

## MALBAC® 微量基因组快速扩增试剂盒说明书

### 【产品编号】

KT110700324/KT110700396

### 【产品名称】

通用名：MALBAC® 微量基因组快速扩增试剂盒

英文名：MALBAC® Single Cell DNA Quick-Amp Kit

### 【包装规格】

24 测试/盒，96 测试/盒

### 【预期用途】

本产品可用于单细胞或其他微量样本中全基因组 DNA 扩增，扩增产物可用于实时定量 PCR、高通量测序等技术平台。也可用于多种下游实验：

- 基因点突变分析检测
- 单核苷酸多态性（SNP）基因分型
- 基因拷贝数（CNV）分析
- 微阵列比较基因组杂交（Array CGH）
- SNP 芯片技术

### 【检测原理】

本产品采用 MALBAC 专利技术（即多次退火环状循环扩增技术）对单细胞或稀有细胞样本进行全基因组高效、快速裂解和扩增；该技术无需提取核酸，利用独特的具有链置换活性的 DNA 聚合酶进行准线性的全基因组扩增和指数式扩增，扩增均一性高，脱扣率较低，只需两步即可为下游分析提供充足的实验材料。

### 【主要组成成分】

序号	名称	规格及数量		储存条件
		24 测试	96 测试	
1	RAPE Mix	12 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	48 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	-20 $^{\circ}\text{C}$
2	Rapid Solution	108 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	432 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	
3	RWGA Enzyme Mix	48 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	192 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	
4	Rap-WGA Solution	1440 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	1440 $\mu\text{L}$ $\times$ 4 管	

### 【储存条件及有效期】

-20 $^{\circ}\text{C}$  保存，避免反复冻融。有效期：24 个月。

### 【自备物品】

1. 试剂：无核酸酶水、1 $\times$ PBS 缓冲液；
2. 仪器：微型离心机、涡旋混匀仪、紫外分光光度计、PCR 仪。

### 【产品特点】

- 单细胞经扩增后可获得 2~5  $\mu\text{g}$  的 DNA 产物；
- 单管操作、2 步完成、仅需 2 小时；
- 可从流式分选出的细胞或 0.5 pg 级 DNA 中扩增出全基因组 DNA，且成功率达 95% 以上；



- 可在 AT-GC 富集区得到准确、高重复度的连续扩增结果；
- 全基因组覆盖度高，仅存在<10%的基因座丢失及等位基因丢失。

### 【适用领域】

MALBAC 单细胞全基因组扩增试剂盒的适用范围十分广泛，基因组 DNA、新鲜或干燥的血液、新鲜或冷冻的组织、司法痕量物证等多种微量样本均可通过该试剂盒进行全基因组扩增，本产品适用的其他领域如下：

#### 人和动物生物学研究

- 生物标志物研究（CNVs、SNVs）
- 体外受精胚胎植入前基因筛查和诊断（PGS/PGD）
- 转基因动物基因分型
- 胚胎和干细胞单精子、卵细胞研究，神经元细胞等研究

#### 肿瘤研究

- 体细胞遗传变异分析
- 肿瘤进化和发展
- 肿瘤干细胞
- 循环肿瘤细胞(CTCs)

#### 微生物研究

- 宏基因组学研究
- 微生物基因分型

### 【样本要求】

#### 1. 样本起始量

本试剂盒主要用途是针对单细胞的全基因组扩增，同时适用于起始模板量为单染色体或范围在 0.5 pg~1 ng 级的微量基因组 DNA。

#### 2. 样本收集方式

通过流式细胞仪分选，缓冲液稀释，显微操作和激光显微切割等方式获得的单细胞均可利用本试剂盒进行全基因组扩增。此外，本试剂盒也适用于经过多聚甲醛固定或激光显微切割的微量的组织细胞样本。

#### 3. 样本清洗

为避免细胞准备过程中外源 DNA 的污染，建议在实验前对细胞进行清洗，清洗液为不含  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  的 1×PBS 溶液，需注意，确保后续实验中的 PBS 溶液的体积不超过 1  $\mu$ L。

### 【实验准备】

#### 1. 预扩增样本准备区的隔离

- 为避免样本受外界因素干扰或 DNA 扩增产物的污染，在扩增前，预扩增样本的准备过程需在单独隔离的实验室或专门工作区完成，并预备专用的实验材料和仪器，例如，移液器、移液管、PCR 管、1.5 mL 的离心管、离心管架、离心机、涡旋混匀仪和实验服等；
- 请将 DNA 扩增产物与预扩增试剂分开储存；所有的下游分析处理，如 DNA 纯化、测序前的准备工作，请在另一实验室中进行。

