

辅助生殖

从单细胞扩增到高通量测序

我们和您携手共进，为您打造灵活、优异的解决方案，
助您快速可靠地开展辅助生殖



CWBIO 康为世纪

上海证券交易所上市公司 (688426.SH)



前言 INTRODUCTION

生育问题既关系民族复兴，也关系亿万家庭的幸福。随着生育推迟、社会压力增加，不孕不育率提升，部分人群面临“生不出、生不好”的问题，辅助生殖技术逐渐成为育儿新希望，通过建立辅助生殖友好型社会，可以提升辅助生殖渗透率、使治疗不孕需求得到充分释放，带来净增新生人口，能够在一定程度上缓解经济低迷问题、提振社会信心。

CONTENTS 目录

背景介绍	01
康为世纪解决方案	03
单细胞全基因组扩增试剂盒	03
二代建库试剂盒	09



背景介绍

辅助生殖技术是人类辅助生殖技术 (Assisted Reproductive Technology, ART) 的简称, 指采用医疗辅助手段使不育夫妇妊娠的技术, 包括人工授精 (Artificial Insemination, AI) 和体外受精-胚胎移植 (In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, IVF-ET) 及其衍生技术两大类。

人工授精是指用人工方式将精液注入女性体内以取代性交途径使其妊娠的一种方法。根据精液来源不同, 分为丈夫精液人工授精 (AIH) 和供精人工授精 (AID)。这种治疗的前提是女方排卵、子宫和输卵管都没有大问题, 通常三次人工授精不成功, 或者患者年龄已经超过35岁, 就要考虑体外受精。

体外受精-胚胎移植技术及其各种衍生技术是目前广泛使用的辅助生殖方法, 指从女性体内取出卵子, 在器皿内培养后, 加入经技术处理的精子, 待卵子受精后, 继续培养, 到形成早期胚胎时, 再转移到子宫内着床, 发育成胎儿直至分娩的技术。目前共有三代IVF技术, 主要包括体外受精-胚胎移植、卵胞浆内单精子显微注射、植入前胚胎遗传学诊断等。

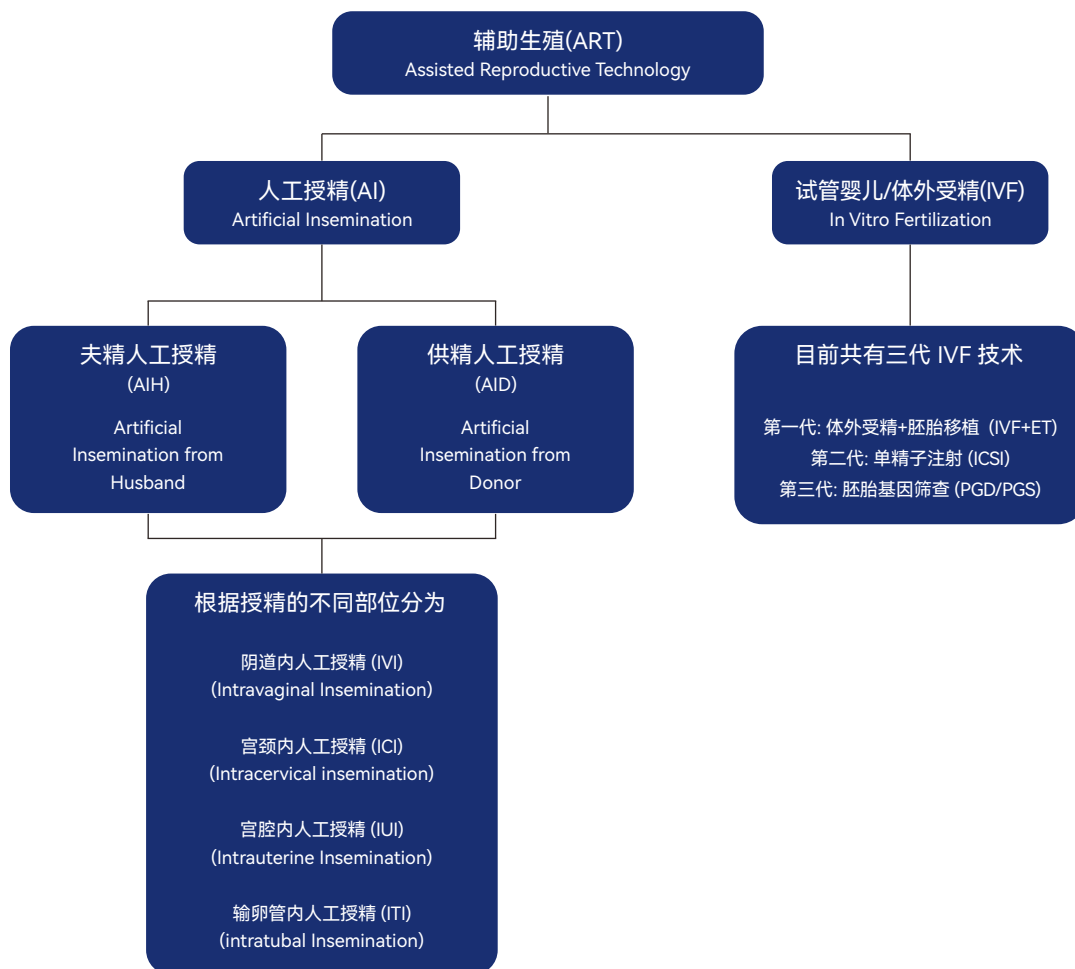


图1 辅助生殖技术分类

第一代技术是单纯的体外受精和胚胎移植 (IVF+ET), 把取出的卵子和精子在实验室的培养皿中完成受精, 并将受精卵移植入母体; 第二代技术为胞浆内单精子注射技术 (ICSI), 帮助患有少精/弱精等不育症的男性患者和卵子受精能力较弱的女性患者, 扩大了试管婴儿技术的适用范围; **第三代技术**为胚胎植入前遗传学诊断/筛查 (PGD/PGS), 指在IVF-ET的胚胎移植前, 取胚胎的遗传物质进行分析, 诊断是否有异常, 筛选健康胚胎移植, 防止遗传病传递的方法。**第三代试管婴儿是目前最为先进的试管婴儿技术**, 相比前两代试管婴儿技术, 第三代技术可以让试管婴儿胚胎避免遗传病。

