

REPLI-g® Single Cell Kit

适用于单细胞或有限样品材料的全基因组扩增 (WGA)

利用新颖仪器对生物学样品进行 DNA 序列分析和基因分型往往受限于可用的样品量很少。REPLI-g Single Cell Kit 采用经 UV 处理的专门成分来消除任何可检测到的 DNA 污染，可从单细胞 (<1000 个细胞到低至 1 个细菌或肿瘤细胞) 或已纯化的基因组 DNA 中均匀扩增基因组 DNA，其基因组覆盖最大化，且序列偏向可忽略不计。

REPLI-g Single Cell Kit 提供了：

- 单细胞材料的全基因组扩增，且基因组覆盖最大化
- 多次置换扩增 (MDA) 技术带来的基因座的无偏向扩增
- 经优化可用于新一代测序等新技术
- 高达 40 µg 的一致产量 (产物平均长度 >10 kb)
- 一种创新的工具 (适合癌症研究和宏基因组学 (metagenomics))

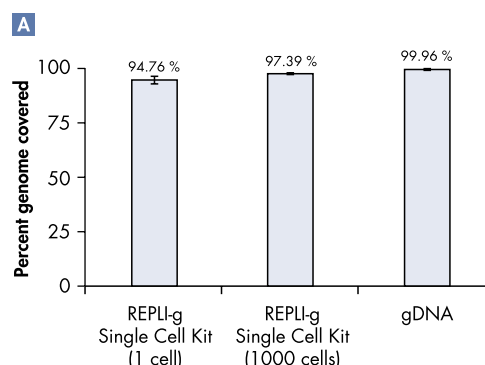
仅仅一个细胞也能带来高产量，适合各种应用

REPLI-g Single Cell Kit 旨在从单细胞 (如分离的肿瘤细胞或细菌) 中获得高产量的扩增 DNA。它可用于广泛的应用中，使用各种临床和非临床研究样品，包括已纯化的基因组 DNA (gDNA)、新鲜或干燥的血液，以及新鲜或冷冻的组织 (表 1)。REPLI-g Single Cell 扩增后的 DNA 产物平均长度 >10 kb，且完整覆盖基因组，高度适合也已经开发用于新一代测序 (NGS) (图 1)、芯片法比较基因组杂交 (array CGH) 或 qPCR 分析 (表 2、图 3)。

客户评价：

“我已经试过了这个试剂盒，并成功开展了单细胞全基因组扩增。所获得的 DNA 让我能可靠检测一个结肠直肠癌细胞系中等位基因特异的点突变。扩增后 DNA 的出色产量和序列代表性确实帮助我推进了单细胞基因组学的研究工作。”

Masafumi Muratani 博士，Cancer Therapeutics & Stratified Oncology, Genome Institute of Singapore



	REPLI-g Single Cell Kit (1 cell)	REPLI-g Single Cell Kit (1000 cells)	gDNA
Error rate	0.43 %	0.22 %	0.35 %
Chimeras	0.08 %	0.06 %	0.11 %
Indel rate	0.05 %	0.02 %	0.01 %

图 1：利用已纯化的基因组 DNA 或 REPLI-g Single Cell 扩增的 DNA 获得可比的 NGS 结果。 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 基因组的全基因组测序是在 Illumina® MiSeq® 仪器上开展的。在分析中，2 µg 基因组 DNA 或利用 REPLI-g Single Cell Kit 从单个细胞 (三个不同的单细胞实验) 和 10³ 个细胞中扩增出的 DNA 被剪切成 300 bp 的片段，每个取 1 µg 用于文库制备。**A** gDNA 和 REPLI-g Single Cell 扩增的 DNA 观察到可比的序列覆盖度*。**B** 未扩增和 REPLI-g 扩增 DNA 的比较显示出错误率是在相似、非常低的百分比范围†。

