

QX200微滴式数字PCR简易操作流程

1. 先打开电脑，再打开QX200 Droplet Reader电源，在使用前需预热至少30分钟。
2. 配制PCR反应体系，振荡混匀，离心除气泡，注意20ul体系中所加样本核酸含量不要超过规定检测范围(1~100000拷贝片段化核酸或者1~20000拷贝较完整基因组DNA)，如完整的人类基因组DNA不要超过66ng/20ul，可提前用限制性内切酶处理样本可提高检测浓度。如：

Table 1. Mutation detection ddPCR reaction setup.		
Component	Volume per Reaction, μ l	Final Concentration
2x ddPCR supermix for probes (no dUTP)	10	1x
20x target primers/probe (FAM)	1	450 nM primers/250 nM probe
20x wild type primers/probe (HEX)	1	450 nM primers/250 nM probe
Restriction enzyme, diluted *	1	2–5 U per reaction
DNA sample/water	Variable	50 fg to 100 ng**
Final volume	20	--

* When not digesting directly in the ddPCR reaction setup, this component can be replaced by water.

** For most routine mutation detection applications, up to 130 ng of human genomic DNA can be added per ddPCR well for a final concentration of 2,000 copies/ μ l.

3. 将一个新的DG8 cartridge放入holder中，注意缺口方向；



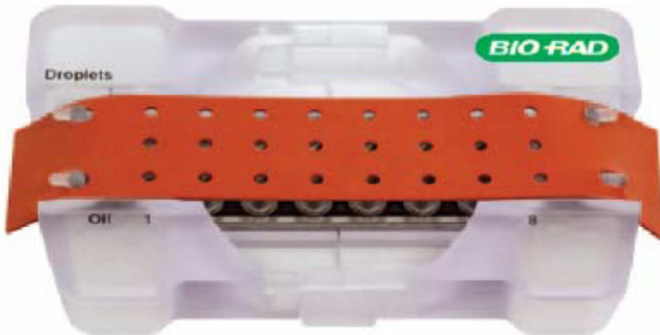
4. 将20ul样品反应体系加入到DG8 cartridge中间一排的8个孔内，不足8个样品时用20ul 1 $\times$ buffer control补足，建议使用Rainin的8通道20ul排枪和20ul枪头（不能用200ul枪头），加样时枪头接近孔一侧底部，与侧壁呈大约15°角，缓慢打出液体，打出一部分后慢慢提升枪头位置再打出余下液体，不要将枪打至第一档位置以免引入气泡；



5. 在DG8 cartridge最底下一排8个孔中各加入70ul微滴生成油（DG Oil），同样不能有空着的孔；



6. 盖上胶垫（gasket），注意两边的小孔都要钩牢；



7. 将以上holder轻轻地平稳放置于微滴生成仪中，开始生成微滴，注意仪器上指示灯状态，一般2分钟之内完成；



			
Solid green	Power on	DG8 cartridge holder in place	Run complete
Flashing green	---	---	Run in progress
Flashing amber	---	No gasket; empty well or seal	Low volume in well
Off	Power off	No DG8 cartridge holder	Idle

8. 微滴生成于cartridge最上面一排孔内，建议使用Rainin的8通道P-50排枪和200ul枪头小心缓慢吸取，调整吸取体积为40ul，将holder放平，枪头以与孔壁呈30~45°角放入，轻触孔底，约5秒吸取40ul，再同样缓慢地打入96孔板相应位置孔内（约5秒），枪头贴近孔壁接近孔底，注意封上盖以防油挥发，每次弃去已使用过的cartridge和胶垫；



9. 转移油滴进入96孔板内完成后，用预热好的PX1热封仪对其进行封膜（红线朝上），推荐的运行程序为：180℃，5s，无需颠倒方向二次封膜；

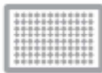


10. 封好膜之后应该在30分钟内进行PCR反应，或者放于4℃冰箱4小时之内进行PCR，可在任意一台96孔PCR仪上完成，注意升降温速度≤2.5℃/s。推荐反应条件：