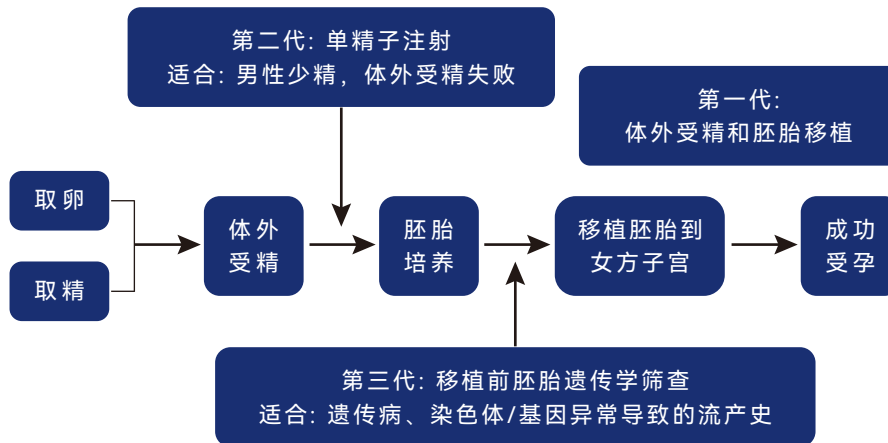


图2 IVF技术流程

PGS是胚胎植入前遗传学筛查（preimplantation genetic screening），是第三代试管婴儿的基础技术。对23对染色体数目进行筛查，排除三体或者单体，数量异常导致的遗传病，典型的如21三体即先天愚型（或唐氏综合症）、18三体（爱德华症）等，所以，第三代试管婴儿中的PGS**广泛适合于有需求的准父母**。PGD（preimplantation genetic diagnosis），即种植前基因诊断，染色体是细胞核中载有遗传信息（基因）的物质，而PGD**可对单个基因进行筛查，排除单基因遗传病**，适合准父母任何一方已检出有染色体问题，尤其是单基因遗传病如红绿色盲、白化病等。

	PGD	PGS
目的	选择遗传学正常胚胎移植	获得临床妊娠
适应症	单基因病	高龄
	染色体病	反复流产
	X连锁遗传病	反复失败
不孕	继发	原发
活检	D3或极体或TE	D5或极体或TE
活检细胞数	1-2, 3-5个(TE活检)	1, 3-5个(TE活检)
诊断方法	FISH, PCR	FISH尽可能多探针
	近年高通量方法	近年高通量方法
无诊断结果胚胎	不可以移植	可以移植
产前诊断	要求	同自然妊娠

图3 PGD/PGS技术对比

胚胎植入前遗传学诊断/筛查（PGD/PGS）的主要方式是从培养的胚胎中取出个别卵裂球细胞、极体或滋养层细胞（TE）进行遗传学检测，结合高通量测序技术，通过分析选择正常的胚胎移植。难点主要在于样本的扩增，因为检测所需的样本是胚胎的一个或几个细胞，样本珍贵且含量稀少，不能够满足下游检测需求，且同一样本中的单细胞基因组存在异质性，并会随着时间进行随机的改变，所以需要通过对单个细胞的微量全基因组DNA进行扩增，以达到可用于后续检测诊断的样本量。因此单细胞全基因组扩增技术（whole genome amplification, WGA）成为了首要解决超微量样本的方式之一，**获取细胞以后，首先进行单细胞全基因组扩增，之后结合下游NGS技术，最后通过生信分析得到最终的胚胎信息，结合临床表现选择合适的胚胎进行移植。**

康为世纪解决方案

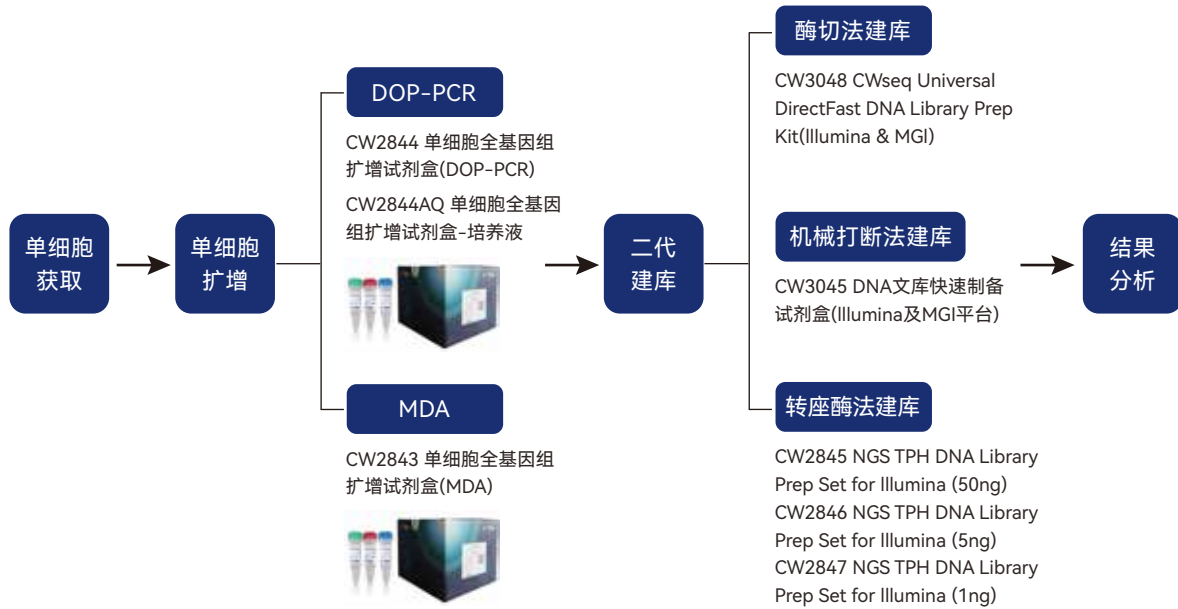


图4 康为世纪辅助生殖解决方案流程图

单细胞全基因组扩增试剂盒

目录号	产品名称	规格
CW2843S	Single Cell WGA Kit (MDA)	24 rxns
CW2843M	Single Cell WGA Kit (MDA)	96xns