* 利用 Burrows-Wheeler Alignment 程序进行比对 (截留：10 倍覆盖度)：bio-bwa.sourceforge.net。

† 未扩增和 REPLI-g Single Cell 扩增 DNA 的比较还显示出定位到基因组的序列有着高的百分比 (数据未显示)。



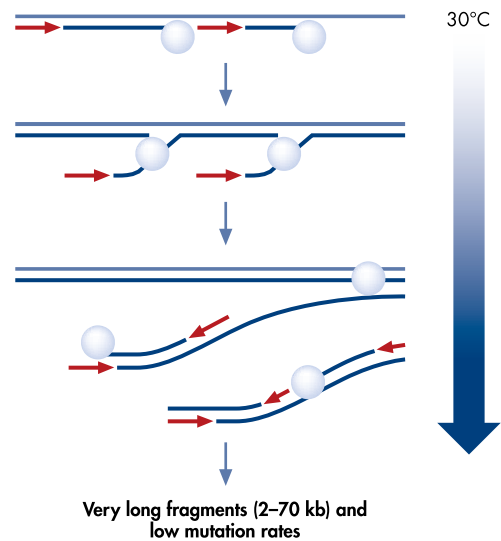


图 2. 多次置换扩增 (MDA) 技术带来长读长和等温扩增。
引物 (箭头所示) 与模板 DNA 退火, 并利用在 DNA 模板链上移动的 Phi 29 聚合酶在 30°C 延伸, 取代互补链, 同时自身成为复制的模板。与 PCR 扩增不同, MDA 不需要不同的温度, 且最终的片段非常长, 突变率低。

满足 NGS 和芯片技术的单细胞分析需求

新的高通量 NGS 和芯片技术为多个研究领域带来了快速且通用的成果 (表 1)。如今的 NGS 研究急需对单细胞中的 DNA 准确测序的能力 – 例如, 分析肿瘤细胞中的体细胞 DNA 突变, 或单个细菌基因组。这在很大程度上依赖于产生足够数量和质量的 DNA 用于后续分析的技术。尽管单个细胞含有 fg (细菌) 或 pg (真核细胞) 级的 DNA, 但测序或芯片分析通常需要 mg 级的 DNA。REPLI-g Single Cell Kit 是专门为满足这些特定需求而开发和优化的, 让研究人员能够在使用现代化平台技术时获得值得信赖的结果。

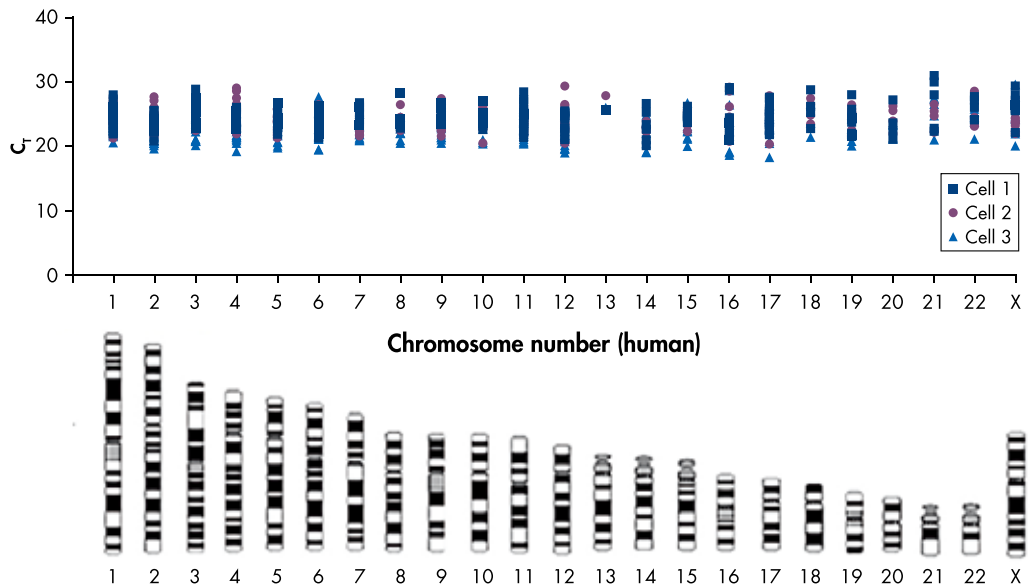


图 3. 完整的基因组覆盖。利用 RT² qPCR Primer Assays (QIAGEN) 以及 REPLI-g Single Cell Kit 在 3 个不同的单细胞实验中扩增 DNA 后的实时定量 PCR 开展整个人类基因组中分布在不同染色体上的 267 个基因座的全面分析 (如上)。低且一致的 C_t 值、无任何标记的丢失, 表明基因组中所有区域的成功扩增, 且高度适合单细胞基因组学。