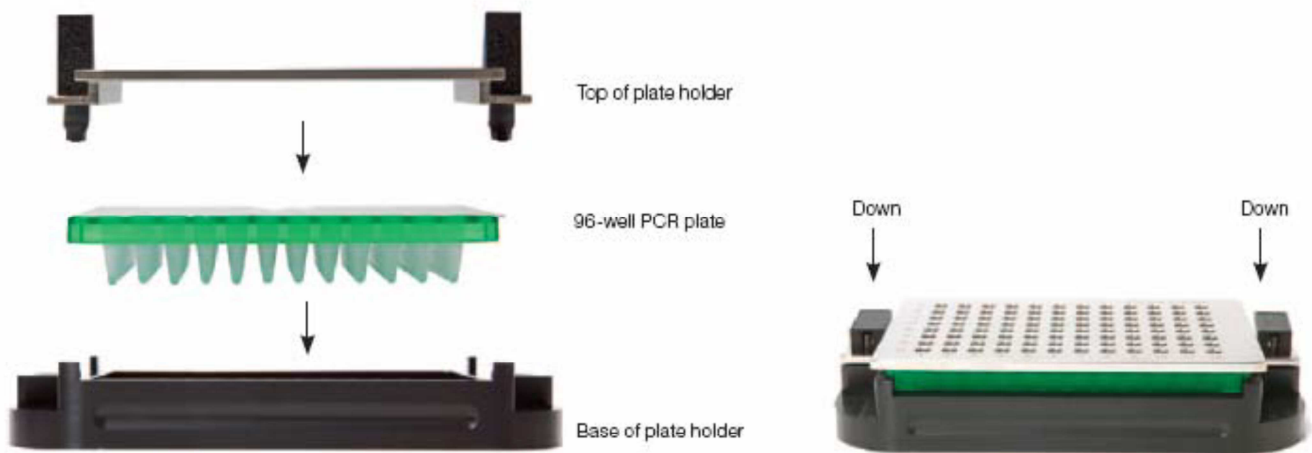
Table 2. Thermal cycling protocol.*				
Cycling Step	Temperature, °C	Time	Ramp Rate	# Cycles
Enzyme activation	95	10 min	~2°C/sec	1
Denaturation	94	30 sec		40
Annealing/extension	55	1 min		
Enzyme deactivation	98	10 min	~1°C/sec	1
Hold (optional)	4	infinite		1

* Use a heated lid set to 105°C and set the sample volume to 40 µl.

11. 查看微滴读取仪上状态指示灯指示是否正常(不同说明书上稍有不同);

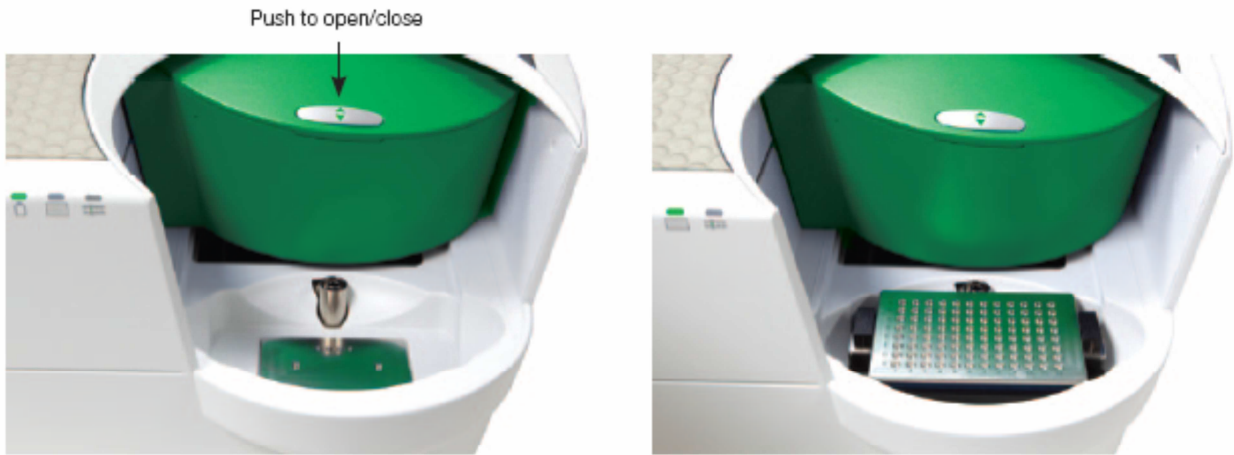
				
Solid green	Power on	Bottle levels OK*	Plate in place	Run complete
Flashing green	---	Oil <30% or waste >70%**	---	Run in progress
Flashing amber	---	Oil <10% or waste >90%***	---	Error during run
Off	Power off	---	No plate	Idle

12. 将之前完成PCR的96孔板放入plate holder中组装好，注意板斜角方位，如下图所示：



Placing the 96-well plate into the plate holder.

13. 组装好之后轻轻地平稳放入微滴读取仪中，如图：



Placing the plate holder into the droplet reader.

14. 打开QuantaSoft软件，建议每次实验之前做一次Flush System，若一周以上未使用建议先做一次Prime再做Flush System。之后对96孔板中样品信息进行Setup，主要是提供实验名称、实验类型（ABS、CNV、RED）、assay以及探针信息等，完成后即可进行Run，结束后结果会被自动Analyze，人工核实后保存结果，即完成了一次QX200实验。