

Version 1

Code No. AG12901

# *ChiDigit* 探针法芯片式数字 PCR 试剂盒

## *ChiDigit* Chip dPCR Kit for Probe

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本产品是一款适用于芯片式数字 PCR ( Chip digital PCR, cdPCR ) 的 2X Premix 探针法 DNA 检测试剂盒, 反应液配制十分简单、快捷, 仅需加入引物、探针、模板及 RNase free water 即可进行 PCR 反应, 可有效降低污染风险。

本产品采用了反应性能优越的 *Pro Taq* HS 体系 ( 混合了 Taq 抗体 ), 能够有效抑制非特异性扩增, 提高反应灵敏度, 提升结果准确性。本产品含 ROX 染料, 可以对有效微孔数进行质量控制。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG12901 ( 200 rxns )
2X Chip dPCR Premix for Probe <sup>*1</sup>	500 $\mu$ l X 2 pcs
RNase free water	1 ml

\*1: 含有 *Pro Taq* HS DNA Polymerase、dNTP Mixture 、ROX 与反应 Buffer 等。

## ➤ 保存及运输

保存温度:  $-20^{\circ}\text{C}$  保存

运输温度: 干冰运输或  $-20^{\circ}\text{C}$  冰袋运输。

## ➤ 产品优势

1. 本产品是 2X Premix 探针法 DNA 检测试剂盒, 反应液配制十分简单、快捷, 仅需加入引物、探针、模板及 RNase free water 即可进行数字 PCR 反应, 可有效地降低因多次操作而造成污染的可能性。
2. 本产品采用了反应性能优越的热启动聚合酶, 搭配精心优化的反应体系, 具有特异性强、扩增效率高等特点。

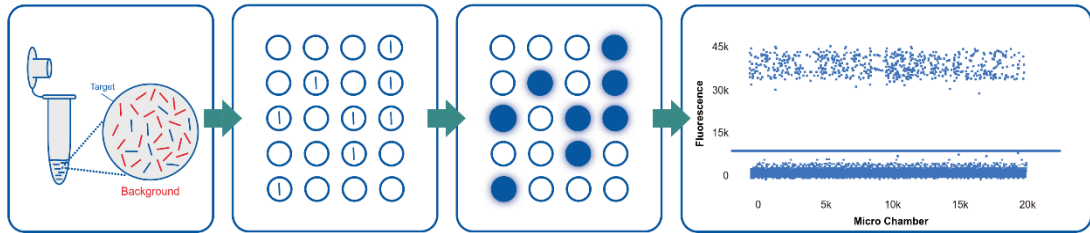
## ➤ 实验原理

### 1. 数字 PCR 原理

数字 PCR 是第三代 PCR, 是一种高灵敏核酸绝对定量分析技术。与传统 PCR 技术相比, 数字 PCR 技术不依赖于标准曲线, 具有更高的灵敏度、更强的耐受性, 可实现对样本的绝对定量分析。其原理是通过将反应体系均匀分配到大量独立的微反应单元中, 在微反应单元中进行 PCR 扩增后, 获得阳性、阴性微反应单元的数量, 基于泊松分布原理