产品介绍

CW2843是多重链置换扩增（MDA）法的单细胞全基因组扩增试剂盒，该方法是一种等温的链置换扩增反应，其使用随机的6碱基引物在多位点和模板链结合，接着利用 Phi29 DNA 聚合酶很强的模板结合和置换能力实现对全基因组的扩增。

产品特点

康为世纪启用改造后的Phi29 DNA聚合酶，该聚合酶具有很强的链置换特性及3'-5'核酸外切酶活性，能够在等温的条件下，对单个细胞或完整性较好的gDNA**扩增产生50~100kb的DNA片段，扩增产量大于20ug**，同时保证扩增产物的高保真性。扩增反应时间2h即可完成。下游可以应用于二代测序、SNP分型、STR、qPCR 分析、基因芯片分析等方向。

操作流程示意图

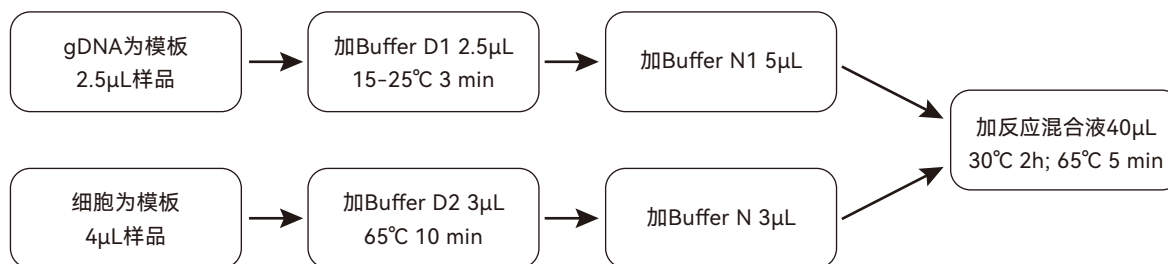


图5 CW2843操作流程

性能展示

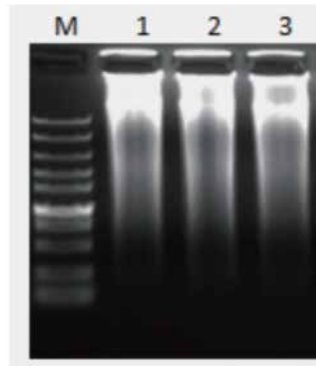
以基因组DNA为模板，进行灵敏度扩增测试（反应时间2h），并对扩增产物进行浓度检测及qPCR检测，结果表明，如图6所示，不同模板投入量的gDNA均能正常检出，CW2843单细胞全基因组扩增试剂盒灵敏度高。

模板投入量	1ng	0.5ng	0.1ng	0.05ng
扩增产物浓度 ng/µL	656.5	624.0	614.3	624.0
扩增产物产量 ug	32.8	31.2	30.7	31.2

编号	1ng	500pg	100pg	50pg	SC-NTC	阳	阴
引物1	25.2	25.7	26.1	26.4	37.5	25.0	N/A
引物2	26.5	26.4	27.7	27.0	39.7	26.0	38.8
引物3	26.4	26.3	26.7	27.1	N/A	25.7	N/A
引物4	26.9	27.3	26.9	27.8	34.5	26.0	34.7
引物5	25.6	25.7	26.3	25.7	39.1	25.3	N/A
引物6	25.9	25.8	26.2	27.7	32.4	24.5	32.7
引物7	25.1	25.1	25.9	25.4	N/A	25.0	38.8
引物8	27.2	27.2	28.2	27.4	N/A	25.6	N/A
平均值CT	26.1	26.2	26.8	26.8		25.4	

图6 CW2843对不同模板投入量的gDNA均能检出

以单细胞和基因组DNA为模板，CW2843与国外竞品A公司同款试剂盒同时扩增检测，最后对比扩增效果，结果表明，如图7所示，与国外竞品相比，康为世纪的CW2843**扩增性能优秀，扩增产量高**，性能与国外竞品相媲美。同时对扩增产物使用康为世纪的建库试剂盒进行下游的NGS建库测序，结果表明，如图8所示，首先CW2843对单个细胞全基因组扩增的**SNP突变结果与基因组DNA的SNP突变结果一致**，此外与国外竞品相比，检出的SNP位点也完全符合。



- 1: A公司试剂盒
- 2: CW试剂单细胞基因组扩增
- 3: CW试剂基因组为模板扩增

图7 CW2843与国外竞品对比(扩增产物)

1) 肿瘤细胞gDNA为模板

Chr	Start	End	Ref	Alt	DP	AD	Freq	MuType	Gene	Accession	Exon	CDSMutation	AAMutation
chr4	55141055	55141055	A	G	124763	124556	99.83%	synonymous SNV	PDGFRA	NM_006206	exon12	c.1701A>G	p.P567P
chr17	7579472	7579472	G	C	237655	236767	99.63%	nonsynonymous SNV	TP53	NM_001126118	exon3	c.98C>G	p.P33R
chr5	112175770	112175770	G	A	560217	557656	99.54%	synonymous SNV	APC	NM_000038	exon16	c.4479G>A	p.T1493T
chr12	25380275	25380275	T	A	67244	66547	98.96%	nonsynonymous SNV	KRAS	NM_033360	exon3	c.183A>T	p.Q61H
chr19	1207021	1207021	C	T	28104	26461	94.15%	stopgain	STK11	NM_000455	exon1	c.109C>T	p.Q37X
chr11	534242	534242	A	G	15577	14552	93.42%	synonymous SNV	HRAS	NM_001130442	exon2	c.81T>C	p.H27H
chr3	178936091	178936091	G	A	25851	12673	49.02%	nonsynonymous SNV	PIK3CA	NM_006218	exon10	c.1633G>A	p.E545K
chr5	170837552	170837552	T	G	195706	3009	1.54%	nonsynonymous SNV	NPM1	NM_199185	exon10	c.781T>G	p.W261G

