

Manuel du kit MALBAC® WGA pour cellules uniques

NOM DU

PRODUIT

Nom universel : Kit MALBAC® WGA pour cellules uniques

TAILLE / CAT. NO.

Taill	Cat.
10 rxns	KT110700110
50 rxns	KT110700150

UTILISATIONS

PRÉVUES

Les produits amplifiés par le kit MALBAC Single Cell WGA peuvent être utilisés sur diverses plateformes analytiques telles que la PCR en temps réel (qPCR) et le séquençage de nouvelle génération. Il est également applicable à d'autres expériences et analyses en aval : détection de mutations ponctuelles par séquençage Sanger ; génotypage SNP ; profilage CNV et détection d'aneuploidie ; Array CGH ; SNP array .

PRINCIPE DE

BASE

Le kit MALBAC Single Cell WGA génère une amplification très uniforme sur l'ensemble du génome. La méthode est basée sur la technologie brevetée - MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles). MALBAC utilise un mélange d'ADN polymérases très progressives avec une forte activité de déplacement de brin pour effectuer des cycles de préamplification quasi-linéaires du génome, suivis d'une amplification exponentielle (PCR régulière) pour obtenir une quantité suffisante d'ADN génomique pour diverses analyses en aval.

COMPOSANTS

Composant	Couleur du bouchon	Volume & Quantité	
		10 rxns	50 rxns
Tampon de lyse	Bleu	50 µL * 1	250 µL * 1
Enzyme de lyse	Bleu	5 µL * 1	25 µL * 1
Tampon de pré-	Vert	300 µL * 1	750 µL * 2
Enzyme Pré-Amp	Vert	10 µL * 1	50 µL * 1
Tampon d'amplification	Rou	300 µL * 1	750 µL * 2
Amp Enzyme	Rou	8 µL * 1	40 µL * 1

ÉQUIPEMENTS ET CONSOMMABLES FOURNIS PAR LES UTILISATEURS

- consommables : Eau sans nucléase, 1×PBS Tampon.
- Equipement : Thermocycleur, Micro spectrophotomètre, Vortexer, Microcentrifugeuse.

STOCKAGE ET PÉRIODE DE VALIDITÉ

Condition de conservation : -25~15°C éviter les cycles répétés de gel-dégel.

Durée de validité : 24 mois ; MFD / EXP : Sur l'emballage.

CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT

- 2 à 5 µg d'ADN généré par l'amplification du génome entier d'une seule cellule.
- Tube, 3 étapes, processus de 4 heures. Aucune purification requise pour les produits intermédiaires.
Taux de réussite de l'amplification de 3, 95 % pour les cellules uniques triées par cytométrie en flux ou l'ADN génomique de départ de > 0,5 pg.
- Représentation reproductible des locus et efficacité d'amplification constante dans les régions riches en AT et en GC.
- couverture élevée avec un taux d'abandon du locus inférieur à 10%.

DOMAINES DE RECHERCHE

Le kit MALBAC Single Cell WGA est un outil innovant pour l'amplification du génome entier à partir de divers matériaux de départ, notamment l'ADN génomique, les cellules en culture, les spermatozoïdes, les ovocytes, les taches de sperme, le sang frais ou séché, les tissus frais ou congelés et autres traces de preuves médico-légales.



Les domaines de recherche applicables comprennent :

- 1) Biologie humaine et animale appliquée** : Étude des biomarqueurs (CNVs, SNVs) ; dépistage et diagnostic génétique préimplantatoire (PGS/PGD) ; génotypage d'animaux transgéniques ; génotypage d'embryons, de spermatozoïdes individuels, recherche sur les cellules souches et les neurones.
- 2. recherche sur le cancer** : Analyse des mutations somatiques ; hétérogénéité des tumeurs, développement/évolution ; cellules souches cancéreuses ;
les cellules tumorales circulantes (CTC).
- 3. microbiologie** : Métagénomique ; génotypage microbien.



