

ChiDigit 探针法芯片式数字PCR试剂盒 (含UNG)

ChiDigit Chip dPCR Kit for Probe (UNG Plus)

Code No. AG12902

包装量:	200 rxns / 10 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

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。

保存及运输

保存温度: -20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

2X Chip dPCR Premix for Probe (UNG Plus) *1	500 μ l 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。

实验操作

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

1. 配制 cdPCR 反应液*1

组分名称	反应终浓度	10 μ l 体系
2X Chip dPCR Premix for Probe (UNG Plus)	1 \times	5 μ l
Primer F (10 μ M)	0.4 μ M ²	0.4 μ l
Primer R (10 μ M)	0.4 μ M ²	0.4 μ l
Probe (10 μ M)	0.4 μ M ³	0.4 μ l
Template ⁵	-	1 ~ 2000 copies / μ l ⁴
RNase free water	-	Up to 10 μ l

*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 $0.4 \mu\text{M}$, 也可根据实际需求在 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 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 $0.4 \mu\text{M}$, 可根据实际需求在 $0.2 \sim 0.8 \mu\text{M}$ 范围内进行调整。

*4: 在 $10 \mu\text{l}$ 体系里, DNA 模板浓度控制在 $1 \sim 2000 \text{ copies} / \mu\text{l}$, 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, $10 \mu\text{l}$ 反应体系中, 建议将模板稀释后加入 $2 \sim 4 \mu\text{l}$ 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 $9 \mu\text{l}$ 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 $15 \mu\text{l}$ 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。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

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.

4. cdPCR 反应条件^{*1}

步骤 ^{*2}	温度	时间	循环数
预变性	95°C	$30 \text{ sec}^{\text{*3}}$	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 ^{*4}	60°C	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°C , 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 $5 \sim 10 \text{ min}$ 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 $30 \text{ sec} \sim 2 \text{ min}$ 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°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)。

➤ 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	