2) 肿瘤细胞A公司试剂盒单扩产物为模板

Chr	Start	End	Ref	Alt	DP	AD	Freq	MuType	Gene	Accession	Exon	CDSMutation	AAMutation
chr4	55141055	55141055	A	G	150763	150489	99.82%	synonymous SNV	PDGFRA	NM_006206	exon12	c.1701A>G	p.P567P
chr17	7579472	7579472	G	C	966636	962952	99.62%	nonsynonymous SNV	TP53	NM_001126118	exon3	c.98C>G	p.P33R
chr5	112175770	112175770	G	A	496937	494415	99.49%	synonymous SNV	APC	NM_000038	exon16	c.4479G>A	p.T1493T
chr12	25380275	25380275	T	A	70831	69765	98.50%	nonsynonymous SNV	KRAS	NM_033360	exon3	c.183A>T	p.Q61H
chr19	1207021	1207021	C	T	225570	221173	98.05%	stopgain	STK11	NM_000455	exon1	c.109C>T	p.Q37X
chr11	534242	534242	A	G	13870	12133	87.48%	synonymous SNV	HRAS	NM_001130442	exon2	c.81T>C	p.H27H
chr3	178936091	178936091	G	A	27184	14365	52.84%	nonsynonymous SNV	PIK3CA	NM_006218	exon10	c.1633G>A	p.E545K
chr17	7578408	7578408	C	T	511792	34915	6.82%	synonymous SNV	TP53	NM_001276699	exon1	c.45G>A	p.R15R
chr5	170837552	170837552	T	G	323647	5310	1.64%	nonsynonymous SNV	NPM1	NM_199185	exon10	c.781T>G	p.W261G
chr5	112175634	112175634	C	G	180247	2812	1.56%	nonsynonymous SNV	APC	NM_000038	exon16	c.4343C>G	p.T1448S

3) 肿瘤细胞CW试剂盒单扩产物为模板

Chr	Start	End	Ref	Alt	DP	AD	Freq	MuType	Gene	Accession	Exon	CDSMutation	AAMutation
chr4	55141055	55141055	A	G	107893	107676	99.80%	synonymous SNV	PDGFRA	NM_006206	exon12	c.1701A>G	p.P567P
chr17	7579472	7579472	G	C	309458	308019	99.54%	nonsynonymous SNV	TP53	NM_001126118	exon3	c.98C>G	p.P33R
chr5	112175770	112175770	G	A	370052	368112	99.48%	synonymous SNV	APC	NM_000038	exon16	c.4479G>A	p.T1493T
chr12	25380275	25380275	T	A	60113	59163	98.42%	nonsynonymous SNV	KRAS	NM_033360	exon3	c.183A>T	p.Q61H
chr19	1207021	1207021	C	T	189902	186877	98.41%	stopgain	STK11	NM_000455	exon1	c.109C>T	p.Q37X
chr11	534242	534242	A	G	16959	15834	93.37%	synonymous SNV	HRAS	NM_001130442	exon2	c.81T>C	p.H27H
chr3	178936091	178936091	G	A	67237	32423	48.22%	nonsynonymous SNV	PIK3CA	NM_006218	exon10	c.1633G>A	p.E545K
chr7	55242430	55242430	G	A	28209	3025	10.72%	nonsynonymous SNV	EGFR	NM_005228	exon19	c.2200G>A	p.E734K
chr5	112175634	112175634	C	G	139042	4961	3.57%	nonsynonymous SNV	APC	NM_000038	exon16	c.4343C>G	p.T1448S
chr5	170837552	170837552	T	G	566344	8904	1.57%	nonsynonymous SNV	NPM1	NM_199185	exon10	c.781T>G	p.W261G
chr3	178936092	178936092	A	C	67238	1042	1.55%	nonsynonymous SNV	PIK3CA	NM_006218	exon10	c.1634A>C	p.E545A
chr17	7577049	7577049	G	A	130426	1975	1.51%	nonsynonymous SNV	TP53	NM_001276699	exon4	c.412C>T	p.H138Y

图8 CW2843与国外竞品对比 (分析结果)



特别推荐

目录号	产品名称	规格
CW2844S	Single Cell WGA Kit (DOP-PCR)	24 rxns
CW2844M	Single Cell WGA Kit (DOP-PCR)	96 rxns
CW2844AQ	Single Cell WGA Kit-NBS (培养液)	96 rxns

产品介绍

CW2844是简并寡核苷酸引物PCR扩增 (DOP-PCR) 法的单细胞全基因组扩增试剂盒, 该方法是一种部分随机引物法, 其引物构成为3'-ATGTGG-NNNNNN-CCGACTCGAG-5', 主要利用3'端ATGTGG这6个在人体中分布频率极高的碱基作为引导, 以6个碱基的随机序列来决定特异的扩增起始位点, 从而达到扩增整个基因组的目的。

产品特点

主要包括裂解反应、预扩增、扩增反应, 预扩增过程为线性扩增, 从而减少了扩增的偏好性, 适用大片段拷贝数变异分析。扩增产量约2-5ug, 片段大小在200-1500bp之间, **扩增反应时间3h即可完成**。为解决单细胞传统运输问题, 康为世纪优化了细胞裂解液和程序, 使用CW2844中的**裂解液裂解后的细胞产物可以在37°C下保存运输3天**。

此外由于目前市场上辅助生殖检测一般还会通过囊胚期时培养液中游离的DNA进行WGA, 进而检测染色体拷贝数变异情况。此方式相对于传统的检测囊胚滋养层细胞, 通过检测囊胚培养液中的游离DNA具有无创安全、操作简单等优势。