计算核酸拷贝数（DNA 模板分子的起始浓度）。可进行稀有突变的检测，拷贝数变异及病毒微生物检测等研究。

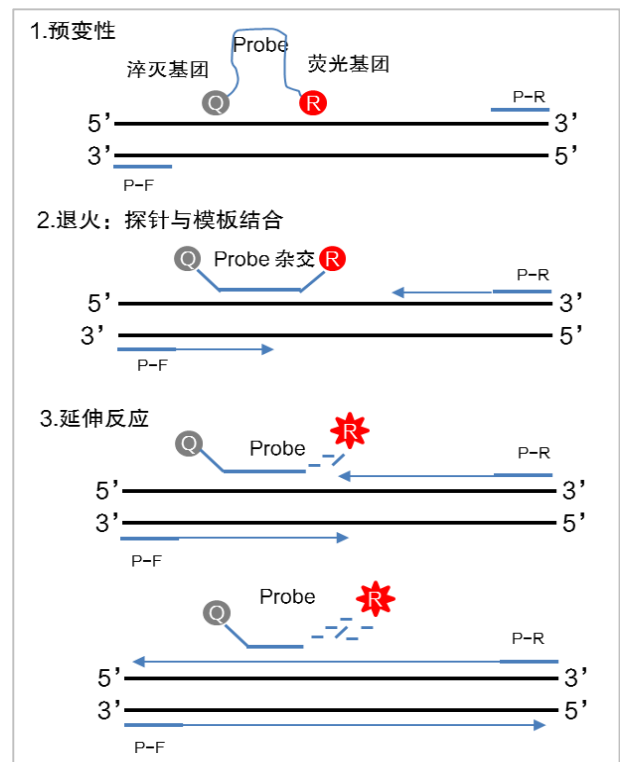
芯片式数字 PCR 是将配制好的反应体系加入到芯片的大反应孔中，随后加入封闭液以封闭体系。在压强的作用下，反应体系被均匀分散到含有数万个微孔的芯片之中，然后进行 PCR 反应，最终统计阴阳微孔数以及有效微孔数，根据泊松分布公式计算样本中的拷贝数。



## 2. 荧光探针 qPCR 检测原理

荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质（如：FAM），3' 端标记有淬灭物质（如：BHQ），当探针保持完整时，5' 端荧光基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5' 端荧光基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。

在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针，使得 5' 端荧光基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。



### ➤ 使用注意事项

1. 请仔细阅读芯片式数字 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 所有反应混合液建议在冰上配制。
3. 2X Premix 含有 ROX，尽量避光进行操作。

4. 需要几个样本同时进行检测时，可先将各组分溶液配制成预混液，然后分装到每个反应管中。
5. 2X Premix 使用前请充分溶解、混匀，确保溶液中无沉淀。短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失。
6. 产品避免反复冻融，防止酶活降低，如有必要可进行分管保存；使用前可上下颠倒混匀或用移液器吸打混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。

## ➤ 实验前准备

### 试剂、耗材 & 设备：

引物、探针、1.5 ml 离心管、定量 PCR 管、枪头、移液器、离心机。

## ➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System 为例)

### 1. 配制 cdPCR 反应液<sup>\*1</sup>

组分名称	反应终浓度	10 μl 体系
2X Chip dPCR Premix for Probe	1 ×	5 μl
Primer F ( 10 μ M )	0.4 μ M <sup>*2</sup>	0.4 μl
Primer R ( 10 μ M )	0.4 μ M <sup>*2</sup>	0.4 μl
Probe ( 10 μ M )	0.4 μ M <sup>*3</sup>	0.4 μl
Template <sup>*5</sup>	-	1 ~ 2000 copies / μl <sup>*4</sup>
RNase free water	-	Up to 10 μl

\*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

\*2: 引物推荐使用终浓度为 0.4 μ M，也可根据实际需求在 0.2 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

\*3: 探针浓度与使用的仪器、荧光标记物质种类有关，请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。探针推荐使用终浓度为 0.4 μ M，可根据实际需求在 0.2 ~ 0.8 μ M 范围内进行调整。

\*4: 在 10 μl 体系里，DNA 模板浓度控制在 1 ~ 2000 copies / μl，若模板量超出芯片承载量（即全部微孔为阳性微孔），不满足泊松分布规则，则需进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量。

\*5: 该制品灵敏度极高，10 μl 反应体系中，建议将模板稀释后加入 2 ~ 4 μl / 样本，以提升实验的准确度及重复性。

## 2. 上机前准备

- 1) 配制完混匀后，使用桌面小型离心机进行瞬时离心，去除肉眼可见的大气泡；
- 2) 室温 10000 g 离心 1 min，除去肉眼无法观测的小气泡（后续均在室温下进行操作）；
- 3) 使用移液枪吸取 9  $\mu$ l 离心后的样品，倾斜 45° 缓慢加入到芯片 QuantStudio™ Absolute Q™ MAP16 Plate Kit（Thermo Fisher Scientific, Code No. A52865）样品孔中，避免操作中产生气泡；
- 4) 加完样品后立即倾斜 45° 缓慢加入 15  $\mu$ l QuantStudio™ Absolute Q™ Isolation Buffer（Thermo Fisher Scientific, Code No. A52730）；
- 5) 实验完成后，需尽快进行上机扩增。

