

Version 1

Code No. AG12902

ChiDigit 探针法芯片式数字 PCR 试剂盒 (含 UNG)

ChiDigit Chip dPCR Kit for Probe (UNG Plus)

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 *Accurate Taq* HS DNA 聚合酶, 配合精心优化 Buffer, 可以在芯片中进行高效稳定的 PCR 扩增。本产品含 ROX 染料, 可以对有效微孔数进行质量控制。

本产品中还引入了 dUTP/UNG 防污染系统, 在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP, 利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链, 而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性, 除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dUTP 的污染模板, 从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生。同时, 本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体, 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。

➤ 产品组成

组分名称	AG12902 (200 rxns)
2X Chip dPCR Premix for Probe (UNG Plus) ^{*1}	500 μl X 2 pcs
RNase free water	1 ml

*1: 含有 *Accurate Taq* HS DNA Polymerase、UNG Enzyme 、dN(U)TP Mixture 、ROX 与反应 Buffer 等。

➤ 保存及运输

保存温度: -20℃保存

运输温度: 干冰运输或-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

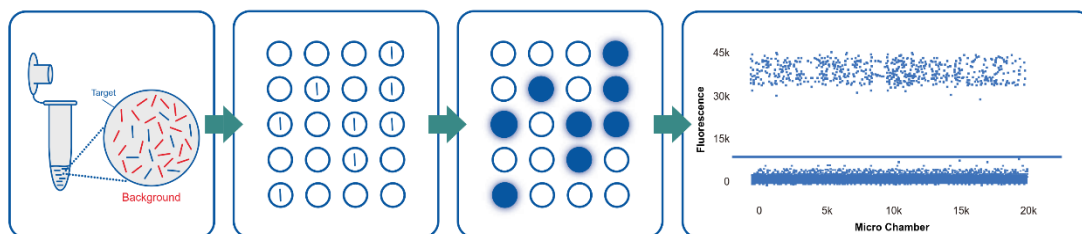
1. 本产品是 2X Premix 探针法 DNA 检测试剂盒, 反应液配制十分简单、快捷, 仅需加入引物、探针、模板及 RNase free water 即可进行数字 PCR 反应, 可有效地降低因多次操作而造成污染的可能性。
2. 本产品采用了反应性能优越的热启动聚合酶, 搭配精心优化的反应体系, 具有特异性强、扩增效率高等特点。
3. 本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统, 可除去含 dUTP 的 PCR 产物污染, 从而有效防止出现 PCR 假阳性结果, 提升实验结果的准确性。

➤ 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。

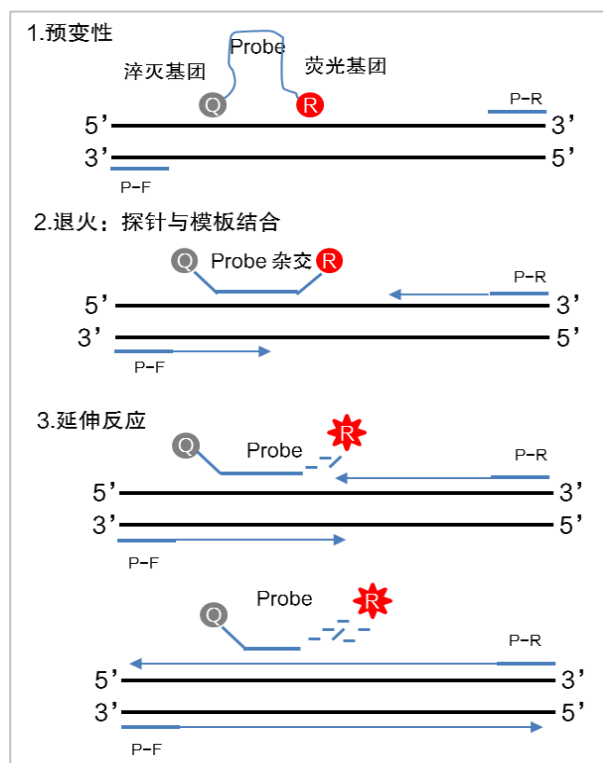
芯片式数字 PCR 是将配置好的反应体系加入到芯片的大反应孔中，随后加入封闭液以封闭体系。在压强的作用下，反应体系被均匀分散到含有数万个微孔的芯片之中，然后进行 PCR 反应，最终统计阴阳微孔数以及有效微孔数，根据泊松分布公式计算样本中的拷贝数。