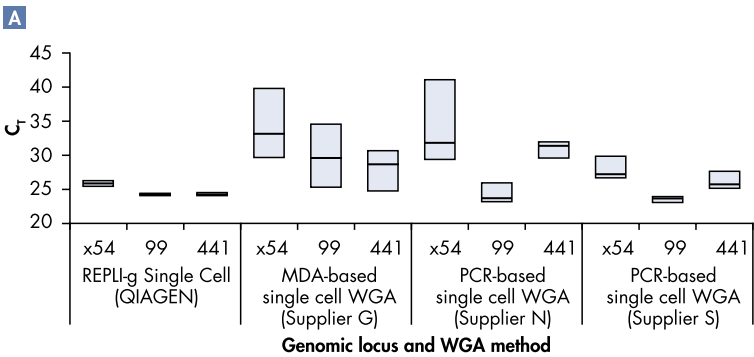
利用先进 MDA 技术的高保真全基因组扩增

REPLI-g 单细胞技术提供了整个基因组内高度均匀的 DNA 扩增。REPLI-g sc 聚合酶是新型、高保真 Phi 29 聚合酶的优化配方，具有强的置换活性，可通过多次置换扩增（MDA）扩增复杂的基因组 DNA，而温和的碱变性步骤可防止 DNA 片段化并产生脱碱基位点。Phi 29 聚合酶确保了基因座的均匀扩增，它最多能复制 70 kb 而不与基因组 DNA 模板解离，实现了基因座的均匀扩增（图 2）。与基于 PCR 的 WGA 技术不同，Phi 29 聚合酶有着 3' → 5' 的核酸外切酶校正活性，在复制时其保真度比 Taq DNA 聚合酶高出 1000 倍。

REPLI-g Single Cell Kit 性能更出色

其他供应商使用的基于 PCR 的 WGA 方法可导致扩增片段短且容易出错，这会带来单碱基对突变、STR 缩小和扩大，并因低保真 Taq DNA 聚合酶的使用而造成偏向或突变的基因座。

相比之下，REPLI-g Single Cell Kit 提供了整个基因内高度均匀的扩增，且扩增时的偏向极低。我们检测了 4 个 WGA 试剂盒，使用每个试剂盒特异的单细胞扩增步骤，来查看序列代表性和基因座丢失。与 REPLI-g Single Cell Kit 不同，使用其他供应商的试剂盒分析单细胞常常不能获得完整和无偏向的序列代表性（图 4）。



B

Dropout rates				
Genomic marker	QIAGEN	Supplier G	Supplier N	Supplier S
X54	0 %	40 %	40 %	0 %
99	0 %	20 %	0 %	0 %
441	0 %	0 %	0 %	0 %

表 1. 样品材料和研究领域的范围

样品材料 (细胞 / DNA)	研究领域
人 / 动物	生物标志物研究 (SNP、突变、CNV) 干细胞研究 循环胎儿细胞的分析 嵌合研究 遗传易感性研究 转基因动物的分型
癌症	体细胞遗传变异分析 肿瘤发展 肿瘤干细胞 / 进化 循环肿瘤细胞的分析
细菌	宏基因组学 (Metagenomics) 研究病原体分析 微生物基因分型
植物 *	气孔研究 花粉分析

* 无细胞壁的细胞或已纯化的基因组 DNA。

表 2. 下游应用及仪器

应用	研究领域
全基因组测序 外显子组测序	新一代测序平台 †
SNP 基因分型芯片 Array CGH	芯片平台 †
qPCR/PCR 技术	实时定量 PCR/PCR 循环仪 †
Sanger 测序	毛细管测序仪 †
焦磷酸测序	PyroMark® (QIAGEN)