## 3. 上机

将装载有样品的芯片转至仪器中，根据仪器说明书设置程序，开始实验。

## 4. cdPCR 反应条件<sup>\*1</sup>

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec <sup>*2</sup>	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 <sup>*3</sup>	60°C	30 sec	

\*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

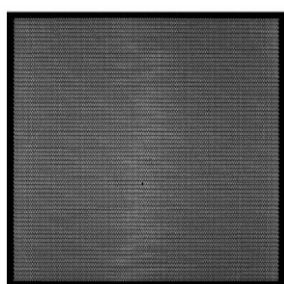
\*2: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可根据实际需求在 30 sec ~ 2 min 调整预变性时间。

\*3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下，扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求；如需提高反应特异性，可适当提高退火和延伸温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应退火和延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增（三步法 PCR 反应程序可参考附录）。

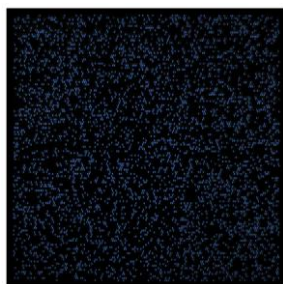
## ➤ 实验例

（以 ABI QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System 为例）

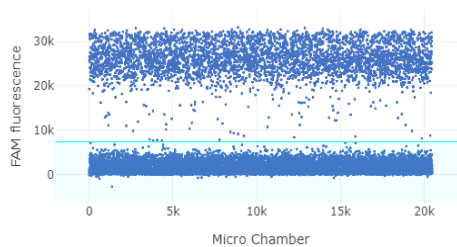
1. 采用本产品扩增非洲猪瘟（ASFV）标准品（理论检测拷贝数为 4500 copies），实验结果如下：



QC 质控图



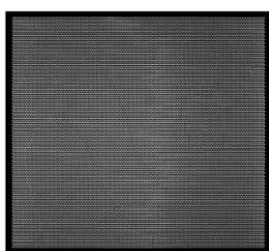
阳性微孔图



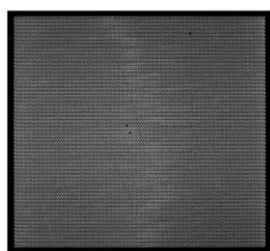
4274 copies  
荧光分区图

- 结果如上图所示：
- 1、QC 质控有效孔为 20477, 满足质控要求( 质控要求总有效微孔数大于 20000 )；
  - 2、阳性微孔分散均匀，无阳性微孔聚集；
  - 3、阴阳分区清晰，有助于阈值线的设定；
  - 4、实际检测模板量为 4274 copies，与理论拷贝数相符。

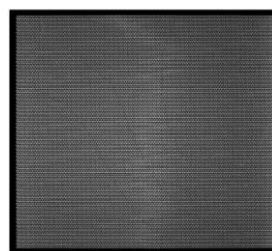
2. 采用本产品扩增 Human TFR 基因，理论的 DNA 模板加入量分别为 100 copies、10 copies、1 copy、0 copy（阴性对照），实验结果如下：



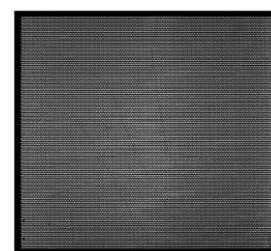
96 copies



7 copies

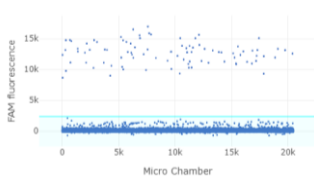


1 copy

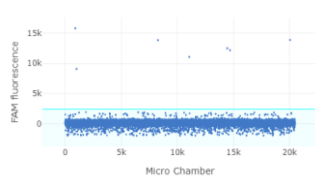


0 copy

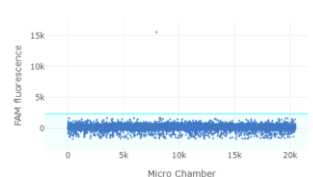
QC 质控图



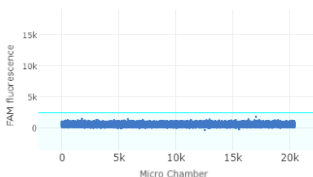
96 copies



7 copies



1 copy

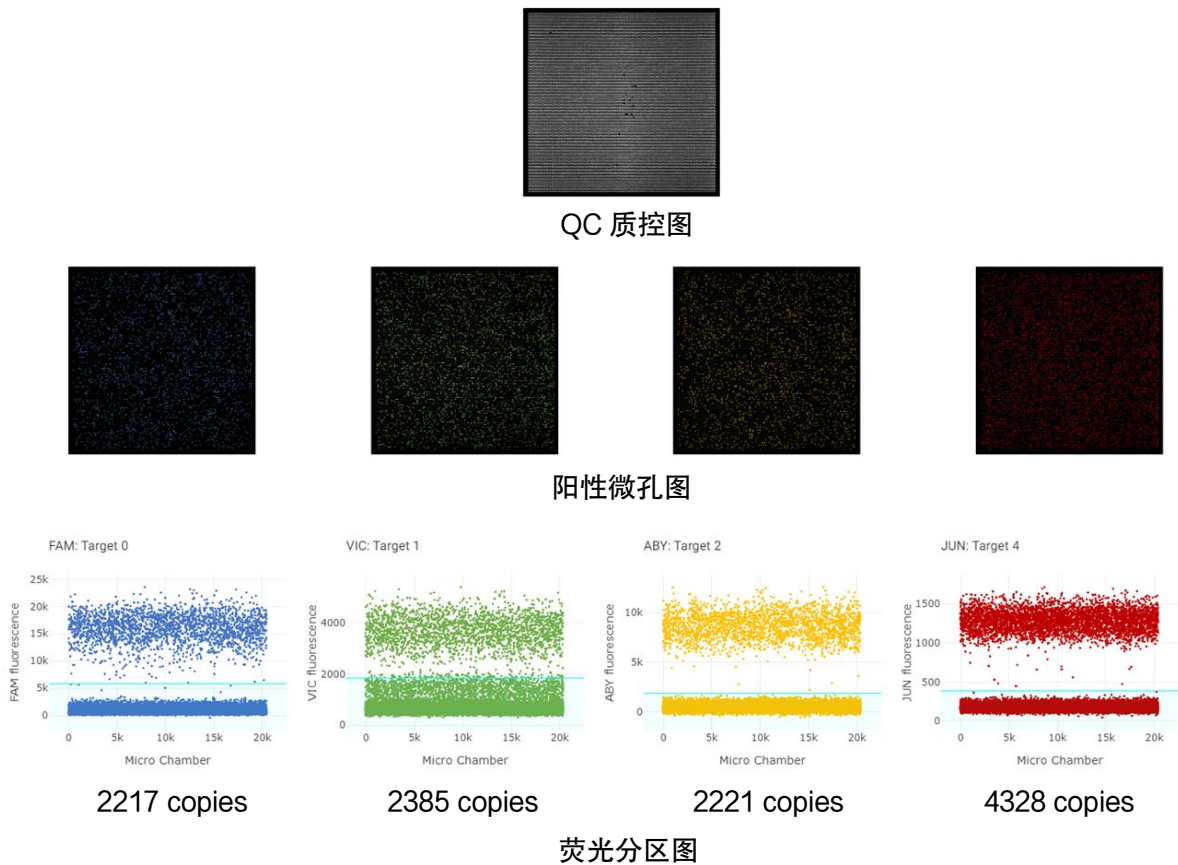


0 copy

荧光分区图

- 结果如上图所示：
- 1、QC 质控有效孔为 20400, 满足质控要求( 质控要求总有效微孔数大于 20000 )；
  - 2、阳性微孔分散均匀，无阳性微孔聚集；
  - 3、阴阳分区清晰，有助于阈值线的设定；
  - 4、实际检测的模板量分别为 96 copies、7 copies、1 copy、0 copy，与理论拷贝数相符。

3. 采用本产品扩增 Human *CEPH* 基因进行拷贝数变异分析，进行四通道检测，FAM、VIC、ABY 和 JUN 通道分别检测 1 个位点（各通道的理论检测拷贝数比例 FAM : VIC : ABY : JUN = 1:1:1:2），结果如下：



- 结果如上图所示：
- 1、QC 质控有效孔为 20458, 满足质控要求( 质控要求总有效微孔数大于 20000 )；
  - 2、阳性微孔分散均匀，无阳性微孔聚集；
  - 3、阴阳分区清晰，有助于阈值线的设定；
  - 4、可进行四重检测；
  - 5、不同荧光通道检测拷贝数满足 FAM : VIC : ABY : JUN  $\approx$  1:1:1:2，与理论拷贝数相符。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量高：模板量过高可能会超过芯片最大载量，如果所有反应孔均为阳性，会导致结果判读错误，影响实验结果。
- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，可能会导致模板加样体积不准，实验重复性差。可将模板适当稀释后加样。

## 2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：含有较多的抑制 PCR 反应的物质，可能会导致扩增结果差。PCR 反应扩增效率较低，可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：可能会导致扩增结果差，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

## 3. 合适的引物

- ❖ dPCR 的引物设计原则与 qPCR 类似。dPCR 的引物通常使用比 qPCR 更高的浓度，以便更好地从背景噪音中分离特定信号。
- ❖ 引物浓度低：可能会导致反应效率低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：可能会导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
  - ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60 % 之间。
  - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70°C，尽量减小两者的 Tm 值差，并使差值不超过 5°C。
  - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
  - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
  - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列，尤其是 3' 端，否则可能会形成引物二聚体，影响实验结果。

## 4. 合适的探针

- ❖ 探针浓度过高：可能会导致背景值偏高；若进行多重定量 PCR 检测，易造成探针之间相互干扰。
- ❖ 探针浓度过低：可能会导致荧光信号值较低。
- ❖ 探针设计的原则：
  - ① 探针长度一般为 18 ~ 40 bp。
  - ② 探针 5' 端尽量避免使用 G 碱基，因其具有淬灭荧光的能力。C 碱基比 G 碱基多的探针效果更好，如果 C 碱基数量少于 G 碱基数量，可选择其互补链。
  - ③ 应避免探针中多个重复的碱基出现，尤其是要避免 4 个及以上的 G 碱基出现。
  - ④ 探针的 Tm 值通常比扩增引物 Tm 值高 10°C，一般控制在 65°C ~ 70°C 左右。
  - ⑤ 探针尽量靠近扩增引物，但不可与之重叠。

## 5. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：可能会导致反应特异性不好，或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：可能会导致扩增效率低。可适当降低退火温度。



## 6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。
- ❖ 配制试剂时冰上操作，以避免操作时间过长而导致产生非特异性扩增。
- ❖ 上芯片之前试剂需恢复到室温，以避免在芯片表面产生冷凝水影响实验结果。

## 7. 芯片状态判断

- ❖ 阳性微孔聚集：试剂需充分混匀后上仪器，避免产生气泡；加快操作的时间，尽量减少试剂在室温下放置的时间。
- ❖ 阳性微孔背景有杂色：首先排查操作问题，在芯片中加样前应避免产生气泡，然后再进行重复实验。
- ❖ 芯片图异常（移位，部分缺失）：需与仪器工程师联系。

## ➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	