康为世纪通过优化升级公司现有的CW2844产品, 推出可以**用于囊胚培养液中游离DNA的全基因组扩增试剂盒—CW2844AQ**。

操作流程示意图

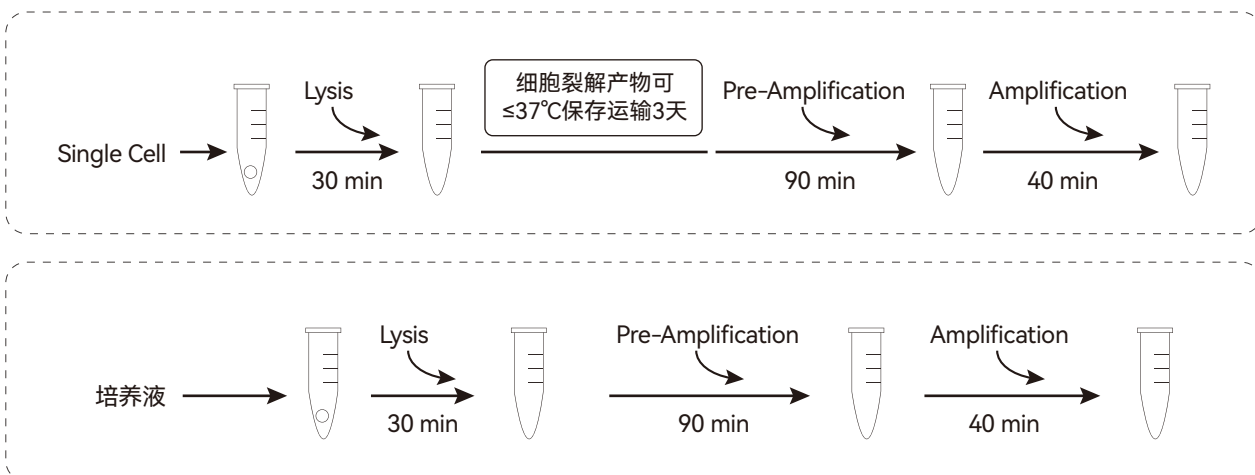
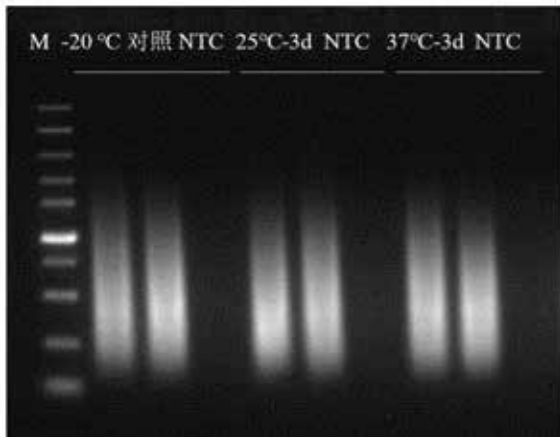


图9 CW2844 (上)、CW2844AQ (下) 操作流程

性能展示

使用康为的单细胞全基因组扩增试剂盒CW2844分别对-20℃保存的样本、25℃存储3天的细胞裂解产物、37℃存储3天的细胞裂解产物进行扩增，实验结果表明，如图10所示，不同的保存温度不影响单细胞全基因组扩增的产量。同时对扩增后的产物进行qPCR检测，实验结果表明，如图11所示，使用荧光定量PCR进行质检时，不同的保存温度，CT值无差异。

扩增产物电泳图及产物浓度



编号	名称	产物浓度(60 μL) ng/μL
1	-20℃ 对照1	68.8
2	-20℃ 对照2	66.6
3	-20℃ NTC	3.62
4	25℃ 3d 1	68
5	25℃ 3d 2	66.6
6	25℃ 3d NTC	3.52
7	37℃ 3d 1	61.8
8	37℃ 3d 2	57.8
9	37℃ 3d NTC	3.06

图10 不同温度下使用CW2844扩增后的产物浓度结果

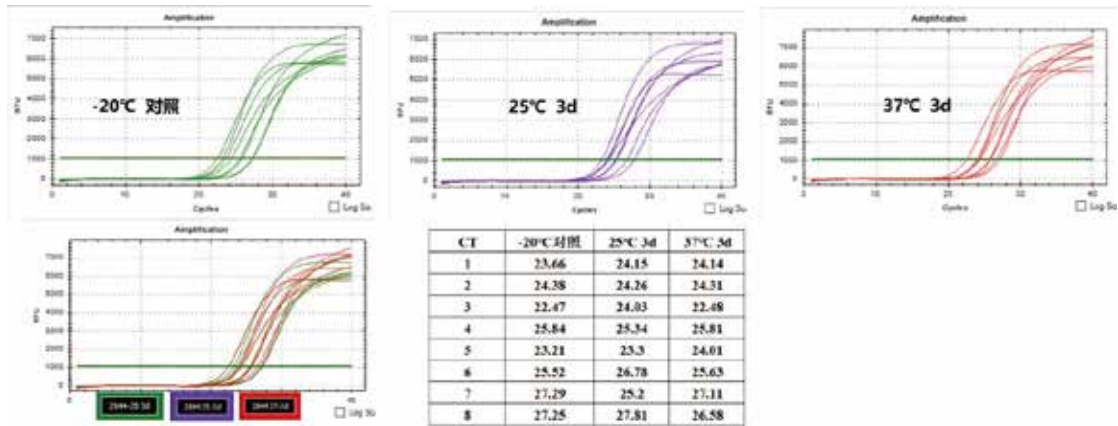
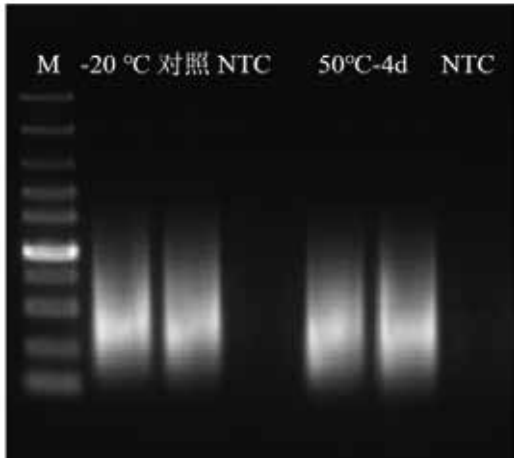


