

Super Pfx DNA Polymerase

单细胞全基因组扩增试剂盒 (MDA)

目录号:

S665716 (24 rxns)

S665716 (96 rxns)

保存条件: 请于干冰中寄送, 在收到试剂盒后立即将所有组分储存于-20℃ 恒温冰箱中, 可保存6个月。如需更长期储存请-70℃以下存放。

产品内容

Component	24 rxns	96rxns
SC-DNA Polymerase	48 µl	192 µl
SC-Reaction Buffer	1 ml	4×1 ml
Buffer D	1 ml	1.5 ml
Buffer N	1 ml	1.5 ml
DTT, 1 M	1 ml	1 ml
PBS	1 ml	1.5 ml

产品简介

单细胞全基因组扩增试剂盒基于 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扩增。单细胞全基因组经扩增后扩增产物大小在 2-100 kb 间, 可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 分析等。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 置换活性和链亲合力, 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 适用于多种下游应用, Phi29 DNA 聚合酶还具有很强的 3'-5'外切酶活性, 保证了 DNA 合 成的高保真性。正常情况下一个反应可以产生大于 20µg 高覆盖度的基因组 DNA。

自备仪器、试剂

离心机

水浴锅或 PCR 仪

反应管: 建议使用低吸附的 PCR 管

枪头: 建议使用高质量过滤枪头防止污染

去离子水

注意事项

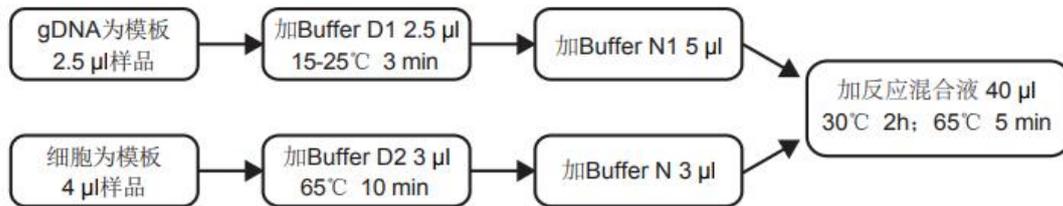
1. 本产品检测灵敏度极高, 实验操作应在正压的超净工作台中完成, 扩增反应产物浓度较高, 应做好隔离, 避免扩增产物导致的气溶胶污染。

上海阿拉丁生化科技股份有限公司

电话: 400-620-6333

2. 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。

操作流程示意图



操作步骤

细胞为模板扩增

本方案适用于以 1-1000 个细胞为模板进行全基因组无差别扩增。应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. 本方案适用于以 1-1000 个细胞为模板进行全基因组无差别扩增。应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。

组分	体积
Buffer D	33 μl
DTT, 1 M	3 μl
总体积	36 μl

2. 将 4 μl 细胞样品(重悬于 PBS 中)加入到 PCR 管中。如果样品体积少于 4 μl，请使用 PBS 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. 样品 65°C 孵育 10 min。

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

6. 按照下表准备反应混合液，混匀并短暂离心。

组分	体积
SC-Reaction Buffer	38 μl
SC-DNA Polymerase	2 μl
总体积	40 μl

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°C 孵育 2h，如有需要可延长孵育时间增加产量。

9. 65°C 孵育 5 min 失活 SC-DNA Polymerase。注：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全基因组和外显子测序、qPCR 分析、基因芯片分析等。

基因组为模板扩增

上海阿拉丁生化科技股份有限公司

电话：400-620-6333

本方案适用于大于 1 ng 纯化的基因组 DNA 为模板进行全基因组的无差别扩增，如果基因组完整度与纯度足够高，更少的起始 DNA 也可以使用。

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

组分	Buffer D1	Buffer N1
Buffer D	7 μl	—
Buffer N	—	9 μl
水	25 μl	51 μl
总体积	32 μl	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 ,请使用水或者 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。

4. 室温 ($15-25^{\circ}\text{C}$) 孵育 3 min。

5. 加入 5 μl 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. 按照下表准备反应混合液, 混匀并短暂离心。

组分	体积
SC-Reaction Buffer	38 μl
SC-DNA Polymerase	2 μl
总体积	40 μl

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°C 孵育 2h, 如有需要可延长孵育时间增加产量。

9. 65°C 孵育 5 min 失活 SC-DNA Polymerase。

注: 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全基因组和外显子测序、qPCR 分析、基因芯片分析等。

使用方法

以下举例为常规 PCR 反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR 反应体系 所有操作请在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回 -20℃ 保存。

试剂	50 μ L 反应体系	终浓度
2 \times Super Pfx Buffer	25 μ L	1 \times
dNTP Mix, 10 mM each	1.5-2.5 μ L	300-500 μ M each
Forward Primer, 10 μ M	2 μ L	0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	2 μ L	0.4 μ M
TemplateDNA 适量	适量	<500 ng/50 μ L
Super Pfx DNA Polymerase	0.5-0.75 μ L	1-1.5 U/50 μ L
ddH ₂ O	up to 50 μ L	

2. PCR 反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	98°C	30 s-3 min	
变性	98°C	10-30 s	25-35 cycles
退火	根据引物 T _m 定	15-30 s	25-35 cycles
延伸	72°C	3-5 kb/min	25-35 cycles
终延伸	72°C	5 min	

注意

- 1) 优先使用三步法扩增，三步法无法扩增目的产物或引物 T_m 值大于 68° C，请尝试两步法。
- 2) 变性：简单模板的预变性 98°C，30s-1min，对于复杂的模板，预变性时间可延长至 3min。
- 3) 退火：一般实验中退火温度比引物的 T_m 值低 3-5°C，如无法得到理想的扩增效率时，应梯度改变退火温度，进行优化；发生非特异性反应时，适当提高退火温度。
- 4) 延伸：延伸时间应根据所扩增片段的长度和模板复杂程度设定，本产品扩增效率为 3-5 kb/min，对于长片段及复杂性高的模板建议 2-4kb/min。
- 5) 循环次数：可根据扩增产物的下游应用设定循环数，如果循环次数太少，扩增量不足，循环次数太多，错配机率会增加，所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。