ÉCHANTILLON DE SPÉCIFICATION

1. **Quantité d'échantillon :** Le kit MALBAC Single Cell WGA est spécifiquement conçu pour l'amplification du génome entier d'une seule cellule. Le kit convient également aux échantillons qui sont un seul chromosome ou 0,5 pg à 1 ng d'ADN génomique.
2. **Méthode de collecte :** Le kit MALBAC Single Cell WGA est compatible avec les méthodes de collecte suivantes : tri par cytomètre en flux, dilution par tampon, micromanipulation, microdissection par capture laser, cellules buccales, échantillons de biopsie. Le kit est également adapté aux échantillons de tissus obtenus par fixation au paraformaldéhyde et microdissection par capture laser.
3. **Prétraitement des échantillons :** Le lavage des cellules est fortement recommandé avant l'expérience pour éviter la contamination de l'ADN exogène pendant la préparation des cellules. Utiliser une solution 1xPBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ pour le lavage. Les tampons de lavage contenant du Mg²⁺, Ca²⁺ doivent être évités. Notez que le volume de solution PBS reporté avec l'échantillon cellulaire dans l'amplification ne doit pas dépasser 2 µL.

PRÉPARATION AVANT L'EXPÉRIENCE

1. Isolement de la zone de travail de préparation de l'échantillon de pré-amplification

Avant l'amplification, la préparation de l'échantillon doit être effectuée dans un laboratoire désigné ou dans un laboratoire de travail.

station avec du matériel et des équipements de laboratoire destinés uniquement à la préamplification, tels que des pipettes, des embouts de pipette, des tubes PCR,

Tubes de microcentrifugation de 1,5 ml, supports de tubes, EPI, etc.

Les produits d'ADN amplifié doivent être stockés séparément des réactifs de préamplification afin d'éviter toute contamination croisée. Les autres analyses ou traitements en aval, tels que la purification de l'ADN, la préparation avant séquençage, doivent être traités dans un autre laboratoire.

2. Préparation des contrôles

Contrôle positif : Diluer la concentration de l'ADN génomique à 30 pg/µL avec de l'eau exempte de nucléase. Ajouter 1 µL de la solution d'ADN génomique à 30 pg/µL à 4 µL de tampon de lyse cellulaire dans un tube ou un puits PCR.

Contrôle négatif : Ajoutez 1 µL d'eau exempte de nucléase à 4 µL de tampon de lyse cellulaire dans un tube ou un puits PCR.

Note sur le PROTOCOL

E :

Toutes les réactions décrites dans les procédures de la trousse Single Cell WGA de MALBAC ont lieu dans le même tube où se trouvent

la cellule unique a été isolée et lysée.

Pour éviter de retirer accidentellement la cellule (ou des parties du génome cellulaire), ajoutez soigneusement une quantité appropriée de mélange réactionnel sur la paroi interne du tube, sans perturber le liquide.

Centrifuger ensuite brièvement le mélange (2000 tr/min, 3 à 4 secondes). Transférer les tubes de Cell Lysis Enzyme, Pre-Amp Enzyme et Amp Enzyme sur de la glace juste avant l'utilisation, et les autres composants peuvent être décongelés sur de la glace avant l'utilisation.

Étape 1 : Lyse des cellules

Préparez le mélange de réaction de lyse cellulaire selon le tableau suivant et mélangez soigneusement.

Composant	Volume
Tampon de lyse	5 µL*(N+1)
Enzyme de lyse	0,5 µL*(N+1)
Volume total	5,5 µL*(N+1)

Note : N désigne le nombre de réactions.

2. Transférer les échantillons dans 5 µL du mélange de réaction de lyse cellulaire préparé dans un tube ou un puits PCR (Le volume de PBS

solution emportée avec l'échantillon ne doit pas dépasser 2 µL). Centrifuger brièvement. Ne pas faire de tourbillon.

Incuber le(s) échantillon(s) dans un thermocycleur avec un couvercle chauffant en utilisant les paramètres indiqués dans le tableau ci-dessous.

Cycle	Température	Temp
-------	-------------	------



1	50μL	50 minutes
	80μL	10 min
	4μL	Forever

Étape 2 : Pré-amplification MALBAC

Préparez le mélange réactionnel MALBAC Pre-Amp selon le tableau suivant et mélangez soigneusement.

Composant	Volume
Tampon de pré-	30 μL*(N+1)
Enzyme Pré-Amp	1 μL*(N+1)



- | | |
|--------------|-------------------------|
| Volume total | 31 $\mu\text{L}^*(N+1)$ |
|--------------|-------------------------|
5. Ajouter 30 μL de mélange réactionnel MALBAC Pre-Amp fraîchement préparé à chaque 5 μL d'échantillons lysés terminés et de groupes de contrôle(le volume total doit être de 35 μL). Mélangez par vortex et centrifugez brièvement.