图11 不同温度下使用CW2844扩增后产物的qPCR结果

考虑极端情况下的运输条件，将裂解产物在50℃存储4天后使用康为的单细胞全基因组扩增试剂盒CW2844对细胞裂解产物进行扩增，实验结果表明，如图12所示，与-20℃保存的样本相比，在50℃存储4天的裂解产物的扩增产量无影响，同时对扩增后的产物进行qPCR检测，实验结果表明，如图13所示，使用荧光定量PCR进行质检时，50℃运输保存与对照组相比，CT值无差异。

扩增产物电泳图及产物浓度



编号	名称	产物浓度(60 μL) ng/μL
1	-20°C 对照1	59.6
2	-20°C 对照2	55.2
3	-20°C NTC	4.72
4	50°C 4d 1	57.2
5	50°C 4d 2	56
6	50°C 4d NTC	4.0

图12 50°C下使用CW2844扩增后的产物浓度结果

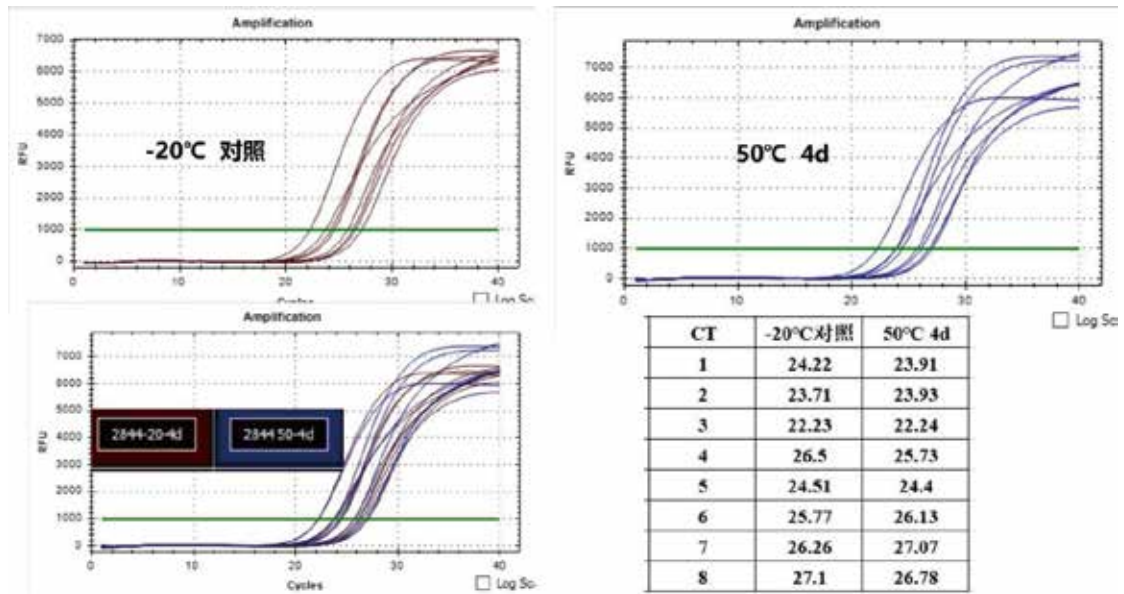


图13 50°C下使用CW2844扩增后产物的qPCR结果

除了对产物浓度和qPCR检测外，康为世纪还对上述-20°C、37°C、50°C三个温度的样本进行了下游的NGS建库测序，实验表明，通过对CNV的分析，如图14所示，不同温度存储不影响细胞产物后续的扩增及CNV的检出，具有高再现性和准确性。

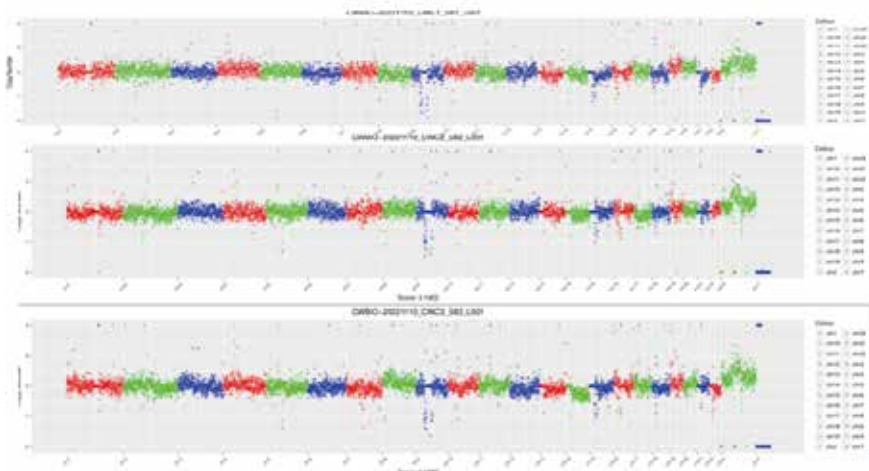


图14 使用CW2844扩增-20°C (上)、37°C (中)、50°C (下) 三个温度的样本后的CNV结果

二代建库试剂盒



特别推荐

目录号	产品名称	规格
CW3048S	CWseq Universal DirectFast DNA Library Prep Kit(Illumina & MGI)	24rxns
CW3048M	CWseq Universal DirectFast DNA Library Prep Kit(Illumina & MGI)	96rxns

- 目录号: CW3048S/M
- 建库方法: 片段化酶切法
- 起始量: 0.1 ng-1 μg DNA
- 平台: 适用于Illumina、MGI各个平台
- 精准酶切, 片段化末端修复加A一管完成, 无需纯化直接连接接头
- 高保真酶进行PCR富集扩增, 最大程度上降低了扩增偏好性
- 缩短磁珠双选时间: 将两步筛选纯化, 合为一步完成

目录号	产品名称	规格
CW3045S	DNA文库快速制备试剂盒(Illumina及MGI平台)	24rxns
CW3045M	DNA文库快速制备试剂盒(Illumina及MGI平台)	96rxns