† 多个供应商。

图 4. REPLI-g Single Cell Kit 带来了单细胞中 DNA 的无偏向、高度可靠扩增。我们使用 REPLI-g Single Cell Kit 或来自供应商 G、N 和 S 的单细胞试剂盒对 5 种人类细胞单独扩增。利用实时定量 PCR 来分析 3 种标志物，以鉴定基因座数量的损失或差异。**A** 与其他供应商的试剂盒不同，REPLI-g Single Cell Kit 带来了 5 种细胞的无偏向 DNA 扩增，而每种标志物的 C_t 值相同可说明这一点。**B** 与 REPLI-g Single Cell Kit 不同，利用供应商 G 和 N 的试剂盒扩增的 DNA 表明了高的丢失率。对于这两个试剂盒，2 种细胞中的基因组标志物 X54 未扩增，且供应商 G 的试剂盒未扩增 1 种细胞的标志物 99，表明不完整的基因组覆盖和偏向扩增，这使得这些试剂盒不适用于可靠的单细胞研究。

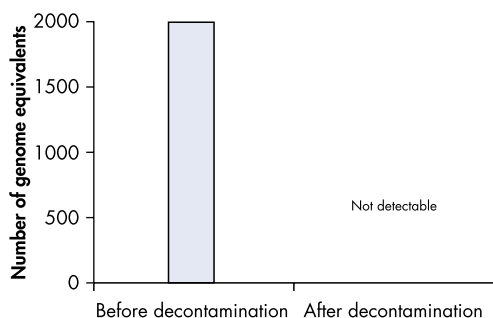


图 5. 创新的 UV 处理排除试剂盒组分中任何可检测到的残留 DNA。我们在 REPLI-g sc Reaction Buffer 中加入细菌 DNA (2000 个拷贝), 随后根据标准步骤对 REPLI-g Single Cell Kit 提供的所有缓冲液和试剂进行 UV 照射 (在 UV 处理之后, 试剂盒经过严格的质量控制, 以确保完整的功能性)。在随后的实时定量 PCR 中, 在 UV 去污染步骤之后未检测到细菌 DNA。

创新且方便的步骤 – 专门用于单细胞 WGA

REPLI-g Single Cell Kit 使用专门的缓冲液和试剂, 反应设置简单, 且处理时间仅为 15 分钟, 能够为单细胞、有限的组织材料和已纯化的 DNA 带来高纯的全基因组扩增 DNA, 且序列代表性和无偏向扩增最大化 (表 3)。这些独特的组分, 以及创新且标准化的 UV 处理步骤, 能够消除任何可检测到的残留污染 DNA, 确保仅来自单细胞的高质量结果 (图 5)。

表 3. REPLI-g Single Cell Kit 的组分

试剂盒组分	优势
REPLI-g sc Polymerase	长达 70 kb 的长片段 保真度比 Taq 高 1000 倍 序列代表性最大化 所有基因座的均匀扩增
REPLI-g sc Reaction Buffer*	为所有基因座的无偏向扩增和代表而优化
Buffer DLB (裂解和变性)	扩增的高效制备 无 DNA 损伤过程
UV 去污染过程	确保可检测到的残留 DNA 污染的消除

* 包含盐、引物和 dNTP。

订购信息

产品	规格	货号
REPLI-g Single Cell Kit (24)	REPLI-g sc Polymerase, Buffers, and Reagents for 24 x 50 µl whole genome amplification reactions (yields up to 40 µg/reaction)	150343
REPLI-g Single Cell Kit (96)	REPLI-g sc Polymerase, Polymerase, Buffers, and Reagents for 96 x 50 µl whole genome amplification reactions (yields up to 40 µg/reaction)	150345

关于最新的许可信息和产品特定的免责声明, 请阅读相关的 QIAGEN 试剂盒手册或操作指南。QIAGEN 试剂盒手册和操作指南可在 www.qiagen.com 上下载, 或向 QIAGEN 技术服务或当地的经销商索取。

访问 www.qiagen.com/goto/NGS 或 www.qiagen.com/goto/WGA, 了解更多信息!

Trademarks: QIAGEN®, PyroMark®, Pyrosequencing®, REPLI-g® (QIAGEN Group); Illumina®, MiSeq® (Illumina, Inc.).
8072974 11/2012 © 2012 QIAGEN, all rights reserved.



凯杰企业管理 (上海) 有限公司

电话: 021-3865 3865 ■ 技术支持热线: 800 988 0325 400 880 0325

TechService-CN@qiagen.com ■ www.qiagen.com