Incuber le(s) échantillon(s) dans un thermocycleur avec un couvercle chauffant en utilisant les paramètres indiqués dans le tableau ci-dessous.

Cycle	Température	Temp
8	94°C	3 min
	20°C	40
	30°C	40
	40°C	30
	50°C	30
	60°C	30
	70°C	4 min
	95°C	20
1	58°C	10
1	4°C	Forever

Étape 3 : Amplification exponentielle

7. préparez le mélange de réaction Amp selon le tableau suivant et mélangez soigneusement.

Composant	Volume
Tampon	30 $\mu\text{L}^*(N+1)$
Amp Enzyme	0.8 $\mu\text{L}^*(N+1)$
Volume total	30.8 $\mu\text{L}^*(N+1)$

8. Ajoutez 30 μL de mélange de réaction Amp fraîchement préparé à 35 μL des produits Pre-Amp(le volume total devrait être de 1,5 million d'euros.

65 μL). Mélanger par vortex et centrifuger brièvement.

Incuber le(s) échantillon(s) dans un thermocycleur avec un couvercle chauffant en utilisant les paramètres indiqués dans le tableau ci-dessous.

Cycle	Température	Temp
17*	94°C	30
	94°C	20
	58°C	30
	72°C	3 min
1	4°C	Forever

* Le nombre de cycles peut être optimisé en fonction des types d'échantillons. 14 cycles sont recommandés pour 100 pg d'ADNg.

ou une quantité équivalente . 17 cycles sont recommandés pour une cellule unique triée par cytométrie de flux. 19 à 21 cycles sont recommandés pour un chromosome unique. Pour les autres types d'échantillons, l'optimisation du nombre de cycle est suggéré.

10. Lorsque le programme de cyclage thermique est terminé, le produit amplifié peut être stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure.

SPÉCIFICATION TECHNIQUE DU PRODUIT

1. **Électrophorèse sur gel d'agarose :** Faites passer 5 μL du produit d'amplification sur un gel d'agarose à 1% (110V, 25-35 min). Un frottis d'ADN allant de 300 à 2000 pb sera observé.
2. **Quantification :** Purifier le produit d'ADN amplifié et le quantifier. Le rendement final est de 2~5 μg .

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. C. Zong, S. Lu, A.R. Chapman, X.S. Xie. Détection à l'échelle du génome des nucléotides uniques et du nombre de copies. Variations d'une seule cellule humaine. 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 Séquençage du génome à l'aide de MALBAC. Science, 2012, 338(6114):1627-30.



3. Hou Y, Fan W, et al. Analyses du génome des cellules humaines uniques. Cell, 2013, 155(7):1492-506.(Meiotic Recombinaison)
4. Ni X, Zhuo M, Xie XS, et al. Reproductible Copy Number Variation Patterns among Single Circulating Tumor Cellules de patients atteints de cancer du poumon. PNAS, 2013, 110(52):21083-8.
5. Yu Z, Lu S, Huang Y. Dispositif microfluidique d'amplification du génome entier pour le séquençage de cellules uniques. Anal.Chem, 2014; 86(19):9386-90.
6. Huang J, Yan L, Xie XS, Qiao J, et al. Validation du recuit multiple et du cycle d'amplification basé sur la boucle.



Séquençage pour le dépistage de l'aneuploïdie à 24 chromosomes des embryons au stade de clivage. Fertil. Stéril, 2014, Dec;102(6):1685-91.