- 目录号: CW3045S/M
- 建库方法: 机械打断法, 适用于物理打断后的gDNA及cfDNA
- 平台: 适用于Illumina、MGI各个平台
- 末端补平, 磷酸化, 加A一步完成, 末端修复后无需纯化, 直接加接头
- 超保真扩增, 最大程度上降低了扩增偏好性
- 缩短磁珠双选时间: 将两步筛选纯化, 合为一步完成

目录号	产品名称	规格
CW2845S/M	NGS TPH DNA Library Prep Set for Illumina (50ng)	24rxns/96rxns
CW2846S/M	NGS TPM DNA Library Prep Set for Illumina (5ng)	24rxns/96rxns
CW2847S/M	NGS TPL DNA Library Prep Set for Illumina (1ng)	24rxns/96rxns

- 目录号: CW2845S/M、CW2846S/M、CW2847S/M
- 建库方法: 转座酶法
- 平台: 适用于Illumina各个平台
- 建库速度快: 90分钟即可高质量完成文库构建, 并获得优异的测序质量
- 单管易操作: DNA片段化、末端修复及接头连接反应一步完成
- 文库扩增均一性好: 针对不同GC含量的DNA样本, 建库均一性良好

性能展示

以肿瘤细胞为模板, 经康为世纪单细胞扩增试剂盒 (CW2843) 扩增后, 收集扩增产物进行康为世纪以上3种建库方法的试剂盒 (CW3048、CW3045、CW2845) 进行建库后测序, 结果表明, 如图15所示, 康为世纪**三种方式的建库试剂盒均能搭配单细胞全基因组建库试剂盒正常检出CNV结果。**

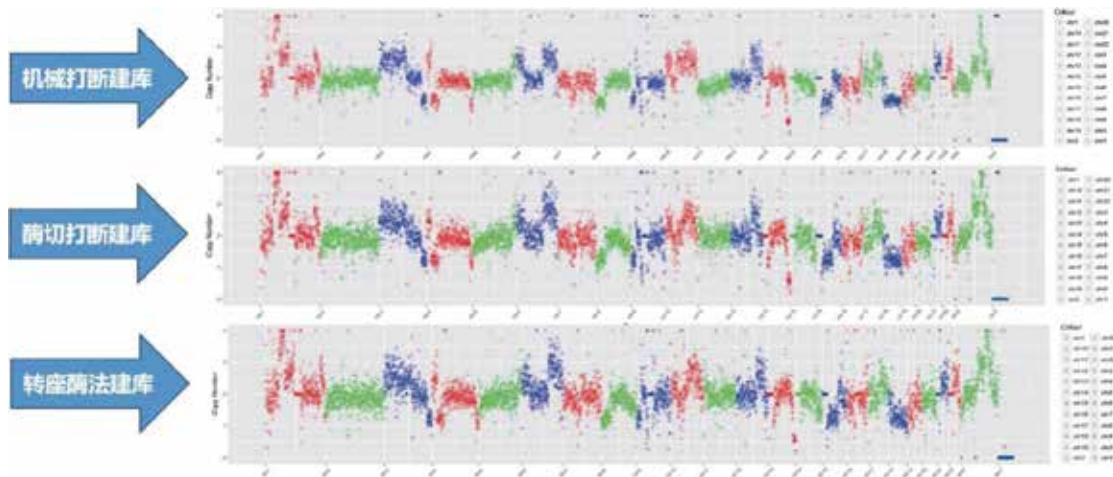


图 15 不同建库试剂盒对单细胞扩增产物的CNV检出结果

对正常细胞和多个不同的异常细胞样本使用康为世纪单细胞扩增试剂盒 (CW2844) 扩增后, 收集扩增产物再用康为世纪酶切法建库试剂盒 (CW3048) 进行建库测序, 结果表明, 如图16所示, **无论是正常样本还是异常样本, 康为世纪建库试剂盒和单细胞扩增试剂盒搭配后, CNV均能正确检出。**

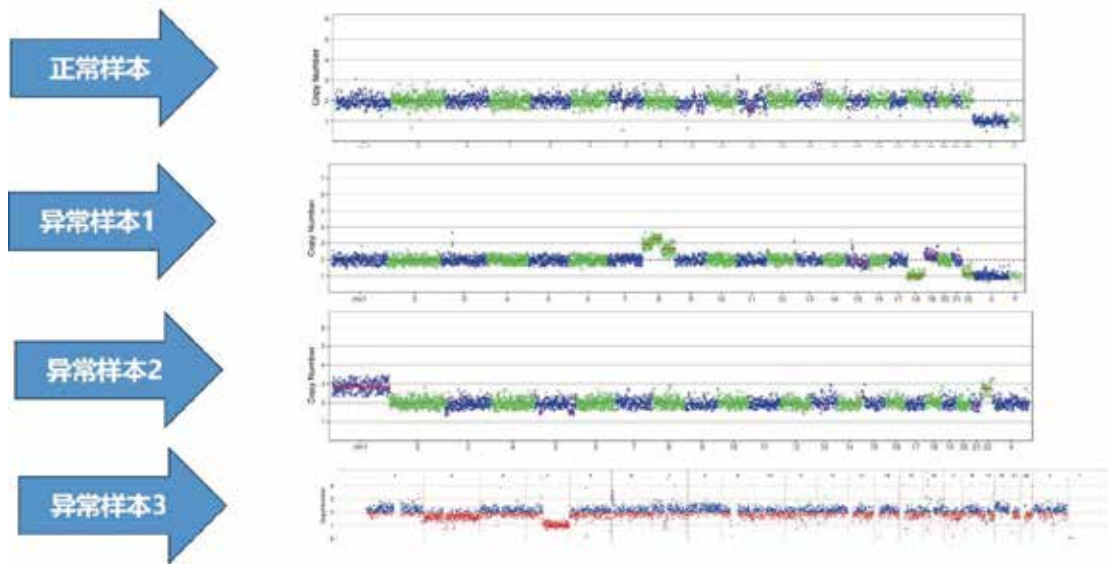


图 16 不同样本类型的CNV检测结果

以基因组DNA和单细胞为模板，各自分别使用国外竞品B公司扩增试剂盒和康为单细胞扩增试剂盒（CW2844）扩增后，再使用康为世纪酶切法建库试剂盒（CW3048）建库后分析拷贝数变异，结果表明，如图17所示，与国外竞品产品对比，无论模板是基因组DNA还是单细胞，CNV检测拷贝数可以满足，具有高再现性和准确性，此外部分质控数据甚至优于国外竞品。