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。

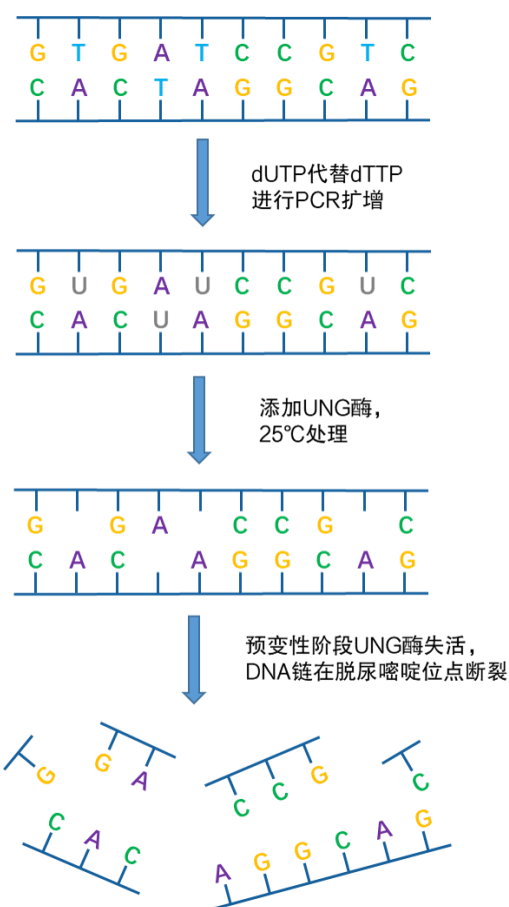
在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针，使得 5' 端荧光基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。



3. dUTP/UNG 防污染系统作用原理

扩增产物所形成的气溶胶，是 PCR 反应中最主要的污染源之一。扩增产物中片段拷贝数大，即使极微量体积的气溶胶，其片段拷贝数也远远超过 PCR 检测下限，从而造成后续 PCR 反应的假阳性结果。由于气溶胶难以通过常规方法去除，因此 UNG 酶应运而生。

尿嘧啶-N-糖基化酶 (Uracil-N-glycosylase, UNG) 可以选择性水解双链或单链 DNA 中尿嘧啶脱氧核糖核苷酸 (dU) 中的尿嘧啶糖苷键。如果在 PCR 反应中用 dUTP 代替 dTTP，使 PCR 扩增产物都是带有 dU 的 DNA 链，并在后续 PCR 反应开始前增加 25°C 的恒温步骤，那么 PCR 体系中污染模板的尿嘧啶碱基会因 UNG 酶特异性切割 β -N 尿嘧啶糖苷键而从 DNA 链上脱离，产生脱嘧啶位点。当反应经过预变性阶段 95°C, 2 min 热处理后，DNA 污染模板在脱嘧啶位点处断裂，从而无法被扩增，避免了假阳性结果的产生，同时 UNG 酶被灭活，不再降解新产生的含有 dU 的 DNA 产物。



➤ 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 PCR 反应液^{*1}

组分名称	反应终浓度	10 μl 体系
2X Chip dPCR Premix for Probe (UNG Plus)	1 ×	5 μl
Primer F (10 μ M)	0.4 μ M ^{*2}	0.4 μl
Primer R (10 μ M)	0.4 μ M ^{*2}	0.4 μl
Probe (10 μ M)	0.4 μ M ^{*3}	0.4 μl
Template ^{*5}	–	1 ~ 2000 copies / μl ^{*4}
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, 使用小型离心机离心, 去除肉眼可见的大气泡;
- 2) 室温 10000 g 离心 1min, 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 μl 离心后样品, 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, 加样速度适中, 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 μl 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^{*1}

