匀并短暂离心。

▲请确保DNA样品没有粘附在管壁上。

▲请勿使用移液器吹打，避免将少量样本DNA粘附到移液器吸头上影响DNA样品的完整性。

4. 室温孵育3 min。

5. 加入5 μl Stop Solution Mix，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。

组分	体积	
Nuclease-free ddH_2O	8 μl	□
Discover-sc WGA Master Buffer	30 μl	■
Discover-sc WGA Enzyme Mix	2 μl	■
Total	40 μl	

▲请按顺序加入以上组分，在加入Nuclease-free ddH_2O和Discover-sc WGA Master Buffer之后振荡混匀并短暂离心收集至管底，加入Discover-sc WGA Enzyme Mix之后应立即使用。

7. 立即将40 μl反应混合液加入到准备好的10 μl DNA样品中(第5步)，轻弹管壁混匀并短暂离心收集。

8. 30℃孵育2 h。

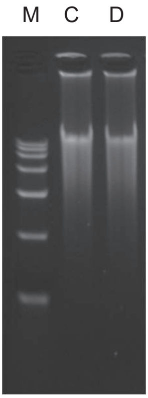
9. 65℃孵育5 min失活Discover-sc WGA Enzyme Mix。

10. 扩增产物是高浓度基因组DNA，请使用Nuclease-free ddH_2O或者TE稀释到合适的浓度后进行下游实验。其扩增产物可广泛应用于全基因组和外显子测序、微卫星分析、qPCR分析、基因芯片分析、Array CGH等。

10/扩增产物分析

电泳分析

Discover-sc Single Cell WGA Kit扩增产物大小在2 - 100 kb之间,平均长度大于15 kb。



M：DL15,000

C：单细胞扩增产物

D：基因组扩增产物

图1：扩增产物电泳图

11/常见问题与解决方案

◇ 没有扩增产物：

① **样品在收集过程中丢失**

重新收集样品，确定不会因操作不当，造成样品意外丢失。

② **基因组DNA样本中含有抑制反应的成分**

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。

③ **反应温度过高**

反应温度应控制在30℃，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℃。

◇ 扩增产生7.5 - 20 μg DNA，但检测到部分染色体错位或等位基因丢失：

① **对于以基因组DNA为起始模板的反应：**

基因组DNA存在降解。应使用完整的DNA或使用更多量的DNA做为模板。

② **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。

◇ 阴性对照有一定的产出，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。

◇ 阴性对照扩增产生7.5 - 20 μg DNA，且下游检测结果为阳性(如qPCR)：

可能存在交叉污染，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。

Vazyme

Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com
Tel: +86-400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com

www.vazyme.com