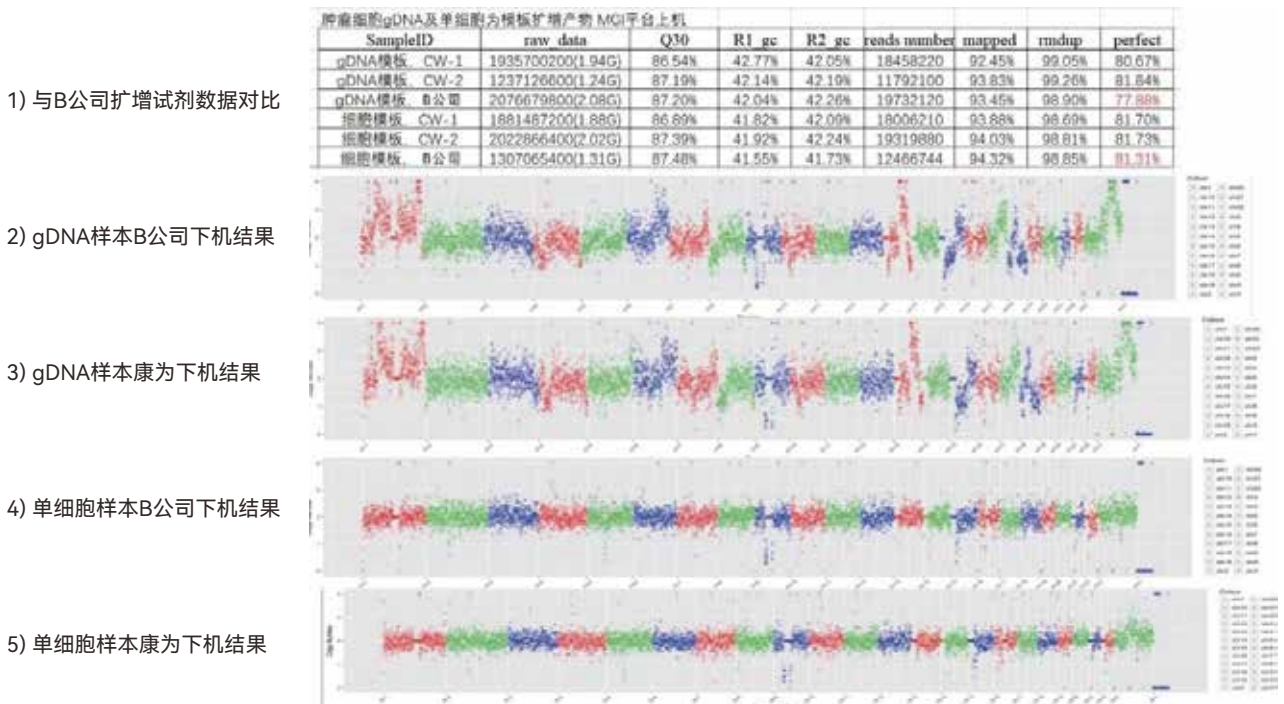


图 17 康为世纪与国外竞品对比

辅助生殖相关产品列表

目录号	产品名称	规格	关键词
CW2843S/M	Single Cell WGA Kit (MDA)	24 rxns/96 rxns	MDA法
 CW2844S/M	Single Cell WGA Kit (DOP-PCR)	24 rxns/96 rxns	DOP-PCR法
CW2844AQ	Single Cell WGA Kit-NBS (培养液)	96 rxns	DOP-PCR法培养液扩增
 CW3048S/M	CWseq Universal DirectFast DNA Library Prep Kit(Illumina & MGI)	24 rxns/96 rxns	片段化酶切法DNA建库试剂盒
CW3045S/M	DNA文库快速制备试剂盒 (Illumina及MGI平台)	24 rxns/96 rxns	机械打断法DNA建库试剂盒
CW2845S/M	NGS TPH DNA Library Prep Set for Illumina (50ng)	24rxns/96rxns	转座酶法DNA建库试剂盒
CW2846S/M	NGS TPM DNA Library Prep Set for Illumina (5ng)	24rxns/96rxns	
CW2847S/M	NGS TPL DNA Library Prep Set for Illumina (1ng)	24rxns/96rxns	
 CW3082S	CWseq® UDB Primer Kit for MGI (Plates) MGI平台多样本UDB接头引物试剂盒 (板式)	1536rxns	试剂盒包含二代测序建库中使用的384种双端唯一Barcode标记的UDB Primer, 可配合康为世纪提供的MGI建库试剂盒使用
 CW3084S/M	CWseq® UDI Primer Kit for Illumina (Plates) Illumina平台多样本UDI接头引物试剂盒 (板式)	768rxns/1536rxns	本套试剂盒包含通用接头和384种不同Unique DualIndex Primer, Index Primer为板式包装, 方便高通量建库使用

官方商城注册送积分

步骤1 关注公众号

“康为世纪生物”公众号



步骤2 官网进入商城

点击左下角“官网”



步骤3 点击我的

点击右下角“我的”



步骤4 点击头像

点击左上角头像，跳出登录界面



步骤5 注册账号

自动弹出登录界面
点击“立即注册”填写信息



步骤6 注册成功享积分

注册成功立享1000积分



步骤7 点击积分商城

登录后点击右下角“我的”
进入“积分商城”



步骤8 积分及兑换

“积分商城”可查看
积分及兑换



4006-222-360 (免费电话)
service@cwbiotech.com
www.cwbio.com



让每一个生命健康有为
上海证券交易所上市公司 (688426.SH)