步骤 ^{*2}	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30 sec ^{*3}	1
变性	95℃	5 sec	45
退火和延伸 ^{*4}	60℃	30 sec	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 本产品含 UNG 酶，使用 ABI QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System 设备时，由于反应液分散至芯片微孔过程在室温下进行，该过程可降解含 dUTP 的模板，故无需额外新增 UNG 处理步骤。对于其他芯片式数字 PCR 设备，可根据需要在预变性步骤前增加 25℃，10 min 进行 UNG 处理，以便于充分降解含 dUTP 的模板，也可根据实际需求在 5 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

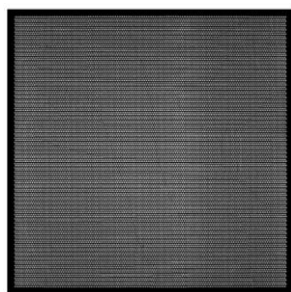
*3: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可根据实际需求在 30 sec ~ 2 min 调整预变性时间。

*4: 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℃、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）。

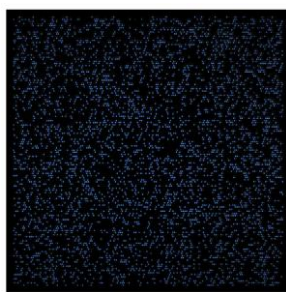
➤ 实验例

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

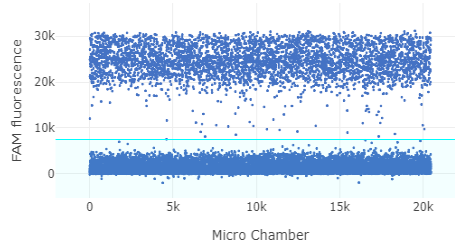
1. 采用本产品扩增非洲猪瘟（ASFV）标准品（理论检测拷贝数为 4500 copies），结果如下：