#### 2. 对照组 DNA 样本(5 $\mu$ L) 配制

- 阳性对照配制：用无核酸酶水将 DNA 存储液稀释为 30 pg/ $\mu$ L 的 DNA，取 30 pg/ $\mu$ L DNA 溶液 1  $\mu$ L，加入含 4  $\mu$ L Rapid Solution 的 PCR 管中，作为阳性对照。
- 阴性对照配制：取 1  $\mu$ L 无核酸酶水，加入到含 4  $\mu$ L Rapid Solution 的 PCR 管中，作为阴性对照。



## 【使用方法】

### 1. 样本预处理

- 1.1 从-20℃拿出 Rapid Solution，室温解冻，震荡混匀，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒），备用。  
1.2 根据反应数目（N，建议设置阴性对照及阳性对照），按照下表配制反应体系。

组分	体积
Rapid Solution	4.5 μL×N
RAPE Mix	0.5 μL×N
反应总体积	5.0 μL×N

备注：如样本活检后不能立即进行预处理，需将活检样本放入 4.5μL Rapid Solution 放于-20℃或-80℃保存，待需要预处理时再加入 0.5μL RAPE Mix。

- 1.3 涡旋混匀仪充分混匀，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒），用于样本裂解反应。  
1.4 将裂解混合液 5.0 μL 分装至 0.2mL PCR 管内，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒）。  
1.5 收集活检样本至上一步的 PCR 管内，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒）。

**注意：不要用力震荡，以防活检样本丢失，尽量避免产生气泡。**

- 1.6 （如果使用亿康基因的 MALBAC 基因扩增仪）将“步骤 1.5”PCR 管放置在 MALBAC 基因扩增仪中，逆时针旋转拧紧热盖，按以下步骤设定裂解程序：  
1) 点击“Lysis”程序自动跳转到下一界面；  
2) “加液量”调到 10μL，“控温模式”勾选“Tube”，确认“热盖控制”为 105℃，勾选“On”选项，“首节暂停”勾选“否”，点击“确定”按钮，自动跳转到工作界面；  
3) 待“剩余时间”显示为“--: --: --”表示程序已结束，点击“停止”终止程序。

- 1.7 （可选）使用自备 PCR 仪的用户，按照下表设定反应程序。

温度	时间	循环
50 °C	20 min	1
80 °C	10 min	
4 °C	Forever	

注：热盖温度设置为 105℃。

- 1.8 程序结束后样本可以留在 MALBAC 基因扩增仪中（4℃），或者取出放置于 2-8℃冰箱暂存。

### 2. 样本扩增

- 2.1 从-20℃拿出 Rap-WGA Solution，室温解冻，涡旋混匀，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒），备用。  
2.2 根据反应数目（N），按照下表配制反应体系。

组分	体积
Rap-WGA Solution	60 μL×N
RWGA Enzyme Mix	2 μL×N
反应总体积	62 μL×N

- 2.3 涡旋震荡，充分混匀，用于样本扩增反应。  
2.4 将配好的扩增反应液分装至步骤 1.8 的产物中，涡旋震荡，瞬时离心（微型离心机，2000 转，3-5 秒）。  
2.5 将步骤 2.4 中的 PCR 管放置在 MALBAC 基因扩增仪中，逆时针旋转拧紧热盖，按照以下步骤设定扩增程序。  
1) 点击“MALBAC”程序自动跳转到下一界面；  
2) “加液量”调到 65 μL，“控温模式”勾选“Tube”，确认“热盖控制”为 105℃，勾选“On”选项，“首节暂停”勾选“否”，点击“确定”按钮，自动跳转到工作界面；  
3) 待“剩余时间”显示为“--: --: --”表示程序已结束，点击“停止”终止程序。  
2.6 (可选) 用户使用自备 PCR 仪，按照下表设置反应程序。



温度	时间	循环
94 °C	3 min	1
10 °C	20 s	8
30 °C	30 s	
50 °C	40 s	
70 °C	2 min	
95 °C	20 s	
94 °C	30 s	1
94 °C	20 s	17*
58 °C	15 s	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	Forever	

注：热盖温度设置为 105°C。

\* 循环数可根据细胞类型不同而优化，100pg gDNA 推荐循环数为 14，流式细胞仪分选的哺乳动物细胞建议设置 17 个循环，单染色体建议设置 19-21 个循环。

- 2.7 程序结束后，将样本取出进行纯化，取适量纯化后的 MALBAC 产物进行 Nanodrop 定量，MALBAC 产物终产量为 2-5 µg 为合格。
- 2.8 取 5uL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳（条件：1%琼脂糖凝胶，110V，25-35 分钟），扩增产物大小为 300~2000bp。
- 2.9 纯化后的 MALBAC 产物保存于-20°C 冰箱，留待后续实验使用。

#### 【参考文献】

1. C. Zong, S. Lu, A.R. Chapman, X.S. Xie. Genome-Wide Detection of Single-Nucleotide and Copy Number Variations of a Single Human Cell. Science, 2012, 338, 1622-1626.
2. Lu S, Zong C, Xie XS, et al. Probing Meiotic Recombination and Aneuploidy of Single Sperm Cells by Whole Genome Sequencing using MALBAC. Science, 2012, 338(6114):1627-30.
3. Hou Y, Fan W, et al. Genome Analyses of Single Human Oocytes. Cell, 2013, 155(7):1492-506.
4. Ni X, Zhuo M, Xie XS, et al. Reproducible Copy Number Variation Patterns among Single Circulating Tumor Cells of Lung Cancer Patients. PNAS, 2013, 110(52):21083-8.
5. Yu Z, Lu S, Huang Y. Microfluidic Whole Genome Amplification Device for Single Cell Sequencing. Anal.Chem., 2014 Oct 7; 86(19):9386-90.
6. Huang J, Yan L, Xie XS, Qiao J, et al. Validation of Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle Sequencing for 24-chromosome Aneuploidy Screening of Cleavage-stage Embryos. Fertil. Steril., 2014,Dec;102(6):1685-91.
7. Huang L, Ma F, Xie XS, et al. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2015. 16: 1-16. 24.

#### 【问题解决方案】

问题	原因	措施
无扩增产物	样本在收集过程中丢失	重新收集样本，确保操作准确
	起始样本中含有聚合酶抑制剂	建议实验前应使用不含 Ca <sup>2+</sup> 、Mg <sup>2+</sup> 、Mo <sup>2+</sup> 或肝素等成分的 1× PBS 缓冲液对细胞进行清洗，确保样本中不含有聚合酶抑制剂
	酶失活	试剂盒中所有的组份都应该在-20°C 的条件下保存；试剂复融过程需在冰上进行，避免反复冻融



扩增产物含量低	样本中含有聚合酶抑制剂	建议实验前应使用不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mo}^{2+}$ 或肝素等成分的 1×PBS 缓冲液对细胞进行清洗, 确保样本中不含有聚合酶抑制剂
	DNA 降解	避免细胞因储存方法或准备方法不当造成 DNA 的降解, 影响扩增效率
阴性对照产生了与单细胞全基因组扩增相似的产物	试剂被外源性 DNA 污染	避免试剂盒的组份与扩增产物接触, 并使用无核酸酶和无核酸污染的实验耗材进行单细胞全基因组扩增, 建议实验前应使用不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mo}^{2+}$ 或肝素等成分的 1×PBS 缓冲液对细胞进行清洗, 确保不含有外源 DNA 污染。
	操作台被外源性 DNA 污染	使用防核酸污染试剂彻底清理操作台
	阴性对照溶液被外源性 DNA 污染	使用新阴性对照

### 【注意事项】

1. 操作前必须仔细检查所有样品, 应排除污染的样品;
2. 操作注意安全防护, 穿戴防护衣物、一次性手套、口罩; 所有直接接触过样本的物品应进行消毒后丢弃或再次使用, 同时防止操作者脱落细胞的污染;
3. 使用前, 试剂应混合均匀, 尽量避免反复冻融;
4. 所使用的接触试剂的材料均要求干燥、洁净, 以防止污染。操作过程中涉及的耗材为一次性使用, 不得重复使用;
5. 实验人员必须进行专业培训, 严格按照说明书操作;
6. 本试剂一次性使用, 不同批号试剂禁止交叉使用, 请勿使用过期试剂;
7. 样本应视为存在潜在的生物危害, 实验结束后作为潜在传染源处理;
8. 减少准备过程中 DNA 的污染, 聚合酶抑制剂的影响;
9. 避免样本因储存方法或准备方法不当造成的 DNA 降解;
10. 请严格按照试剂盒储存条件存放试剂盒各个组分, 防止由于储存不当导致的试剂失效或其他不良结果;
11. 本试剂盒仅供科研使用, 不用于临床诊断和其他用途。
12. 本试剂盒必须严格按照说明书进行操作, 由于不按说明书操作引起的损失和伤害(相关法律特别要求的除外), 本公司不承担由此引发的任何责任。

### 【基本信息】

生产企业: 亿康基因科技有限公司

地址: 上海: 上海市徐汇区田林路 888 号科技绿洲一期 1 楼 102 室, 200233

北京: 北京市海淀区永丰产业基地永澄北路 2 号院 1 号楼绿海大厦 C 座 302 室, 100094

江苏: 江苏省泰州市药城大道一号 TQB 大楼 5 楼, 225300

苏州: 江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B7 楼 201 室, 215000

邮箱: technical@yikongenomics.com (技术支持)

info@yikongenomics.com (咨询)

order@yikongenomics.com (销售)

电话: +86-10-5091-7399 (国际及中国港澳台), 400-688-9230 (中国大陆境内)

传真: +86-10-5091-7374

网址: www.yikongenomics.com

【版本号】180524.1

【识别码】PMC050