GUIDE DE DÉPANNAGE

Num	Cause potentielle	Solution
Pas de produit amplifié	Perte de l'échantillon pendant la	Refaites la biopsie de l'embryon et assurez-vous que les échantillons de biopsie sont transférés complètement dans le tampon de lyse cellulaire. Évitez de retirer accidentellement le
	Échantillon contenant des inhibiteurs de	Les inhibiteurs de polymérase transportés avec les matériaux de départ peuvent parfois causer une faible efficacité d'amplification. Le lavage des cellules est fortement recommandé pour minimiser la contamination non cellulaire. Une solution PBS 1X ne contenant pas de Ca ²⁺ ,
	Enzymes inactives	Tous les composants doivent être conservés à -25~15°C Toutes les enzymes et les tampons doivent être fraîchement préparés et soigneusement mélangés avant utilisation. Éviter les cycles
Produit faiblement amplifié	Échantillon contenant des inhibiteurs de polymérase	Les inhibiteurs de polymérase transportés avec les matériaux de départ peuvent parfois causer une faible efficacité d'amplification. Le lavage des cellules est fortement recommandé pour minimiser la contamination non cellulaire. Une solution PBS 1X qui ne contient pas de Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mo ²⁺ ou d'héparine peut être utilisée pour le lavage. Le volume du tampon de lavage reporté à l'étape de lyse
	Dégénération de la génomique	Évitez la dégradation de l'ADN due à une mauvaise conservation des cellules ou à une mauvaise préparation
Produits amplifiés en négatif (no-template) contrôlée	Réactifs contaminés par de l'ADN exogène	Conservez les réactifs du kit et l'ADN amplifié dans l'espace de stockage désigné. Aliquer les réactifs après la première utilisation. Utilisez des tubes et des embouts stériles et
	Zone de travail contaminée par de	Nettoyer soigneusement l'espace de travail par l'ADN et l'ARN des réactifs de décontamination.
	Groupes de contrôle négatifs contaminés par de l'ADN externe	Utilisez de nouveaux groupes de contrôle négatifs.

NOTES

1. Vérifiez soigneusement tous les échantillons. Exclure le(s) échantillon(s) contaminé(s).
2. Le contact direct avec la peau ou les yeux peut provoquer des blessures mineures. Portez un équipement de protection individuelle comprenant une blouse de laboratoire, des gants jetables et un masque facial lorsque vous manipulez le(s) échantillon(s) et le(s) réactif(s). Éliminer correctement tous les produits qui ont été en contact avec l'échantillon après la stérilisation. Évitez la contamination des cellules excréées par l'opérateur.
3. Le tampon doit être mélangé soigneusement avant utilisation et les congélations/décongélations répétées doivent être évitées.
4. Tous les matériaux utilisés doivent être secs et propres pour le contrôle de la contamination. Les consommables utilisés pendant l'expérience sont à usage unique et ne peuvent pas être réutilisés.
5. L'opérateur doit recevoir une formation professionnelle et réaliser l'expérience en suivant strictement le manuel.
6. Le ou les échantillons doivent être traités comme des risques biologiques et éliminés comme source d'infection après l'expérience.
7. Minimiser l'influence de la contamination de l'ADN et des inhibiteurs d'enzymes pendant la préparation des échantillons.
8. Éviter la dégradation de l'ADN causée par un stockage ou une préparation inadéquats.
9. Veuillez stocker les composants du kit en suivant strictement les instructions du manuel afin d'éviter toute perte d'effet ou autre conséquence négative causée par un stockage incorrect.
10. Le kit est uniquement destiné à la recherche, et non au diagnostic ou à d'autres fins.



11. Le kit doit être utilisé strictement selon le contenu du manuel. Yikon Genomics Co., Ltd. ne prendra aucun risque.



responsabilité causée par des utilisations improches ou incorrectes, à moins qu'il n'en soit spécifié autrement par les réglementations et les lois correspondantes.

FABRICATION D'INFORMATIONS DE BASE

Unité d'enregistrement/Fabrication : Yikon Genomics (Shanghai) Co., Ltd.

Adresse :

Bureau de Shanghai : Room 102, No.1, Lane 888, Tianlin Road, Hi-Tech Building, Shanghai Business Park 1, Caohejing Development Zone, Shanghai, 200233, Chine

Bureau de Pékin : C bl °C k 3 layer 302, Yongfeng industrial base, Cheng Wing Road, No. 2 Building, No. 1 hospital bâtiment vert, district de Haidian, Pékin, 100094, Chine

Bureau de Jiangsu : 5th Floor, Building TQB, No.1 China Medical City Avenue, Taizhou, Jiangsu, 225300, China

Bureau de Suzhou : Room 201, No. B7, SIP BioBay, 218 Xinghu Road, Suzhou Industrial Park, Suzhou, Jiangsu, 215000, China

E-mail : technical@yikongenomics.com (support
technique) info@yikongenomics.com
(consultation) order@yikongenomics.com
(commande)

Tél : +86-10-5091-7399 (international, Hong-Kong, Macao et Taiwan), 400-688-9230 (Chine continentale) Fax : +86-10-5091-7374

Web : www.yikongenomics.com

VERSION 190118.1

N° D'IDENTIFICATION PME051