QC 质控图



阳性微孔图

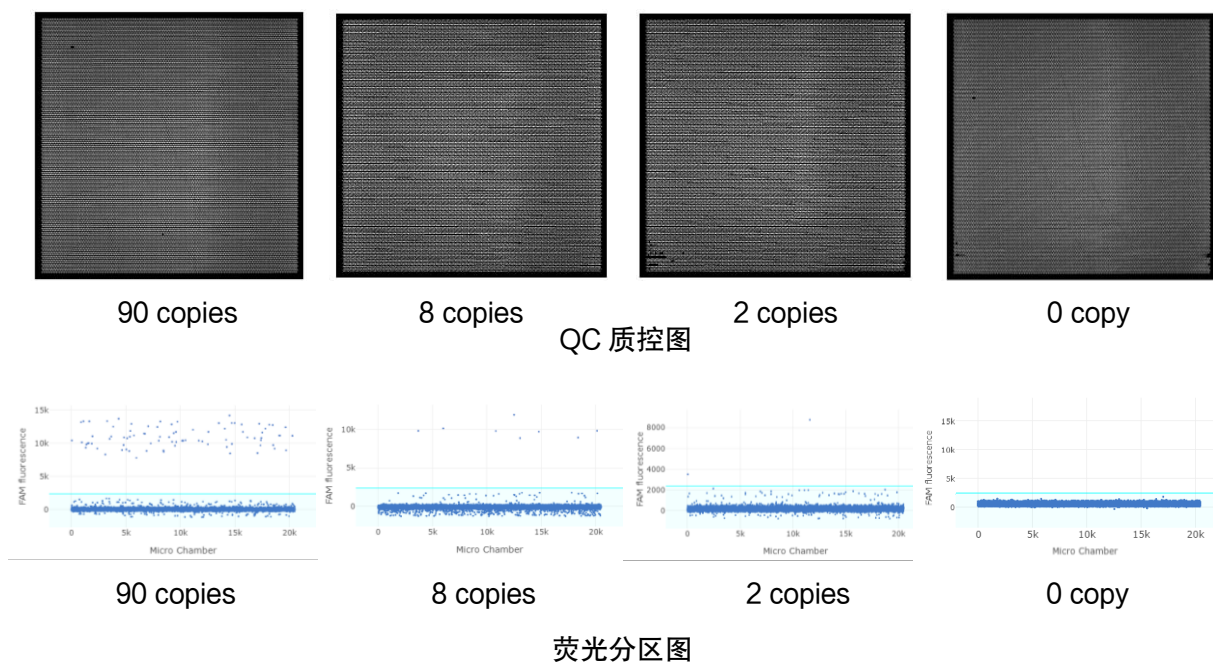


4296 copies
荧光分区图

结果如上图所示：1、QC 质控有效孔为 20479，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 4296 copies，与理论拷贝数相符。

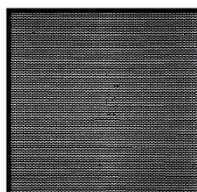
2. 采用本产品扩增 Human TFR 基因，理论的 DNA 模板加入量分别为 100 copies、10 copies、1 copy、0 copy（阴性对照），实验结果如下：



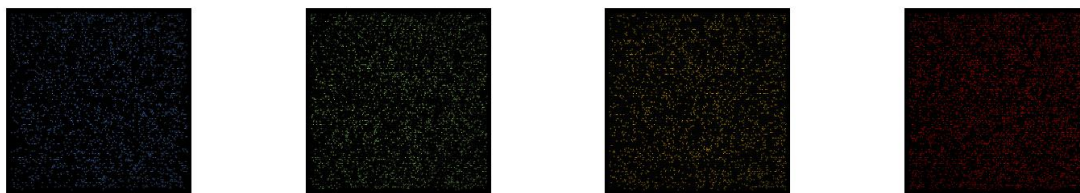
结果如上图所示：1、QC 质控有效孔为 20448，满足质控要求（质控要求总有效微孔数大于 20000）；

- 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 90 copies、8 copies、2 copies、0 copy，与理论拷贝数相符。

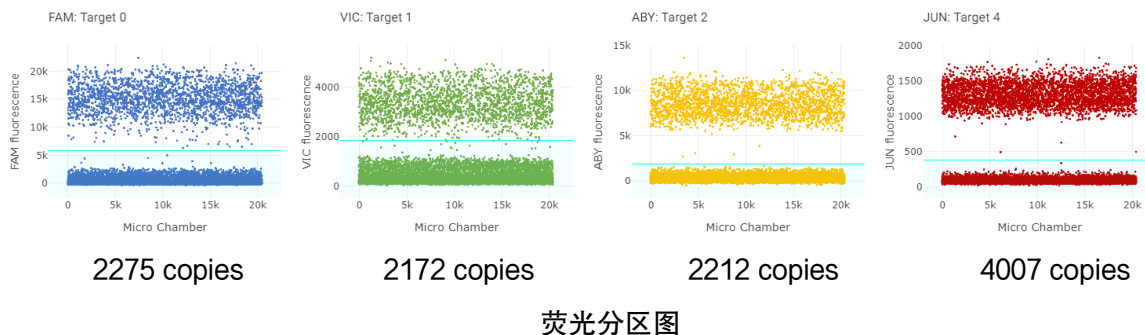
3. 采用本产品扩增 Human *CEPH* 基因进行拷贝数变异分析，进行四通道检测，FAM、VIC、ABY 和 JUN 通道分别检测 1 个位点（各通道的理论检测拷贝数比例 FAM : VIC : ABY : JUN = 1:1:1:2），结果如下：



QC 质控图



阳性微孔图



- 结果如上图所示：1、QC 质控有效孔为 20461,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℃，尽量减小两者的 Tm 值差，并使差值不超过 5℃。
 - 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℃，一般控制在 65℃ ~ 70℃ 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℃	30 sec	1
变性	95℃	5 sec	45
退火	55℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec	