

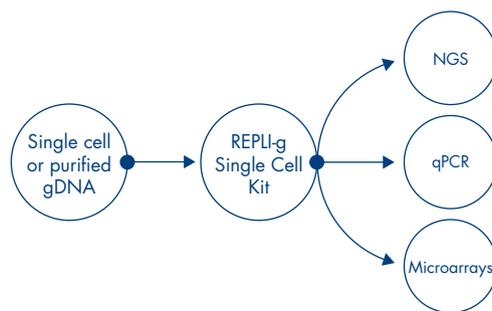
## REPLI-g® Single Cell Kit

### 适用于单细胞或极其微量样品材料的全基因组扩增 (WGA)

对于包括全基因组测序等 NGS 检测、qPCR 和芯片在内的许多技术来说,单个哺乳动物或细菌细胞中的 DNA 含量十分有限。为了克服这一限制并将这些检测方法应用于单个细胞, REPLI-g Single Cell Kit 将基因组 DNA 从单个细胞或皮克级的纯化后 DNA 放大为微克级, 从而可用于下游分析。这种完全 PCR-free 的方法能在引入可忽略不计偏倚的情况下, 带来高产量的 DNA 扩增产物和最大程度的基因组覆盖。此外, 考虑到单细胞实验的高度敏感性, 该试剂盒所有组分均经过独特的去污染流程以消除任何可能存在的 DNA 污染。

#### REPLI-g Single Cell Kit 提供了:

- 对于低至单细胞的样本进行高覆盖率的全基因组扩增
- 基于多重置换扩增 (MDA) 技术实现的高保真度扩增
- 高度适用于二代测序等多种新技术应用
- 常规产量高达 40 µg (产物平均长度 >10 kb)
- 一种用于癌症、发育生物学和宏基因组学研究的创新工具



### 仅仅一个细胞也能带来高产量, 适合多种应用

REPLI-g Single Cell Kit 可提供对于低至单个细胞的 DNA 高产量扩增, 样本来源可以是循环肿瘤细胞、细菌或细胞等。它可广泛应用于不同的应用, 适用于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)。▷

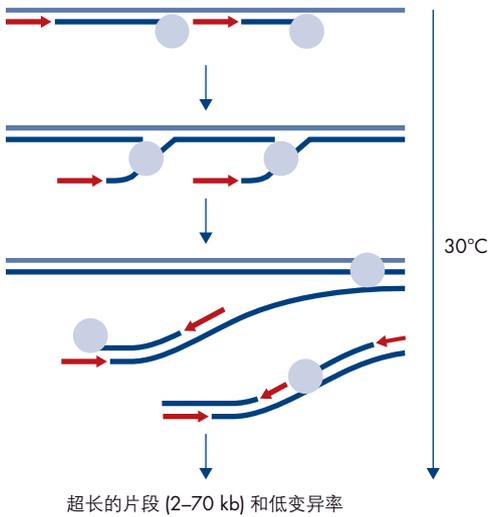
#### 客户评价:

“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 的出色产量和扩增序列均一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 个细胞)	REPLI-g Single Cell Kit (1000 个细胞)	基因组 DNA
可比对 reads 数	1.8M	1.5M	3.0M
基因组覆盖度	98.1%	97.4%	100.0%
错误率	0.43%	0.22%	0.35%
嵌合体率	0.08%	0.06%	0.11%
插入缺失率	0.05%	0.02%	0.01%

图 1. 来自单个细胞的无偏倚 WGA。以 2 µg 基因组 DNA、来自单个以及 1000 个细胞的 REPLI-g 扩增后 DNA 作为起始样本, 采用 GeneRead™ DNA Library Kit 制备 NGS 文库, 并使用 Illumina® MiSeq® 完成测序。实验数据结果显示即使在测序深度较低时, REPLI-g 单细胞、多细胞和大量基因组 DNA 经测序后的基因组覆盖度是相似的。此外, 嵌合体或 SNV 率的变化也未被检测到。

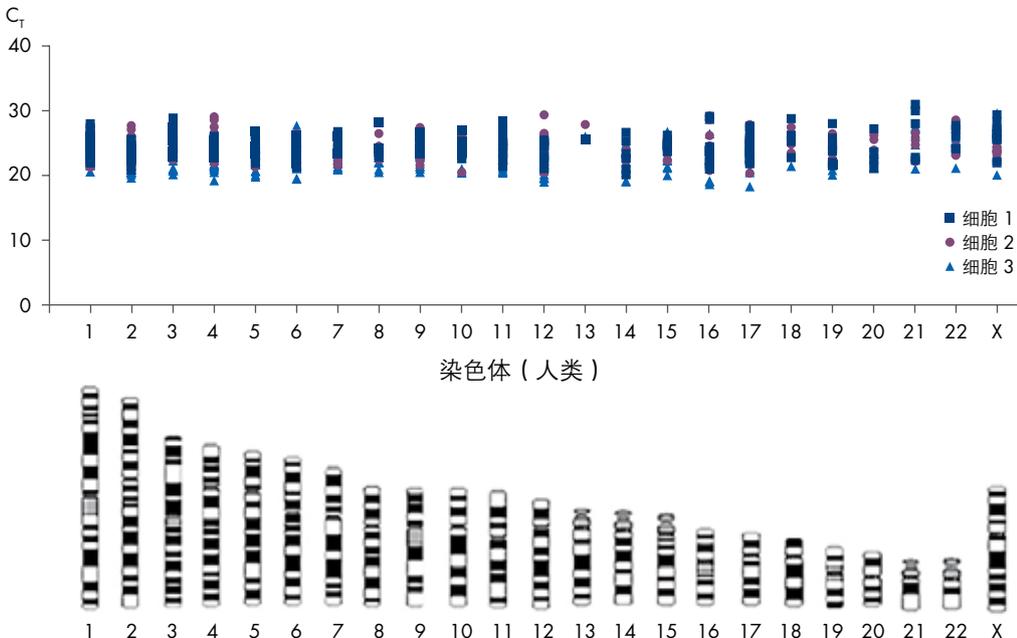


**图 2. 基于等温扩增的多重置换扩增 (MDA) 技术带来超长的扩增片段。**引物 (箭头所示) 与模板 DNA 结合, 并在等温反应中由 Phi29 聚合酶进行延伸。Phi29 沿着模板链移动, 将互补链或其他杂交延伸产物进行解链, 延伸产物同时作为进一步复制的模板。与基于 PCR 的 WGA 不同, MDA 可产生超长的扩增片段, 且突变率极低。

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, 高度适合并已广泛运用于二代测序 (NGS)(图 1)、比较基因组杂交芯片 (array CGH) 和 qPCR 分析 (表 1 和 3)。

## 满足 NGS 和芯片技术的单细胞分析需求

新的高通量测序和芯片技术为多个研究领域带来了快速而丰富的成果 (表 1)。如今的 NGS 技术急需对单细胞中的 DNA 进行准确测序的能力 - 例如, 分析肿瘤细胞中的体细胞突变, 或单个细菌基因组。这在很大程度上依赖于可产生用于后续分析的大量高质量 DNA 的扩增技术。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。



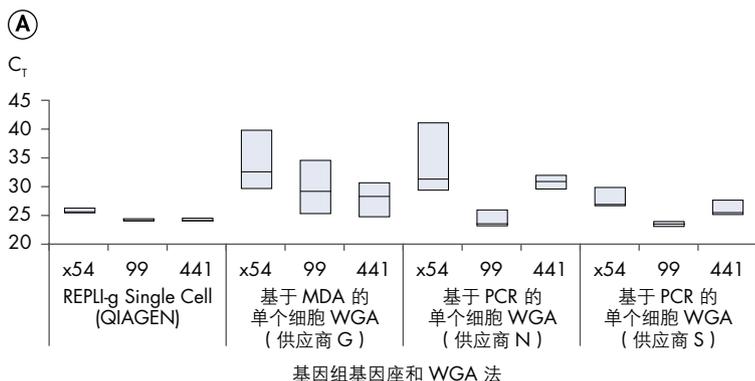
**图 3. 完整的基因组覆盖。**利用 REPLI-g Single Cell Kit 在 3 个不同的单细胞实验中扩增 DNA 后, 使用 RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays (QIAGEN®) 进行实时定量 PCR 检测, 对人类全基因组中分布在不同染色体上的 267 个位点进行了全面分析 (如上)。扩增结果显示 Ct 值较低且无任何标记位点丢失, 表明基因组中所有区域均被成功扩增, 体现出其高度适合单细胞基因组学研究。

## 采用 MDA 技术的高保真度 WGA

REPLI-g 单细胞技术采用了一种新型、优化的高保真 Phi29 聚合酶。这种酶具有超强的扩增能力，可生成长达 70 kb 的片段。这种无 PCR 偏倚的特殊长片段扩增确保了对于整个基因组的高度覆盖，将由全基因组不均等扩增而导致的位点丢失率降低到最小。此外，REPLI-g 单细胞聚合酶有很强的 3'-5' 核酸外切酶（校正）活性，保真度比 Taq DNA 聚合酶高出 1000 倍。当分析单核苷酸变异时，可极大减少错误率，降低了背景从而增加灵敏度。

## REPLI-g Single Cell Kit 性能更出色

一般 WGA 法通常在扩增时依赖于一种仅有低保真度的热稳定性 DNA 聚合酶，在扩增过程中会引入单碱基对突变、插入或缺失，并导致短重复序列的不准确扩增。具有高保真性的 REPLI-g Single Cell Kit 提供了优越的基因组覆盖能力，且扩增时可将偏倚降低到最低。我们在多种单细胞样本中测试了 4 种不同的 WGA 试剂盒，并以针对多个位点的特异性定量 PCR 来分析得到的扩增 DNA。实验结果分析表明，基于其他方法的几款试剂盒在扩增时均具有较强的偏倚性（图 4）。此外，REPLI-g 能可靠地检测到所有位点，而采用来自其他几个供应商的试剂盒则具有较高的位点丢失率。



**B** 丢失率

基因组标志物	QIAGEN	供应商 G	供应商 N	供应商 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 嵌合体研究 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 肿瘤嵌合现象 肿瘤干细胞 / 进化 循环肿瘤细胞的分析
细菌	宏基因组学 (Metagenomics) 病原体分析 微生物基因分型
植物	气孔研究、花粉分析

表 2. 下游应用及仪器

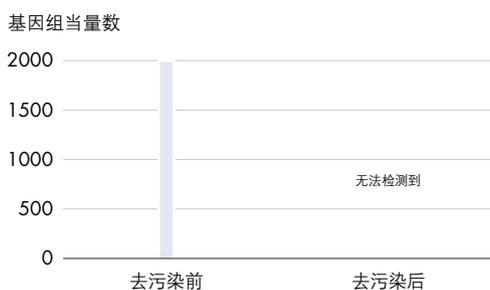
应用	检测平台
全基因组测序	二代测序平台 †
外显子组测序	
靶向测序	
SNP 基因分型芯片	芯片平台 †
Array CGH	
qPCR/PCR 技术	实时定量 PCR/PCR 循环仪 †
Sanger 测序	毛细管测序仪 †
焦磷酸测序	PyroMark® (QIAGEN)

† 支持多种平台。

**图 4. REPLI-g Single Cell Kit 带来了单细胞中 DNA 的无偏倚、高度可靠扩增。**我们使用 REPLI-g Single Cell Kit 及来自供应商 G、N 和 S 的单细胞试剂盒对 5 种人类细胞单独进行扩增。利用实时定量 PCR 来分析 3 种标志物，以鉴定位点的丢失率或错误率。**A** 与其他供应商的试剂盒不同，REPLI-g Single Cell Kit 带来了 5 种细胞的无偏倚 DNA 扩增，通过每种标志物的低  $C_t$  平均值和严格的标准偏差而得到反映。**B** 利用供应商 G 和 N 的试剂盒扩增的 DNA 表现出了较高的位点丢失率。对于这两个试剂盒，2 种细胞中的基因组标志物 X54 并未被成功扩增，且供应商 G 的试剂盒在 1 种细胞中对于标志物 99 也未能进行有效扩增，体现了不完整的基因组覆盖和偏倚扩增，反映出这些试剂盒无法达到可靠的单细胞研究要求。

## 创新的生产工艺杜绝外源污染的可能

在任何实验反应中，DNA 或细胞的污染都是不容存在的，而相关试剂的去污染是单细胞应用中的一个关键问题。在对单细胞样本进行扩增时，即使是单个分子的 DNA 污染也会造成背景噪音的大幅度增加，而这一点在传统实验中可能并不明显。为了克服这一点，REPLI-g Single Cell Kit 的组分在生产时经历了一种独特的去污染处理，以确保产生的结果更加可靠（图 5）。



**图 5. 创新的去污染处理流程杜绝试剂盒组分中任何可检测到的污染。**在 REPLI-g sc Reaction Buffer 中加入细菌 DNA (2000 个拷贝)，随后根据应用于所有 REPLI-g Single Cell Kit 的去污染流程对其进行处理。在后续的实时定量 PCR 检测中，细菌 DNA 完全被检测不到，表明即使是在如此高的污染水平下，这一流程也能生产出纯净、无 DNA 污染的 WGA 试剂。

## 订购信息

产品	规格	货号
REPLI-g Single Cell Kit (24)	用于 24 x 50 µl 全基因组扩增反应的 REPLI-g sc 聚合酶、缓冲液和试剂 (产量可高达 40 µg/ 反应)	150343
REPLI-g Single Cell Kit (96)	用于 96 x 50 µl 全基因组扩增反应的 REPLI-g sc 聚合酶、缓冲液和试剂 (产量可高达 40 µg/ 反应)	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](http://www.qiagen.com) 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](http://www.qiagen.com/goto/NGS) 或 [www.qiagen.com/goto/WGA](http://www.qiagen.com/goto/WGA)，了解更多信息！

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, GeneRead™, PyroMark®, REPLI-g® (QIAGEN Group); Illumina®, MiSeq® (Illumina, Inc.).  
© 2016 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](http://www.qiagen.com)



凯杰生命科学